TASCIANE YAMASAKI

**Detecção dos agentes etiológicos da malária em símios
resgatados em regiões de Mata Atlântica de São Paulo**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Ciências
Programa de Doenças Infecciosas e
Parasitárias
Orientadora: Profa. Dra. Rosely dos
Santos Malafronte

**São Paulo
2011**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Yamasaki, Tasciane

Detecção dos agentes etiológicos da malária em símios resgatados em regiões de Mata Atlântica de São Paulo / Tasciane Yamasaki. -- São Paulo, 2011.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Rosely dos Santos Malafronte.

Descritores: 1.Malária 2.*Alouatta* 3.Reação em cadeia de polimerase
4.Sorologia 5.Mata Atlântica

USP/FM/DBD-109/11

Agradecimentos

À minha orientadora Rosely Malafronte, pelos ensinamentos, broncas, risadas, por compartilhar comigo seus conhecimentos científicos ou não.

À Dra. Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte e à Dra. Izilda Curado pelas valiosas contribuições ao projeto e pela amizade que surgiu durante a realização do trabalho.

Aos membros da banca de qualificação, Prof. Delsio Natal, Dra. Sandra Moraes e Dra. Silvia Di Santi,, pelas preciosas críticas e sugestões ao projeto.

À equipe de veterinários do DEPAVE/SP, pelo material biológico dos macacos e pelo apoio fundamental na realização deste trabalho.

À pesquisadora Regiane Maria Tironi de Menezes que me auxiliou nas análises estatísticas deste trabalho. Obrigada pelas valiosas sugestões.

Aos amigos do laboratório de Malaria da SUCEN, Silvia, Gisele, Angélica, Juliana, Dida e a todos que nunca hesitaram em ceder espaço e corantes, além de chás e boas risadas.

Aos meus amigos do Laboratório de Protozoologia, Amanda, Bel, Luana, Byanca, Adriana, Eliane, Lícia, Leandro e tantos outros que fizeram parte deste período e me ajudaram muito, tanto para ouvir quanto para ensinar. Obrigada pela amizade.

Aos funcionários do IMT pela ajuda, especialmente o Luciano que sempre se mostrou eficaz e pronto a ajudar sempre.

Às secretárias da pós-graduação do departamento de Moléstias Infecciosas, Roseli e Vânia pela paciência em que tiveram com as minhas intermináveis dúvidas e perguntas.

Aos meus pais, Eva e Julio pelo carinho, suporte, incentivo, preocupação e paciência durante todo este período.

Aos meus irmãos Priscila e Fábio e meu sobrinho Matheus pelo carinho.

Ao meu namorado Daniel pelo companheirismo e cumplicidade.

Às minhas amigas de coração, Dri, Quel, Rafa, Camis, Rosito e Nath, que desde a faculdade me acompanham, me ajudam, me escutam, me contemplam com sua amizade.

Às minhas queridas, Tininha (*in memorian*), Astrinha, Maya e Jade por alegrarem minha vida e deixarem os dias mais divertidos.

Ao Fundo de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento deste projeto de mestrado 2008/51278-0.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho. Muito Obrigada!

Normalização Adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journal Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina, Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. I. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valeria Vilhena. 2a. ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

“O macaco é um animal demasiado simpático
para que o homem descenda dele”.

Friedrich Nietzsche

Sumário

Lista de abreviaturas	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Resumo	
Summary	
1. Introdução	01
1.1. Malária simiana.	06
1.2. Malária simiana no Novo Mundo.	08
1.3. A Malária simiana no Brasil.	09
1.4. Relação entre malária símiana e humana.	11
1.6. A proteína circumsporozoíta (CSP) e a correlação entre os plasmódios simianos e humanos.	13
1.7. Proteína de superfície do merozoíto (MSP-119) de <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i> .	16
1.8. Diagnóstico da malária.	18
1.8.1. Diagnóstico Parasitológico.	18
1.8.2. Diagnóstico Molecular.	20
1.8.3. Diagnóstico sorológico.	24
1.8.3.1. Imunofluorescência Indireta (IFI).	25
1.8.3.2. Ensaio imuno-enzimático (ELISA).	26
2. Objetivos.	27
2.1. Geral.	27
2.2. Específicos.	27
3. Materiais e Métodos.	28
3.1. Amostras de macacos de São Paulo.	28
3.2. Diagnóstico por gota espessa e esfregaço sanguíneo.	30
3.3. Extração de DNA das amostras	31
3.4. Reação em cadeia da Polimerase (PCR).	32
3.4.1. PCR semi-nested Multiplex (Rubio <i>et al.</i> , 1999).	33
3.4.2. PCR nested (Singh <i>et al.</i> , 1999).	35
3.4.3. PCR nested (Win <i>et al.</i> , 2002).	38

3.4.4. Visualização dos amplificados	40
3.5. Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI).	40
3.6. ELISA para detecção do antígeno (CSP).	42
3.7. ELISA para detecção do antígeno (MSP).	44
3.8. Análise estatística.	46
4. Resultados.	47
4.1. Identificação parasitológica de plasmódios (gota espessa/efregaço).	47
4.2. Identificação molecular de plasmódios.	49
4.3. Sorológicos.	53
4.3.1. Detecção de anticorpos da classe IgG contra formas assexuadas pela reação de imunofluorescência indireta (IFI).	53
4.3.2. Detecção de anticorpos da classe IgG contra a proteína CSP pela técnica imunoenzimática (ELISA).	55
4.3.3. Detecção de anticorpos da classe IgG contra as proteínas PvMSP-1 ₁₉ e PfMSP-1 ₁₉ pela técnica imunoenzimática (ELISA).	57
5. Discussão.	58
6. Referências.	70

Lista de Abreviaturas

CDC	Centers for Diseases Control.
CSP	Circunsporozoite Surface Protein.
DEPAVE	Departamento de Parques e Áreas Verdes.
DNA	Ácido desoxirribonucléico.
DNAr	DNA ribossômico.
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatos.
DP	Desvio padrão.
ELISA	Enzyme Linked Imunosorbent Assay.
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
<i>et al</i>	E outros.
GST	Glutathione S- transferase.
IFI	Reação de Imunofluorescência Indireta.
IMT	Instituto de Medicina Tropical.
ITS	Internal transcribed spacer.
MgCl ₂	Cloreto de magnésio.
MSP	Merorozoite Surface Protein.
OPD	<i>Orto-fenilenodiamina</i> .
OMS	Organização Mundial da Saúde.
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês "polymerase chain reaction").
pb	Pares de base..
PBS	Phosphate buffered saline.
pm	Peso molecular.
RNA	Ácido ribonucléico.
RNAr	RNA ribossômico.
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SUCEN	Superintendência de Controle de Endemias.
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> .
TBE	Tris, ácido bórico e EDTA.
UV	Ultravioleta.

Lista de Figuras

Figura 01 – Ciclo da malária no homem.	02
Figura 02 – Distribuição mundial da doença em 2009.	03
Figura 03 – Ocorrência da malária no Brasil, 2007.	04
Figura 04 – Ocorrência de casos de malária e localização de remanescentes de Mata Atlântica no Estado de São Paulo.	05
Figura 05 – Esquema hipotético de interação entre a malária humana e simiana.	09
Figura 06 – Distribuição dos plasmódios simianos no Brasil.	11
Figura 07 – Representação esquemática da molécula de MSP-1 ₁₉ .	17
Figura 08 – Ilustração do cistron ribossômico.	22
Figura 09 – Esquema representando a expressão gênica dos RNAs das espécies de plasmódio.	24
Figura 10 – Região de resgate dos macacos.	29
Figura 11 – Descrição da reação de PCR multiplex segundo Rubio <i>et al</i> (1999).	35
Figura 12 – A figura mostra a reação <i>nested</i> segundo Singh <i>et al</i> , (1999).	37
Figura 13 – A figura mostra a reação <i>nested</i> segundo Kimura <i>et al.</i> , (1997).	39
Figura 14 – Esquizonte de <i>P. vivax</i> / <i>P. brasilianum</i> corado com Giemsa.	49
Figura 15 – Perfil de amplificação em gel de agarose a 1,5% de acordo com Rubio <i>et al.</i> , 1999.	52
Figura 16 - Perfil de amplificação em gel de agarose a 1,5% de acordo com Singh <i>et al</i> , 1999.	52
Figura 17 - Perfil de amplificação em gel de agarose a 1,5% de acordo com Win <i>et al.</i> , 2002.	53
Figura 18 – Distribuição dos títulos de anticorpos da classe IgG obtidos em IFI com os antígenos de <i>P. vivax</i> , <i>P. falciparum</i> e <i>P. malariae</i> nos soros de animais resgatados nas regiões norte e sul.	54
Figura 19 – Distribuição das absorbâncias dos soros de animais resgatados nas regiões norte e sul por meio da técnica de ELISA com os peptídeos sintéticos correspondentes a Pvc, Pvk, Pvl, Pm e Pf.	56
Figura 20 - Distribuição das absorbâncias dos soros de animais resgatados nas regiões norte e sul por meio da técnica de ELISA com proteínas MSP-1 ₁₉ de <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i> .	57

