

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

**Estudo Molecular dos Parasitos Causadores da Malária Simiana no Centro de
Primatologia do Rio de Janeiro, Brasil**



por

Denise Anete Madureira de Alvarenga

Belo Horizonte

Dezembro/2014

DISSERTAÇÃO MBCM-CPqRR

D.A.M. ALVARENGA 2014

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

**Estudo Molecular dos Parasitos Causadores da Malária Simiana no Centro de
Primatologia do Rio de Janeiro, Brasil**

por

Denise Anete Madureira de Alvarenga

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do Título de
Mestre em Ciências na área de concentração Biologia
Celular e Molecular.

Orientação: Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito

Co-orientação: Dra. Taís Nóbrega de Sousa

Belo Horizonte

Dezembro/2014

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

A473e
2014

Alvarenga, Denise Anete Madureira.

Estudo Molecular dos Parasitos Causadores da Malária Simiana no Centro de Primatologia do Rio de Janeiro, Brasil / Denise Anete Madureira de Alvarenga. – Belo Horizonte, 2014.

XXI, 58 f.: il.; 210 x 297mm
Bibliografia: f. 70 - 77

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Malária Vivax/genética 2. *Plasmodium vivax* /imunologia 3. Reservatórios de Doenças/classificação I. Título. II. Brito, Cristiana Ferreira Alves (Orientação). III. Souza, Taís Nóbrega (Co-orientação)

CDD – 22. ed. – 616.936 2

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

**Estudo Molecular dos Parasitos Causadores da Malária Simiana no Centro de
Primatologia do Rio de Janeiro, Brasil**

por

Denise Anete Madureira de Alvarenga

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito (Presidente)

Prof. Dra. Zelinda Maria Braga Hirano

Prof. Dra. Paloma Helena Fernandes Shimabukuro

Suplente: Dr. Rodrigo Pinto Soares

Dissertação defendida e aprovada em: 22 / 12 / 2014

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Malária do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR), Fundação Oswaldo Cruz Minas (FIOCRUZ/MG), sob a orientação da Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito, co-orientação da Dra. Taís Nóbrega de Sousa e com suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

“Nosso parentesco com todas as formas de vida não é só ciência, é também uma incrível experiência espiritual”.

Autor desconhecido

“(...) Estudar, Ensinar, Praticar Ciência. A Ciência é uma iniciativa de cooperação que cobre gerações. É a passagem da tocha do professor para o aluno e de volta ao professor. Uma comunidade de mentes, voltando no tempo e alcançando as estrelas. Nossa jornada está só começando (...)”

Carl Sagan

Aos meus pais, pelo amor e dedicação incondicionais.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Cristiana, pelo carinho, companheirismo e paciência. Obrigada pela oportunidade, pela dedicação, por todo crescimento científico, profissional e pessoal. Serei eternamente grata.

À minha co-orientadora Dra. Taís, uma jovem pesquisadora de excelência. Gostaria de agradecer imensamente por toda ajuda, paciência, pelos ensinamentos, pelas ótimas ideias, por toda dedicação e apoio.

À toda equipe do Laboratório de Malária, pelo suporte e cooperação. Aos Pesquisadores Dra. Flora, Dr. Luciano e Dra. Luzia, por todo conhecimento e dedicação. É uma honra poder fazer parte dessa equipe. À Alice e ao Geraldo por toda ajuda. A todos os meus queridos colegas do LAMAL que tornam minha rotina muito feliz. À Marina, Aracele, Sarah, Ana Luíza e Ricardo pela amizade sincera, pelas rizadas, pela alegria imensurável, pela força em todos os momentos. À Daniela Robortella, Camila, Barbara, Ana, Filipe, Gabriel, Jéssica, Michaelis, Letícia, Flávia, Lucas, Bráulio pela amizade, pela companhia alegre de todos os dias. À todo pessoal do Insetário, em especial à Daniela Gonçalves, Etiene, Jessica, Débora, Carol, Fernanda. Às meninas da Antoniana, em especial à Julia e a Carol, pela amizade. Gostaria de agradecer especialmente a Gabriela e a Lara por toda ajuda nos experimentos e pela grande amizade.

Ao Armando, meu co-orientador da Iniciação Científica, pela paciência, dedicação, aprendizado, pela oportunidade e confiança.

À Anielle Pina por todo apoio, generosidade, amizade e carinho. De colaboradora, tornou-se uma grande amiga.

Ao Dr. Cláudio, que tive a oportunidade de conhecer pessoalmente, agradeço pela oportunidade, confiança, pelo grande aprendizado. É uma honra poder colaborar com o senhor.

Aos meus colaboradores Dra. Patrícia Brasil, Dr. Ricardo Lourenço, Dr. Mariano Zalis e Dra. Martha pela oportunidade e confiança.

Ao Dr. Pissinati do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro, que tive a imensa felicidade em conhecer pessoalmente. Muitíssimo obrigada por todos os ensinamentos, pelo apoio, por toda ajuda. Uma pessoa de conhecimento imensurável e de extrema humildade. É um grande exemplo de determinação e perseverança a ser seguido.

À Dra. Zelinda, uma pesquisadora de excelência, uma mulher que transborda determinação, irreverência e simpatia. Fiquei extremamente admirada com a sua dedicação, experiência, inteligência, simplicidade e bondade. Gostaria de agradecer por toda ajuda, pelos ensinamentos, pela oportunidade.

À plataforma de sequenciamento PDTIS/FIOCRUZ, em especial à Renata e à Elisângela por toda ajuda, carinho e paciência.

À comissão organizadora do XIX Seminário Laveran e Deane de Malária de 2014, pela oportunidade de fazer parte desse importantíssimo evento. À todos os participantes, pelas valiosas discussões que contribuíram de forma significativa para a construção desse trabalho.

Aos organizadores e alunos do Curso de Malária “From the Bench to the Field Course” oferecido pela Universidade de Harvard em parceria com a Fiocruz. Obrigada pela oportunidade e pela incrível experiência oferecida de conhecer intimamente essa doença, no que tange tanto o contato direto com os pacientes, quanto à coleta de anofelinos, até as análises laboratoriais.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida para o desenvolvimento dessa dissertação.

Agradeço à Universidade Federal de Minas Gerais por proporcionar diversas oportunidades ao longo da minha formação acadêmica, permitindo uma formação completa e nas mais diversas áreas de atuação.

Aos meus pais, Air e Janete, pelo amor sem limites, pela dedicação incondicional, pelo apoio imensurável. Vocês são minha base, a minha maior dádiva.

Ao meu namorado, companheiro, amigo e grande amor da minha vida Pedro Cheib, por todo carinho, alegria e por tornar meus dias mais felizes, cheios de luz e sorrisos. Aos seus pais e avós que me acolheram como parte da família.

Ao meu irmão Flávio por toda ajuda e paciência. Obrigada por ser meu maior companheiro. Agradeço também a Laura, que tornou-se uma irmã.

À toda minha família pelo apoio, por toda alegria, pelas orações que me concedem tanta luz. Especialmente a minha vovó Rita e a minha madrinha Ivanete.

Aos meus grandes amigos e irmãos Lídia, Bruno e Stefan, pela amizade incondicional, companheirismo e por toda alegria que compartilhamos.

Às minhas grandes amigas da UFMG Grazi e Denise, pela alegria, amizade, parceria e apoio.

Principalmente, gostaria de agradecer a Deus, à Nossa Senhora Aparecida e ao meu mentor pela luz, serenidade, paz e amor concedidos a minha família e a mim. Pela força, paciência e inspiração.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	XIV
LISTA DE TABELAS.....	XVI
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XVII
RESUMO.....	XVIII
ABSTRACT	XX
1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Aspectos gerais da malária	22
1.2 Ciclo biológico do plasmódio.....	23
1.3 Malária Simiana no mundo	26
1.4 Epidemiologia da Malária no Mundo e no Brasil	29
1.5 Malária extra-amazônica	31
1.5.1 Malária autóctone na Mata Atlântica Brasileira.....	31
1.5.2 Infecção malárica em primatas não humanos no Brasil	35
1.5.3 A malária no Rio de Janeiro	37
1.6 Estudos moleculares e filogenéticos da malária.....	39
2 JUSTIFICATIVA	42
3 OBJETIVOS	44
3.1 Objetivo Geral	44
3.2 Objetivos Específicos	44
4 METODOLOGIA.....	45
4.1 Descrição da área de estudo no Rio de Janeiro	45
4.2 Ética.....	48
4.3 Amostras.....	48
4.4.1 Extração de DNA a partir de sangue total.....	51
4.4.2 Extração de DNA a partir de tecidos.....	52
4.5 PCR de citocromo B de mamíferos	52
4.6 Diagnóstico molecular: Reação em cadeia da polimerase (PCR)	53
4.7 Visualização dos fragmentos por gel de agarose.....	53
4.8 Controles das reações de PCR.....	54
4.9 Purificação dos produtos de PCR.....	54
4.10 Reação de Sequenciamento	55
4.11 Reação de precipitação	55

4.12 Análise das sequências	56
4.13 Análises Filogenéticas	56
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
ARTIGO	58
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
7 REFERÊNCIAS	70

LISTA DE FIGURAS

FIGURA DA CAPA: Ilustração de *Sapajus* spp.

FIGURA 1. Representação esquemática do ciclo biológico do *Plasmodium vivax* no hospedeiro humano e no vetor *Anopheles*..... 25

FIGURA 2. Mapa do Sudeste Asiático mostrando a distribuição das infecções humanas por *P. knowlesi* 27

FIGURA 3. Distribuição da malária no mundo e estágios de eliminação segundo estratégias de controle..... 29

FIGURA 4. Distribuição da malária no Brasil em 2012..... 30

FIGURA 5. Distribuição do bioma de Mata Atlântica no Brasil em 2012..... 33

FIGURA 6. *Anopheles (Kerteszia) cruzii*..... 34

FIGURA 7. Esquema hipotético de transmissão da malária simiana ao ser humano em regiões de Mata Atlântica.....35

FIGURA 8. *Alouatta clamitans*.....36

FIGURA 9. Casos de malária autóctone no estado do Rio de Janeiro.....38

FIGURA 10. Mapas do Brasil e do estado do Rio de Janeiro, onde está localizado o CPRJ.....46

FIGURA 11. Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ).....47

FIGURA 12. Estrutura do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ).....47

FIGURA 13. Carcaça de fêmea de *Alouatta clamitans* de vida livre.....50

FIGURA 14. Local onde *Alouatta clamitans* de vida livre foi encontrado morto.....51

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Espécies de plasmódios descritas em primatas não humanos do Velho Mundo e do Novo Mundo, seus respectivos hospedeiros naturais e distribuição geográfica.....	28
TABELA 2. Descrição dos primatas não humanos estudados.....	49
TABELA 3. Resumo das condições das reações de PCR utilizadas nesse estudo.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CPRJ – Centro de Primatologia do Rio de Janeiro

CSP – Proteína circunsporozoíta

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

MS – Ministério de Saúde

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

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

pb – par de bases

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PNHs – primatas não humanos

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

SUCEN – Superintendência de Controle de Endemias

RESUMO

No Brasil, foram descritas duas espécies de plasmódios simianos, *Plasmodium brasilianum* e *Plasmodium simium*, que são morfológica, genética e imunologicamente similares aos plasmódios humanos *Plasmodium malariae* e *Plasmodium vivax*, respectivamente. *Plasmodium brasilianum* infecta naturalmente macacos das famílias Cebidae, Aotidae, Pitheciidae e Atelidae, e foi detectado em uma ampla região geográfica. Já *P. simium* foi encontrado em uma área muito mais restrita, com descrições apenas nas regiões Sul e Sudeste, infectando naturalmente somente os gêneros *Alouatta* e *Brachyteles*, da família Atelidae. Apesar da malária no Brasil estar restrita como endemia à região amazônica, também são descritos casos da doença na região extra-amazônica, entre eles casos autóctones de malária, como os notificados em áreas de Mata Atlântica. Sugere-se que a manutenção destes casos envolva a presença de macacos infectados, que podem atuar como reservatórios da doença. Portanto, estudos moleculares das espécies de plasmódios simianos são fundamentais para o entendimento da real prevalência da doença, da dinâmica de transmissão, diversidade dos parasitos, assim como para esclarecer as relações filogenéticas entre as diferentes espécies de *Plasmodium*. O relato recente de casos autóctones no estado do Rio de Janeiro nos motivou a investigar a malária simiana na região. O presente estudo foi realizado em parceria com o Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ), que está localizado no município de Guapimirim, onde foram relatados alguns destes casos autóctones. Foi realizada a extração de DNA a partir de amostras de sangue de 30 primatas do CPRJ para o diagnóstico molecular por Nested PCR e sequenciamento. O resultado do diagnóstico molecular indicou uma taxa de infecção de 30% nos primatas do CPRJ (9 amostras positivas), sendo 5 amostras positivas para *P. brasilianum*; 3 amostras positivas para *P. simium* e 1 amostra positiva para ambos os parasitos (infecção mista). O fragmento do 18SSU rRNA amplificado para o diagnóstico foi sequenciado e as sequências obtidas de *P. simium* alinhadas com sequências de outras espécies de *Plasmodium* disponíveis no GenBank e utilizadas para reconstrução da árvore filogenética. A partir do alinhamento, fica evidente que o fragmento analisado é bastante conservado, mostrando uma alta similaridade genética entre *P. simium* e *P. vivax*. É importante ressaltar que o nosso estudo mostra de forma inédita a descrição de infecção malárica por *P. simium* nos gêneros *Cebus* e *Sapajus*. Essa descoberta é de suma relevância uma vez que ressalta a possibilidade de malária por *P. simium* em outras espécies de primatas não humanos, cujo impacto pode ser significativo para a epidemiologia da doença. A presença de símios infectados atuando como reservatórios da malária pode sugerir um caráter zoonótico da doença nas regiões

de Mata Atlântica. Além disso, abre a possibilidade de utilizar estes macacos como novo modelo de malária vivax. Ademais, o maior entendimento da saúde dos animais selvagens é um ponto chave para a sua conservação. As doenças parasitárias e infecciosas estão envolvidas em eventos de declínios populacionais, e até mesmo de extinções de espécies. Logo, este estudo pode contribuir para a conservação dos primatas, especialmente aqueles que estão ameaçados de extinção, como alguns *Cebus* e *Sapajus*.

ABSTRACT

In Brazil, have been described two species of simian plasmodia, *Plasmodium brasilianum* and *Plasmodium simium*. These parasites are morphologically, genetically and immunologically similar to the human parasites *P. malariae* and *P. vivax*, respectively. *Plasmodium brasilianum* naturally infects monkeys of the Cebidae, Aotidae, Pitheciidae and Atelidae families, and was detected in a large geographic area. On the other hand, *P. simium* was described in a restricted area, only in the Atlantic Forest of the South and Southeast regions of Brazil naturally infecting monkeys of the genus *Alouatta* and *Brachyteles*, of the Atelidae family. Although malaria in Brazil been restricted as endemic to the Amazon region, cases of the disease have also been described in extra-Amazon region, including autochthonous cases, as reported in the Atlantic Forest. It is suggested that the maintenance of these cases involve the presence of infected monkeys, which can act as reservoirs of the disease. Therefore, molecular studies of simian plasmodia species are paramount to understand the true prevalence, transmission dynamics, diversity of parasite, as well as to clarify phylogenetic relationships between different *Plasmodium* species. The report of autochthonous cases in Rio de Janeiro motivated us to study the simian malaria in the region. This study is conducted in collaboration with the Primate Center of Rio de Janeiro (CPRJ), located in Guapimirim municipality, where autochthonous cases have been reported. DNA extraction from blood samples of 30 non-human primates kept in captivity in CPRJ for plasmodium molecular diagnosis by nested PCR (18SSuRNA) and DNA sequencing were performed. The result of the molecular diagnosis shows an infection rate of 30% in the captivity non-human primates from CPRJ (nine samples positive), of which five samples were positive for *P. brasilianum*; three samples were positive for *P. simium* and one sample positive for both parasites (mixed infection). The sequences obtained for *P. simium* were aligned with other *Plasmodium* species available in *GenBank* and then used to reconstruct a phylogenetic tree. From the alignment, it is evident that the fragment analyzed is highly conserved, showing a high genetic similarity between *P. vivax* and *P. simium*. Importantly, our study shows for the first time the description of malarial infection by *P. simium* in the genus *Cebus* and *Sapajus*. This discovery is of great importance since highlighted the possibility of malaria by *P. simium* in other species of non-human primates whose impact could be significant for the epidemiology of the disease. The presence of infected apes acting as reservoirs of malaria may suggest zoonotic disease transmission in areas of the Atlantic Forest. In addition, it opens the possibility of using these monkeys as a new model for vivax malaria. Beyond that, the greater understanding of wildlife health is a key to their conservation. Parasitic and

infectious diseases are involved in population declines events, and even species extinctions. Therefore, this study can contribute to the conservation of primates, especially those who are threatened with extinction, as some *Cebus* and *Sapajus*.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da malária

A malária representa um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. A doença é causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e é transmitida a seus hospedeiros vertebrados através da picada de mosquitos do gênero *Anopheles*.

A classificação taxônomica do agente etiológico da malária (HOMMEL & GILLES et al. 1998) é:

Subreino: Protozoa
Filo: Apicomplexa
Classe: Sporozoea
Subordem: Haemosporina
Família: Plasmodiidae
Gênero: *Plasmodium*

Existem mais de 100 espécies de *Plasmodium* que já foram descritas parasitando répteis, aves e mamíferos. Cinco delas infectam naturalmente humanos: *Plasmodium falciparum* (Welch, 1897), *Plasmodium vivax* (Grassi & Feletti, 1890), *Plasmodium ovale* (Stephens, 1922), *Plasmodium malariae* (Grassi & Feletti, 1890), e mais recentemente, *Plasmodium knowlesi* (Sinton & Mulligan, 1932). Este último foi originalmente descrito em macacos, entretanto, em 2004 foi confirmada a infecção natural em seres humanos (SINGH et al. 2004).

Também conhecida como febre terçã, febre quartã, maleita e paludismo, a doença afeta principalmente as áreas tropicais e subtropicais do planeta. A malária é uma doença infecciosa e de evolução crônica, com manifestações episódicas de caráter agudo. Provavelmente é a doença parasitária mais antiga de que se tem registro, conhecida na Antiguidade como Febre Intermitente. Devido ao seu caráter endêmico, foi responsável por tantas mortes quanto foram às próprias guerras em vários períodos da história (GARNHAM, 1966).

O espaço de tempo entre a picada do mosquito infectante e o aparecimento do quadro clínico varia, em geral de 12 até 30 dias, dependendo da espécie do plasmódio. A febre é o sintoma mais característico da malária. Quando é acompanhada de calafrio e cefaléia constitui a tríade malárica, frequente durante o episódio clínico. Outros sinais e sintomas também podem

estar presentes, tais como astenia, anorexia, artralgia, insônia, dor abdominal, diarreia, vômitos, hepatomegalia, esplenomegalia e anemia. Essas manifestações clínicas, quando associadas aos dados epidemiológicos, ou viagem para áreas endêmicas de malária levantam a suspeita da doença. O diagnóstico definitivo é feito pela pesquisa do plasmódio no sangue periférico através da técnica da gota espessa.

O diagnóstico rápido e eficiente das infecções causadas por *Plasmodium* tem sido motivo de pesquisas em todo o mundo, já que a adoção de tratamento apropriado depende diretamente da identificação da espécie responsável pela doença. Nesse sentido, vários são os métodos utilizados atualmente para o diagnóstico de malária, incluindo técnicas moleculares, imunológicas e microscópicas, sendo esta última estabelecida como padrão-ouro, através do exame de gota espessa corada pelo Giemsa. O diagnóstico molecular tem se mostrado uma das ferramentas mais promissoras na detecção de *Plasmodium* por possuir alta sensibilidade e especificidade, alcançando até mesmo infecções subclínicas (DEMAS et al. 2011). A técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), baseada na amplificação de DNA presente em uma amostra, é capaz de identificar o material genético alvo em um processo cíclico através da geração de milhares de cópias idênticas, que poderão ser analisadas em pouco tempo. A Nested-PCR é um protocolo útil para diagnóstico por apresentar dois passos de amplificação, o que aumenta a capacidade de detecção do parasito tanto em sensibilidade quanto em especificidade (SNOUNOU et al. 1993; LIU et al. 1998).

1.2 Ciclo biológico do plasmódio

Para completar seu ciclo biológico, os plasmódios precisam de um hospedeiro vertebrado e outro invertebrado para se desenvolver. A fase de reprodução sexuada ocorre no hospedeiro invertebrado, enquanto a fase assexuada ocorre no hospedeiro vertebrado (Figura 1). As formas infectantes do parasito, conhecidas como esporozoítos, penetram na pele através da picada da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* durante o repasto sanguíneo. Estima-se que de 15 a 200 esporozoítos sejam depositados sob a pele do hospedeiro, podendo permanecer na derme após a picada do vetor (AMINO et al. 2006).

Amino e colaboradores em 2006 descreveram uma nova rota de migração dos esporozoítos, em que esses, após atravessarem o epitélio do hospedeiro vertebrado, podem alcançar o sistema linfático. Porém, estes parasitos parecem não alcançar o fígado por esta via. Entretanto, esta rota pode ser importante para estimular o sistema imunológico do hospedeiro

(AMINO et al. 2006). Aqueles que escapam do sistema de defesa atingem a circulação sanguínea e migram para o fígado, onde irão penetrar nos hepatócitos. A invasão dos hepatócitos pelo esporozoíto é complexa e envolve várias interações do tipo ligante-receptor. O parasito possui a capacidade de interagir com as células do fígado e migrar entre os hepatócitos, até por fim se instalar e desenvolver em uma das células (MOTA et al. 2001). Acredita-se que esta migração é importante para estimular a exocitose de organelas apicais dos parasitos e torná-los aptos para infectar os hepatócitos e se desenvolver dentro do vacúolo parasitóforo (AMINO et al. 2006; MOTA & RODRIGUEZ, 2004). Ainda no fígado, *P. vivax* e *P. ovale* podem se desenvolver em formas dormentes, denominadas hipnozoítos, que são responsáveis pelas recaídas que ocorrem meses ou anos após a infecção inicial (BARNWELL et al. 1998). Nos hepatócitos, os esporozoítos se diferenciam e multiplicam assexuadamente dando origem aos merozoítos, que são liberados diretamente na corrente sanguínea através de vesículas denominadas merossomas (STURM et al. 2006).

Na circulação sanguínea, os merozoítos penetram nos eritrócitos através de interações específicas entre proteínas presentes na superfície dos parasitos e receptores presentes na superfície destas células, dando início à fase eritrocítica do ciclo, que é responsável pela sintomatologia clínica da doença. Nos eritrócitos os merozoítos se transformam em trofozoítos jovens, trofozoítos maduros e por fim esquizontes. Estes esquizontes, dependendo da espécie, geram de 10 a 30 merozoítos que são liberados pelo rompimento das células parasitadas e penetram em outros eritrócitos, reiniciando o ciclo eritrocítico. Alguns merozoítos se diferenciam nas formas sexuais do parasito, os macrogametócitos (feminino) e os microgametócitos (masculino) os quais amadurecem sem sofrer divisão celular (COATNEY et al. 1971). Estas formas sexuais ao serem ingeridas pelo mosquito do gênero *Anopheles* durante o repasto sanguíneo dão início à fase sexuada do ciclo, que ocorre no interior do hospedeiro invertebrado.

No interior intestino médio do mosquito, os gametócitos se diferenciam em gametas masculinos e femininos, e após a fecundação, dão origem ao zigoto (VLACHOU et al. 2006). Aproximadamente um dia após a fecundação, o zigoto se desloca em movimentos amebóides, passando a se denominar oocineto e, por um mecanismo transcelular, atinge a camada de células epiteliais do intestino médio onde se aloja entre o epitélio e a membrana basal e passa então a se chamar oocisto (VLACHOU et al. 2004). Em cada oocisto é ativada a maquinaria de replicação de DNA e de síntese de proteínas para a multiplicação assexuada dos parasitos, o que gera a produção de milhares de esporozoítos. Em aproximadamente duas semanas, a parede do oocisto se rompe liberando os esporozoítos, que por sua vez invadem a hemolinfa do inseto.

Ao cárem na hemolinfa, muitos esporozoítos conseguem invadir as glândulas salivares, podendo, num novo repasto sanguíneo, serem inoculados no hospedeiro vertebrado.

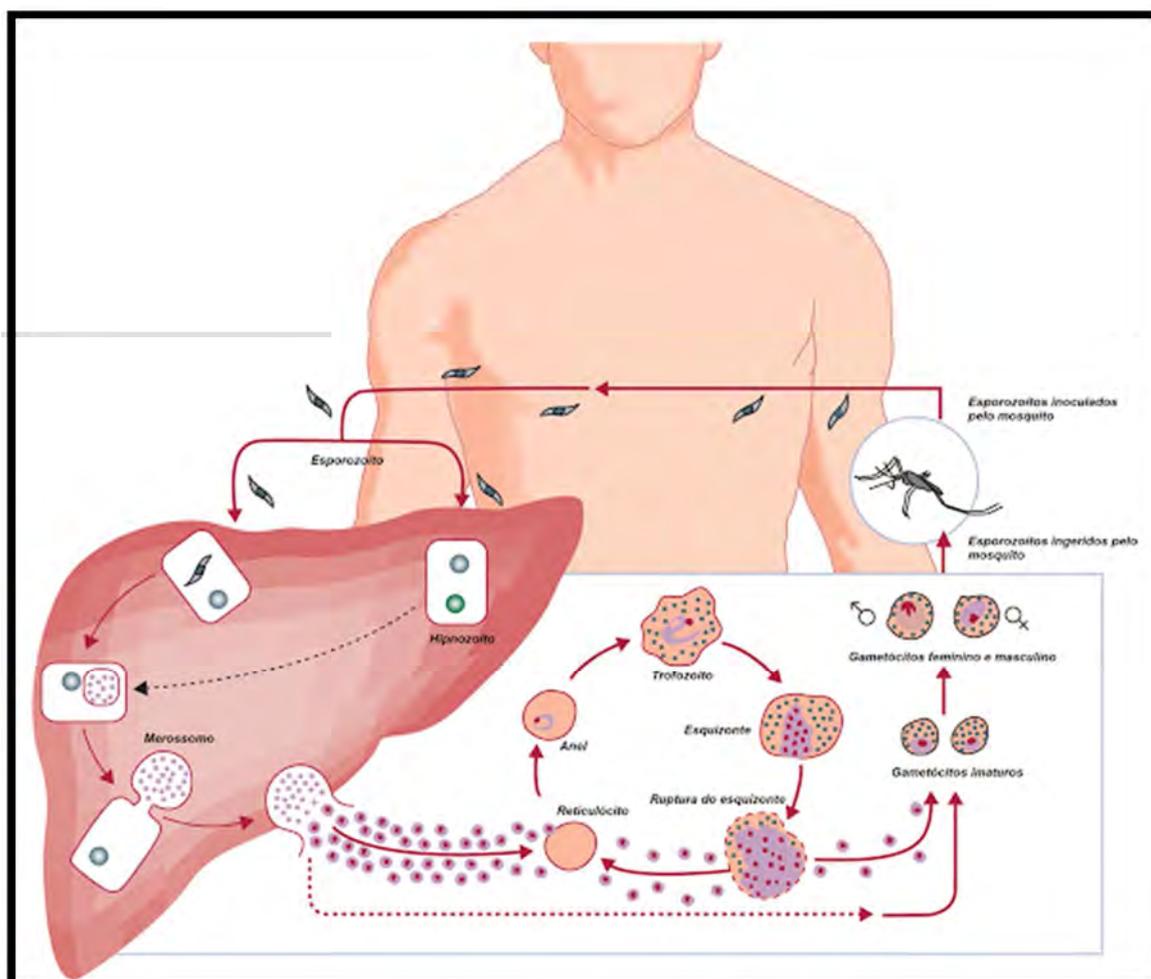


Figura 1. Representação esquemática do ciclo biológico do *Plasmodium vivax* no hospedeiro humano e no vetor *Anopheles*. Durante o repasto sanguíneo, fêmeas de *Anopheles* infectadas transmitem os esporozítos ao homem. Os esporozoítos alcançam o fígado através da corrente sanguínea, onde se multiplicam, liberando os merozoítos que poderão invadir as hemácias. Nestas células o parasito sofre esquizogonia e libera novos merozoítos, reiniciando o ciclo eritrocítico. Alguns merozoítos se diferenciam em formas sexuais, que quando ingeridas pelo inseto vetor, dão início à fase sexuada do ciclo, que ocorre no interior do hospedeiro invertebrado. Fonte: Modificado de Mueller et al. 2009.

1.3 Malária Simiana no mundo

A possibilidade da malária poder se comportar como uma zoonose tem despertado o interesse da comunidade científica há muito tempo. Desde a década de 60 já se tem conhecimento de que a malária de alguns primatas não humanos pode infectar o homem (DEANE, 1966). Em 1965, foi descrito o primeiro caso de infecção humana naturalmente adquirida por *Plasmodium knowlesi* (CHIN et al. 1965). Mas foi apenas em 2004, quando Singh e colaboradores identificaram na Malásia que mais de 57% dos pacientes diagnosticados com *P. malariae* na verdade estavam infectados por *P. knowlesi*, é que a malária simiana começou a ser considerada uma preocupação para a saúde pública humana (SINGH et al. 2004). Desde então as infecções em humanos causadas por *P. knowlesi* têm levantado novas possibilidades sobre a epidemiologia da malária. Assim, a proximidade do homem com regiões de mata traz a possibilidade de que parasitos que circulam naturalmente entre os primatas não humanos em caráter silvestre, também possam ser transmitidos para os humanos (CHIN et al. 1965; WHITE et al. 2008).

Plasmodium knowlesi tem como hospedeiros naturais: *Macaca nemestrina*, *Macaca fascicularis*, *Presbytis melalophos* e *Trachypithecus obscurus*, provocando uma infecção branda e crônica, o que sugere um processo de coevolução (MOYES et al. 2014). A espécie é transmitida por mosquitos do grupo *Anopheles leucosphyrus*, endêmicos no sudeste Asiático, motivo pelo qual a espécie é restrita a essa região (SINGH et al. 2004) (Figura 2). A malária causada por *P. knowlesi* no homem é altamente virulenta, tendo muitas vezes curso fatal, e tem sido relatada na Malásia, Filipinas, Tailândia, Singapura e Vietnã (COX-SINGH et al. 2010; ANTINORI et al. 2013; MULLER et al. 2014; YUSOF et al. 2014).

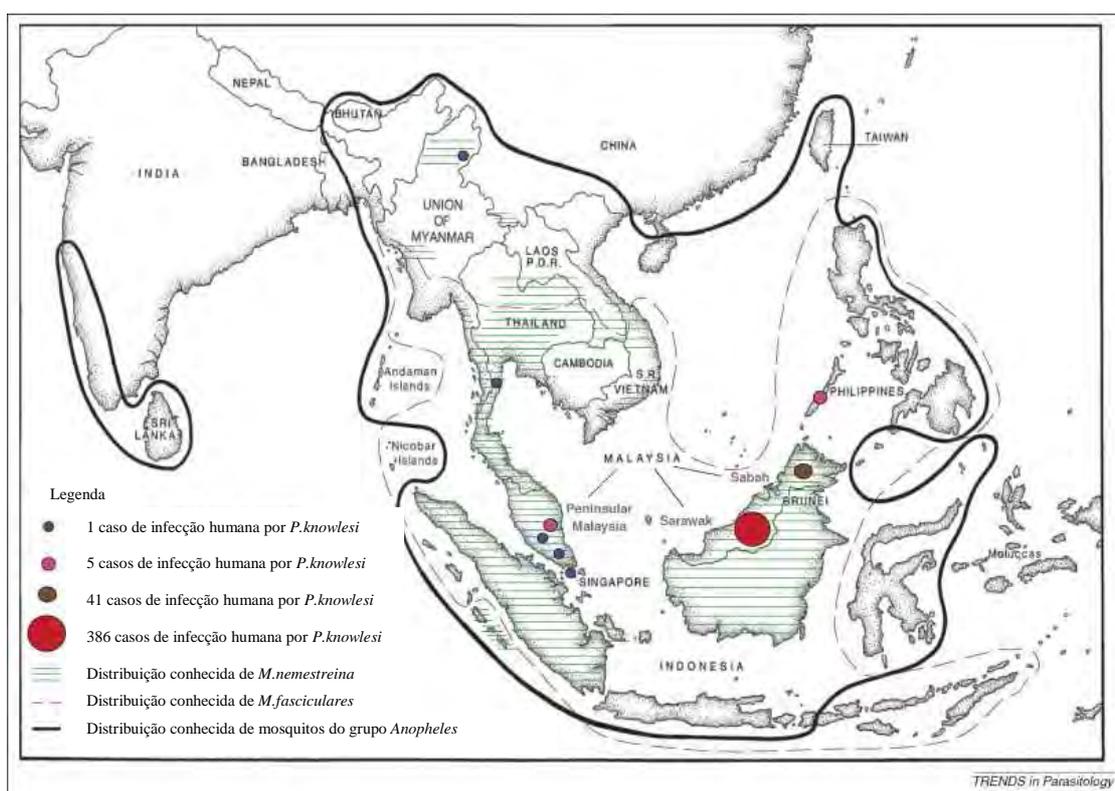


Figura 2: Mapa do Sudeste Asiático mostrando a distribuição das infecções humanas por *P. knowlesi*. Além da distribuição das infecções humanas por *P. knowlesi*, o mapa mostra também a distribuição de duas espécies de macaco naturalmente hospedeiras e os limites da distribuição natural do mosquito vetor do grupo *An. leucosphyrus*. Fonte: Modificado de Cox-Singh et al. 2008.

Além do *P. knowlesi*, existem diversas outras espécies de plasmódios que infectam primatas não humanos (PNH): *Plasmodium cynomolgi* (Mayer, 1907), *Plasmodium inui* (Halberstaedter & Von Prowazek, 1907), *Plasmodium schwetzi* (Warrell, 2002), entre outros (Tabela 1). Neste ano de 2014 foi publicada a primeira descrição de caso humano de malária por *P. cynomolgi* (TA et al. 2014). É importante ressaltar que infecções por plasmódios de símios neotropicais também já foram descritas na população humana: *Plasmodium brasilianum* (Gonder & Berenberg-Gossler, 1908) e *Plasmodium simium* (Fonseca, 1939) (DEANE et al. 1966; CERUTTI-JUNIOR et al. 2007; ARRUDA et al. 1989).

Sabe-se que o ciclo de vida dos plasmódios simianos é muito semelhante ao dos plasmódios humanos e que algumas infecções desaparecem dentro de poucos meses, mas outras podem persistir por vários anos (YAMASAKI et al. 2011). Geralmente, a maioria dos animais apresenta baixa parasitemia, esporadicamente febre e a doença cura-se espontaneamente (DEANE et al. 1992).

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

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

Fonte: Dados compilados a partir de Deane et al. 1992; Cormier et al. 2010; Curotto et al. 2012; Araújo et al. 2013.

1.4 Epidemiologia da Malária no Mundo e no Brasil

De acordo com a Organização Mundial da Saúde de 2014 (WHO), a malária no ano de 2013 atingiu 97 países do mundo e 3,2 bilhões de pessoas estão sobre o risco de contrair a doença (WHO, 2014). Em 2013, foram registrados 198 milhões de casos de malária e 584.000 mortes. A África é a região mais afetada, sendo responsável por mais de 90% dos casos de morte, dos quais cerca de 78% crianças menores de cinco anos (WHO, 2014). A figura 3 mostra a distribuição da malária no mundo e estágios de eliminação segundo estratégias de controle (ALONSO & TANNER, 2013).

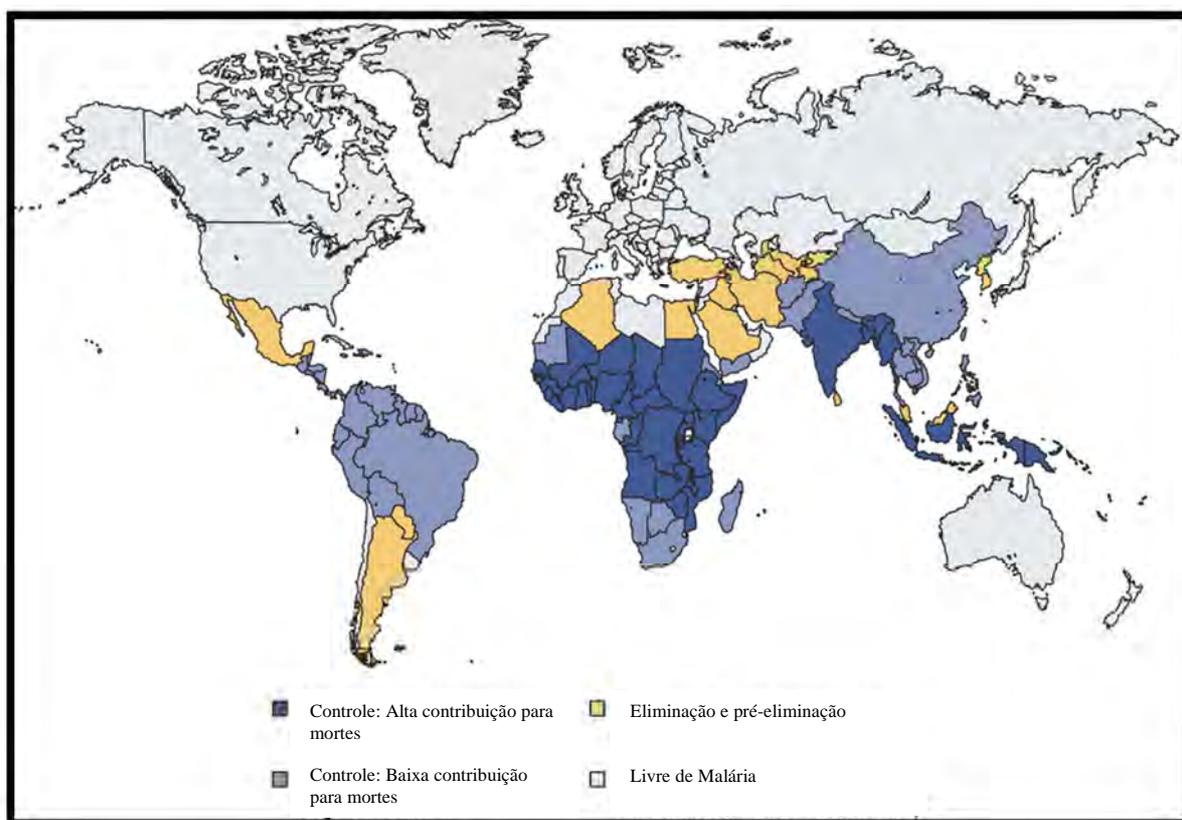


Figura 3. Distribuição da malária no mundo e estágios de eliminação segundo estratégias de controle. Os países com maior incidência da doença estão marcados em tons de azul mais escuro. Cerca de 90% de todos os casos descritos de malária humana concentram-se na África subsaariana. Os demais casos da doença estão distribuídos nas Américas do Sul e Central, sudeste asiático e ilhas da Oceania. Fonte: Modificado de Alonso & Tanner, 2013.

Nas Américas, a malária é endêmica em 21 países (WHO, 2014). O Brasil é o país com maior número de casos. No país, a malária é doença de notificação compulsória, e mais de 45 milhões de pessoas estão em área de risco (Figura 4). No período de 2000 a 2011, 99,5% dos casos de malária no Brasil foram notificados na Região Amazônica, considerada área endêmica do país. A região amazônica brasileira é composta pelos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. Nos últimos 12 anos foram notificados uma média de 422.858 casos por ano, dos quais 85% causados pelo *Plasmodium vivax* (Brasil, MS 2013). *Anopheles darlingi* é o principal vetor no Brasil (OLIVEIRA-FERREIRA et al. 2010).

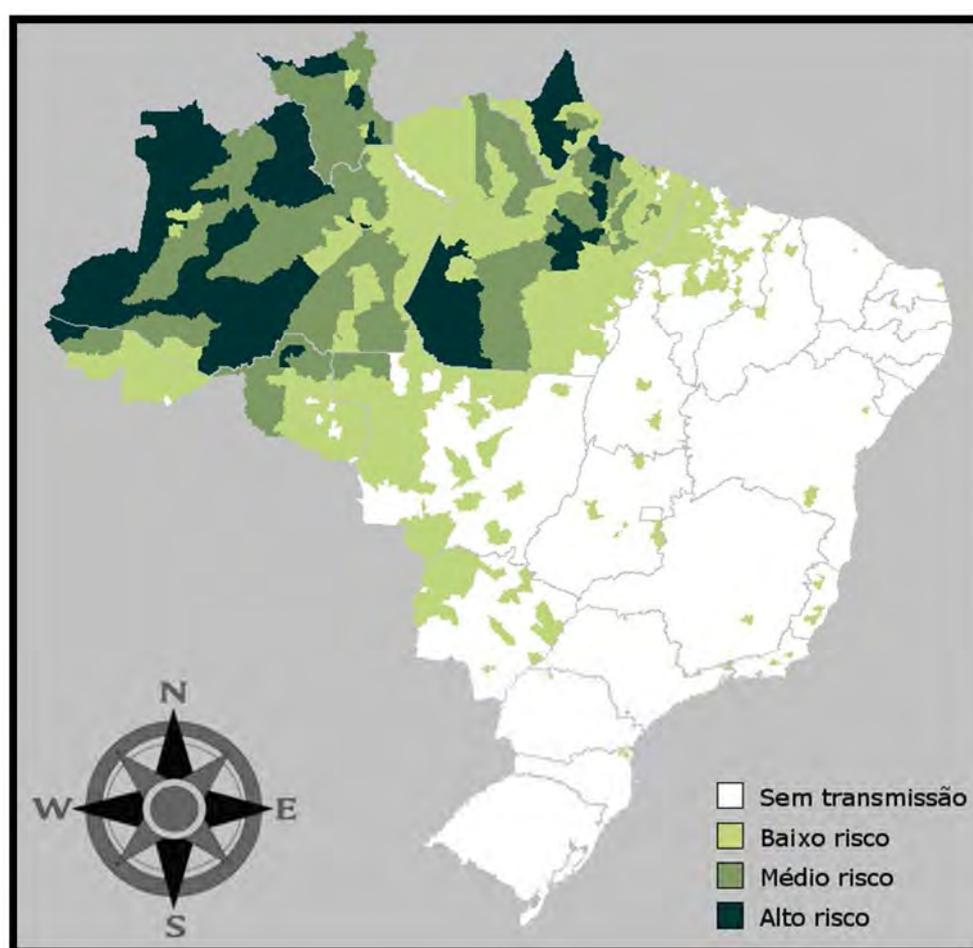


Figura 4: Distribuição da malária no Brasil em 2012. Nesta figura é possível observar as áreas onde ocorre risco de transmissão de malária no Brasil, cuja área endêmica está restrita a região Amazônica. Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde/ MS.