Lista de Tabelas

Tabela 01 – Espécies de plasmódios simianos segundo hospedeiro natural e origem geográfica.	07
Tabela 02 – Tabela de primers (Rubio <i>et al.</i> , 1999).	33
Tabela 03 – Tabela de primers (Singh <i>et al.</i> , 1999).	36
Tabela 04 – Tabela de primers (Win <i>et al.</i> , 2002).	38
Tabela 05 – Animais resgatados ao sul da cidade de São Paulo.	47
Tabela 06 – Animais resgatados ao norte da cidade de São Paulo.	48
Tabela 07– Amostras procedentes da zona sul que exibiram consenso molecular segundo as três diferentes técnicas aplicadas	50
Tabela 08 – Amostras procedentes da zona norte que exibiram consenso molecular segundo as três diferentes técnicas aplicadas	51
Tabela 09 – Médias geométricas dos títulos de anticorpos da classe IgG segundo espécies de plasmódio e região.	54

Resumo

Yamasaki, T. Detecção dos agentes etiológicos da malária em símios resgatados em regiões de Mata Atlântica de São Paulo [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

Foram analisadas, para a detecção de plasmódios, 50 amostras de sangue de bugios (*Alouatta guariba clamitans*) resgatados de várias áreas circundadas pela Mata Atlântica, pertencentes à região metropolitana da cidade de São Paulo. Para tanto, 20 e 30 amostras das regiões de resgate norte e sul respectivamente, foram analisadas pelas técnicas de microscopia, análise molecular e sorologia. Apenas uma lâmina de animal proveniente da região sul foi positiva para *Plasmodium* sp. A fim de encontrar um consenso molecular (dois ou mais resultados idênticos em PCR), utilizamos três protocolos de PCR. A porcentagem de infecções por plasmódios, detectada por PCR foi de 13.3% (04/30) e 6.6% (02/30) para *Plasmodium vivax* e *P. malariae* respectivamente nos animais resgatados na região sul, enquanto que na região norte 25% (05/20) das amostras foram positivas apenas para *Plasmodium vivax*. As médias geométricas em imunofluorescência indireta (IFI) foram maiores para *Plasmodium vivax*, seguidas das médias para *P. malariae* e *P. falciparum* nas duas regiões. As porcentagens de positividade para anticorpos contra a proteína circumsporozoíta (CSP) foram 30% (9/30), 13.6% (3/22), 3.84% (1/26), 23% (7/30), 27.6% para *Plasmodium vivax* VK210, *P. vivax* VK247, *P. vivax* like, *P.*

malariae/*P. brasilianum* e *P. falciparum* respectivamente em regiões ao sul e 10% (2/20), 30.8% (4/13), 11.1% (2/18), 15% (3/20), 33.3% (6/18) para *P. vivax* VK210, *P. vivax* VK247, *P. vivax* like, *P. malariae*/*P. brasilianum* e *P. falciparum* respectivamente em regiões ao norte. Com relação a positividade de anticorpos contra a proteína MSP-119, estas foram de 30% (9/30) para o sul e 10% (2/20) para o norte. Nenhuma amostra foi positiva para Pf- MSP119.

Descritores: Malária simiana, PCR, sorologia, Mata Atlântica, bugio.

Summary

Yamasaki, T. Detection of etiological agents of malaria in monkeys rescued in Atlantic Forest regions of São Paulo [dissertation]. São Paulo: Faculty of Medicine, University of São Paulo, (Brazil); 2011.

In order to detect *Plasmodium*, fifty blood samples of holler monkeys (*Alouatta guariba clamitans*), collected in areas surrounded by the Atlantic Forest and located in the metropolitan region of São Paulo city, were analysed. Thus, 20 and 30 samples from the northern and southern areas, respectively, were examined by microscopy techniques, molecular analysis and sorology. Only one animal slide from the Southern area was positive for *Plasmodium* sp. In order to achieve a molecular agreement (two or more identic results on PCR), three PCR protocols were applied. The percentage of *Plasmodium* infections detected by PCR was 13,3% (04/30) and 6,6% (02/30) for *Plasmodium vivax* and *P. malariae*, respectively, in animals collected in the Southern area. Meanwhile, in the Northern area, 25 % (05/20) of the samples were exclusively positive for *Plasmodium vivax*. The geometric means titles in indirect immunofluorescence were higher for *Plasmodium vivax* followed by *P. malariae* and *P. falciparum* in both areas. Percentages of positive results for antibodies against circumsporozoite protein (CSP) were of 30% (9/30); 13,6% (3/22); 3,84% (1/26); 23% (7/30); 27,6% for *Plasmodium vivax* VK210, *P.vivax* VK247, *P. vivax* like, *P.malariae*/*P.brasilianum* and *P. falciparum*, respectively in Southern areas

and 10% (2/20), 30,8% (4/13), 11,1% (2/18), 15% (3/20), 33,3% (6/18) for *P. vivax* VK210, *P.vivax* VK247, *P. vivax* like, *P. malariae*/*P.brasilianum* and *P. falciparum*, respectively, in Northern areas. Antibodies with positive results against MSP-119 protein were 30% (9/30) in the South and 10% (2/20) in the North. None of the samples were positive for Pf-MSP119.

Keywords: simian malaria, PCR, sorology, Atlantic Forest, holler monkeys

1. Introdução

A malária é uma parasitose cujos agentes etiológicos pertencem ao Filo Apicomplexa e gênero *Plasmodium*, sendo sua transmissão realizada por meio da picada da fêmea pertencente ao gênero *Anopheles*, infectada com o parasito. São conhecidas mais de 100 espécies de plasmódios que podem ter como hospedeiros macacos, aves, répteis e roedores. Classicamente, quatro espécies são infectantes para o homem: *P. malariae*, *P. ovale*, *P. falciparum* e *P. vivax* (Rey, 1991). Uma quinta espécie, o *P. knowlesi*, que originalmente infecta macacos no sudeste da Ásia, foram descrita infectando humanos (Fong *et al.*, 1971; Bronner *et al.*, 2009).

A doença é caracterizada por febre alta acompanhada de calafrios, suores e cefaléia, que ocorrem em padrões cíclicos, dependendo da espécie do parasito infectante. A fêmea do mosquito *Anopheles* inocula os esporozoítas (formas infectantes do plasmódio) no hospedeiro vertebrado e estas formas são transportadas pela corrente sanguínea até o fígado. Durante o ciclo hepático os esporozoítas invadem os hepatócitos e por meio da reprodução assexuada (esquizogonia) multiplicam-se e diferenciam-se em merozoítos que acabam por romper as células. Outra vez na corrente sanguínea, esses merozoítos terão como alvo os eritrócitos, onde se

multiplicam de forma assexuada (esquizogonia eritrocítica). Estes se alimentam da hemoglobina, diferenciando-se e multiplicando-se em formas denominadas esquizontes que por esquizogonia, multiplicam-se dando origem aos merozoítos os quais rompem as células vermelhas sendo liberados na corrente sanguínea invadindo outra hemácia e completando assim o ciclo eritrocitário. Após uma série de ciclos assexuados (*P. falciparum*) ou imediatamente após o ciclo hepático (*P. vivax*), alguns dos parasitos diferenciam-se em formas sexuais, gametócitos masculinos e femininos, que são ingeridos pelos anofelinos, que após o ciclo esporogônico, são os responsáveis por transmitir a malária ao homem no momento de seu repasto sanguíneo (Figura 1).

Figura 1 – Ciclo da malária no homem, mostrando a dinâmica do ciclo no mosquito (A), ciclo hepático (C) e eritrocítico (B) no homem. Fonte: CDC, 2009.

Em 2008, cerca de 300 milhões de casos clínicos de malária foram notificados e 708.000 a 1.003.000 de pessoas foram a óbito, sendo as crianças africanas as maiores vítimas desta enfermidade. A malária ocorre predominantemente em regiões tropicais e subtropicais (Figura 2) e é nestas regiões que se concentram índices de elevada morbidade e mortalidade, disseminando-se tanto em populações rurais quanto urbanas (Bruce-Chwatt, 1985; CDC, 2010).

Figura 2 – Distribuição mundial da malária em 2009. Fonte: OMS, 2010.

No Brasil, a malária apresenta um quadro epidemiológico preocupante. Apesar de se encontrar em declínio, o número de casos notificados em 2008 foi superior a 300.000. Essa transmissão permanece praticamente restrita à Região Amazônica, onde 99,9% dos casos ocorrem com predominância do *P. vivax* (Brasil, 2009)

Apesar de não ser considerada área endêmica de malária, diversos Estados pertencentes à Região Extra-Amazônica registraram casos autóctones e importados da doença, sendo que em 2007 os Estados do Paraná, Espírito Santo e São Paulo foram responsáveis por 88% desses casos (Brasil, 2008).

Figura 3 – Ocorrência da malária no Brasil em 2008. Fonte: Brasil, 2009.

Casos de malária autóctone residual também são notificados na região sudeste, em áreas cuja cobertura vegetal é formada pela Mata Atlântica. As espécies vetoras incriminadas na transmissão foram identificadas como sendo o *Anopheles (Kerteszia) cruzii* e o *Anopheles (Kerteszia) bellator* (Forattini et al., 1986). Embora o agente etiológico seja o *P. vivax*, a sintomatologia por vezes é atípica, sendo que os pacientes exibem parasitemia baixa e em alguns casos, podem ser assintomáticos. A malária nestas regiões é conhecida como “malária bromeliana” já que os verticilos das bromélias servem de criadouros

dos vetores (Downs & Pittendrigh, 1946).

Foram encontrados dois tipos epidemiologicamente distintos de transmissão associados a algumas regiões no Estado de São Paulo (Wanderley *et al.*, 2006). Na região Oeste do Estado, pode-se observar uma transmissão relacionada ao intenso fluxo de indivíduos infectados provenientes da Região Amazônica com a presença de vetores do subgênero *Nyssorhynchus*. Na região da Serra do Mar cuja cobertura vegetal é constituída pela Mata Atlântica (Figura 4), há ocorrência de baixo número de casos humanos relacionados com a alta densidade de vetores do subgênero *Kerteszia* (Couto *et al.*, 2010).

Figura 4 – Ocorrência de casos de malária (1980 a 2007) e localização de remanescentes de Mata Atlântica no Estado de São Paulo (1998). Pode-se observar uma correlação entre os casos de malária com o tipo de cobertura vegetal. Fonte: Couto *et al.*, 2010 / www.biota.org.br.

Estudos recentes foram realizados na tentativa de se estudar a dinâmica da transmissão da malária nestas áreas de Mata Atlântica e sua correlação com a malária simiana e humana. Eles levaram em conta diversos aspectos relativos à dinâmica da transmissão da malária, tais como a aplicabilidade dos testes sorológicos e sua relação com a especificidade da imunidade (contra esporozoítas ou contra formas circulantes), competência e capacidade vetoriais, o desempenho dos testes parasitológicos e moleculares na detecção dos parasitos e a viabilidade da ocorrência de transmissão entre hospedeiros diferentes (Ceruti et al., 2007, Rezende et al., 2009, Duarte et al., 2008, Couto et al., 2010).

1.1. Malária simiana.

São conhecidas vinte espécies de plasmódios que infectam primatas não humanos (Tabela 1).

Tabela 1- Espécies de plasmódios simianos segundo hospedeiro natural e origem geográfica.

Espécie de plasmódio	Hospedeiro natural	Origem geográfica
<i>P. eylesi</i>	Gibão- Hylobates	Malásia
<i>P. hylobati</i>	Gibão- Hylobates moloch	Leste da Malásia
<i>P. jefferyi</i>	Gibão- Hylobates lar	Malásia
<i>P. youngi</i>	Gibão- Hylobates lar	Malásia
<i>P. schwetzi</i>	Chimpamzé-Pan troglodytes Gorila-Gorilla gorilla	Camarões, Serra Leoa, Zaire, Libéria, Rep. Dem. Do Congo
<i>P. reichenowi</i>	Chimpamzé-Pan troglodytes Gorila-Gorilla gorilla	Camarões, Serra Leoa, Zaire, Rep. Dem. Do Congo
<i>P. pitheci</i>	Orangotango-Pongo pygmaeus	Leste da Malásia
<i>P. silvaticum</i>	Macacos do Velho Mundo	Leste da Malásia
<i>P. cynomolgi</i>	Macacos do Velho Mundo	Índia, Sri Lanka, Assam, Malásia, Indonésia, Taiwan
<i>P. gonderi</i>	Macacos do Velho Mundo	Camarões, Zaire
<i>P. fragile</i>	Macacos do Velho Mundo	Sri Lanka, Sul da Índia
<i>P. coatneyi</i>	Macacos do Velho Mundo	Malásia, Filipinas
<i>P. fieldi</i>	Macacos do Velho Mundo	Malásia
<i>P. simiovale</i>	Macacos do Velho Mundo	Sri Lanka
<i>P. inui</i>	Macacos do Velho Mundo	Sri Lanka, Índia, Taiwan, Malásia, Indonésia, Filipinas.
<i>P. knowlesi</i>	Macacos do Velho Mundo	Malásia
<i>P. girardi</i>	Lêmures	Madagascar
<i>P. lemuris</i>	Lêmures	Madagascar
<i>P. brasilianum</i>	Macacos do Novo Mundo	Brasil, Venezuela, Peru, Colômbia, Panamá.
<i>P. simium</i>	Macacos do Novo Mundo	Brasil

Fonte: Duarte, 1998.

O ciclo de vida dos plasmódios simianos é muito semelhante ao dos parasitos humanos, isto é, todos são transmitidos por mosquitos do gênero *Anopheles*. Algumas infecções desaparecem dentro de poucos meses, mas outras podem persistir por vários anos. São poucas

as informações a respeito da dinâmica das infecções do parasito, do vetor e dos hospedeiros na natureza (Duarte, 1998).

1.2. Malária simiana no Novo Mundo.

A malária encontrada em símios da África e Ásia pode ter como agente etiológico uma grande variedade de plasmódios, porém em símios do Novo Mundo, até o momento, apenas duas espécies infectantes foram descritas: *P. brasilianum* e *P. simium*.

O *P. brasilianum* foi identificado por Gonder & Von Berenberg-Glosser em 1908, e apresenta grandes semelhanças com o *P. malariae*, plasmódio humano, responsável pela febre quartã. Em hospedeiros naturais, o *P. brasilianum* apresenta parasitemia muito baixa, sendo a infecção, muitas vezes, não aparente.

O *P. simium* foi identificado por Fonseca em 1951, nas regiões de Mata Atlântica dos Estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Espírito Santo. Esse parasito apresenta semelhanças biológicas e morfológicas com o *P. vivax*.

O *Anopheles (Kertessia) cruzii* foi incriminado como vetor natural de ambos os parasitos (Deane, 1969; Deane *et al* 1969a, b). Esse vetor tem o desenvolvimento de suas fases larvais nos verticilos das

bromélias, plantas abundantes na Mata Atlântica. Possui também uma peculiar característica, a dispersão vertical, que lhe permite se alimentar tanto ao nível do solo quanto ao nível da copa das árvores (Deane, 1992). A partir destas informações pode-se hipotetizar um quadro zoonótico de transmissão de malária simiana ao ser humano (Figura 5).

Figura 5 – Esquema hipotético de interação entre a malária humana e simiana. O vetor apresenta dispersão vertical entre mata solo e mata copa, possibilitando contato com ambos os tipos de parasitos e hospedeiros.

1.3. A Malária simiana no Brasil.

No Brasil, o Dr. Leonidas M. Deane concentrou suas pesquisas no estudo da malária simiana. Ao final da década de 30, trabalhando em

pesquisas associadas à Campanha Nacional de Erradicação da Malária, relatou que a maior prevalência de *P. malariae* encontrava-se nas florestas, e levando em conta as similaridades entre essa espécie e o *P. brasilianum*, isolado em 1908 em um macaco da região Amazônica, pensou na possibilidade de que humanos e símios pudessem compartilhar o mesmo parasito. Suas formas sanguíneas são indistinguíveis, assim como os ciclos esporogônico e esquizogônico, e imunologicamente, os anticorpos contra esses dois parasitos apresentam reações cruzadas.

O *P. simium* e *P. brasilianum* foram, até o momento, os únicos plasmódios encontrados infectando os macacos do Novo Mundo. Devida a pouca análise das infecções naturais, realizada apenas uma vez e com poucas lâminas, acredita-se que possam existir mais espécies de plasmódios circulando entre os símios. É possível também que o mesmo plasmódio apresente diferenças morfológicas dependendo da espécie de macaco infectado (Deane, 1992).

Deane estudou 4.585 primatas na maior parte dos Estados do Brasil e destes, 655 apresentaram infecção malárica, ou seja, 14,3%. Esses casos não estavam distribuídos uniformemente no território nacional sendo que 35,6% concentraram-se na região sudeste seguido por 17,9% na região sul. Pode-se observar que no país, a taxa de infecção por *P. brasilianum* (73,9%) foi maior que a por *P. simium*

(17,7%). Enquanto na Amazônia a única espécie descrita foi o *P. brasilianum*, na região sudeste, ambas as espécies foram catalogadas, *P. brasilianum* (46,3%) e *P. simium* (37,5%), incluindo em alguns casos, infecções mistas (9,6%) (Figura 6). Sabe-se que o gênero *Alouatta* possui uma alta taxa de infecção dessa espécie quando comparada aos demais primatas examinados. A parasitemia nos símios é geralmente baixa, porém mais persistente se estes estiverem infectados por *P. brasilianum*. Os animais apresentaram sintomas como febre, apatia, perda de apetite e de peso, porém, a maioria teve cura espontânea (Deane, 1992).

Figura 6 – Distribuição dos plasmódios simianos no Brasil.