1.5 Malária extra-amazônica

A malária relatada na região extra-amazônica inclui os casos importados, introduzidos e autóctones. É importante ressaltar que existe o risco de reintrodução da doença nas regiões consideradas não endêmicas do país uma vez que espécies de vetor do gênero *Anopheles* se encontram em todo território nacional. Cerca de 0,5% dos casos de malária registrados no Brasil são diagnosticados e tratados fora da região endêmica da Amazônia (1.296 casos / anos 2000-2013). A maioria dos casos diagnosticados e relatados fora da Amazônia brasileira correspondeu a casos importados originários da Amazônia (376 casos, 50,9% do total importado dos casos em 2013) ou da América Central e do Sul, países africanos ou asiáticos que têm transmissão ativa (363 casos, 49,1%) (PINA COSTA et al. 2014). Apesar da malária no Brasil estar restrita como endemia à região amazônica, também são descritos casos da doença na região extra-amazônica, incluindo casos autóctones de malária, como os notificados em áreas de Mata Atlântica (OLIVEIRA-FERREIRA et al. 2010).

1.5.1 Malária autóctone na Mata Atlântica Brasileira

A autoctonia pode ser definida quando um caso se origina em uma localidade onde existe fonte de infecção (OMS, 1961). Um total de 932 casos autóctones foi registrado na região extra-amazônica entre 2007-2013. Quatro estados brasileiros (SP, RJ, ES e MG) foram os responsáveis por 57,1% desses casos (PINA-COSTA et al. 2014). Dos 96 casos autóctones registrados apenas em 2012, 77 (80,2%) foram reportados em domínios de Mata Atlântica (PINA-COSTA et al. 2014). Casos esporádicos de malária autóctone têm sido frequentemente registrados no estado de São Paulo, sendo a maioria diagnosticada como sendo causada por *P. vivax* (BRANQUINHO et al. 1997, CURADO et al. 2006, MARQUES et al. 2008). Carréri-Bruno e colaboradores (1995) descreveram no município de São Vicente, São Paulo, um pequeno surto de malária autóctone, causada por *P. vivax*. Do total de casos do estudo, três deles foram descritos entre funcionários da SUCEN, após atividade entomológica para o controle da malária na região (CARRÉRI-BRUNO et al. 1995).

Cerutti-Junior e colaboradores (2007) realizaram um levantamento epidemiológico no Espírito Santo, onde foi possível caracterizar pela microscopia ótica a infecção por *P. vivax* em 51 pacientes sem histórico de viagens para áreas endêmicas. Dos 51 casos, 48 foram testados pela PCR, sendo 45 positivos para *P. vivax*, um positivo para *P. malariae* e dois resultados

negativos. Na captura entomológica, foram detectados 785 anofelinos e um “pool” de sete espécimes amplificou fragmento de DNA para *P. vivax*. Foi observada a presença de *P. brasilianum* em dois bugios. Finalmente, o estudo aponta para uma possível zoonose, baseando-se nas evidências de símios infectados na região (CERUTTI-JUNIOR et al. 2007).

A Mata Atlântica é hoje um bioma altamente prioritário para a conservação da biodiversidade mundial. Sua cobertura vegetal já se estendeu por uma área equivalente a 1.315.460 km ao longo de 17 estados, abrangendo um mosaico de diferentes tipos de vegetações como florestas ombrófilas densa, aberta e mista; florestas estacionais decidual e semidecidual; campos de altitude, mangues e restingas. As drásticas mudanças geradas pelos humanos na Mata Atlântica nos últimos 150 anos, resultantes da expansão das áreas urbanas e rurais, além da caça e tráfico ilegais, causaram a fragmentação dos ambientes e severas reduções no tamanho das populações, ocasionando graves ameaças às espécies de mamíferos, particularmente àquelas de maior porte, culminando no desaparecimento de algumas espécies em certas regiões ou localidades. Hoje, restam apenas 8,5 % de remanescentes florestais acima de 100 hectares do que existia originalmente. Somados todos os fragmentos de floresta nativa acima de 3 hectares, são 12,5%. É um hotspot mundial, ou seja, uma das áreas mais ricas em biodiversidade e mais ameaçadas do planeta e também decretada Reserva da Biosfera pela Unesco e Patrimônio Nacional (Fundação S.O.S. Mata Atlântica & Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, 2013). Das 250 espécies de mamíferos da Mata Atlântica, 55 são endêmicas e 38 estão ameaçadas de extinção. O Brasil é o país com a maior biodiversidade de primatas do mundo, contando com 145 táxons (ICMBio, 2015).

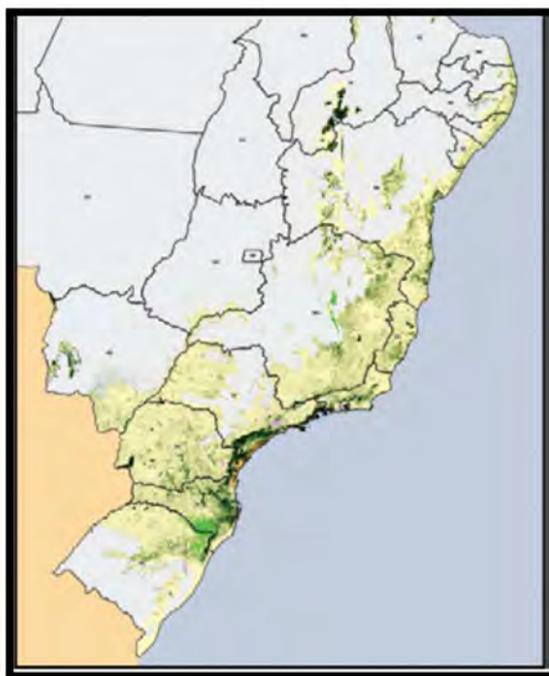


Figura 5: Distribuição do bioma de Mata Atlântica no Brasil em 2012. A Mata Atlântica é um bioma de floresta tropical que abrange a costa leste, sudeste e sul do Brasil. Nessas regiões vivem cerca de 131 milhões de pessoas, distribuídas em 3.284 municípios. Isso equivale a 69% da população brasileira (Fundação S.O.S. Mata Atlântica, 2013). Fonte: Pina-Costa et al. 2014.

Na década de 80, Leônidas M. Deane, sugeriu que os casos autóctones em regiões de Mata Atlântica seriam causados por espécies de plasmódios simianas (DEANE et al. 1992). Esses casos ficaram conhecidos como “malária de bromélias” (PITTENDRIGH, 1948), nome que se refere à presença de formas imaturas do anofelino vetor em águas acumuladas dentro dessas plantas (DEANE et al. 1992, CONSOLI e OLIVEIRA, 1994). O mosquito *Anopheles (Kerteszia) cruzii* é o principal vetor natural da malária nas regiões cobertas por Mata Atlântica, no Brasil (DEANE et al. 1992; CONSOLI & LOURENÇO-OLIVEIRA et al. 1994; BRANQUINHO et al. 1997; RONA et al. 2010).

A maioria das espécies de *Anopheles (Kerteszia)* é encontrada na região costeira dos oceanos Pacífico e Atlântico, que tem registro da presença de *An. cruzii*, *An. bellator*, *An. homunculus*, *An. bambusicolus* e *An. laneanus* (MARELLI et al. 2007). Dessas espécies, apenas *An. cruzii* e *An. bellator* apresentam importância epidemiológica (UENO et al. 2007).

Anopheles (K) cruzii (Figura 6) são mosquitos vorazes que picam durante as 24 horas do dia (com picos crepusculares) (BRANQUINHO et al. 1997). Esta espécie, que pertence ao subgênero *Kerteszia*, é encontrada desde o litoral do Rio Grande do Sul até Sergipe, nordeste do Brasil (CONSOLI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994) ao longo de toda a Mata

Atlântica brasileira. O ecossistema de Mata Atlântica, onde bromélias são abundantes, proporciona um excelente ambiente para as espécies do subgênero *Kerteszia*, que sabidamente se utilizam dessas plantas para seu criadouro (MARELLI et al. 2007).



Figura 6: *Anopheles (Kerteszia) cruzii*. Este é o principal vetor da malária simiana no Brasil, sendo capaz de transmitir *P. brasilianum* e *P. simium* tanto aos seres humanos quanto aos primatas não humanos. Fonte: Pina-Costa et al. 2014.

De acordo com Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994), o *An.(K)bellator* é encontrado apenas no litoral, e seus hábitos são muito semelhantes aos do *An.(K) cruzii* e de outras espécies do subgênero *Kerteszia*. Prefere criar-se em bromélias mais expostas ao sol e aquelas maiores que permitem o acúmulo de maior quantidade de água nas axilas de suas folhas. Tem hábito essencialmente crepuscular vespertino, prolongando sua atividade hematofágica às primeiras horas da noite, e ao pôr-do-sol (CONSOLI & LOURENÇO DE OLIVEIRA et al.1994).

A presença do vetor anofelino que pica tanto próximo da copa das árvores quanto próximo ao solo sugere que a malária na Mata Atlântica seja possivelmente uma zoonose, uma vez que possibilita a transmissão entre humanos e símios (DUARTE et al. 2013; MARRELLI et al. 2007; NEVES et al. 2013; UENO et al. 2007). A figura 7 mostra um esquema hipotético de transmissão da malária simiana ao ser humano.

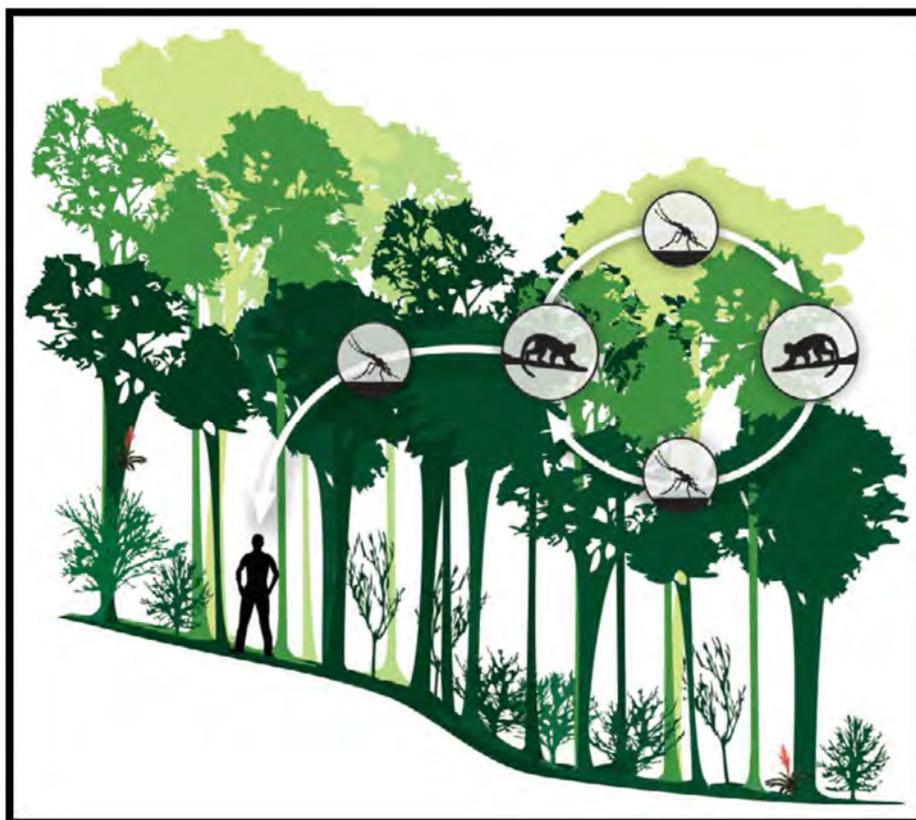


Figura 7: Esquema hipotético de transmissão da malária simiana ao ser humano em regiões de Mata Atlântica. Sugere-se que a malária na Mata Atlântica seja possivelmente uma zoonose devido à presença de primatas não humanos infectados e do vetor anofelino que pica tanto próximo da copa das árvores quanto próximo ao solo. Fonte: Pina-Costa et al. 2014.

1.5.2 Infecção malárica em primatas não humanos no Brasil

No Brasil, foram descritas apenas duas espécies de *Plasmodium* infectando primatas não-humanos: *P. brasilianum* e *P. simium* (DEANE et al. 1992). Estes são morfológica, genética e imunologicamente semelhantes aos plasmódios humanos *P. malariae* e *P. vivax*, respectivamente (DUARTE et al. 2006; LECLERC et al. 2004; DEANE et al. 1992; COATNEY et al. 1971). *Plasmodium brasilianum* possui uma ampla distribuição na América do Sul e Central, sendo encontrado no Brasil, Venezuela, Panamá e Peru infectando naturalmente membros das famílias Cebidae, Aotidae, Pitheciidae e Atelidae. Já *P. simium* foi encontrado em uma área muito mais restrita, apenas em regiões de Mata Atlântica do Sul e Sudeste brasileiro, infectando macacos dos gêneros *Alouatta* (Figura 8) e *Brachyteles* (DEANE et al. 1992, DEANE et al. 1968).

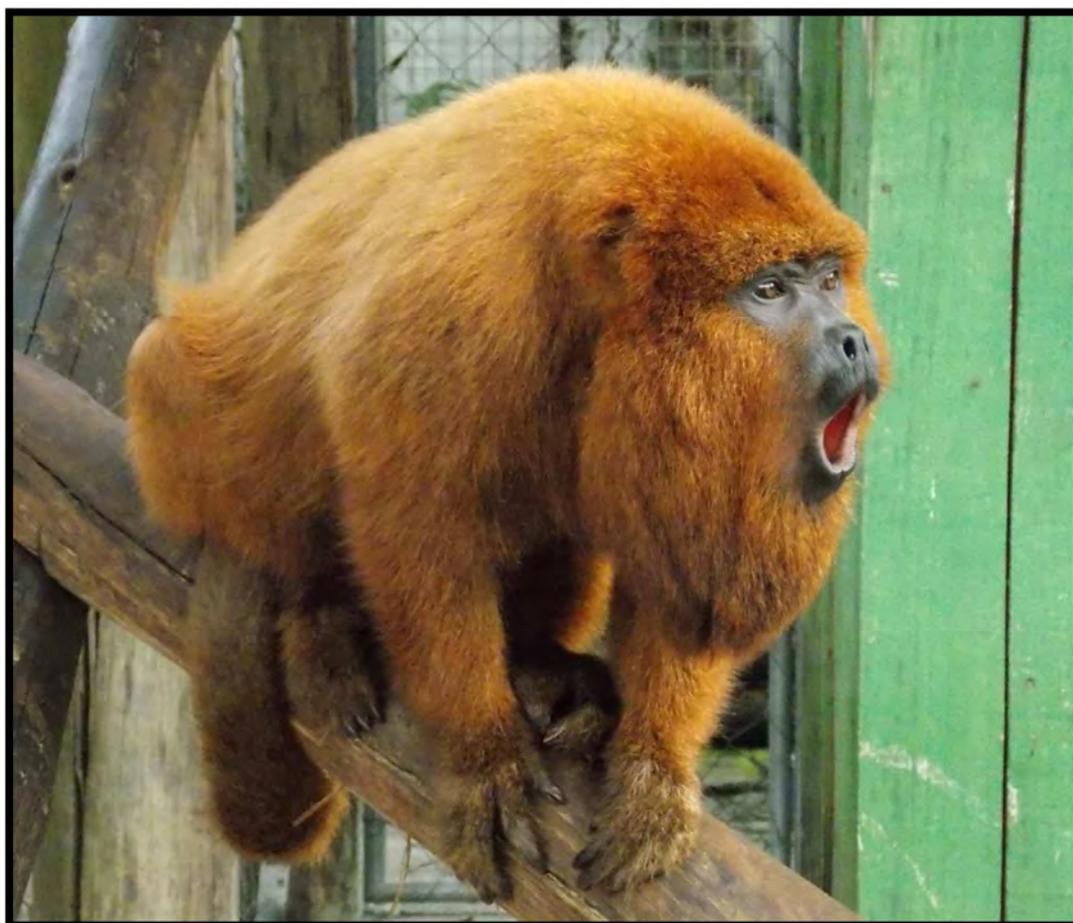


Figura 8: *Alouatta clamitans*. Foto de um *Alouatta*, gênero susceptível a infecção por *P. simium*. Fonte: Foto de Denise Alvarenga, 2015 (Cepesbi, Indaial, SC, Brasil).

Em 2011, Yamasaki e colaboradores analisaram 50 bugios ruivos de áreas de Mata Atlântica da região metropolitana de São Paulo, encontrando 18% de animais infectados com *P. simium* e 4% com *P. brasilianum* (YAMASAKI et al. 2011). Assim, a presença de possíveis reservatórios silvestres traz importantes implicações para a saúde pública.

Anopheles (Kerteszia) cruzii é o principal vetor natural conhecido de malária simiana no Brasil, veiculando os dois plasmódios de macacos do Novo Mundo — o *P. brasilianum* e o *P. simium* (DEANE et al. 1970; BRANQUINHO et al. 1997; DUARTE et al. 2013).

Além disso, o estudo da saúde animal é um ponto chave para a conservação (ICMBio, 2015). Já foi relatado malária sintomática em símios de cativeiro (COSTA et al. 2014), o que ressalta a necessidade de estudar a malária simiana do ponto de vista da conservação, principalmente de espécies ameaçadas em extinção.

1.5.3 A Malária no Rio de Janeiro

Diferente do cenário atual, em meados da década de 1940, a malária no Brasil ainda assolava grande parte do território nacional e se constituía em verdadeiro desafio ao desenvolvimento das regiões Amazônica, litorânea do sudeste e da bacia dos rios Paraná, São Francisco e Doce, e no Planalto Central (PEREIRA-DA-SILVA & OLIVEIRA, 2002). Diversas ações foram implementadas na região com objetivo de combater a malária, dentre as quais a quinização à força, que esbarrou em forte resistência popular. Uma cápsula de quinino era entregue ao trabalhador e caso ele não a ingerisse era dispensado sumariamente de suas funções (BENCHIMOL e SILVA, 2008).

A partir das décadas de 60 e 70, com o sucesso da campanha de erradicação da malária os estados da região extra-amazônica, tiveram suas regiões malarígenas transformadas em áreas de transmissão interrompida. Nessa época estava em voga o processo de tratamento maciço de casos, porém sem eliminação completa do mosquito transmissor.

Segundo relatos históricos, a malária foi considerada eliminada no estado do Rio de Janeiro em 1968 (MORAES et al. 1990).

No estado do Rio de Janeiro, foram registrados entre os anos de 1990 a 2008, 1.500 casos de malária autóctone, todos originados de regiões de Mata Atlântica sem história de exposição às áreas endêmicas (Dados do SIVEP, MS/SVS). A Figura 9 mostra os casos de malária autóctone no Rio de Janeiro entre os anos de 2002 a 2010, em um estudo publicado por Miguel e colaboradores em 2014.

O ecossistema na região da Mata Atlântica do estado do Rio, com existência abundante de bromélias, de *Anopheles (Kerteszia) cruzii* e a provável presença de macacos infectados, e a detecção de malária em indivíduos que entraram em área de mata, são indícios de que pode haver casos de malária não diagnosticados e infecção assintomática na região (PINA COSTA et al. 2010; PINA COSTA et al., 2014). Se, por um lado, a falta de investigação dos casos de malária autóctone no estado do Rio de Janeiro não nos permite ter uma dimensão do que realmente acontece na região, por outro, estudos realizados em estados vizinhos, confirmam, por métodos sorológicos ou moleculares, a infecção assintomática por *Plasmodium* na região extra-amazônica (CERUTTI-JUNIOR et al. 2007; CURADO et al. 2006).

No ano de 2008 um caso de malária autóctone ocorreu no município de Guapimirim. Tratou-se de uma bióloga que adoeceu após realizar um trabalho de campo na região do Garrafão, tendo tido o diagnóstico por malária vivax no Laboratório de Doenças Febris do

Instituto de Pesquisa Evandro Chagas (IPEC)/FIOCRUZ (PINA COSTA et al. 2010). Dois outros casos de infecção por *P. vivax* ocorreram em Guapimirim no ano de 2009, na localidade Monte Olivete (PINA COSTA et al. 2010). Nenhum desses pacientes esteve em área endêmica para malária (MIGUEL 2011). Esses casos de malária autóctone descritos no município de Guapimirim estimulou a pesquisa na região, para verificar a existência de transmissão plasmodial autóctone em seus habitantes. Miguel (2011) realizou um estudo em 324 habitantes locais de Guapimirim, que foram submetidos a exames moleculares, sorológicos e parasitológicos. A prevalência de exames moleculares (PCR) positiva foi de 2,8%, com nove casos de indivíduos assintomáticos com presença de DNA plasmodial; já na sorologia 3,5% das amostras foram positivas para anticorpos IgG anti *P. falciparum* e 7,7% para IgG anti *P. vivax*, apenas um exame parasitológico direto (gota espessa) foi positivo para *Plasmodium* spp. Observou-se que o ingresso na mata foi considerado comportamento de risco para infecção (MIGUEL 2011). O relato de casos autóctones no município de Guapimirim nos motivou a estudar a malária simiana na região, onde se localiza o Centro de Primatologia do Rio de Janeiro.