1.4. Relação entre malária simiana e humana.

O *P. brasilianum* acomete diferentes espécies de primatas em diversos países da América Central e do Sul (Deane *et al.*, 1967). No

Brasil, a presença do parasito já foi registrada na região Amazônica e nas regiões sul e sudeste, acompanhando as áreas de distribuição de Mata Atlântica e é observado principalmente em símios da família Cebidae (Deane *et al.*, 1966; Deane, 1969; Deane *et al.*, 1969a,b; Deane *et al.*, 1967; Deane *et al.*, 1971; Deane, 1992, Cochrane *et al.*, 1984). Alguns autores relatam que este parasito é indistinguível do *P. malariae* (Qari *et al.*, 1996; Escalante *et al.*, 1998).

Existem evidências de que, na realidade, as regiões não repetitivas do gene que codifica a proteína CSP de *P. malariae*, *P. vivax*, e *P. vivax-like* humano sejam indistinguíveis de *P. brasilianum*, *P. simium* e *P. simiovale*, respectivamente, e que estes parasitos sejam sinónimas para a mesma espécie de protozoário (Coatney, 1971; Qari *et al.*, 1993). Desta forma, existe a possibilidade, em áreas de ocorrência simultânea da doença em humanos e símios, de que a malária se comporte como uma zoonose (Vie *et al.*, 1998). A partir de um reservatório representado pelos símios, o *P. brasilianum*/*P. malariae* seria transmitido ao ser humano. Esta efetividade na transmissão foi demonstrada por Deane *et al.*; 1969.

O *P. simium* apresenta-se mais restrito em sua distribuição, sendo encontrado entre as latitudes de 20° sul e 30° sul (Deane *et al.*, 1971; Cochrane *et al.*, 1984). Infecta primata das espécies *Alouatta fusca* e *Brachyteles arachnoides* em áreas de distribuição de Mata Atlântica

(Deane *et al.*, 1966; Deane *et al.*, 1967; Deane, 1969; Deane *et al.*, 1969a,b; Deane *et al.*, 1971; Deane, 1992; Cochrane *et al.*, 1984). Da mesma forma que o *P. brasilianum* foi identificado como *P. malariae*, tomando por base alelos do segmento de DNA responsável pela síntese de RNA ribossômico, o *P. simium* foi identificado como *P. vivax* com perfil genético de uma variante do Velho Mundo (Agoramoorthy *et al.*, 1994; Fonseca, 1951; Deane, 1992). Infecção natural acidental em seres humanos por esta espécie, também já foi relatada (Deane *et al.*, 1967; Deane *et al.*, 1968). A exemplo do *P. malariae*, não se pode descartar a possibilidade de transmissão em um contexto de zoonose para esta espécie.

1.5. A proteína circunsporozoíta (CSP) e a correlação entre os plasmódios simianos e humanos

Os esporozoítas, formas infectantes inoculadas no hospedeiro por meio do repasto sanguíneo do vetor, possuem sua membrana recoberta pela proteína majoritária circunsporozoíta (CSP). Essa proteína é estágio-específica e apresenta-se em seqüência repetitivas em *tandem* (Zavala *et al.*, 1986).

Sabe-se que o aparecimento dessa proteína na superfície do esporozoíta é gradual e quase inexistente em sua membrana quando este ainda está em fase de migração para as glândulas salivares do

mosquito. Logo, observa-se uma relação entre a infectividade e aparecimento da proteína (Vanderberg *et al.*, 1969).

As seqüências repetitivas que codificam o gene CSP de *P. malariae* e *P. brasilianum* possuem identidade antigênica (Lal *et al.*, 1988a; Lal *et al.*, 1988b). A região central imunodominante do gene CSP de *P. malariae* consiste em 45 cópias da sequência repetitiva (NAAG) e seis cópias da sequência (NDAG), sendo que a proteína CSP de *P. brasilianum* contém as mesmas seqüências repetitivas.

Por meio da utilização de anticorpos monoclonais contra um epítopo específico da proteína CSP do *P. malariae*, observou-se que o mesmo anticorpo reconhecia um epítopo semelhante em *P. brasilianum*, mas não reconhecia nenhum outro em nenhuma outra espécie de plasmódio (Cochrane *et al.*, 1984). Tal fato, segundo os autores, reforça a hipótese de que o *P. brasilianum* seja uma cepa do *P. malariae* que se adaptou aos macacos do Novo Mundo (Coatney, 1971).

Descobriu-se também que o gene que codifica para a CSP de *P. simium* foi amplificado por *primers* correspondentes à CSP de *P. vivax* (Goldman *et al.*, 1993). A partir da clonagem do fragmento de aproximadamente 1,2 Kb, nove clones foram obtidos, dos quais sete possuíam a sequência repetitiva da proteína CSP idêntica ao *P. vivax* VK210 (GDRAA/DGQPA) correspondente às linhagens "Belem", "Sal 1" e "North Korean" que foram designados como PVCS type 1 (old type), e

dois clones que possuíam sequência repetitiva idêntica ao *P. vivax* VK 247 (ANGAG/DN/DQPG), designados como PVCS type 2.

A estrutura do gene que codifica a região repetitiva da proteína CSP de *P. falciparum* foi descrita por Dame *et al*, em 1984. Sabe-se que a região repetitiva da proteína CSP de *P. reichenowi* (NVNP) possui similaridade com a de *P. falciparum* (NANP e NVDP) (Lal & Goldman, 1991).

Árvores filogenéticas construídas a partir das porções terminais (não repetitivas) da CSP originárias de 12 espécies de plasmódios demonstraram que nestas porções, *P. malariae*, *P. vivax* e *P. vivax-like* humano são indistinguíveis de *P. brasilianum*, *P. simium* e *P. simiovale*, respectivamente (Escalante *et al.*, 1995). A partir destes resultados, os autores sugeriram que hospedeiros simianos podem servir como reservatório de plasmódios humanos e que as similaridades entre plasmódios simianos e humanos são fortes indicativos da ocorrência de processos de especiação, ou seja, uma mesma espécie de plasmódio, ao longo do tempo, poderia ter se adaptado a hospedeiros humanos e simianos.

Essas hipóteses corroboram com a de Coatney (1971) que sugeriu que o *P. vivax* e o *P. malariae* tenham sido transmitidos aos macacos do Novo Mundo quando humanos chegaram às Américas.

Essa semelhança entre plasmódios humanos e simianos poderia exercer efeitos mais intensos no caso de aplicação de uma vacina

antimalárica, em regiões de floresta, onde homens e macacos estão presentes. Caso a distribuição destes reservatórios simianos seja maior que o atualmente esperado, a dinâmica da vacinação, o controle e a eliminação poderiam ser afetadas por meio da conservação de cepas em primatas servindo como uma fonte constante de infecção (Lal *et al.*, 1998a,b).

1.6. Proteína de superfície MSP-1₁₉ de *P. vivax* e *P. falciparum*.

Merozoítas são as formas dos parasitos da malária, que uma vez liberados dos hepatócitos, penetram e evoluem no interior das hemácias. Essas formas apresentam em sua superfície uma proteína, a MSP que possui massa molecular de 185 a 210 kDa (Blackman *et al.*, 1990) e está ancorada à superfície dos merozoítos, apresentando considerável grau de diversidade antigênica.

Essa proteína é sintetizada durante o processo de esquizogonia e ao final deste sofre duas quebras proteolíticas onde se originam fragmentos menores. A primeira quebra que acontece na molécula de MSP-1 gera quatro produtos p83, p30, p38 e p42 chamados de MSP-1₈₃, MSP-1₃₀, MSP-1₃₈ e MSP-1₄₂ respectivamente. Quando ocorre a invasão dos eritrócitos pelo merozoíto ocorre outra clivagem onde a MSP-1₄₂ é quebrada em MSP-1₃₃ e MSP-1₁₉ (Holder *et al.*, 1992; Lucchi *et al.*, 2008),

(Figura 07).

Figura 7 – Representação esquemática da molécula de MSP-1₁₉. A molécula precursora MSP-1 passa por um processo de quebra proteolítica onde origina quatro subunidades, mostrado em (ii). Uma das subunidades sofre nova clivagem originando MSP-1₃₃ e MSP-1₁₉. Fonte: Lucchi *et al.*, 2008.

Os estudos sobre a diversidade alélica das MSPs têm essencialmente dois objetivos: a) avaliar o grau de diversidade desses antígenos em parasitos de diferentes áreas endêmicas e suas possíveis implicações sobre o desenvolvimento de vacinas e b) investigar a genética de populações de plasmódios, empregando esses antígenos como marcadores polimórficos, baseando-se na disponibilidade de técnicas de tipagem sorológica ou molecular em larga escala (Babiker *et al.*, 1994).