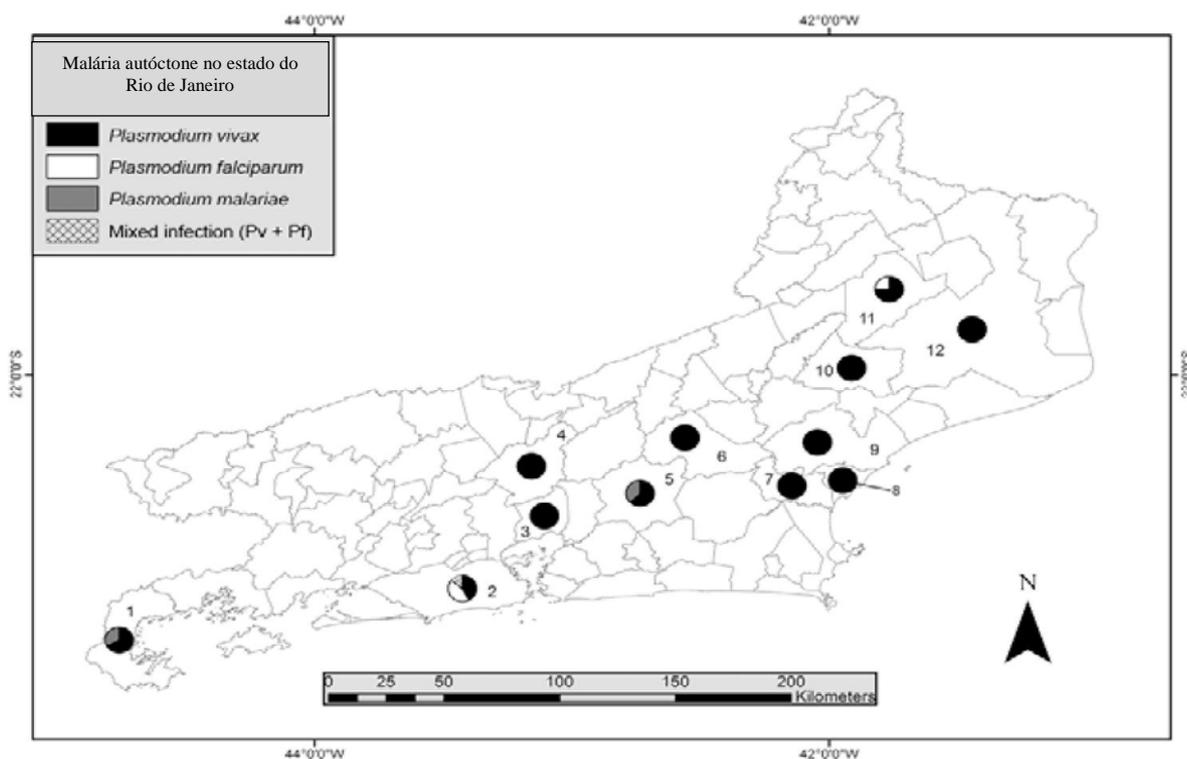


Figura 9: Casos de malária autóctone no estado do Rio de Janeiro. Municípios de provável infecção dos casos autóctones de malária no estado do Rio de Janeiro, 2002-2010. 1: Paraty; 2: Rio de Janeiro; 3: Magé; 4: Petrópolis; 5: Cachoeiras de Macacu; 6: Nova Friburgo;

7: Casimiro de Abreu; 8: Rio das Ostras; 9: Macaé; 10: Santa Maria Madalena; 11: São Fidélis; 12: Campos dos Goytacazes. Fonte: Miguel et al. 2014.

O escasso registro de casos de malária autóctone no estado do Rio de Janeiro não traduz a inexistência ou raridade da transmissão da doença, mas a necessidade de esclarecimento da dinâmica de transmissão e da real magnitude da doença na região. As áreas com elevado potencial turístico e fluxo intenso de pessoas podem estar sujeitas à ocorrência de surtos e, ainda, à reintrodução da malária no estado.

1.6 Estudos moleculares e filogenéticos da malária

Pouco se sabe sobre a história evolutiva e a variabilidade genética de *P. vivax*, quando comparado com a de *P. falciparum*. Isso se deve, principalmente, à ausência de um sistema eficiente de cultivo contínuo de *P. vivax* e à menor mortalidade associada à infecção causada por esse parasito.

Recentemente, alguns estudos foram realizados na tentativa de elucidar a história evolutiva do *P. vivax*. Existem atualmente duas hipóteses, não excludentes, que sugerem a origem para esse parasito. A primeira hipótese e que era mais amplamente aceita é a da origem asiática do *P. vivax*. Diversos autores sugerem que a população atual de *P. vivax* originou-se de um parasito que infectava macacos no continente asiático e passou, posteriormente, a parasitar os humanos modernos há pelo menos 50 mil anos atrás. Esses trabalhos são embasados na alta diversidade genética das sequências mitocondriais dos parasitos asiáticos (CORNEJO & ESCALANTE, 2006; ESCALANTE et al. 2005; MU et al. 2005). Entretanto esta hipótese não explica o fato de que a maior parte da população africana é refratária à infecção por malária vivax, por não expressarem o principal receptor eritrocitário para invasão desse parasito (Duffy negativo), o que sugere um antigo processo de pressão seletiva (LIVINGSTONE et al. 1984; CARLTON et al. 2003; CARTER et al. 2002). Assim, estes autores defendem que o *P. vivax* teria se originado na África.

Entretanto, um estudo de Liu e colaboradores (2014) conseguiu esclarecer essa questão da origem do *P. vivax*. Ao estudar a diversidade genética de parasitos semelhantes ao *P. vivax* (*P. vivax like*), que infectam naturalmente chimpanzés e gorilas africanos, os autores observaram que existe uma diversidade muito maior nos parasitos simianos, o que sugere uma origem africana para o *P. vivax*. Assim, *P. vivax* teria se originado de uma população ancestral

que infectava macacos do continente africano e que, posteriormente, migrou para a Ásia e lá se diversificou. Na África, a forte pressão seletiva provocada pelo surgimento dos indivíduos Duffy negativos refratários à infecção por *P. vivax*, causou o desaparecimento das populações ancestrais desse parasito, motivo este que justifica a maior diversidade genética encontrada na população atual dos parasitos que infectam macacos no continente asiático (LIU et al. 2014).

A história evolutiva do *P. vivax* nas Américas ainda é bastante controversa. A hipótese mais aceita é a da origem pós-Colombiana, no qual o *P. vivax* teria chegado com os Europeus, durante o processo de colonização das Américas (CARTER et al. 2003; GRYNBERG et al. 2008). No Novo Mundo, diversas evidências sugerem uma introdução recente de *P. vivax* (CARTER et al. 2003; CORNEJO & ESCALANTE, 2006; LI et al. 2001).

A história evolutiva do *P. vivax* nas Américas foi estudada através da análise da variabilidade do genoma mitocondrial desses parasitos. Foram encontrados diversos grupos genéticos divergentes circulando na América do Sul, e que devem ter se originado a partir de introduções independentes (TAYLOR et al. 2013).

A descoberta da grande similaridade genética entre *P. vivax* e *P. simium* e entre *P. malariae* de *P. brasilianum* levantou a possibilidade de estudar esses parasitos simianos como elos na evolução dos parasitos humanos nas Américas (ESCALANTE & AYALA, 1994; AYALA et al. 1999, LECLERC et al. 2004; ESCALANTE et al. 2005). Dessa forma, estuda-se *P. simium* para compreender a evolução do *P. vivax*, e da mesma forma, *P. brasilianum* para melhor compreender a história do *P. malariae* (TAZI & AYALA, 2011). Entretanto, são escassos os trabalhos que abordam os aspectos moleculares e evolutivos dos plasmódios simianos do Novo Mundo.

Diversas perguntas sobre a origem e a história evolutiva do *P. malariae* também permanecem em grande parte não resolvidas. Pouquíssimos estudos abordam o tema, e essa negligência ocorre em parte devido a baixa prevalência das infecções causadas por esse parasito. *Plasmodium malariae* é geneticamente indistinguível de *P. brasilianum*, e alguns autores defendem que estas duas espécies seriam sinônimas (ESCALANTE et al. 1995, 1998).

As relações filogenéticas entre os parasitos humanos e os parasitos que infectam primatas neotropicais *P. vivax* e *P. simium* e *P. malariae* e *P. brasilianum*, respectivamente foram estudadas de maneira aprofundada (TAZI & AYALA, 2011). Foram utilizados de forma conjunta três genes nucleares e um gene mitocondrial em análises e foi observada uma grande similaridade genética entre esses parasitos. Esses dados sugerem uma transferência recente de hospedeiro entre humanos e primatas neotropicais. Os autores discutem que, devido ao limitado número de sequências disponíveis dos parasitos que infectam primatas neotropicais *P. simium*

e *P. brasilianum*, não foi possível estabelecer as direções das transferências de hospedeiro (TAZI & AYALA, 2011).

2 JUSTIFICATIVA

Apesar da malária no Brasil estar restrita como endemia à região amazônica, existem casos da doença na região extra-amazônica, entre eles casos autóctones de malária, como os notificados em áreas de Mata Atlântica. Sugere-se que a manutenção destes casos envolva a presença de macacos infectados, que podem atuar como reservatórios da doença. Relatos de casos humanos de malária autóctone em regiões do Mata Atlântica Rio de Janeiro, especialmente no município de Guapimirim, nos motivou a estudar a presença de infecção por plasmódios em primatas neotropicais da região. A importância dos potenciais reservatórios não-humanos foi destacada por recentes descobertas no sudeste da Ásia na transmissão de *P. knowlesi* para a população humana (SINGH et al. 2004; YOSOF et al. 2014).

No Brasil, país que detêm a maior fauna simiana do planeta, foram descritas apenas duas espécies de *Plasmodium* infectando primatas não-humanos: *Plasmodium simium* e *Plasmodium brasilianum*, que se assemelham aos plasmódios humanos *Plasmodium vivax* e *Plasmodium malariae*, respectivamente. Estas semelhanças ocorrem no nível morfológico, genético e imunológico. *Plasmodium brasilianum* infecta naturalmente os gêneros das famílias Cebidae, Aotidae, *Pitheciidae* e Atelidae, enquanto *P. simium* foi encontrado infectando naturalmente somente *Alouatta* e *Brachyteles*, da família Atelidae. Entretanto, a lista de potenciais hospedeiros vertebrados pode estar subestimada, já que os dados disponíveis foram em grande parte baseados em análises de exame microscópico de sangue periférico, um método com sensibilidade limitada, considerando a potencial característica sub-patente dessas infecções. A presença de símios infectados atuando como reservatórios da malária podem sugerir um caráter zoonótico da doença nas regiões de Mata Atlântica. Neste contexto, o estudo da relação homem-símio e da dinâmica de transmissão de *Plasmodium* são passos importantes para o entendimento das implicações epidemiológicas para a doença nos humanos, particularmente em focos residuais de casos autóctones de malária humana em regiões da Mata Atlântica brasileira.

Devido a grande similaridade genética entre *P. vivax* e *P. simium* e entre *P. malariae* de *P. brasilianum* utiliza-se esses parasitos simianos para estudar a evolução dos parasitos humanos (AYALA et al. 1999, LECLERC et al. 2004; ESCALANTE et al. 2005). Trabalhos recentes sugerem uma recente transferência de hospedeiro entre os parasitos humanos e simianos (TAZI e AYALA et al. 2011). Estudos recentes sugerem a origem africana para o *P. vivax* e demonstraram que todos os isolados deste parasito foram originados de um ancestral comum que infectava primatas não humanos na África, uma vez que a diversidade genética de parasitos dos primatas africanos é maior que de *P. vivax* que infecta humanos (LIU et al. 2014).

Esta descoberta só foi possível a partir do estudo de parasitos que infectavam primatas não humanos na África. Diante disso, estudos moleculares das espécies de plasmódio simianas são de extrema relevância para estudar a diversidade genética dos parasitos, esclarecer as relações filogenéticas entre as diferentes espécies de *Plasmodium*, assim como para estabelecer uma estimativa mais precisa da prevalência de malária simiana e avaliar o papel dos macacos como reservatórios de malária humana.

Entretanto, estudos que abordam os aspectos evolutivos e filogenéticos dos parasitos simianos do Novo Mundo ainda são extremamente escassos, principalmente devido ao pequeno número de sequências disponíveis. Assim, uma série de dúvidas ainda precisam ser esclarecidas, como elucidar a introdução do *P. vivax* nas Américas, estabelecer qual a origem da transferência de hospedeiro entre os parasitos humanos e simianos, bem como descrever marcadores moleculares capazes de diferenciar *P. vivax* de *P. simium* e *P. malariae* de *P. brasilianum*.

Além disso, o maior entendimento da saúde dos animais silvestres é um ponto chave para a sua conservação. As doenças parasitárias e infecciosas estão envolvidas em eventos de extinções de espécies ou declínios populacionais. O aumento das taxas de doenças infecciosas emergentes está relacionado ao aumento das pressões antrópicas e é uma das manifestações da diminuição da saúde ecológica, resultando também na mudança da ecologia dos hospedeiros, dos parasitos ou de ambos (ICMBio, 2015). Já foi relatado malária sintomática em símios de cativeiro (COSTA et al. 2014), o que ressalta a necessidade de estudar a malária simiana do ponto de vista da conservação, principalmente de espécies ameaçadas em extinção.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar do ponto de vista molecular *Plasmodium* spp. que infectam primatas não humanos do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a prevalência da infecção por *Plasmodium* spp em primatas não humanos do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (RJ).
- Identificar a infecção por *Plasmodium* spp a partir de fragmentos de tecido (fígado e baço) através do diagnóstico molecular.
- Estudar a variabilidade genética através do sequenciamento do gene 18SSU rRNA de *P. simium*

4 METODOLOGIA

4.1 Descrição da área de estudo no Rio de Janeiro

Este trabalho foi realizado em colaboração com o Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ). O CPRJ (número de registro do IBAMA 458460) é uma unidade de proteção de macacos selvagens e está localizado no município de Guapimirim, entre Magé e Cachoeiras de Macacu, na Serra dos Órgãos, em uma área de Mata Atlântica, a cerca de 100 km da cidade do Rio de Janeiro (Figura 10). A altitude média é de 48 m (IBGE, 2010). Localizado a 22°48' de latitude sul e 42°91' de longitude oeste, 70% do município encontra-se em área de proteção ambiental coberto pela Mata Atlântica. Segundo dados do IBGE (2010), Guapimirim possui 51.487 habitantes.

O CPRJ foi criado em 1979, pela antiga FEEMA, atual Instituto Estadual do Ambiente (INEA). O CPRJ está situado junto à antiga Estação Ecológica Estadual do Paraíso (EEEP), hoje integrada ao Parque Estadual dos Três Picos (PETP). Boa parte da área permanece revestida de mata cuja riqueza biótica ainda é significativa, principalmente sob o ponto de vista florístico. No centro são realizados estudos, manutenção e reprodução das espécies de primatas da Mata Atlântica, em adequado regime de cativeiro. Trata-se de modelo original e único no mundo com o propósito de conservar a fauna primatológica.

O CPRJ ocupa uma área de aproximadamente 265 hectares com prédio-sede (Figura 11); 85 viveiros (Figura 12); unidade de internação, diagnóstico e tratamento médico-veterinário; insetário; sala de reuniões e acompanhamento de projetos.

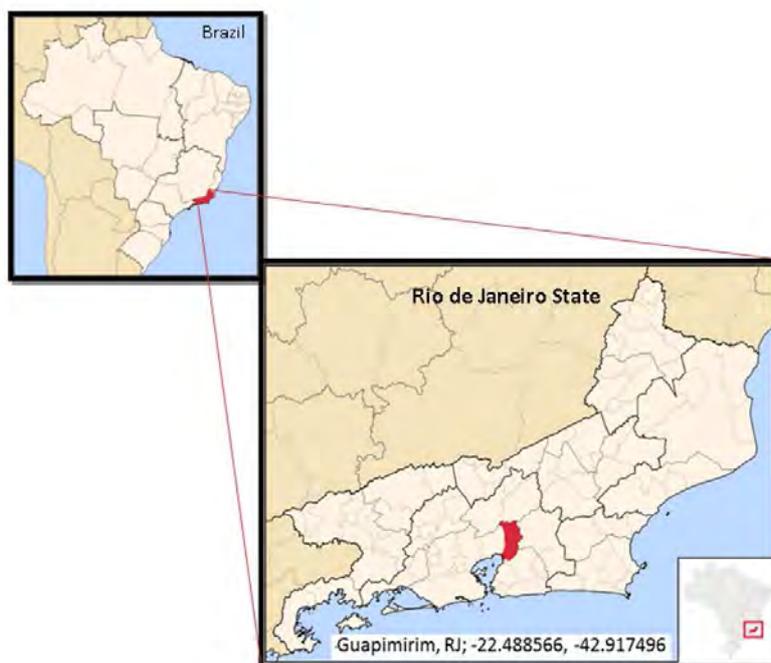


Figura 10: Mapas do Brasil e do estado do Rio de Janeiro, onde está localizado o CPRJ.

Município de Guapimirim e suas coordenadas (marcado em vermelho no mapa do Rio de Janeiro). O Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ) está localizado na Serra dos Órgãos, em uma área de Mata Atlântica, a cerca de 100 km da cidade do Rio de Janeiro. O CPRJ compreende uma área de aproximadamente 265 ha. Fonte: Figura modificada de *Wikimedia Commons*.



Figura 11: Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ). O CPRJ é uma unidade de proteção de primatas selvagens e está localizado no município de Guapimirim. Fonte: Foto de Denise Alvarenga.



Figura 12: Estrutura do Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ). O CPRJ possui diversos viveiros, e comporta cerca de 200 animais. Está localizada próximo a mata. Fonte: Foto de Denise Alvarenga.

4.2 Ética

O presente estudo foi conduzido em resposta a uma demanda da Secretaria de Saúde do Rio de Janeiro, no contexto de uma investigação de casos humanos de malária autóctone registrados na região do CPRJ. Além disso, foi feita uma consulta ao Comitê de Ética em animais experimentais da Fiocruz, que dispensou a necessidade de autorização, uma vez que o manuseio dos animais seria realizado apenas pelos próprios funcionários do Centro de Primatologia. O CPRJ tem autorização do IBAMA para o manuseio desses animais (número de registro do IBAMA 458460).

4.3 Amostras

A coleta das amostras de sangue foi realizada em novembro de 2011, pelo Dr. Alcides Pissinati, coordenador do CPRJ. Foram coletadas amostras de um total de 30 primatas do cativeiro (Tabela 2). Dezoito animais eram do sexo feminino (62%); a média de idade era de seis anos, mediana de sete anos (1-14). O peso médio era de 2,800 g (700 g – 7.500 g). Nenhum animal era esplenectomizado no momento da coleta do material. Aproximadamente dois ml de sangue foram coletados em tubos *vacuum* contendo EDTA por punção da veia femoral. Para apenas poucos indivíduos foi necessária sedação com Quetamina® e Midazolam.

A investigação do óbito de um primata de vida livre também foi realizada, após o comunicado do Dr. Alcides Pissinati. A carcaça do animal (Figura 13 e 14), de vida livre, foi encontrada nos arredores do CPRJ em dezembro de 2013. Tratava-se de uma fêmea da espécie *Alouatta guariba clamitans*, com aproximadamente 15 anos, com sinais de decomposição. O animal (identificado com MP1943) passou por autópsia e fragmentos de baço e fígado foram submetidos à extração de DNA. A tabela 2 apresenta uma lista dos primatas estudados neste trabalho.

A Classificação taxonômica dos primatas Neo-Tropicais utilizada nesse trabalho foi baseada em Groves, 2001.

Tabela 2: Descrição dos primatas não humanos estudados.

Número	Espécie	Sexo	Peso (kg)	Idade (anos)	Origem	Data de chegada ou nascimento no CPRJ
MP1943	<i>Alouatta guariba clamitans</i>	F	3.7	10.0	Selvagem, encontrado morto nas proximidades do CPRJ	04/12/2013
1624	<i>Sapajus xanthosternos</i>	M	5.2	16.0	Nascido no CPRJ	30/11/1995
2005	<i>Sapajus xanthosternos</i>	F	2.9	13.0	Selvagem capturado em Ilhéus, BA	15/12/2000
2006	<i>Sapajus xanthosternos</i>	F	3.0	13.0	Ilhéus, BA	15/12/2000
2046	<i>Sapajus xanthosternos</i>	F	2.6	9.5	Nascido no CPRJ	07/01/2002
2098	<i>Sapajus xanthosternos</i>	F	2.4	9.0	Nascido no CPRJ	25/11/2002
2110	<i>Sapajus robustus</i>	F	3.2	8.5	Capturado em Belo Horizonte, MG	07/04/2003
2125	<i>Sapajus xanthosternos</i>	F	3.1	8.0	Nascido no CPRJ	06/10/2003
2135	<i>Sapajus xanthosternos</i>	F	2.3	7.6	Nascido no CPRJ	15/02/2004
2183	<i>Sapajus xanthosternos</i>	F	2.0	6.1	Nascido no CPRJ	20/12/2004
2203	<i>Aotus nigriceps</i>	M	0.7	7.0	Velho Jatobá, Sorocaba, SP	11/04/2005
2207	<i>Sapajus robustus</i>	M	3.5	9.0	Selvagem capturado em Porto Seguro, BA	05/05/2005
2208	<i>Sapajus robustus</i>	F	2.9	9.0	Selvagem capturado em Porto Seguro, BA	05/05/2005
2209	<i>Sapajus robustus</i>	M	2.2	7.0	Selvagem capturado em Porto Seguro, BA	05/05/2005
2297	<i>Sapajus robustus</i>	F	2.0	8	Nascido no CPRJ	21/04/2003
2299	<i>Saimiri sciureus</i>	M	0.8	6.0	Cachoeiras de Macacu, RJ, capturado de cativo ilegal	03/07/2007
2324	<i>Sapajus xanthosternos</i>	F	2.45	3.5	Nascido no CPRJ	10/01/2008
2360	<i>Sapajus robustus</i>	F	2.2	3.0	Nascido no CPRJ	06/10/2008
2388	<i>Sapajus xanthosternos</i>	M	2.4	3.0	Nascido no CPRJ	22/11/2008
2392	<i>Sapajus xanthosternos</i>	F	1.2	2.1	Nascido no CPRJ	08/12/2008
2443	<i>Alouatta guariba clamitans</i>	M	6.25	5.0	Selvagem capturado em Cachoeira de Macacu, RJ	28/09/2009
2456	<i>Sapajus robustus</i>	M	1.8	2.0	Nascido no CPRJ	18/12/2009
2465	<i>Callicebus moloch donacophilus</i>	F	1.6	3.0	Zoo Ecológico de Quinzinho de Barros, SP	25/01/2009
2466	<i>Callicebus personatus</i>	F	1.0	4.0	Selvagem capturado em Belo Horizonte, MG, transferido para o Zoo de Sorocaba, SP	25/01/2010
2501	<i>Cebus sp.</i>	M*	3.1	2.5	Parque dos Passaros, Rio das Ostras, RJ	09/06/2010
2503	<i>Cebus sp.</i>	F*	2.4	15	Centro de Triagem de animais silvestres, Viçosa, MG, pais selvagens	22/07/2010
2504	<i>Cebus sp.</i>	F*	2.1	2.5	Centro de Triagem de animais silvestres, Viçosa- MG	22/07/2010
2559	<i>Cebus sp.</i>	F*	2.3	5.5	Zoologico of Bom Jardim, RJ	15/06/2011

2536	<i>Sapajus xanthosternos</i>	M	1.7	1.0	Nascido no CPRJ	19/10/2010
2539	<i>Sapajus xanthosternos</i>	M	2.3	4.0	Nascido no CPRJ	ND
2576	<i>Alouatta caraya</i>	M	7.5	4.0	Recreio dos Bandeirantes, Estácio de Sá, RJ	11/11/2011

1. *Híbrido, ND – não determinado.

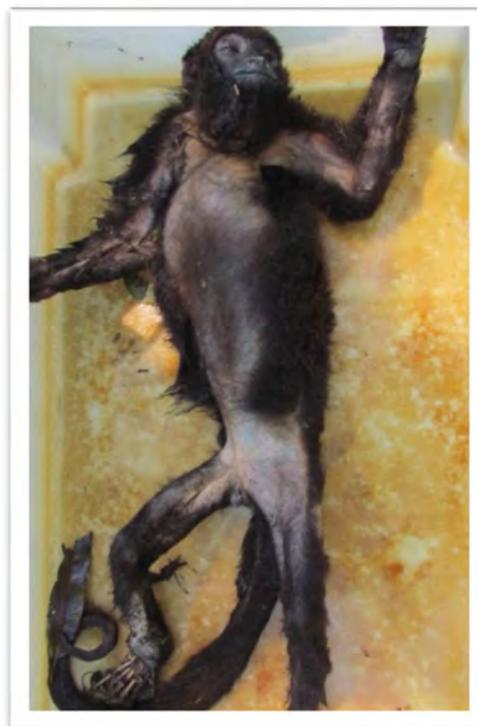


Figura 13: Carcaça de fêmea de *Alouatta g. clamitans* de vida livre. O animal foi encontrado nos arredores do CPRJ em dezembro de 2013. A causa da morte é desconhecida. Fonte: Foto retirada pela equipe do CPRJ em dezembro de 2013.

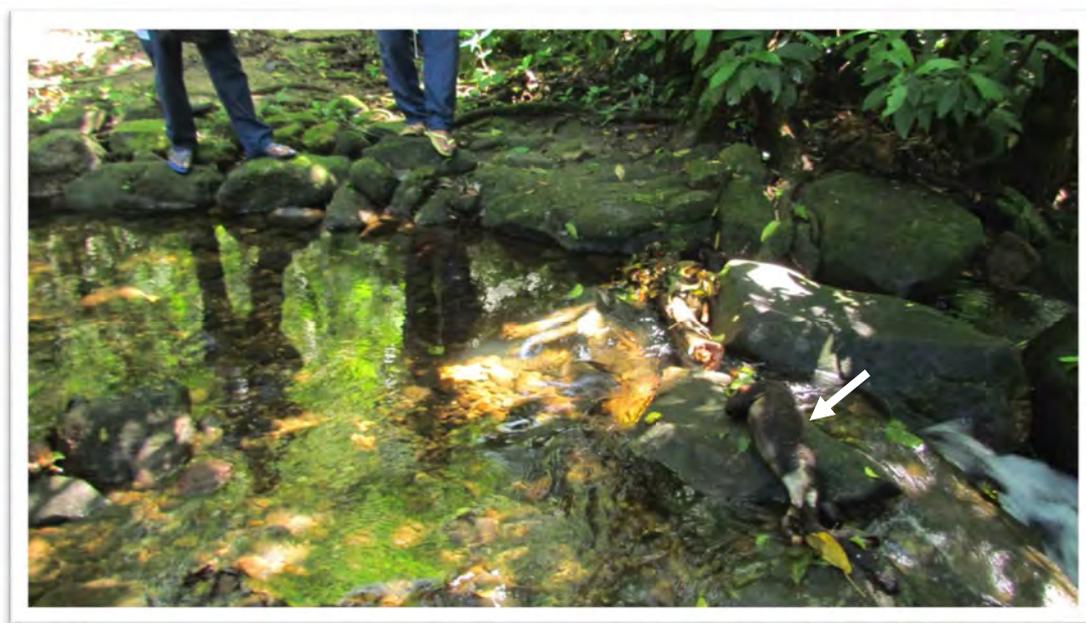


Figura 14: Local onde *Alouatta g. clamitans* de vida livre foi encontrado morto. O animal (indicado pela seta) foi encontrado por funcionários do CPRJ, nos arredores do Centro. Fonte: Foto retirada pela equipe do CPRJ em dezembro de 2013.

4.4.1 Extração de DNA a partir de sangue total

A partir das 30 amostras coletadas de sangue total, foi realizada a extração de DNA utilizando o kit Gentra Puregene Blood kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) de acordo com as especificações do fabricante. Resumidamente, para cada 1 mL de sangue total foram acrescentados 3 mL de solução de lise para eritrócitos. Após lise visível (\pm 10 minutos), a mistura foi centrifugada a 2000 x g, por 10 minutos a 25 °C. O sobrenadante foi então removido e o material ressuspenso em 1 mL de solução de lise celular. Em seguida, foram adicionados 300 μ L de solução de precipitação de proteína, sendo o material submetido por 30s em agitador de tubos (vórtex), e centrifugado a 2000 x g, por 10 minutos a 25 °C. O sobrenadante contendo o DNA solúvel foi precipitado em um tubo contendo 1 mL de isopropanol P.A. (Merck) a 4 °C. Em seguida, o DNA foi centrifugado a 2000 x g, por 3 minutos, a 25 °C, sendo o sobrenadante descartado. Foi adicionado 1 mL de etanol 70% para a lavagem do DNA seguido de centrifugação a 2000 x g, por 1 minuto, a 25 °C. O sobrenadante foi novamente descartado e após a completa evaporação do etanol por aproximadamente 15 min, o DNA foi hidratado com 330 μ L de solução de hidratação (Tris-hidrometil aminometano, EDTA) e incubado por 1 hora, a 65 °C e o DNA extraído foi armazenado a -20 °C até o seu uso.

4.4.2 Extração de DNA a partir de tecidos

A extração de DNA foi realizada utilizando o Gentra Puregene kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands) de acordo com as especificações do fabricante. Primeiramente o órgão foi macerado. Para cada 25 mg de amostra foram acrescentados 80 μ L de PBS e 100 μ L de solução de lise ATL, em um tubo Eppendorf (1,5 mL). Após esse passo, foi adicionado 20 μ L de Proteinase K. A mistura foi vortexada, e incubada por 3 horas a 56°C, e centrifugado brevemente. Em seguida foi adicionado 200 μ L de Tampão AL, vortexado e incubado por 10 minutos a 70°C. Foi adicionado no tubo 200 μ L de etanol (Merck), levado ao vortex e centrifugado brevemente. Em seguida, a amostra foi colocada em uma coluna, centrifugada a 8000 rpm, por 1 minuto, a 25°C, sendo o sobrenadante descartado. Foi adicionado 500 μ L de AW1, centrifugada a 8000 rpm, por 1 minuto, a 25°C, sendo o filtrado descartado. Em seguida foi adicionado 500 μ L de AW2, centrifugada a 14000 rpm, por 3 minutos, a 25°C, sendo o sobrenadante descartado, e posteriormente centrifugada a 14000 rpm, por mais 1 minuto, a 25°C, e o sobrenadante novamente descartado. A coluna foi colocada em um novo tubo e o DNA foi hidratado com 200 μ L de solução de hidratação (AE) e incubado por 3 minutos e centrifugado a 8000 rpm, por 1 minuto. Esse passo foi repetido mais uma vez, após 3 minutos. O DNA extraído foi armazenado a -20°C até o seu uso. As concentrações das soluções utilizadas em cada um dos kits não são disponibilizadas pelo fabricante.

4.5 PCR de citocromo B de mamíferos

A fim de averiguar se as extrações de DNA foram realizadas com sucesso e se os DNAs obtidos eram de qualidade satisfatória, as amostras de DNA foram submetidas a uma PCR para amplificar um fragmento do gene citocromo B de mamíferos (iniciadores apresentados na Tabela 3). As amostras de DNA dos primatas não humanos deste estudo foram amplificadas através da PCR baseando-se na metodologia descrita por Kocher et al. 1993, com modificações. Este protocolo amplifica o gene citocromo B de mamíferos gerando um fragmento de 350 pb para primatas neotropicais. A reação foi realizada em volume de 20 μ L utilizando-se: 2 μ L de DNA, 0,625 μ M de cada um dos iniciadores, 0,125 μ M de cada um dos dNTPs, 1,875 mM de MgCl₂, 1 U de Taq DNA Polimerase (*Invitrogen*, California, USA) e o tampão da Taq DNA polimerase 10 X. As amplificações foram realizadas no termociclador *Mastercycler® personal*

– Eppendorf, sendo as condições da PCR para a reação: 95 °C por cinco minutos, 35 ciclos com 95 °C por trinta segundos, 58 °C por trinta segundos, 72 °C por um minuto, após estes ciclos um passo de extensão a 72 °C por seis minutos e 4 °C por tempo ilimitado.

4.6 Diagnóstico molecular: reação em cadeia da polimerase (PCR)

As amostras foram submetidas à Nested-PCR (SNOUNOU et al. 1993), que amplifica na primeira reação um fragmento gênero-específico de 1200 pb do gene que codifica a subunidade menor do RNA ribossomal utilizando-se os iniciadores rPLU5 e rPLU6. Na segunda reação, seqüências espécie-específicas são amplificadas (rFAL1-rFAL2, rVIV1-rVIV2, rMAL1-rMAL2 para *P. falciparum*, *P. vivax*, e *P. malariae*, respectivamente). Os iniciadores estão apresentados na Tabela 3. As reações foram realizadas em volumes de 20 µL utilizando-se: 100-200 ng de DNA, 0,25 µM de cada um dos iniciadores, 10 µL de Master Mix (PROMEGA-0,3 U Taq DNA Polimerase, 200 µM de cada um dos dNTPs e 1,5 mM de MgCl₂). As amplificações foram realizadas no termociclador PTC-100™ Version7.0 - MJ Research e as condições da PCR foram, para a primeira reação: um ciclo de 95 °C por cinco minutos, 58 °C por dois minutos, 72 °C por dois minutos, 24 ciclos de 94 °C por um minuto, 58 °C por dois minutos, 72 °C por cinco minutos, 4 °C por tempo ilimitado. A segunda reação foi realizada nas mesmas condições, porém com 29 ciclos, utilizando-se 0,8 µL do produto amplificado da primeira reação como DNA molde.

4.7 Visualização dos fragmentos por gel de agarose

A visualização dos fragmentos amplificados foi feita em eletroforese em gel contendo 1.5% de agarose (Invitrogen) dissolvida em tampão TAE 1x (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA), sendo adicionados 5 µg/mL de brometo de etídio (Invitrogen). As amostras de DNA foram misturadas ao tampão de amostra Orange 5X (Alaranjado G da VETEC e Ficol da Sigma) e aplicadas em cada uma das canaletas do gel de agarose. A corrida eletroforética foi realizada em um sistema horizontal (Bio-Rad) a 100V, por cerca de 30 minutos em TAE 1X. O gel foi analisado em transluminador ultravioleta (UVP - Bio-Doc it System) e arquivado em sistema digital.

Para evitar a contaminação cruzada, a extração de DNA e a preparação do Master Mix foram realizadas em "salas livres de DNA do parasita" distintas umas das outras. Além disso, cada uma dessas áreas separadas tem diferentes conjuntos de pipetas e todos os procedimentos

foram realizados utilizando ponteiras com filtro. A extração de DNA foi realizada duas vezes em dias diferentes. Cada reacção de PCR teve um controlo negativo, onde o DNA foi substituído por água e também controles positivos para cada par de iniciadores.

4.8 Controles das reacções de PCR

Em todos os ensaios de PCR foram utilizados controles positivos e negativos nas reacções. Os controles positivos utilizados foram: (i) DNA de *P. falciparum*, cepa 3D7 mantida no Laboratório de Malária (CPqRR-FIOCRUZ MINAS); (ii) DNA de paciente com alta parasitemia para *P. vivax* e DNA de *P. simium* obtido de símio com infecção aguda e parasitemia confirmada pela microscopia óptica (BL10); (iii) DNA de *P. brasilianum* do MR4 (Banco Internacional de Reagentes de Referência de Malária – ATCC, USA).

Tabela 3. Resumo das condições das reacções de PCR utilizadas nesse estudo.

PCR	Alvo	Iniciadores	Sequência de nucleotídeos (5' – 3')	Tamanho do fragmento	Referência
Nested 1ª Reacção	Gene 18S de <i>Plasmodium sp.</i>	rPLU5 rPLU6	5'CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC 3' 5'TTAAAATTGTTGCAGTTAAACG3'	1200 pb	SNOUNOU et al. 1993
Nested 2ª Reacção	Gene 18S de <i>P. vivax</i> , <i>P. falciparum</i> e <i>P. malariae</i>	rVIV1	5'CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC3'	120 pb	SNOUNOU et al. 1993
		rVIV2	5'TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT3'	205 pb	
		rFAL1 rFAL2	5'TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT3' 5'ACACAATGAACTTCAATCATGACTACCCGTC3'	144 pb	
PCR Convencional	Citocromo B de mamíferos	cyBF cyBR	5' CCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA 3CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA 3'	350 pb	KOCHER et al. 1989

4.9 Purificação dos produtos de PCR

Para o sequenciamento de DNA, cada amostra foi purificada a partir do produto de PCR em reacções de 50 µL, utilizando-se o kit de purificação QIAquick® (Qiagen, Venlo, Netherlands).

Inicialmente, foram adicionados 5 vezes o volume do tampão PB para cada o volume da reacção de PCR, homogeneizando completamente. Em seguida, a mistura foi adicionada à coluna QIAquick® acoplada a um tubo de coleta de 2 mL fornecido no kit e centrifugada a 12000 rpm por 60 segundos. Posteriormente, o filtrado foi descartado e a coluna foi recolocada

no mesmo tubo. Foram acrescentados 0,75 mL de tampão PE à coluna QIAquick®, centrifugando por 60 segundos a 12000 rpm. Em seguida o filtrado foi descartado e a coluna recolocada para mais um passo de centrifugação por um minuto, em rotação máxima. Finalmente, a coluna QIAquick® foi acoplada a um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL novo, onde foram adicionados 30 µL do tampão EB (Tris 10 mM, pH 8,5) ou água (pH 8,5) no centro da membrana para eluir o DNA. O material foi centrifugado por 1 minuto a 12000 rpm e armazenado a 4 °C até o uso. Cada um dos produtos foi analisado em gel de agarose corado com brometo de etídio e dosados em espectrofotômetro Nanodrop®.

4.10 Reação de Sequenciamento

Para a reação de sequenciamento foi utilizado o kit Big Dye® Terminator v3.1 cycle sequencing (Applied Biosystems, Califórnia, USA). As reações foram conduzidas em um volume final de 10 µL com cerca de 10 ng de DNA, 3,3 µM de iniciador (senso ou anti-senso), 1 µL do mix Big Dye® Terminator. As reações foram realizadas no termociclador Veriti® (Applied Biosystems, Carlsbad, CA), sendo as condições da amplificação: 96 °C por um minuto, 35 ciclos a 96 °C por quinze segundos, 60 °C (variando de acordo com a temperatura do iniciador) por quinze segundos e após estes ciclos, um passo de extensão final a 60 °C por quatro minutos.

4.11 Reação de precipitação

Para precipitação do DNA, em cada poço da placa MicroAmp 96-well® Reaction plate (Applied Biosystems, Califórnia, USA) foram adicionados 1 µL de EDTA 125 mM, 1 µL de acetado de amônio 7,5 M e 50 µL de etanol absoluto P.A. gelado. Em seguida, a placa foi selada e vortexada brevemente. Logo após, a placa foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente e centrifugada por 45 minutos a 3700 r.p.m. também em temperatura ambiente. A placa foi vertida e o sobrenadante foi descartado. Em cada poço foram adicionados 100 µL de etanol 70% gelado. A placa foi centrifugada por 15 minutos a 3700 r.p.m. em temperatura ambiente e foi vertida de forma que o sobrenadante fosse descartado. Em seguida a placa foi centrifugada em posição invertida a 3700 rpm por dois minutos. Finalmente, o DNA foi ressuspendido com formamida HI-DI™ (Applied Biosystems, Califórnia, USA). A placa foi novamente selada e vedada em papel alumínio e analisada em sequenciador automático 37300

ABI pela plataforma de sequenciamento da FIOCRUZ MINAS, conforme procedimentos de rotina.

4.12 Análise das sequencias

Os dados brutos obtidos do sequenciador automático ABI foram inicialmente analisados no programa BLASTn (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), a fim de se confirmar o gene sequenciado e a cobertura do sequenciamento. Cada sequência foi também analisada individualmente pelo Chromas Lite versão 2.1.1, que fornece o “*base-calling*”, onde é possível avaliar a qualidade dos cromatogramas gerados pelo sequenciador automático. Os alinhamentos das sequências e a obtenção da sequência consenso foram realizados com o software de alinhamento múltiplo *ClustalW* (Thompson *et al.*, 1994) e *Contig Assembly Program (CAP)* (Huang, 1992), dentro do pacote de programas *BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.9* (Hall, 1999). No *BioEdit*, quando necessário, foi realizada a edição manual do alinhamento do gene sequenciado. O alinhamento também foi realizado utilizando o software *Muscle*, implementado no MEGA. As sequências de referência de *Plasmodium* utilizadas estão disponíveis no GenBank [número de acesso]: *P. vivax* [GenBank: AY579418.1], *P. cynomolgi* [Genbank: JQ794445.1], *P. knowlesi* [GenBank: AY579417], *P. falciparum* [GenBank: JQ627150.1], *P. malariae* [GenBank: GU815531.1], *P. brasilianum* [GenBank: KC906730.1] e *P. ovale* [GenBank: KF018663.1].

4.13 Análises Filogenéticas

As análises filogenéticas foram realizadas no software MEGA versão 5.0 (Tamura *et al.*, 2011), utilizando o método de Máxima Verossimilhança (Saitou & Nei, 1987). A consistência dos padrões de agrupamento na árvore foi avaliada através do método de bootstrap com 5000 repetições. Para reconstrução da filogenia, o modelo evolutivo foi selecionado utilizando o MEGA, que elege entre as matrizes de substituição candidatas, o modelo que melhor se adequa para o conjunto de dados. Para as análises do gene 18SSU rRNA utilizou-se o modelo de substituição nucleotídica descrito por Tamura (1992). Esse modelo assume que a diferença na composição das bases reflete as diferenças nas taxas de transições e transversões. Todas as figuras das árvores filogenéticas foram geradas no software MEGA 5.0 a partir dos arquivos de saída no formato gráfico PNG.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão serão apresentados na forma de artigo publicado.