O fragmento da MSP-1, a MSP-1₁₉ é o único que permanece ancorado à superfície do merozoíto no momento da invasão eritrocítica. A MSP-1₁₉ ocorre na maioria dos indivíduos com histórico de infecção malárica sendo que muitos possuem anticorpos que reagem contra esta parte bastante conservada da proteína. Em outros estudos, este antígeno foi utilizado para imunizar camundongos,

evidenciando-se que os anticorpos dos animais imunizados com a proteína recombinante reconhecem a proteína nativa. (Blackman *et al.*, 1991; Bonila *et al.*, 2006; Soares *et al.*, 2007)

1.7. Diagnóstico da malária.

O diagnóstico da malária é difícil de estabelecer se levarmos em conta apenas os aspectos clínicos da doença, que geralmente são inespecíficos e presentes em outras enfermidades tropicais. Sendo assim, o diagnóstico parasitológico, atualmente, é realizado por meio da observação de lâminas, gota espessa e/ou esfregaços sanguíneos, os quais indicam a presença ou ausência do parasito no momento do exame. Existem também métodos moleculares e sorológicos para a detecção do parasito. O PCR pode detectar quantidades ínfimas de parasitos circulantes no momento do exame, enquanto que testes sorológicos indicam a presença de anticorpos contra as diferentes espécies de plasmódios.

1.7.1. Diagnóstico Parasitológico.

Laveran foi o pioneiro no diagnóstico parasitológico da malária, quando em 1880 descobriu o parasito em lâmina com sangue de

paciente febril. O esfregaço sanguíneo permite uma análise morfológica do parasito, permitindo com certa facilidade e segurança diferenciar as diversas espécies de plasmódios, porém sua sensibilidade não é tão alta. Ronald Ross verificou que o aumento da concentração do sangue numa área desmembrada aumentava a sensibilidade da técnica em 20 vezes, originando o método da gota espessa (Igreja et. al., 2001; Ferreira, 2004; Ross, 1903; OPAS, 1975).

Durante a avaliação das lâminas, devem-se observar as diferentes características de cada espécie. Nas lâminas infectadas por *P. falciparum*, devido sua propriedade de citoaderência, só é possível detectar trofozoítos e gametócitos, estes últimos possuem formato de lua crescente, facilitando a identificação da espécie. Este parasito não apresenta preferência por hemácias jovens ou maduras e as células sanguíneas possuem aspecto normal. Nesta espécie, as granulações, chamadas de granulações de Maurer não possuem fácil visualização ao microscópio óptico. Em *P. vivax*, que parasita preferencialmente hemácias jovens, podem-se observar parasitos em diversos estágios de evolução, hemácias aumentadas e descoradas e com presença de granulação de fácil visualização chamadas granulações de Schuffner, distribuídos uniformemente pela célula. No diagnóstico do *P. malariae*, que parasita preferencialmente hemácias maduras, observa-se a apresentação do parasito diagonalmente nas

hemácias, ou em banda. Nesta espécie a granulação observada é a de Ziemann, mais discreta que a observada em *P. vivax* (Igreja et al., 2001; Ávila & Ferreira, 1996; OMS, 2000).

Em condições ideais, dentro de laboratório de pesquisa, um microscopista consegue detectar densidades parasitárias bem reduzidas como 10 a 20 parasitos por micro litro de sangue. Em condições de campo a capacidade de detecção necessita de até 100 parasitos por cada micro litro de sangue (OMS, 1988).

1.7.2. Diagnóstico Molecular.

Diversas técnicas foram desenvolvidas com o objetivo de aumentar a sensibilidade e especificidade do diagnóstico. Algumas técnicas moleculares como a reação da polimerase em cadeia (PCR), focaram seus estudos no DNA ribossômico, mais especificamente em diferentes porções da região 18S (porção menor) do rDNA de plasmódios, sendo que algumas foram descritas pelos seguintes pesquisadores: Singh et al., 1999; Rubio et al., 1999 e Win et al. 2002.

O DNAr nuclear codifica os RNAs ribossômicos (RNAr) que são parte estrutural e funcional do ribossomo. O RNAr combina-se com proteínas ribossomais para formar os ribossomos que por sua vez

direcionam a síntese protéica a partir de RNA mensageiro. (Hillis & Dixon, 1991).

O RNAr é transcrito a partir do DNAr como uma família de genes repetitivos, mas nunca traduzidos. É composto por longos arranjos de unidades de repetição *em tandem*, com alto número de cópias (Hwang & Kim, 1999).

As regiões transcritas são constituídas pelas sequências que codificam para as subunidades do RNA, ao longo do cromossomo; 18S (subunidade menor), 5.8S e 28S (subunidade maior) são regiões bastante conservadas, pois variações nessas subunidades poderão gerar mutações nas sequências codificadoras de RNAr, impedindo o sucesso na construção do ribossomo e afetando negativamente toda a síntese de proteínas (Fedoroff, 1979). Apresenta também dois espaçadores internos transcritos ITS1 e ITS2, o primeiro localizado entre os genes 18S e 5.8S e o segundo entre o 5.8S e 28S, cuja evolução é muito mais rápida do que nas regiões codificadoras para o RNAr, uma vez que as substituições não causam efeitos letais ao organismo (Hwang & Kim, 1999) (Figura 08).

Figura 8 – Ilustração do cistron ribossômico. Regiões transcritas: 18S=subunidade menor; ITS1 = espaçador interno transcrito 1; ITS2 = espaçador interno transcrito 2; 5.8S e 28S = subunidade maior; ETS = espaçador externo transcrito.

O DNAr é um marcador bastante difundido, considerado candidato ideal para estudos de sistemática molecular porque é abundante no genoma, demonstrando facilidade na clonagem e potencial para resolver divergências em sequências codificadoras e não codificadoras (Black IV & Munstermann, 1996).

O RNA ribossomal das espécies de plasmódios, como em todos os eucariotos, é um mosaico de regiões conservadas e variáveis. As sequências conservadas estão localizadas em regiões conhecidas e contribuem para a formação da estrutura secundária altamente conservada do RNAr eucariótico (Li *et al.*, 1994a).

Análises das sequências de RNAr são utilizadas para o estudo filogenético entre espécies de plasmódios já que são consideradas um

importante indicador deste tipo de associação (Waters *et al.*, 1991;1993).

As sequências variáveis se encontram intercaladas nas sequências conservadas contribuindo para uma maior diferenciação no tamanho e composição do gene. As funções destas regiões não são bem conhecidas, porém são de grande interesse porque possuem características únicas para cada espécie, fornecendo informações sobre estrutura populacional, taxonomia e diagnóstico (Li *et al.*, 1994b).

Algumas características da sequência e arranjo genômico dos genes de RNAr do plasmódio são diferentes dos observados em outros organismos eucarióticos. A maioria dos organismos possui genes ribossomais que são altamente repetitivos e dispostos em *tandem* e encontram-se restritos a uma ou poucas regiões do genoma. As espécies de plasmódios, por sua vez, possuem de quatro a sete genes que estão dispersos em quase todos os cromossomos (Wellems *et al.*, 1987). Diferentemente dos outros organismos eucariotos, cada gene do RNAr do plasmódio aparenta possuir uma estrutura única (Li *et al.*, 1994b).

Um fato muito importante no RNAr das espécies de *P.* é que sua expressão é claramente regulada durante o ciclo de vida do parasito. Segundo Li *et al* (1994a) um tipo de gene é expresso durante a forma sanguínea assexuada do parasito (gene A) enquanto está no hospedeiro vertebrado, e outro tipo é expresso no parasito durante a

fase no mosquito (gene C). Posteriormente um terceiro tipo de gene foi descoberto, o gene O, que é expresso em oocistos maduros (Figura 9).

Figura 9 – Esquema representando a expressão gênica dos RNAs das espécies do plasmódio. A expressão é regulada durante o ciclo de vida do parasito dentro do hospedeiro vertebrado e dentro do mosquito (Li *et al*, 1994b)

Os mecanismos utilizados pelo parasito e como ele realiza essa alternância de expressões não são totalmente conhecidos até o momento. No entanto, como esse fato distingue o plasmódio dos demais organismos eucarióticos, a melhor compreensão deste sistema é de grande interesse para o melhor entendimento da biologia do parasito.

1.7.3. Diagnóstico sorológico.

Além das técnicas parasitológicas, outras técnicas indiretas também foram desenvolvidas e estas se destinam à pesquisa de

anticorpos formados contra o parasito, geralmente das classes IgM e IgG. As mais utilizadas são a Imunofluorescência indireta (Ferreira & Sanchez, 1988) e ELISA (Zavala *et al.*, 1986).

1.7.3.1. Imunofluorescência Indireta (IFI).

A reação de imunofluorescência indireta (IFI) é considerada referência no sorodiagnóstico e na soropidemiologia da malária (Ambroise-Thomas, 1974; Collins *et al.*, 1975). Os resultados desta reação são expressos em títulos e influenciados pelo tipo de antígeno empregado, pela potência do conjugado, pelo sistema de microscopia e pelo observador, apresentando elevada sensibilidade e reprodutibilidade, porém com especificidade relativa (Sulzer & Wilson., 1967).

No teste de imunofluorescência, as formas em esquizonte são as mais reativas e tornam o teste mais sensível (Target, 1970; Hall *et al.*, 1978) sendo que os anticorpos da classe IgM são detectados logo após o início da parasitemia patente (Kuvín *et al.*, 1962). A persistência dos anticorpos depende da duração, intensidade da infecção e frequência da exposição (Lopez-Antunãno & Schmunis, 1988).

1.7.3.2. Ensaio imuno-enzimático (ELISA).

O ensaio imuno-enzimático (ELISA) foi padronizado por Engvall & Perlmann (1971), como uma alternativa ao teste de radioimunoensaio. Em 1974, Voller e colaboradores, adaptaram o teste para a sorologia da malária, chamando atenção para as vantagens deste teste. Sua especificidade e sensibilidade dependem da qualidade dos antígenos e conjugados empregados (Ferrera & Sanches, 1988). É uma técnica cuja leitura é objetiva, com possibilidade de avaliar o nível de anticorpos a partir de uma única diluição de soro (Kurstak, 1985).

Se estes animais funcionarem como reservatórios silvestres, sua proximidade com o homem, decorrente da entrada deste nas matas ou por meio do desmatamento, poderia, em algum momento, facilitar a transmissão desta parasitose à população humana. Sendo assim, a notificação de casos de malária em populações próximas às regiões de Mata Atlântica, nos levam a pensar em uma provável cadeia de transmissão de malária humana-simiana ou vice-versa. A detecção de parasitos da malária em símios provenientes da Mata Atlântica pode nos dar uma noção de como esta parasitose circula nos ambientes silvestres e antrópicos.

2. Objetivos

2.1. Geral.

Detectar os agentes etiológicos da malária em símios resgatados nas diversas zonas da cidade de São Paulo, oriundos da Mata Atlântica.

2.2. Específicos.

Detectar e identificar as espécies de plasmódios por meio das análises parasitológicas (esfregaços/gotas espessas) e moleculares (PCR).

Detectar a presença de anticorpos da classe IgG contra as proteínas CSP e formas sanguíneas, por meio das técnicas de imunofluorescência indireta e ELISA.

3. Materiais e Métodos.

O projeto de dissertação foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPESQ) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

3.1. Amostras de macacos de São Paulo.

As 55 amostras de sangue de macacos do gênero *Alouatta* (bugios) foram obtidas por meio de trabalho em colaboração com veterinários do Departamento de Parques e Áreas Verdes, Prefeitura Municipal de São Paulo (DEPAVE/SP), que realiza manejo de animais silvestres com autorização do IBAMA. Este órgão colabora com nossas pesquisas desde 1996. Destes 55 animais, cinco nasceram em cativeiro. Os animais foram resgatados nas mais diversas zonas da região metropolitana de São Paulo, sendo 30 procedentes das áreas ao sul e 20 do norte (Figura 10).

As amostras de sangue foram processadas pela equipe técnica da Divisão Veterinária do DEPAVE. Após anestesia os animais tiveram o sangue colhido em tubos tipo “vacutainer” com EDTA. Estas foram

3.2. Diagnóstico por gota espessa e esfregaço sanguíneo.

A coleta, preparo e coloração das gotas espessas e esfregaços, foram realizadas de acordo com as técnicas preconizadas pela OMS (1991). No caso de bugios, realizamos a punção venosa após correta assepsia com álcool 70%. A lâmina foi aproximada do ponto de saída do sangue e apenas parte superior da gota é encostada na lâmina. Após este procedimento a gota foi espalhada em formato retangular e espessura adequada.

Para a confecção de esfregaços os mesmos procedimentos foram adotados. Após o sangue ter sido pingado na lâmina, outra lâmina foi utilizada para fazer uma camada fina deste sangue. Para tanto, esta foi colocada em um ângulo de 50° e deslocada. Após a coleta, a lâmina foi mantida em temperatura ambiente para secagem da gota de sangue – para tanto, pode-se também utilizar estufa de 37°C ou lâmpada de 25-40 watts sob placa de vidro (Brasil, 2009).

Dois tipos de coloração diferentes foram aplicados para cada uma das técnicas. Coloração gota espessa: Em um primeiro momento as lâminas foram mergulhadas em uma solução de azul de metileno por 5-10 segundos e em seguida mergulhadas rapidamente em um recipiente de água destilada para a retirada do excesso do corante. As lâminas foram colocadas em uma placa para coloração com o

lado da gota voltada para a superfície da placa. Em seguida uma solução de Giemsa na proporção de uma gota de corante para 1 ml de água tamponada foi depositada na placa côncava de coloração, sob a lâmina invertida deixando corar por 7 minutos. Após este período as lâminas foram mergulhadas em água destilada para retirada do excesso de corante e finalmente secas a temperatura ambiente.

Coloração esfregaço: As lâminas foram fixadas com álcool metílico por um minuto, após a secagem as mesmas foram colocadas de maneira invertida sobre a placa de coloração. O corante, preparado a uma proporção de duas gotas de Giemsa para 1ml de água tamponada, foi despejado por baixo das lâminas deixando corar por 15 minutos. As lâminas foram enxaguadas em água corrente e secas a temperatura ambiente.

3.3. Extração de DNA das amostras.

Todos os *primers* foram sintetizados pela Dialab ou Invitrogen do Brasil. Para a extração do DNA genômico utilizamos o Kit "Wizard® Genomic DNA Purification" da Promega com pequenas modificações. A amostra foi incubada a 37°C por 5 minutos com adição de 1µl de saponina a 5% e em seguida, o sedimento foi lavado várias vezes com PBS 1x até seu clareamento. Após este procedimento 100µl da solução

de “Nuclei Lysis Solution” e 100µl da solução de “Protein Precipitation Solution” foram adicionados à amostra que foi rapidamente vortexada e centrifugada por dois minutos. O sobrenadante foi separado em um novo tubo. Um volume de 300µl de isopropanol absoluto foi adicionado e a amostra foi centrifugada por cinco minutos. O sobrenadante foi desprezado. Um volume de 300µl de etanol 70% gelado foi adicionado e a amostra foi novamente centrifugada por 5 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado com uma pipeta para que não se encostasse no fundo do tubo. A amostra foi seca no “Speed Vacuum” por 20 minutos e posteriormente um volume de 40µl da solução do próprio kit “DNA Hidratation Solution” foi adicionado.

3.4. Reação em cadeia da Polimerase (PCR).

Três técnicas de PCR foram empregadas para identificação das espécies de plasmódios encontradas no Brasil, *P. vivax*/*P. simium*, *P. falciparum* e *P. malariae*/*P. brasilianum*. O diagnóstico foi realizado de acordo com os protocolos preconizados por Rubio *et al* (1999), Singh *et al.* (1999) e Win *et al* (2002). Todas as técnicas amplificam fragmentos do gene que codifica o RNAr 18S do plasmódio.

Como controles positivos para *P. vivax*, *P. falciparum* e *P.*

malariae, utilizamos respectivamente: DNA de plasmódios de pacientes e DNA de cultura, ambos provenientes do Núcleo de Estudos em Malária da SUCEN (Superintendência de Controle de Endemias) e DNA de paciente, diagnosticado por meio de PCR, originário do Estado do Espírito Santo.

3.4.1. PCR semi-nested Multiplex (Rubio *et al.*, 1999).

A reação de PCR foi realizada em duas etapas por meio da utilização dos seguintes *primers* (tabela 2):

Tabela 2- Tabela de *primers* (Rubio *et al.*, (1999).

1º etapa

UNR: 5'-GACGGTATCTGATCGTCTT-3'

PLF: 5'-AGTGTGTATCAATCGAGTTT-3'

HUF: 5'-GAGCCGCCTGGATACCG-3'

2º etapa

MAR: 5'-GCCCTCCAATTGCCTTCT-3'

FAR: 5'-AGTCCCCTAGAATAGTTACA-3'

VIR: 5'-AGGACTTCCAAGCCGAAG-3'

Antes de qualquer procedimento, a concentração de todos os *primers* foi ajustada para 10pmoles/ μ l. Nesta técnica, os fragmentos correspondentes ao gênero *Plasmodium* foram amplificados em volume final de 25 μ l e continham: 2,5 μ l de tampão de Taq DNA

polimerase 10X (Invitrogen), 1,25 μ l de MgCl₂ (50mM), 0,25 μ l de desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTP) mix (10mM), 1,25 μ l de UNR e PLF, 0,1 μ l de HUF, 0,25 μ l de Platinum Taq DNA polimerase (5U/ μ l) (Invitrogen) e 5 μ l de DNA genômico, sendo o volume final ajustado com água estéril.

Na segunda etapa, foram utilizados 2,5 μ l de tampão de Taq DNA polimerase 10X (Invitrogen), 0,25 μ l de dNTP mix (10mM), 1,25 μ l de MgCl₂ (50mM), 1,25 μ l de PLF, 0,75 μ l de FAR, 0,156 μ l de MAR, 0,125 μ l de VIR, 0,1 μ l Platinum Taq DNA polimerase 10X (Invitrogen), 2 μ l do produto da primeira etapa diluído (4 μ l/1000 μ l), totalizando um volume final de 25 μ l.