RESEARCH

Open Access

Simian malaria in the Brazilian Atlantic forest: first description of natural infection of capuchin monkeys (Cebinae subfamily) by *Plasmodium simium*

Denise Anete Madureira de Alvarenga¹, Anielle de Pina-Costa^{2,3}, Taís Nóbrega de Sousa¹, Alcides Pissinatti^{4,5}, Mariano G Zalis⁶, Martha C Suárez-Mutis⁷, Ricardo Lourenço-de-Oliveira⁸, Patrícia Brasil², Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro^{3,9} and Cristiana Ferreira Alves de Brito^{1*}

Abstract

Background: In Brazil, two species of *Plasmodium* have been described infecting non-human primates, *Plasmodium brasilianum* and *Plasmodium simium*. These species are morphologically, genetically and immunologically indistinguishable from the human *Plasmodium malariae* and *Plasmodium vivax* parasites, respectively. *Plasmodium simium* has been observed naturally infecting monkeys of the genera *Alouatta* and *Brachyteles* in a restricted area of the Atlantic Forest in the south and southeast regions of Brazil. However, its reported geographical distribution and the diversity of its vertebrate hosts may be underestimated, since available data were largely based on analyses by microscopic examination of peripheral blood, a method with limited sensitivity, considering the potential sub-patent feature of these infections. The present study describes, for the first time, the natural infection of *P. simium* in capuchin monkeys from the Brazilian Atlantic Forest.

Methods: Blood samples from 30 non-human primates belonging to nine species kept in the Primate Centre of Rio de Janeiro were collected. Fragments of spleen and liver from one dead monkey found in the neighborhoods of the Primate Centre were also analysed. Molecular diagnosis was performed by nested PCR (18SSU rRNA) and the amplified fragment was sequenced.

Results: Thirty per cent of the captive animals were infected with *P. simium* and/or *P. brasilianum*. The dead monkey tested positive for DNA of *P. simium*. For the first time, Cebinae primates (two specimens of genus *Cebus* and two of genus *Sapajus*) were found naturally infected by *P. simium*. The infection was confirmed by sequencing a small fragment of 18SSU rRNA.

Conclusion: The results highlight the possibility of infection by *P. simium* in other species of non-human primates whose impact could be significant for the malaria epidemiology among non-human primates and, if it becomes clear that this *P. simium* is able to infect monkeys and, eventually, man, also for the maintenance of transmission of human malaria in the context of a zoonosis in areas under influence of the Atlantic Forest.

Keywords: Simian malaria, *Plasmodium simium*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium brasilianum*, *Plasmodium malariae*, Cebinae, Molecular diagnosis, Atlantic forest

* Correspondence: cristiana@cpqrr.fiocruz.br

¹Laboratório de Malária, Centro de Pesquisa René Rachou (CPqRR), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), MG, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 de Alvarenga et al.; licensee BioMed Central. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Malaria, one of the major public health problems in the world, is a mosquito-borne disease caused by parasites of the genus *Plasmodium* that affects mammals, reptiles and birds [1]. *Plasmodium* species causing infection of non-human primates are of great interest because they may be naturally or accidentally transmitted to humans [2-7]. In Brazil, a country that holds the largest species diversified simian fauna of the planet, only two simian *Plasmodium* species have been found infecting non-human primates: *Plasmodium brasilianum* and *Plasmodium simium*. These species are morphologically, genetically and immunologically indistinguishable from the human malaria parasites *Plasmodium malariae* and *Plasmodium vivax*, respectively [8-11]. Both, *P. brasilianum* and *P. simium* are infective to human [2,12].

Plasmodium brasilianum has a wide distribution in Central and South America, where it has been found in Brazil, Colombia, Venezuela, Panama, and Peru naturally infecting a large number of species belonging to all families of New World non-human primates, i.e., Aotidae, Atelidae, Cebidae, and Pitheciidae families [9,13]. In Brazil, excepting the arid portions in the northeast and savannah in the southeast, the territory range of *P. brasilianum* includes all regions and overlaps that of *P. simium*, which is restricted to the Atlantic Forest in the south and southeast [9]. Contrarily to *P. brasilianum*, *P. simium* has been detected infecting only two Atelidae genera: *Alouatta* (howler monkeys) and *Brachyteles* (woolly spider monkeys) [9,14,15]. However, most of the previous simian malaria surveys performed in the Atlantic Forest were based on microscopy of blood smears [9]. Given to the great diversity of primates in the Brazilian Atlantic Forest it is expected that, with the use of more sensitive diagnostic methods, the determination of the real rate of infection in monkeys and, eventually, the expansion of the list of potential hosts would be possible.

According to the National Malaria Control Program (PNCM), Secretary for Health Surveillance (SVS), Ministry of Health, from January 2006 to December 2013, 8,410 cases of malaria were reported in extra-Amazon region, 1,068 of them being autochthonous [16]. In 2013, from the 827 registered extra-Amazonian cases, 10.6% (88 cases) were due to autochthonous transmission, corresponding to 0.05% of the total cases in Brazil [17]. In south and southeastern Brazil, human malaria transmission has been essentially eliminated or has been reported during scattered outbreaks of introduced cases, due to imported ones, for more than four decades [17-19]. However, few autochthonous human malaria cases and outbreaks have been reported associated with the Atlantic Forest environment, particularly in its mountain valleys in southeast Brazil [9,17,19,20]. In such environments, malaria transmission is supported by the bromeliad mosquito

Anopheles (Kerteszia) cruzii, which has been proved to be the natural vector of both human and simian malaria in south and southeast Brazil [9]. Therefore, Deane and colleagues in the 1990s and others [8,9,15,17,21] have suggested that human malaria in the Atlantic Forest could be a zoonosis where non-human primates are the reservoirs.

Autochthonous human malaria cases reported in the mountain valleys of the Atlantic Forest environment in Rio de Janeiro State motivated the search for natural simian plasmodial infections in this region [17]. The present study describes for the first time the natural infection of *P. simium* in the subfamily Cebinae by using molecular approaches.

Methods

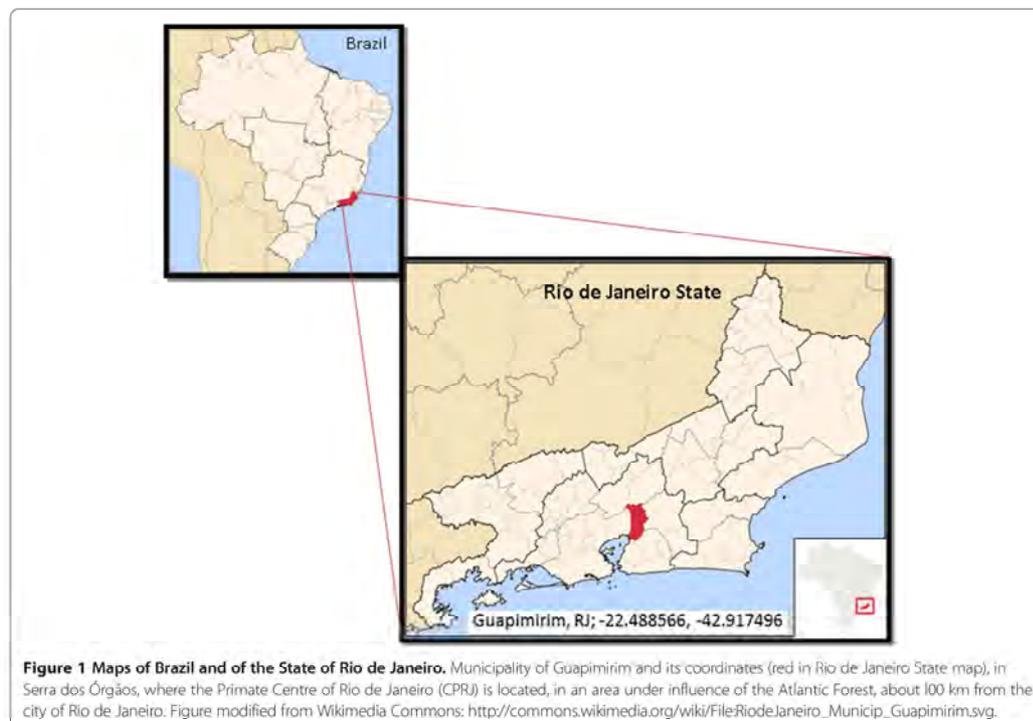
Origin of primate specimens

Animals used in this study were captive primates from the Primate Centre of Rio de Janeiro (CPRJ). The CPRJ (IBAMA register number 458460) is a unit for wild monkey protection and is located in the municipality of Guapimirim, on the Serra dos Órgãos slopes (Figure 1), in an area under influence of the Atlantic Forest, about 100 km from the city of Rio de Janeiro. Serra dos Órgãos is part of the large coastal mountain chain in southeast Brazil named Serra do Mar. One wild animal, identified as an adult female of *Alouatta guariba clamitans*, was found dead nearby the CPRJ in December 2013 and an autopsy was performed, and spleen and liver fragments were included in the analysis. The present study was conducted in response to a demand of the Health Secretary of Rio de Janeiro State, to the Centro de Pesquisa, Diagnóstico e Treinamento em Malária (CPD-Mal), Fiocruz, in the context of an investigation on the autochthonous human cases registered in the surroundings of the CPRJ, and it had, therefore, the authorization of the Fiocruz Human Ethical Committee. As the handling of monkeys was exclusively done by CPRJ technicians, Fiocruz Animal Ethics Committee (CEUA) agreed to the protocol for sample collection.

Samples collection and DNA extraction

A total of 30 captive primates were sampled (Additional file 1) in November 2011. Of these, 18 were female (62%); the average age was six years, median of seven years (1-14). The average weight was of 2,800 g (700-7,500 g). No animal was splenectomized at the time of sample collection. Approximately 2 ml of blood were taken in vacuum tubes containing EDTA by femoral venipuncture. For just a few individuals sedation with Quetamina® and Midazolam was required. The samples collection was performed by the Med Vet Alcides Pissinatti, the blood samples were frozen and sent to the Malaria laboratory of the CPqRR, Fiocruz.

DNA extraction from blood samples was made using the Gentra Puregene Blood kit (Qiagen, Venlo, The



Netherlands) according to manufacturer's recommendations. Fragments of spleen and liver from the dead monkey were used for DNA extraction using the Gentra Puregene kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands) according to manufacturer's recommendations. The DNA was eluted in a 100 μ L volume and stored at -20°C until it was used.

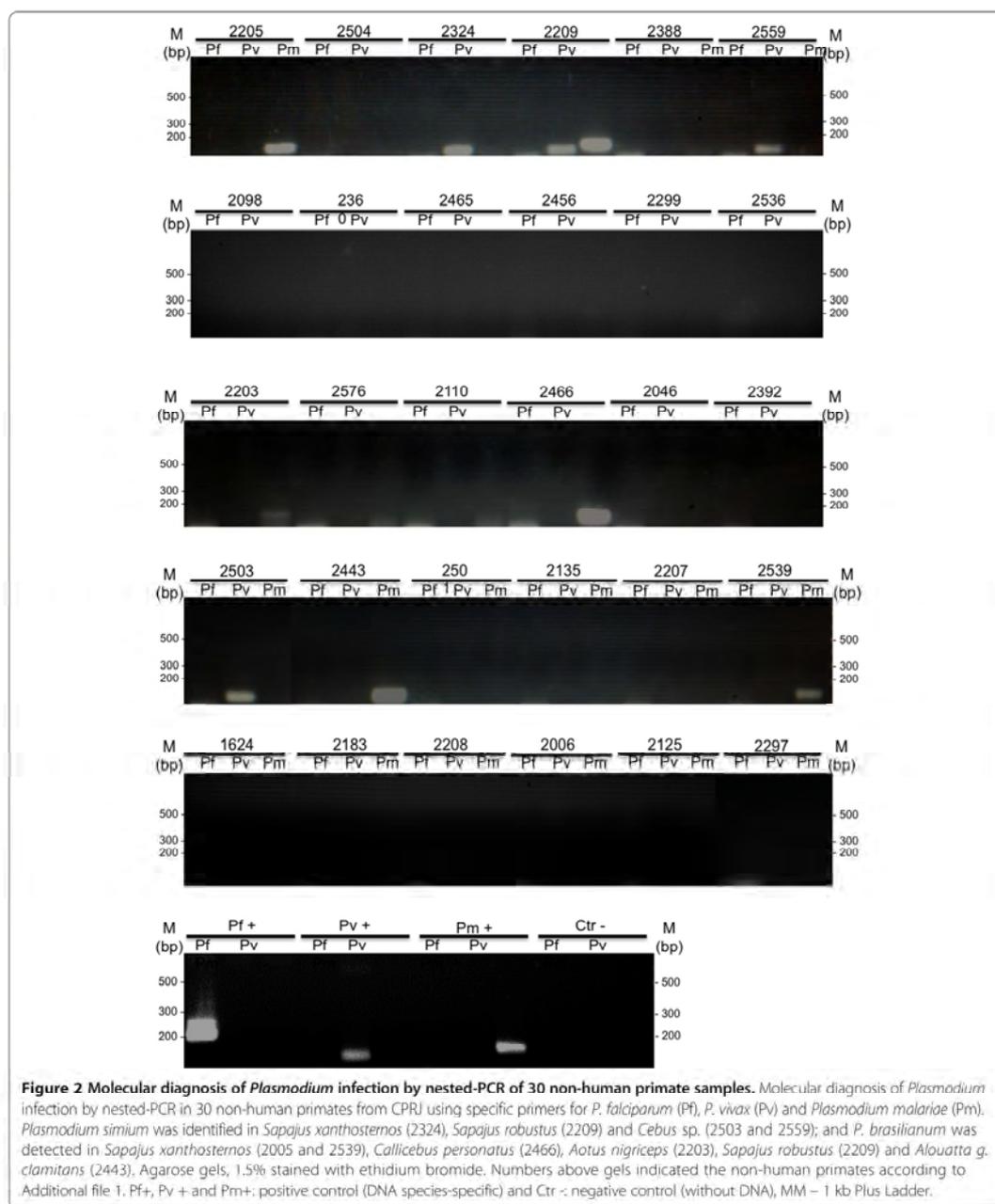
Nested-PCR

The samples were subjected to nested-PCR [22] using primers for identification of human *Plasmodium* species, targeting the small subunit of 18S ribosomal RNA gene (18SSU rRNA). Briefly, all PCR reactions were performed in 20 μ L volumes containing 250 μ M each oligonucleotide primer, 10 μ L of Master Mix (Promega) (0.3 units of Taq Polymerase, 200 μ M each deoxyribonucleotide triphosphates and 1.5 mM MgCl_2) and 2 μ L DNA. The PCR assays were performed using an automatic thermocycler (PTC-100TM v.7.0) (MJ Research Inc, USA) and the following cycling parameters were used: an initial denaturation at 95°C for 5 min followed by 24 cycles of annealing at 58°C for 2 min, extension at 72°C for 2 min and denaturation at 94°C for 1 min followed by a final annealing incubation at 58°C for 2 min and extension at 72°C for 2 min. The temperature was then reduced

to 4°C until the samples were taken. The cycling parameters for the second round of PCR were the same as the first reaction, but instead 30 cycles of amplification were used.

To prevent cross-contamination, the DNA extraction and master mix preparation were performed in "parasite DNA-free rooms" distinct from each other. Furthermore, each of these separate areas has different sets of pipettes and all procedures were performed using plugged pipette tips. DNA extraction was performed twice at different days. Every PCR reaction had a negative control, where DNA has replaced by water and also positive controls for each pair of primers. The sources of genomic DNA samples that served as positive controls in the nested PCR assays are: i) *P. falciparum* DNA, strain 3D7 maintained in Malaria Laboratory (CPqRR-FIOCRUZ MINAS); (ii) DNA of patient with high parasitaemia for *P. vivax* and DNA of *P. simium* of a non-human primate with an acute infection and parasitaemia confirmed by optical microscopy (BL10); (iii) DNA of *P. brasilianum* of MR4 (Malaria Research and Reference Reagent Resource Center – ATCC, USA).

The amplified fragments were visualized in electrophoresis on 1.5% agarose gel dissolved in 1x TAE buffer



(40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) with 5 µg/mL ethidium bromide (Invitrogen) in a horizontal system (Bio-Rad) at 100 V for about 30 min. The gels were be examined under UV transilluminator (UVP - Bio-Doc

System it) and were filed under digital system. Electrophoresis was performed in a room specific for amplified DNA, with appropriated sets of pipettes and plugged pipettes tips.

Sequencing of PCR-amplified DNA

For DNA sequencing, PCR products were purified using Purification Kit QIAquick (Qiagen) following manufacturer's procedure. Around 3 ng of purified PCR products were amplified using 2.0 μ M of each primer (forward or reverse of species-specific primers of second reaction) and 1 μ L of Big Dye terminator kit in a program of: 96°C for 1 min, 35 cycles of 96°C for 15 sec, the temperature of primer annealing for 15 sec and 60°C for 15 sec. The fragments were precipitated using ammonium acetate, resuspended in formamide HI-DI (Applied Biosystems) and electrophoretically separated in ABI 3730 DNA automatic sequencer.

Data analysis

The sequence data were analysed using the Blast program and the sequences aligned using the Clustal W and CAP3 programs in Bioedit package and also Muscle multiple alignment program [23]. The tree was constructed using the maximum likelihood method with Tamura 3-parameter model [24] and 5,000 bootstrap replicates in MEGA 6.0 software [25].

Results

Molecular diagnosis was performed in samples from 30 non-human primates from the CPRJ, and nine samples (30%) were found to be positive by nested-PCR: five samples were positive for *P. brasilianum*; three samples were positive for *P. simium* and one sample was positive for both *P. simium* and *P. brasilianum* (Figure 2). Negative controls never showed any amplified fragments and positive controls showed fragments with the expected sizes (Figure 2). *Plasmodium simium* was identified in *Sapajus xanthosternos*, *Sapajus robustus* and *Cebus* sp.; and *P. brasilianum* was detected in *Sapajus xanthosternos*, *Sapajus robustus*, *Callicebus personatus*, *Aotus nigriceps* and *Alouatta g. clamitans* (see Additional file 1). The dead wild monkey found nearby the CPRJ, sample MP1943, an *Alouatta g. clamitans*, was also found positive for *P. simium* by using DNA obtained from the spleen fragment and, with less intensity of amplification, from the liver fragment (Figure 3).

A species-specific fragment of 18SSU rRNA from *P. simium* identified in the molecular diagnosis was sequenced to confirm the infection for *P. simium* in monkeys from the Cebinae subfamily. Then the nucleotide sequence of 18SSU rRNA fragments from four infected animals (2324, 2559, 2503, and MP1943) identified here were compared to *P. vivax* and other *Plasmodium* species sequences available at Genbank (Figure 4). From the alignment, the high genetic similarity between *P. simium* and *P. vivax* was evident (one difference out of 86 nt). It was also able to discern between the *P. vivax/P. simium* from the other species of *Plasmodium*. In addition, this alignment was used to

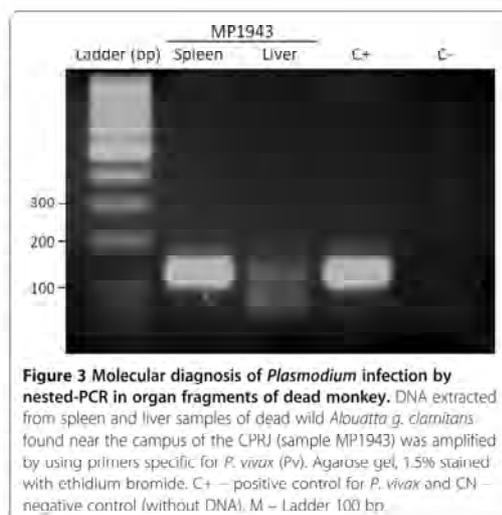


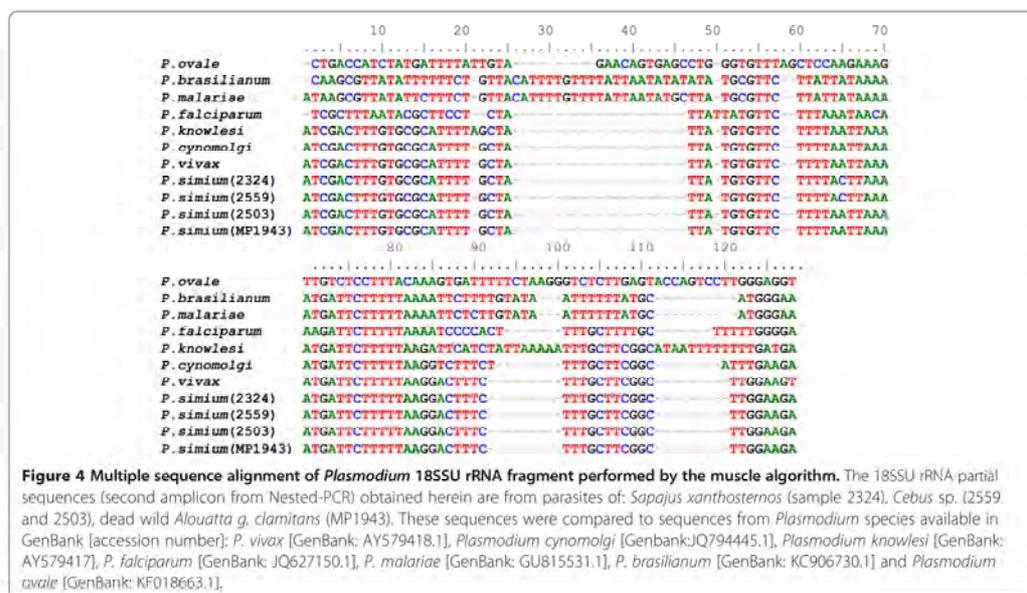
Figure 3 Molecular diagnosis of *Plasmodium* infection by nested-PCR in organ fragments of dead monkey. DNA extracted from spleen and liver samples of dead wild *Alouatta g. clamitans* found near the campus of the CPRJ (sample MP1943) was amplified by using primers specific for *P. vivax* (Pv). Agarose gel, 1.5% stained with ethidium bromide. C+ – positive control for *P. vivax* and C- – negative control (without DNA). M – Ladder 100 bp.

reconstruct the phylogenetic relationships of the simian and human *Plasmodium*. *Plasmodium simium* sequences clustered in a single branch. Moreover, all samples of *P. simium* are in the clade of *P. vivax*, reinforcing the genetic similarity between these parasites (Figure 5).

Discussion

By molecular analysis of blood samples of 30 captive primates from a primate center in southeastern Brazil, 30% of the individuals were found infected with *Plasmodium*. Moreover, the dead monkey (*Alouatta clamitans*) found close to the CPRJ and also studied here showed infection by *P. simium* through detection of *Plasmodium* DNA in spleen and liver fragments. Interestingly, previous surveys based on microscopy of simian blood smears conducted in the same primate center (CPRJ) as well in other localities of the state of Rio de Janeiro failed to detect *Plasmodium* infections [26,27].

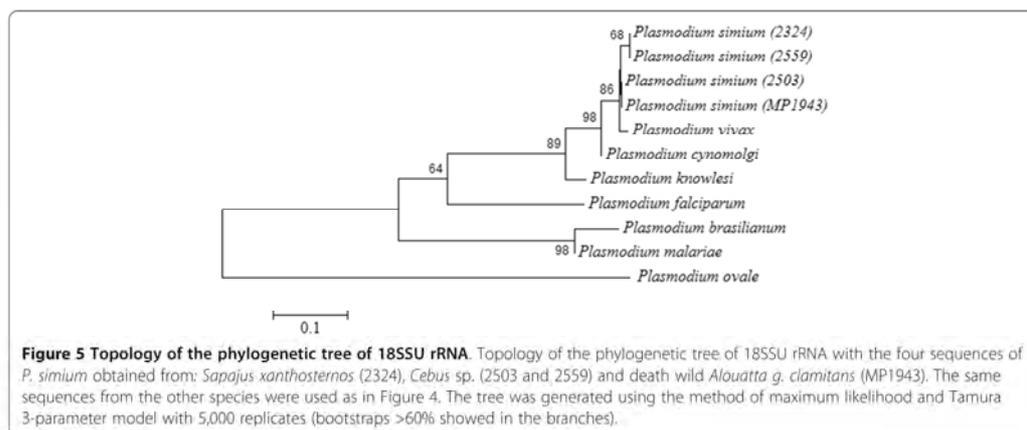
Although microscopic slides were not obtained, the presence of parasite DNA, even indicating possibly a low parasitaemia in the examined animals, points to the identification of a new natural host of *P. simium*: the capuchin monkeys. Capuchin monkeys are New World monkeys of the family Cebidae, subfamily Cebinae, that have the largest geographical distribution among the neotropical primates [28–32]. Prior to 2011, the subfamily Cebinae contained only a single genus, *Cebus*. However, recent studies have suggested the division of capuchin monkeys into two genera, *Sapajus* for robust, tufted capuchins and *Cebus* for untufted, gracile capuchins [33]. *Cebus* and *Sapajus* have been described infected only by *P. brasilianum* [9,34]. However, this study describes that primates belonging to three species from both genera



were found infected by *P. simium*. According to the literature, *P. simium* was described infecting only two species of genus *Alouatta* and one of *Brachyteles* primates [9,15]. Also, no evidence of experimental infection was obtained in splenectomized *Cebus* sp. inoculated with *P. simium* heavily parasitized blood sample [35]. Based on microscopy of blood smears, the natural infection rates for *P. brasilianum* in capuchin monkeys are usually very low compared to other Cebidae species, such as squirrel monkeys, as well as Pitheciidae and Atelidae species [9,13]. Thus, the finding of *P. simium* DNA in blood samples of capuchin monkeys from Rio de Janeiro suggests that these

primates possibly undergoes *Plasmodium* infections with very low or transient parasitaemia.

Although the prevalence of Cebidae monkeys found infected in the CPRJ, which is located inside the Atlantic Forest, is similar to those reported for other species of monkeys found to carry *Plasmodium* parasites in the region [9,15,21], it is still necessary to determine if captive monkeys were caught infected by *Plasmodium* or if the transmission has occurred at the CPRJ, facilitated by the simultaneous presence of the vector and infected monkeys. *Plasmodium* infection detected in one monkey born in CPRJ (monkey 2324), the naturally infected (dead)



wild monkey in the neighborhoods of CPRJ) and the existence of malaria vectors such as *An. (Ker.) cruzii*, *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* and *Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis* in the region may support the latter hypothesis [36,37]. In addition, the high proportion of monkeys found carrying antibodies against blood forms and sporozoites of *P. brasilianum* and *P. simium* may either reinforce the hypothesis of an increased transmission in the CPRJ neighborhoods or suggest that the prevalence of *Plasmodium* infection may be much higher than expected in this area of Atlantic Forest [9,15,21,38].

As all measures to avoid contamination have been undertaken here and the PCR reactions were very well controlled (see Methods) the results presented here can not result from cross-contamination in the laboratory. Therefore, the present list of *P. simium*-susceptible, neotropical, non-human primate species might be incomplete because of the usual nature of sub-patent infections along with the limited sensitivity of the diagnostic methods used, that were mainly based on analyses of peripheral blood microscopy. The findings showed here are strengthened by those of Duarte *et al.* who described the occurrence of antibodies against the *P. vivax* circumsporozoite surface protein (CSP) in *Cebus* sp. from Brazil [11]. The presence of individuals from the *Cebus* genus carrying antibodies against *P. vivax* DBP₁₀, MSP1₁₉ and AMA1 has also been identified by our group in monkeys from different areas (unpublished data).

New World simian *Plasmodium* are very closely related to human *Plasmodium*; *P. brasilianum* and *P. simium* are similar to the human *P. malariae* and *P. vivax* parasites, respectively. The sequencing of a small fragment of the 18SSU rRNA encoding gene showed a high genetic similarity between *P. vivax* and *P. simium*, as demonstrated by Tazi and Ayala [39]. This high identity is also observed in the phylogenetic reconstruction of *P. simium* isolates studied here. It is important to notice that the small size of the sequenced fragment may hinder their ability to reproduce the phylogeny of the genus *Plasmodium*. Moreover, the high level of conservation in 18SSU rRNA among close species, such as *P. vivax* and *P. simium*, hamper the discussion if these species are distinct or not from each other. Many authors based on an analysis of different molecular targets, such as the conserved regions of the gene coding for the circumsporozoite surface protein (CSP) or mitochondrial genes have been suggesting the existence of two different species, *P. simium* and *P. vivax*, very closely related and their origin was through multiple host switches recently in the evolution [40-42].

The evolutionary history of *P. vivax* in the Americas is still very controversial. The most accepted hypothesis is that of post-Columbian origin, where *P. vivax* would have arrived with Europeans during the colonization of the

Americas [43,44]. In the New World, several evidences suggest a recent introduction of *P. vivax* [43,45,46]. The evolutionary history of *P. vivax* in the Americas was studied by analysing the mitochondrial genome variability of these parasites. Many different genetic groups circulating in South America were found, and they have probably originated from independent introductions [47].

Despite the data presented here is not sufficient to support a deep discussion about this subject, the evidence collected so far suggest that *P. simium* is possibly a different species from *P. vivax*, based especially on some differences on the morphology and, more recently, polymorphisms in some genomic sequences. However, additional genomic information on *P. simium* is still needed to support this hypothesis.

Taken together, the data reinforce the hypothesis that non-human primates of Atlantic Forest, including species which have never been incriminated before, such as the capuchins monkeys, could be acting as a reservoir for *Plasmodium*. Once autochthonous human cases of malaria are reported in those regions, the presence of possible wild reservoirs may have important implications for public health, due to close contact between humans and monkeys in some parts of the Atlantic Forest environment [17,19].

Conclusions

The findings presented here might impact the knowledge on the epidemiology of the disease among human and non-human primates in the Brazilian Atlantic Forest. If it becomes clear that the same parasite can infect both humans and monkeys in this area, the presence of possible animal reservoirs may have important implications for public health [48] and areas of Atlantic Forest should be under strict surveillance for the possibility of a zoonotic pattern of malaria transmission. However, more studies are still needed to confirm this, particularly the detection of gametocytes in the monkeys and the identification of the same parasites circulating among the vectors and both hosts: human and simian. Due to the known close similarity between *P. simium* and *P. vivax*, the data reported here indicate that *Cebus* and *Sapajus* monkeys should have their susceptibility to *P. vivax* investigated in order to determine if they could represent new experimental models for studies with human *Plasmodium*, in addition to the *Saimiri* and *Aotus* neotropical monkeys recommended by the World Health Organization [49].

Additional file

Additional file 1: Description of 30 non-human primates studied and molecular diagnosis of *Plasmodium*.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

CTDR, CFAB, PB, APC, MGZ, and RLO conceived the idea and participated in the study design. AP, PB, MCS, and APC were responsible for sample collection. DAMA and TNS carried out the experiments and analysed the data. CFAB, CTDR, RLO, and DAMA drafted the manuscript. All authors read, corrected and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors thank the PDTIS sequencing facilities of FIOCRUZ, Gabriela Assis and Lara Cotta Amaral for assistance on sequencing experiments and the team of the Primate Centre of Rio de Janeiro (CPRJ/INEA). The authors are also grateful to the Parc Zoologique et Botanique Ville de Mulhouse, France; to Jean Marc Lerno, Zoological Society for the Conservation of Species and Populations – München Germany; and to Dr Roland Wirth and the Conservation International (CI), for cooperation in the program for reproduction of *Sapajus* from the Brazilian Atlantic Forest. CFAB, CTDR and RLO are supported by the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)* (through a Research Fellowship). CTDR and RLO are grateful for the support of the *Faperj as Cientistas do nosso Estado*. APC and DAMA received fellowships from the *Coordenação de Pessoal de Ensino Superior (Capes)*. The study received financial support from the Secretary for Health Surveillance (SVS) through the Global Fund.

Author details

¹Laboratório de Malária, Centro de Pesquisa René Rachou (CPqRR), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), MG, Brazil. ²Instituto Nacional de Infectologia (INI), Ambulatório de Doenças Febris Agudas, Fiocruz, RJ, Brazil. ³Centro de Pesquisa, Diagnóstico e Treinamento em Malária (CPD-Mal), Fiocruz, RJ, Brazil. ⁴Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ/INEA), Rio de Janeiro, RJ, Brazil. ⁵Centro Universitário Serra dos Órgãos (UNIFESO), Rio de Janeiro, RJ, Brazil. ⁶Laboratório de Virologia Molecular, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. ⁷Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Doenças Parasitárias, Fiocruz, RJ, Brazil. ⁸Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Laboratório de Transmissores de Hematozoários, Fiocruz, RJ, Brazil. ⁹Laboratório de Pesquisa em Malária (IOC), Fiocruz, RJ, Brazil.

Received: 21 October 2014 Accepted: 3 February 2015

Published online: 18 February 2015

References

- Perkins SL, Austin CC. Four new species of *Plasmodium* from New Guinea lizards: integrating morphology and molecules. *J Parasitol*. 2009;95:424–33.
- Deane LM, Deane MP, Ferreira Neto J. Studies on transmission of simian malaria and on the natural infection of man with *Plasmodium simium* in Brazil. *Bull World Health Organ*. 1966;35:805–8.
- Arruda ME, Nardini EH, Nussenzweig RS, Cochrane AH. Sero-epidemiological studies of malaria in indian tribes and monkeys of the Amazon basin of Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 1989;4:379–85.
- Canéris-Bruno GC, Caravolo RM, Pereira M. Malaria acquired during entomological research in the Serra do Mar, southeastern region of Brazil. *Rev Saude Publica*. 1995;29:142–3.
- Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox-Singh J, et al. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet*. 2004;363:1017–24.
- Ta TH, Hisam S, Lanza M, Jiram AJ, Ismail N, Rubio JM. First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*. *Malar J*. 2014;13:68.
- Yusof R, Lau YL, Mahmud R, Fong MY, Jelip J, Ngian HU, et al. High proportion of *knowlesi* malaria in recent malaria cases in Malaysia. *Malar J*. 2014;13:168.
- Coatney GR. The simian malarial: zoonoses, anthroponoses, or both? *Am J Trop Med Hyg*. 1971;20:795–803.
- Deane LM. Simian malaria in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1992;87 Suppl 3:1–20.
- Leclerc M, Hugot J, Durand P, Renaud F. Evolutionary relationships between 15 *Plasmodium* species from new and old world primates (including humans): an 18S rDNA cladistic analysis. *Parasitology*. 2004;129:677–84.
- Duarte AM, Porto MA, Curado I, Malafrente RS, Hoffmann EH, de Oliveira SG, et al. Widespread occurrence of antibodies against circumsporozoite protein and against blood forms of *Plasmodium vivax*, *P. falciparum* and *P. malariae* in Brazilian wild monkeys. *J Med Primatol*. 2006;35:87–96.
- Garnham PCC. Malaria parasites and other haemosporidia. Oxford: Blackwell; 1966.
- Lourenço-de-Oliveira R, Deane LM. Simian malaria at two sites in the Brazilian Amazon. I – The infection rates of *Plasmodium brasilianum* in non-human primates. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1995;90:331–9.
- Deane LM, Ferreira Neto J, Sítônio JG. A new natural host of *Plasmodium simium* and *Plasmodium brasilianum*: the woolly spider monkey. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1968;10:287–8.
- Duarte AM, Malafrente RS, Cerutti C, Curado I, de Paiva BR, Maeda AY, et al. Natural *Plasmodium* infections in Brazilian wild monkeys: reservoirs for human infections? *Acta Trop*. 2008;107:179–85.
- SIVEP [www.saude.gov.br/svs].
- Pina-Costa A, Brasil P, Santí SM, Araujo MP, Suárez-Mutis MC, Santelli AC, et al. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109:618–33.
- Deane LM. Malaria studies and control in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 1988;38:223–30.
- Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Tauli PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J*. 2010;9:115.
- Miguel RB, Peiter PC, Albuquerque H, Coura JR, Moza PG, Costa Ade P, et al. Malaria in the state of Rio de Janeiro, Brazil, an Atlantic Forest area: an assessment using the health surveillance service. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109:634–40.
- Yamasaki T, Summa ME, Neves DV, de Oliveira SG, Gomes AC. Natural *Plasmodium* infections in Brazilian wild monkeys: reservoirs for human infections? *Acta Trop*. 2008;107:179–85.
- Snounou G, Viriyakosol S, Jara W, Thaitong S, Brown KN. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol*. 1993;58:283–92.
- Bioedit [http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html].
- Tamura K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Mol Biol Evol*. 1992;9:678–87.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*. 2011;28:2731–9.
- Lourenço-de-Oliveira R. Natural infection of golden lion tamarin, *Leontopithecus rosalia*, with *Trypanosoma cruzi* in the state of Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1990;85(1):15.
- Mareira GV, Peixoto CMS, Ziccardi M, Oliveira RL, Castro MG, Dionísio DF, et al. Prevalência de *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma minasense* e de anticorpos contra arbovírus em primatas não humanos (Callitrichidae) em catifeiro. *Rev Bras Med Vet*. 2000;22:252–4.
- Fragaszy DM, Visalberghi E, Fedigan LM. The complete Capuchin – the biology of the genus *Cebus*. Cambridge: Cambridge University Press; 2004.
- Izawa K. Foods and feeding behavior of wild black-capped capuchin (*Cebus apella*). *Primates*. 1979;20:57–76.
- Freese CHE, Oppenheimer JR. The Capuchin Monkeys, Genus *Cebus*. In: A. & R. Mittermeier, editor. Ecology and behavior of neotropical primates. Volume 1. 1st ed. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências; 1981. p. 331–90.
- Brown A, Chalukian S, Malmierca L. Habitat y alimentación de *Cebus apella* en el N.O. Argentino y la disponibilidad de frutos en el dosel arboreo. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales*. 1984;13:273–80.
- Fedigan LM. Vertebrate predation in *Cebus capucinus*: meat eating in a Neotropical monkey. *Folia Primatol*. 1990;54:196–205.
- Alfaro JW, Silva Jr JD, Rylands AB. How different are robust and gracile capuchin monkeys? An argument for the use of *Sapajus* and *Cebus*. *Am J Primatol*. 2012;74:273–86.
- Araújo MS, Messias MR, Figueiró MR, Gil LH, Probst CM, Vidal NM, et al. Natural *Plasmodium* infection in monkeys in the state of Rondônia (Brazilian Western Amazon). *Malar J*. 2013;12:180.
- Deane LM. Studies on simian malaria in Brazil. *Bull World Health Organ*. 1964;31:752–3.
- Flores-Mendoza C, Lourenço-de-Oliveira R. Bionomics of *Anopheles aquasalis* Curry 1932, in Guaraí, State of Rio de Janeiro, southeastern Brazil-I. Seasonal distribution and parity rates. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1996;91:265–70.
- Miguel RB. Estudo da infecção humana por *Plasmodium* spp no município de Guapimirim, estado do Rio de Janeiro. Fundação Oswaldo Cruz: MsD thesis. Instituto Oswaldo Cruz; 2011.

38. Curado I, Dos Santos MR, de Castro Duarte AM, Kirchgatter K, Branquinho MS, Bianchi Galati EA. Malaria epidemiology in low-endemicity areas of the Atlantic Forest in the Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. *Acta Trop*. 2006;100:54–62.
39. Tazi L, Ayala FJ. Unresolved direction of host transfer of *Plasmodium vivax* v. *P. simium* and *P. malariae* v. *P. brasilianum*. *Infect Genet Evol*. 2011;11:209–21.
40. Escalante AA, Barrio E, Ayala FJ. Evolutionary origin of human and primate malarial parasites: evidence from the circumsporozoite protein gene. *Mol Biol Evol*. 1995;12:616–26.
41. Escalante AA, Cornejo OE, Freeland DE, Poe AC, Durrego E, Collins WE, et al. A monkey's tale: the origin of *Plasmodium vivax* as a human malaria parasite. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:1980–5.
42. Mu J, Joy DA, Duan J, Huang Y, Carlton J, Walker J, et al. Host switch leads to emergence of *Plasmodium vivax* malaria in humans. *Mol Biol Evol*. 2005;22:1686–93.
43. Carter R. Speculations on the origins of *Plasmodium vivax* malaria. *Trends Parasitol*. 2003;19:214–9.
44. Lim C, Tazi L, Ayala F. *Plasmodium vivax*: recent world expansion and genetic identity to *Plasmodium simium*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:15523–8.
45. Cornejo OE, Escalante AA. The origin and age of *Plasmodium vivax*. *Trends Parasitol*. 2006;22:558–63.
46. Li J, Collins WE, Wirtz RA, Rathore D, Lal A, McCutchan TF. Geographic subdivision of the range of the malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Emerg Infect Dis*. 2001;7:35–42.
47. Taylor JE, Pacheco MA, Bacon DJ, Beg MA, Machado RL, Fairhurst RM, et al. The evolutionary history of *Plasmodium vivax* as inferred from mitochondrial genomes: parasite genetic diversity in the Americas. *Mol Biol Evol*. 2013;30:2050–64.
48. Pacheco MA, Cranfield M, Cameron K, Escalante AA. Malarial parasite diversity in chimpanzees: the value of comparative approaches to ascertain the evolution of *Plasmodium falciparum* antigens. *Malar J*. 2013;12:328.
49. World Health Organization (WHO). MALVAC meeting 2004: evaluation of malaria vaccines. Pre-clinical evaluation group: optimizing the developmental pathway from the lab to the clinic. Switzerland: Report from a technical consultation at WHO/IVR Malaria Vaccine Advisory Committee meeting. Montreux; 2004.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Recentemente, os casos humanos descritos por *P. knowlesi*, um parasito que infecta macacos do sudeste asiático com curso muitas vezes fatal em humanos, despertaram novamente o interesse pelos estudos dos parasitos simianos no Brasil e no mundo.

Atualmente, sugere-se que a malária na Mata Atlântica seja possivelmente uma zoonose devido à presença de primatas não humanos infectados e do vetor anofelino que pica tanto próximo da copa das árvores quanto próximo ao solo (DUARTE et al. 2013; MARRELLI et al. 2007; NEVES et al. 2013; UENO et al. 2007).

O presente estudo foi realizado em parceria com o Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ), que está localizado no município de Guapimirim, onde foram relatados casos autóctones de malária. Foram analisados 30 primatas do CPRJ para o diagnóstico molecular por Nested PCR e sequenciamento. O resultado do diagnóstico molecular indicou uma taxa de infecção de 30% (9 amostras positivas), sendo 5 amostras positivas para *P. brasilianum*; 3 amostras positivas para *P. simium* e 1 amostra positiva para ambos os parasitos (infecção mista). O fragmento do 18SSU rRNA amplificado para o diagnóstico foi sequenciado e as sequencias obtidas de *P. simium* nesse estudo foram alinhadas com sequências de outras espécies de *Plasmodium* disponíveis no GenBank e utilizadas para reconstrução da árvore filogenética. A partir do alinhamento, fica evidente que o fragmento analisado é bastante conservado, mostrando uma alta similaridade genética entre *P. simium* e *P. vivax*. É importante ressaltar que o nosso estudo mostra de forma inédita a descrição de infecção malárica por *P. simium* nos gêneros *Cebus* e *Sapajus*. Essa descoberta é de suma relevância uma vez que ressaltam a possibilidade de malária por *P. simium* em outras espécies de primatas não-humanos, cujo impacto pode ser significativo para a epidemiologia da doença. A presença de símios infectados atuando como reservatórios da malária podem sugerir um caráter zoonótico da doença nas regiões de Mata Atlântica. Além disso, abre a possibilidade de utilizar estes macacos como novo modelo de malária vivax.