As condições de reação foram as seguintes: Desnaturalização 94°C por 5 minutos; (primeira etapa) 40 ciclos a 94°C por 45 segundos, 62°C por 45 segundos e 72°C por 60 segundos; (segunda etapa) 35 ciclos a 94°C por 20 segundos, 62°C por 20 segundos e 72°C por 30 segundos. O ciclo final foi seguido por um período de extensão de 10 minutos a 72°C.

O protocolo origina fragmentos de tamanhos diferenciados para cada espécie de plasmódio (Figura 11).

Figura 11 – Descrição da reação de PCR multiplex segundo Rubio *et al* (1999). A figura mostra a reação multiplex onde na primeira etapa são amplificados dois fragmentos, um de 783/821pb e outro de 231pb correspondentes a um fragmento gênero específico de *Plasmódio sp* e outro um fragmento controle para mamíferos, respectivamente. Numa segunda etapa, *primers* espécie específicos são adicionados, amplificando fragmentos de tamanhos específicos de acordo com a espécie de plasmódio encontrada. Fragmentos de 269pb para *P. malariae*, 395pb para *P. falciparum* e 499pb para *P. vivax*.

3.4.2. PCR nested (Singh *et al.*, 1999).

A reação de PCR foi realizada em duas etapas por meio da utilização dos seguintes *primers* (tabela 3):

Tabela 3- Tabela de *primers* (Singh *et al.*, (1999)).

1º etapa

rPLU1: 5' - TCA AAG ATT AAG CCA TGC AAG TGA – 3'

rPLU5: 5' - CCT GTT GTT GCC TTA AAC TCC - 3'

2º etapa

rFAL1: 5' - TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT – 3'

rFAL2: 5' - ACACAATGAACTCAATCATGA CTACCCGTC – 3'

rVIV1: 5' - CGCTTCTAGCTTAATCCACAT AACTGATAC – 3'

rVIV2: 5' - ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGA AAGTCCTTA – 3'

rMAL1: 5' - ATAACATAGTTGTACGTTAAG AATAACCGC – 3'

rMAL2: 5' - AAAATTCCCATGCATAAAAAA TTATACAAA – 3'

Antes de qualquer procedimento, a concentração de todos os *primers* foi ajustada para 10pmoles/ μ l. Nesta técnica os fragmentos correspondentes ao gênero *Plasmodium* foram amplificados em volume final de 25 μ l que continham: 2 μ l de tampão de Taq DNA polimerase 10X (Invitrogen), 1 μ l de MgCl₂ (50nM), 0,5 μ l de desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTP) mix (10nM), 2 μ l de rPLU1 e rPLU5, 0,25 μ l de Platinum Taq DNA polimerase (5U/ μ l) (Invitrogen) e 5 μ l de DNA genômico, sendo o volume final ajustado com água estéril.

Na segunda etapa, foram utilizados 2 μ l de tampão de Taq DNA polimerase 10X (Invitrogen), 0,5 μ l de dNTP mix (10mM), 1 μ l de MgCl₂ (50mM), 2 μ l de cada *primer*, rFAL 1 e 2, rMAL 1 e 2 e rVIV 1 e 2 para cada reação, 0,1 μ l Taq DNA polimerase 10X (Invitrogen), 2 μ l do produto da primeira etapa (4 μ l/1000 μ l), totalizando um volume final de 25 μ l.

As condições de reação foram as seguintes: Desnaturalização 94°C por quatro minutos; (primeira etapa) 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por um minuto e 72°C por um minuto; (segunda etapa) 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 58°C por um minuto e 72°C por um minuto. O ciclo final foi seguido por um período de extensão de 10 minutos a 72°C.

O protocolo origina fragmentos de tamanhos diferenciados para cada espécie de plasmódio (Figura 12).

Figura 12 – A figura mostra a reação *nested* segundo Singh et al, (1999). Onde na primeira etapa é amplificado um fragmento de 600pb gênero específico de *Plasmodium* sp. Numa segunda etapa primers espécie específicos são adicionados separadamente, sendo cada reação realizada separadamente para cada par de primers. Foram amplificados fragmentos de aproximadamente 120pb para *P. vivax*, 144pb para *P. malariae*, 205pb para *P. falciparum*.

3.4.3. PCR nested (Win *et al.*, 2002).

A reação de PCR foi realizada em duas etapas por meio da utilização dos seguintes *primers* (tabela 4):

Tabela 4- Tabela de primers (Win *et al.*, 2002).

1º etapa

P1UP: 5' TCC ATT AAT CAA GAA CGA AAG TTA AG 3'

P2: 5' GAA CCC AAA GAC TTT GAT TTC TCA T 3'

2º etapa

P1: 5' ACG ATC AGA TAC CGT CGT AAT CTT 3'

V1: 5' CAA TCT AAG AAT AAA CTC CGA AGA GAA A 3'

F2: 5' CAA TCT AAA AGT CAC CTC GAA AGA TG 3'

M1: 5' GGA AGC TAT CTA AAA GAA ACA CTC ATA T 3'.

Antes de qualquer procedimento, a concentração de todos os primers foi ajustada para 10pmoles/ μ l. Nesta técnica os fragmentos correspondentes ao gênero *Plasmodium* foram amplificados em volume final de 25 μ l que continham: 2 μ l de tampão de Taq DNA polimerase 10X (Invitrogen), 1 μ l de MgCl₂ (50nM), 0,25 μ l de desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTP) mix (10nM), 0,8 μ l de : P1up e P2, 0,16 μ l de Platinum Taq DNA polimerase (5U/ μ l) (Invitrogen) e 5 μ l de DNA genômico, sendo o volume final ajustado com água estéril.

Na segunda etapa, foram utilizados 2 μ l de tampão de Taq DNA polimerase 10X (Invitrogen), 0,5 μ l de dNTP mix (10mM), 1 μ l de MgCl₂ (50mM), 2,0 μ l de P1 combinado a 2,0 μ l de V1 ou F1 ou M1, 0,16 μ l Taq

DNA polimerase 10X (Invitrogen), 2µl do produto da primeira etapa (2 µl/100µl), totalizando um volume final de 25µl.

As condições de reação foram as seguintes: Desnaturalização 92°C por dois minutos; (primeira etapa) 35 ciclos a 92°C por 30 segundos, 60°C por 90 segundos e 60°C por cinco minutos; (segunda etapa) 18 ciclos a 92°C por 30 segundos, 60°C por um minuto e 60°C por cinco minutos. O ciclo final foi seguido por um período de extensão de 10 minutos a 72°C.

O protocolo origina fragmentos de mesmo tamanho para cada espécie de plasmódio (Figura 13).

Figura 13 – A figura mostra a reação *nested* segundo Win et al., (2002). Na primeira etapa, é amplificado um fragmento de 130pb gênero específico de *Plasmodium* sp. Numa segunda etapa, primers espécie específicos são adicionados, sendo cada reação realizada separadamente para cada par de primers. Fragmentos de 100pb são amplificados para as três espécies de plasmódios estudadas.

3.4.4. Visualização dos amplificados.

Os amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em tampão TBE 1X. Após a corrida, o gel foi corado em brometo de etídio e os produtos visualizados e fotodocumentados em aparelho “eagle eye” da Stratagene.

3.5. Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI).

Foram utilizados antígenos de formas assexuadas de *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* obtidos respectivamente de pacientes primoinfectados e cultura do parasita (ambos cedidos pela SUCEN), e de símios infectados experimentalmente. As lâminas de *P. vivax* e *P. falciparum* foram confeccionadas no Laboratório de Protozoologia e as de *P. malariae* foram cedidas pelo Dr. William Collins do CDC de Atlanta.

Os antígenos consistiram de uma suspensão de hemácias lavadas em PBS pH 7.2, com parasitemia ideal (aprox. +/2 a +) e predominância de trofozoítos maduros e esquizontes. Foram adicionados 10µl desta suspensão sobre as áreas demarcadas nas lâminas para imunofluorescência. Após secarem à temperatura ambiente, as lâminas foram embrulhadas e armazenadas a -70°C, até

o momento de uso.

A técnica foi realizada para a pesquisa de anticorpos da classe IgG visto que não há conjugado simiano marcado para a detecção de anticorpos da classe IgM. A reação foi realizada de acordo com o protocolo de Ferreira & Sanches (1988) com pequenas modificações.

Os soros foram diluídos em PBS pH 7.2 contendo 1% de Tween 80, nas razões de 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560, 1:5120 e 1:10240. Uma alíquota de 10µl de cada diluição do soro foi colocada em cada orifício da lâmina com o antígeno. As lâminas foram então incubadas em câmara úmida por 30 minutos à 37°C. Após este período, as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS 7,2 por cinco minutos cada e foram posteriormente secas. Em seguida, cada orifício foi coberto com soro anti-IgG de macaco (produzido em coelhos) conjugado a Isotiocianato de Fluoresceína – FITC, diluído em Azul de Evans. As lâminas foram novamente incubadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos. Após o período de incubação, as lâminas foram lavadas duas vezes em PBS pH 7,2 por cinco minutos para remoção do excesso de conjugado. As lâminas foram secas e montadas com glicerina pH 9,5 ou produto similar. Foram incluídos controles positivos e negativos em cada reação.