Além disso, este trabalho foi pioneiro ao realizar o diagnóstico molecular de malária a partir de amostras de tecido de primata não humano. Uma fêmea de *Alouatta clamitans* de vida livre foi encontrada morta nos arredores do CPRJ em dezembro de 2013. O animal (identificado como MP1943) passou por autópsia e fragmentos de baço e fígado foram submetidos à extração de DNA para o diagnóstico molecular, cujo resultado apontou infecção por *P. simium*.

Duarte e colaboradores (2006) descreveram a ocorrência de anticorpos contra os plasmódios em 777 soros de macacos coletados em três diferentes regiões do Brasil (Cerrado -

Brasília; Floresta Atlântica semidecídua - São Paulo; e Floresta Atlântica - divisa de São Paulo e Mato Grosso do Sul), onde casos de malária autóctone já foram reportados. O grupo encontrou uma alta prevalência de anticorpos contra a proteína Circunsporozoíta (CSP) em todas as áreas, sugerindo o contato intenso de esporozoítos do parasito provenientes de anofelinos infectados na população de macacos. Além disso, a resposta contra formas assexuadas do parasito indicam o desenvolvimento da infecção malárica (DUARTE et al. 2006).

Duarte e colaboradores em 2008, realizando uma pesquisa através de PCR da infecção malárica em populações de primatas neotropicais (n=448) em áreas de Mata Atlântica e cerrado do estado de São Paulo. Foram encontrados 13% (9/71) de infecção por *Plasmodium* sp. em bugios ruivos (*Alouatta clamitans*) e 7% (16/235) de infecção malárica em bugios pretos (*Alouatta caraya*). Este grupo caracterizou além de infecções por *P. vivax/P. simium* e *P. malariae/P. brasilianum*, uma infecção por *P. falciparum* entre os animais estudados (DUARTE et al. 2008).

O diagnóstico molecular tem se mostrado uma das ferramentas mais promissoras na detecção de *Plasmodium* por possuir alta sensibilidade e especificidade, alcançando até mesmo infecções subclínicas (DEMAS et al. 2011). É importante ressaltar como as técnicas moleculares têm possibilitado estes estudos de infecção em primatas não humanos, mesmo em baixas parasitemias, mudando o quadro epidemiológico da malária simiana no Brasil e no mundo, uma vez que os dados disponíveis eram em grande parte baseados em análises de exame microscópico de sangue periférico, um método com sensibilidade limitada.

A problemática envolvendo a malária, anofelinos, população humana e simiana em regiões de Mata Atlântica deve continuar sendo foco das investigações pelas agências de controle. Sendo assim, o aumento da amostragem de símios, estudos da fauna anofélica, assim como a pesquisa de casos assintomáticos e determinação das espécies de plasmódios ocorrentes nessas regiões deve ser intensificada para se determinar o real quadro dessa doença.

A saúde humana, animal e vegetal estão estritamente ligadas através das inter-relações ecológicas, evidenciando a necessidade de coordenação de esforços entre Biologia e Medicina da Conservação. A Medicina da Conservação constitui uma nova ciência, voltada para enfrentar a ameaça crescente que agentes etiológicos, dos mais diversos tipos, afligem sobre a riqueza biológica do planeta. Dentro desse aspecto, as doenças tem importância para conservação das espécies e dos ecossistemas. Além disso, as doenças constituem um grande problema para a conservação de espécies, uma vez que contribuem para o risco de extinção, principalmente em populações reduzidas ou animais de cativeiro. Visto que já foi relatada a malária sintomática em símios de cativeiro (COSTA et al. 2014), fica claro a grande importância e necessidade de

estudar a malária simiana do ponto de vista da conservação, principalmente de espécies ameaçadas em extinção. *Sapajus xanthosternos*, espécie que nesse trabalho foi descrita pela primeira vez infectada com *P.simium*, se encontra nos registros nacionais como um dos dez primatas brasileiros considerados Criticamente em Perigo de Extinção e nos registros internacionais até 2008 foi considerado um dos 25 primatas mais ameaçados do mundo (COLOSIO et al. 2009). É uma espécie endêmica da Mata Atlântica que enfrenta graves riscos de sobrevivência devido à fragmentação desse bioma e a caça frequente (COLOSIO et al. 2009). Outras espécies que neste trabalho foram diagnosticadas com *P.simim* e *P.brasilianum* também se encontram ameaçadas ou em risco de extinção, como *Sapajus robustos*, *Calicebus personatus* e algumas espécies de *Cebus*. Isso ressalta a importância do nosso estudo para conservação dessas espécies.

7 REFERÊNCIAS

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

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

Antinori S, Galimberti L, Milazzo L, Corbellino M. **Plasmodium knowlesi: the emerging zoonotic malaria parasite.** *Acta Trop.* 2013 Feb;**125**(2):191-201.

Arruda ME, Nardini EH, Nussenzweig RS, Cchrane AH: **Sero-epidemiological studies of malaria in indian tribes and monekys of the Amazon basin of Brazil.** *Am J Trop Med Hyg* 1989, **4**:379-385.

Barnwell J, Thomas AW, Conway DJ. ***Plasmodium vivax*: merozoite antigens, the Duffy blood group, and erythrocyte invasion.** *Prog. Clin. Biol. Res* 1998. **313**:1-11.

Benchimol JL, Silva AFC. **Ferrovias, doenças e medicina tropical no Brasil da República. História Ciência e Saúde.** *Casa de Oswaldo Cruz* 2008, **15**(3): 719-762.

Branquinho MS, Marrelli MT, Curado I, Natal D, Barata JM, Tubaki R, Carréri-Bruno GC, de Menezes RT, Kloetzel JK. **Infection of *Anopheles (Kerteszia) cruzii* by *Plasmodium vivax* and *Plasmodium vivax* variant VK247 in the municipalities of São Vicente and Juquitiba, São Paulo.** *Rev Panam Salud Publica.* 1997 Sep;**2**(3):189-93.

Carlton, J. **The *Plasmodium vivax* genome sequencing project.** *Trends Parasitol*, 2003.**19**, 227-231.

Carréri-Bruno GC, Ciaravolo RM, Pereira M: **Malaria acquired during entomological research in the Serra do Mar, southeastern region of Brazil.** *Rev Saúde Pública* 1995, **29**:142-143.

Carter R, Mendis KN. **Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria.** *Clin Microbiol Rev.* 2002 Oct;**15**(4):564-94. Review. Erratum in: *Clin. Microbiol Rev.* 2003 Jan;**16**(1):173.

Carter, R. **Speculations on the origins of *Plasmodium vivax* malaria.** *Trends Parasitol* 2003.**19**, 214-219.

Cerutti-Junior C, Boulos M, Coutinho AF, Hatab MCLD, Falqueto A, Rezende H, Duarte AMRC, Collins W, Malafrente RS. **Epidemiologic aspects of the malaria transmission cycle in an area of very low incidence in Brazil.** *Mal Jour* 2007.**6**:33 1-12.

Chin W, Contacos PG, Coatney GR, Kimball HR. **A naturally acquired quotidian-type malaria in man transferable to monkeys.** *Science* 1965.**149**, 865.

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

Colosio, AC: **Parasitas intestinais em cebus xanthosternos (wiedneuwied, 1826) (primates, cebidae) na região do maruim na reserva biológica de una, Bahia, Brasil.** *MsD thesis.* UESC; 2009

Consoli RAGB & Lourenço-de-Oliveira R: **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil.** Rio de Janeiro: Ed. *Fiocruz*; 1994.

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

Cornejo OE, Escalante AA. **The origin and age of *Plasmodium vivax*.** *Trends Parasitol* 2006. **22**, 558-563.

Costa AP, Bressan CS, Pedro RS, Valls-de-Souza R, Silva S, Souza PR, Guaraldo L, Ferreira-da-Cruz MF, Daniel-Ribeiro CT, Brasil P: **Delayed diagnosis of malaria in a dengue endemic**

area in the Brazilian extra-Amazon: recent experience of a malaria surveillance unit in state of Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010, **43**:571-574.

Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, Shamsul SS, Matusop A, Ratnam S, Rahman HA, Conway DJ, Singh B. **Plasmodium knowlesi malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening.** *Clin Infect Dis.* 2008 Jan **15**;46(2):165-71.

Cox-Singh J. **Malaria: what can apes teach humans?** *Future Microbiol.* 2010 Aug;5(8):1157-60.

Culleton R, Coban C, Zeyrek FY, Cravo P, Kaneko A, Randrianariveolosia M, Andrianaranjaka V, Kano S, Farnert A, Arez AP, Sharp PM, Carter R, Tanabe K. **The origins of African Plasmodium vivax; insights from mitochondrial genome sequencing.** *PLoS One.* 2011;6(12):e291372011 Dec 14.

Curado I, Duarte AM, Lal AA, Oliveira SG, Kloetzel JK. **Antibodies anti bloodstream and circumsporozoite antigens (*Plasmodium vivax* and *Plasmodium malariae*/P. *brasilianum*) in areas of very low malaria endemicity in Brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v. **92**, n. 2, p. 235-243, Mar/Apr. 1997.

Curado I, Malafrente RS, Duarte AMR, Kirchgatter K, Branquinho MS, Galati EAB. **Malaria epidemiology in low-endemicity areas of the Atlantic Forest in the Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil.** *Acta Tropica* 2006, **100**: 54-62.

Deane LM, Deane MP, Ferreira Neto J: **Studies on transmission of simian malaria and on the natural infection of man with *Plasmodium simium* in Brazil.** *Bull World Health Organ* 1966, **35**: 805-808.

Deane LM, Ferreira Neto J, Sitônio JG: **A new natural host of *Plasmodium simium* and *Plasmodium brasilianum*: the woolly spider monkey.** *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1968, **10**:287-288.

Deane LM: **Simian malaria in Brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992, **87** (Suppl 3):1-20.

Demas A, Oberstaller J, DeBarry J, Lucchi NW, Srinivasamoorthy G, Sumari D, Kabanywany AM, Villegas L, Escalante AA, Kachur SP, Barnwell JW, Peterson DS, Udhayakumar V,

Kissinger JC. **Applied genomics: data mining reveals species-specific malaria diagnostic targets more sensitive than 18S rRNA.** *J Clin Microbiol.* 2011 Jul;49(7):2411-8.

Duarte AM, Porto MA, Curado I, Malafronte RS, Hoffmann EH, de Oliveira SG, da Silva AM, Kloetzel JK, Gomes Ade C. **Widespread occurrence of antibodies against circumsporozoite protein and against blood forms of Plasmodium vivax, P.falciparum and P. malariae in Brazilian wild monkeys.** *J Med Primatol.* 2006 Apr;35(2):87-96.

Duarte AM, Malafronte RS, Cerutti C, Curado I, de Paiva BR, Maeda AY, Yamasaki T, Summa ME, Neves DV, de Oliveira SG, Gomes AC: **Natural Plasmodium infections in Brazilian wild monkeys: reservoirs for human infections?** *Acta Trop* 2008, **107**:179-185.

Duarte AM, Pereira DM, de Paula MB, Fernandes A, Urbinatti PR, Ribeiro AF, Mello MH, Matos MO Jr, Mucci LF, Fernandes LN, Natal D, Malafronte RS. **Natural infection in anopheline species and its implications for autochthonous malaria in the Atlantic Forest in Brazil.** *Parasit Vectors.* 2013 Mar 7;6:58.

Escalante AA, Ayala FJ. **Phylogeny of the malarial genus Plasmodium, derived from rRNA gene sequences.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Nov 2;91(24):11373-7.

Escalante AA, Freeland DE, Collins WE, Lal AA. **The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome b from the linear mitochondrial genome.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jul 7;95(14):8124-9.

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

Escalante AA, Barrio E & Ayala FJ. **Evolutionary origin of human and primate malarias: evidence from the circumsporozoite protein gene.** *Mol. Biol. Evol* 1995, **12**, 616-626.

Grimberg, B. T., Udomsangpetch, R., Xainli, J., Mchenry, A., Panichakul, T., Sattabongkot, J., Cui, L., Bockarie, M., Chitnis, C., Adams, J., Zimmerman, P. A. And King, C. L. **Plasmodium**

***vivax* invasion of human erythrocytes inhibited by antibodies directed against the Duffy binding protein.** *Plos Medicine* 2007. **4**, 1940-1948.

Garnham PCC: *Malaria Parasites and Other Haemosporidia*. Oxford: Blackwell; 1966.

Hommel M, Gilles HM. **Malaria. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections**, Volume 5 Parasitology, 9th, 1998. Edition: Eds. Cox FEG Kreier JP Wakelin D. Arnold, Hodder Headline Group, London, publishers, Chapter 20: 261-402.

ICMBio, 2015 [www.icmbio.gov.br]

Kocher TD, Meyer TA, Edwards SV, Paabo S, Villablanca X, Wilson AC: **Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, **86**: 6196-6200.

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

Li, J., Collins, W. E., Wirtz, R. A., Rathore, D., Lal, A. And Mccutchan, T. F. **Geographic subdivision of the range of the malaria parasite *Plasmodium vivax*.** *Emerging Infectious Diseases*, 2001. **7**, 35-42.

Liu Q, Zhu S, Mizuno S, Kimura M, Liu P, Isomura S, Wang X, Kawamoto F. **Sequence variation in the small-subunit rRNA gene of *Plasmodium malariae* and prevalence of isolates with the variant sequence in Sichuan, China.** *J Clin Microbiol*, 1998. **36**: 3378-3381.

Liu W, Li Y, Shaw KS, Learn GH, Plenderleith LJ, Malenke JA, Sundararaman SA, Ramirez MA, Crystal PA, Smith AG, Bibollet-Ruche F, Ayoub A, Locatelli S, Esteban A, Mouacha F, Guichet E, Butel C, Ahuka-Mundeke S, Inogwabini BI, Ndjango JB, Speede S, Sanz CM, Morgan DB, Gonder MK, Kranzusch PJ, Walsh PD, Georgiev AV, Muller MN, Piel AK, Stewart FA, Wilson ML, Pusey AE, et al: **African origin of the malaria parasite *Plasmodium vivax*.** *Nat Commun* 2014, **5**:3346.

Livingstone FB. **The Duffy blood groups, vivax malaria, and malaria selection in human populations: a review.** *Hum Biol.* 1984 Sep;**56(3)**:413-25. Review. Marques GRAM, Condino MLF, Serra LLN, Cursino TVM.

Aspectos epidemiológicos da malária autóctone na mata atlântica, litoral norte, estado de São Paulo, 1985-2006. *Ver Soc Bras Med Trop* 2008. **41**, 386-389.

Marrelli MT, Malafrente RS, Sallum MA, Natal D. **Kerteszia subgenus of Anopheles associated with the Brazilian Atlantic rainforest: current knowledge and future challenges.** *Malar J.* 2007 Sep **19**;6:127.

Miguel RB: **Estudo da infecção humana por *Plasmodium* spp no município de Guapimirim, estado do Rio de Janeiro.** *MsD thesis.* Instituto Oswaldo Cruz. Fundação Oswaldo Cruz; 2011.

Miguel RB, Peiter PC, Albuquerque Hd, Coura JR, Moza PG, Costa Ade P, Brasil P, Suárez-Mutis MC: **Malaria in the state of Rio de Janeiro, Brazil, an Atlantic Forest area: an assessment using the health surveillance service.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2014, **109**: 634-640.

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

Moraes HF. **SUCAM sua origem sua história.** 2ª ed. Brasília. 1990; 484p

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

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

Moyes CL, Henry AJ, Golding N, Huang Z, Singh B, Baird JK, Newton PN, Huffman M, Duda KA, Drakeley CJ, Elyazar IR, Anstey NM, Chen Q, Zommers Z, Bhatt S, Gething PW, Hay SI. **Defining the geographical range of the *Plasmodium knowlesi* reservoir.** *PLoS Negl Trop Dis.* 2014 Mar **27**;8(3)

Mu J, Joy DA, Duan J, Huang Y, Carlton J, Walker J, Barnwell J, Beerli P, Charleston MA, Pybus OG, Su XZ. **Host switch leads to emergence of *Plasmodium vivax* malaria in humans.** *Mol Biol Evol* 2005.**22**, 1686-1693.

Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Kochar DK, Alonso PL, del Portillo HA. **Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite.** *Lancet Infect Dis* 2009. **9** (9): 555-566

Müller M, Schlagenhauf. P. ***Plasmodium knowlesi* in travellers, update 2014.** *IntJ Infect Dis.* 2014 May;**22**:55-64.

Neves A, Urbinati PR, Malafrente RS, Fernandes A, Paganini WS, Natal D. **Malaria outside the Amazon region: Natural *Plasmodium* infection in anophelines collected near and indigenous village in the Vale do Rio Branco, Intanhaém, SP.** 2013. *Acta Tropica* **2952**:1-5.

Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT: **Malaria in Brazil: an overview.** *Malar J* 2010, **9**:115.

Pereira-da-Silva LH & Oliveira VEG. **O desafio da malária: o caso brasileiro e o que se pode esperar dos progressos da era genômica.** *Ciência & Saúde Coletiva* 2002, **7** (1): 49-63.

Pina-Costa A, Brasil P, Santi SM, Araujo MP, Suárez-Mutis MC, Santelli AC, Oliveira-Ferreira J, Lourenço-de-Oliveira R, Daniel-Ribeiro CT: **Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2014, **109**:618-633.

Pittendrigh CS. **The bromeliad-Anopheles-malaria complex in Trinidad; the bromeliad flora.** *Evolution*. 1948 Mar;**2**(1):58-89.

Rona LDP, Carvalho-Pinto CJ, Peixoto AA. **Molecular evidence for the occurrence of a new sibling species within the *Anopheles (Kerteszia) cruzii* complex in south-east Brazil.** *Malaria Journal* 2010, **9**:33.

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

Rylands, A.B.; R.A. Mittermeier & E. Rodriguez-Luna. 1997. **Conservation of neotropical primates: threatened species and an analysis of primate diversity by country and region.** *Folia primatologica*, Switzerland, **68**: 134-160.

Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox-Singh J, Thomas A, Conway DJ: **A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings.** *Lancet* 2004, **363**:1017-1024.

Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN: **Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections.** *Mol Biochem Parasitol* 1993, **58**:283-292.

SIVEP [www.saude.gov.br/sivep_malaria].

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

Ta TH, Hisam S, Lanza M, Jiram AI, Ismail N, Rubio JM: **First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*.** *Malar J* 2014, **13**:68.

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

Taylor JE, Pacheco MA, Bacon DJ, Beg MA, Machado RL, Fairhurst RM, Herrera S, Kim JY, Menard D, Póvoa MM, Villegas L, Mulyanto, Snounou G, Cui L, Zeyrek FY, Escalante AA. **The evolutionary history of *Plasmodium vivax* as inferred from mitochondrial genomes: parasite genetic diversity in the Americas.** *Mol Biol Evol.* 2013 Sep; **30(9)**:2050-64.

Tazi L, Ayala FJ: **Unresolved direction of host transfer of *Plasmodium vivax* v. *P. simium* and *P. malariae* v. *P. brasilianum*.** *Infect Genet Evol* 2011, **11**:209-221.

Ueno HM, Foratinni OP, Kakitani I. **Distribuição vertical e sazonal de *Anopheles* (*Kerteszia*) em Ilha Comprida, SP.** *Rev Saúde Pública* 2007. **41(2)**: 269-275.

Vlachou D, Zimmermann T, Cantera R, Janse CJ, Waters AP, Kafatos FC. **Real-time, in vivo analysis of malaria ookinete locomotion and mosquito midgut invasion.** *Cell Microbiol.* 2004 Jul; **6(7)**:671-85.

Vlachou D, Schlegelmilch T, Runn E, Mendes A, Kafatos FC. **The developmental migration of *Plasmodium* in mosquitoes.** *Curr Opin Genet Dev.* 2006 Aug; **16(4)**:384-91.

White NJ. ***Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite.** *Clin Infect Dis* 2008. **46**, 172-173.

WHO. World malaria Report 2013. Geneva, **Evaluation of malaria vaccines. Pre-clinical Evaluation Group: Optimizing the developmental pathway from the lab to the clinic.** *Report from a technical consultation at WHO/IVR Malaria Vaccine Advisory Committee meeting Montreux: 11-14 October, 2004; Switzerland.*

Yamasaki T, Summa ME, Neves DV, de Oliveira SG, Gomes AC: **Natural *Plasmodium* infections in Brazilian wild monkeys: reservoirs for human infections?** *Acta Trop* 2008, **107**:179-185.

Yusof R, Lau YL, Mahmud R, Fong MY, Jelip J, Ngian HU, Mustakim S, Hussin HM, Marzuki N, Mohd Ali M: **High proportion of knowlesi malaria in recent malaria cases in Malaysia.** *Malar J* 2014, **13**:168.