3.6. ELISA para detecção do antígeno (CSP).

Os peptídeos foram sintetizados comercialmente pela Genemed Biotechnologies, Inc. ou Invitrogen Corp. EUA. Para detecção de anticorpos da classe IgG contra a região repetitiva específica da proteína circumsporozoíta (CSP), foram utilizados os seguintes peptídeos:

MAP-29: *P. malariae* – Pm/Pb [(NAAG)₄]₄: peptídeo contendo quatro braços com 16 aminoácidos cada um, com regiões repetitivas de quatro aminoácidos (Lal et al., 1988b).

AS-30: *P. vivax* VK210 "clássico" – Pvc (GDRADGQPA)₂ (GDRAAGQPA)₂ (GDRADGQPA): peptídeo com 45 aminoácidos, com nove aminoácidos repetitivos (Arnot et al, 1985; Curado, 1995) .

AS-27: *P. vivax* VK 247 – Pvk (ANGAQNQPG)₄: peptídeo com 36 aminoácidos, contendo nove aminoácidos repetitivos (McCutchan et al, 1985).

PL-35: *P. vivax-like* humano – Pvl (APGANQEGGAA)₃: peptídeo com 33 aminoácidos, contendo 11 aminoácidos repetitivos (Rosenberg et al, 1989).

P. falciparum - Pf (NANP)₈: peptídeo com 32 aminoácidos, contendo quatro aminoácidos repetitivos (Qari et al, 1993).

Placas de poliestireno maxisorp/NUNC® foram sensibilizadas com 100 µl/cavidade dos peptídeos [*P. malariae*/*P. brasilanum*, *P. vivax*

“clássico”, *P. vivax* VK 247 e *P. vivax-like* humano e *P. falciparum*] diluídos a 2,5ug/μl em PBS pH 7,2 (0,15 M - solução salina tamponada com fosfatos 0,01 M, pH 7,2). As placas sensibilizadas foram deixadas durante a noite a 4°C. Após seis lavagens com PBS pH 7,2 + Tween 20 à 0,05% (PBS-T), estas foram bloqueadas com PBS-T-leite (desnatado) à 5% por duas horas em câmara úmida à temperatura de 37°C; a seguir a solução de bloqueio foi retirada para a colocação das amostras de soro diluído.

Os soros diluídos em PBS-T-leite 2,5%, foram depositados no volume de 100μl/cavidade da placa, permanecendo por uma hora em câmara úmida à 37°C. Após seis lavagens com PBS-T, procedeu-se à segunda incubação por uma hora com soro anti-IgG de macaco conjugado com peroxidase (Sigma A-2054). Novamente foram realizadas seis lavagens seguidas de uma lavagem final somente com PBS pH 7,2. As reações foram reveladas adicionando-se 100 μl/cavidade de substrato ABTS por cavidade da placa (Kirkegaard & Perry Laboratory, Maryland, EUA).

As reações foram interrompidas por adição de 50 μl/cavidade de solução aquosa de SDS à 10%. As absorbâncias foram determinadas por leitura a 414 nm em leitor de ELISA (Multiskan® MS).

Todos os soros foram testados em duplicatas e os resultados expressos pela média das absorbâncias. Foram incluídos, em cada ensaio, controles positivos e negativos. Os soros utilizados como

controles positivos e negativos para cada peptídeo foram testados anteriormente e, portanto apresentavam absorbâncias conhecidas (Curado *et al.*; 1997).

3.7. ELISA para detecção do antígeno (MSP).

Para detecção de anticorpos da classe IgG proteínas recombinantes correspondentes à sequências conservadas de PvMSP-1₁₉ e PfMSP-1₁₉ foram doadas pelo Professor Doutor Gerhard Wunderlich do Instituto de Ciências Biomédicas/USP.

Para a PvMSP-1₁₉ o antígeno foi diluído às concentrações de 0,65; 1,3; 2,6 e 5,2µg/ml e para PfMSP-1₁₉ o antígeno foi diluído às concentrações 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2µg/ml em Tampão Carbonato (pH 9,6 – 0,05M) e um volume de 100µl/cavidade da placa foi adicionado. A mesma diluição foi utilizada para a proteína GST (sem estar conjugada à PvMSP-1₁₉ ou PfMSP-1₁₉), adicionando-a na placa em colunas paralelas às concentrações testadas para o antígeno. Em seguida, as placas foram colocadas em câmara úmida na geladeira à 4 °C durante a noite. Posteriormente, foram feitas 3 lavagens com PBS-Tween 0,1%. O bloqueio foi realizado com PBS-Tween/leite 4% por 1 hora em câmara úmida à temperatura ambiente. Após esse tempo, foram feitas duas lavagens e os soros foram adicionados nas diluições teste de 1/10, 1/50, 1/100 e

1/200. Os soros foram diluídos em PBS-Tween 1% e soros controle positivos e negativos oriundos da própria área de estudo foram acrescentados às placas (positivos = títulos elevados na RIFI para IgG). Após nova incubação por uma hora em câmara úmida à temperatura ambiente, foram feitas cinco lavagens. O conjugado foi acrescentado às diluições teste de 1/500, 1/1000 e 1/2000 com posterior incubação como citado anteriormente. Um último ciclo de lavagens foi feito e as reações foram reveladas adicionando 100µl/cavidade do substrato OPD (Sigma) diluído em 15ml de tampão citrato com o acréscimo de 7,5µl de H₂O₂. As reações foram interrompidas com a adição de HCl 4N no volume de 50µl/cavidade.

Para a PvMSP-119 as diluições ideais foram de 1/10, 0,65µg/ml e 1/500 para soro, antígeno e conjugado.

Para PfMSP-119 as diluições foram de 1/10, 1,6µg/ml e 1/2000 para soro, antígeno e conjugado.

As absorbâncias foram obtidas por leitura a 492 nm em leitor de ELISAMultiskan/MS). Estabelecemos o limiar de reatividade (cut-off) considerando 27 soros de macacos da área de estudo negativos para IFI.

3.8. Análise estatística.

A análise estatística comparativa entre as duas regiões estudadas (norte e sul) foi efetuada utilizando-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney (programa BioEstat 5.0). A diferença foi considerada significativa quando a probabilidade de igualdade foi menor que 0,05 ($p < 0,05$).

4. Resultados.

4.1. Identificação parasitológica de plasmódios (gota espessa/esfregaço).

As tabelas 5 e 6 mostram os locais de resgate dos animais na região metropolitana da cidade de São Paulo. Observa-se que 70% (30/50) foram resgatados na zona sul enquanto que 30% (20/50) foram resgatados na zona norte.

Tabela 5 – Bugios resgatados ao sul da região metropolitana da cidade de São Paulo (bu). Local de resgate segundo número de registro do DEPAVE (Reg.), data de coleta e número IMT (IMT).

N. Reg.	Data Col.	N. IMT	Localização
27618	23/01/2006	bu 02	Jd. Capela
27.193	31/01/2006	bu 03	Grajaú
23.587	17/10/2006	bu 06	Parelheiros
29.436	09/10/2006	bu 08	Pq Estado
30.446	02/10/2006	bu 12	Parelheiros
30458	02/10/2006	bu 13	Grajaú
30.770	14/11/2006	bu 18	Parelheiros
26.164	20/10/2006	bu 22	Cid. Dutra/Sto Amaro
25932	27/12/2006	bu 23	Ibúna
26.452	19/12/2006	bu 24	Pq. Estado
27.567	22/12/2006	bu 26	Pq Estado
24.278	09/02/2007	bu 35	Pq. Estado
31661	23/04/2007	bu 45	Teresinha Prado
31650	23/04/2007	bu 46	Parelheiros
28.189	05/04/2007	bu 50	Embu das Artes
33554	18/01/2008	bu 66	Parelheiros
34.019	10/04/2008	bu 67	Embu-Guaçu
32338	28/07/2008	bu 72	Iguape
32870	28/07/2008	bu 73	Embu-Guaçu
34.813	22/09/2008	bu 75	Parelheiros
34806	02/12/2008	bu 79	Parque do Estado
35731	10/12/2008	bu 80	Itapeccerica da Serra
36.680	31/04/2009	bu 84	Grajaú

Continuação Tabela 5– Bugios resgatados ao sul da região metropolitana da cidade de São Paulo (bu). Local de resgate segundo número de registro do DEPAVE (Reg.), data de coleta e número IMT (IMT).

N. Reg.	Data Col	N. IMT	Localização
34.496	13/3/2009	bu 86	Parelheiros
36327	12/02/2009	bu 89	Grajaú
34299	06/04/2009	bu 93	Jabaquara
34066	06/04/2009	bu 94	Osasco
35217	09/04/2009	bu 99	Itapecerica da Serra
37016	25/05/2009	bu 101	São Bernardo do Campo
33102	24/06/2009	bu 107	Ipiranga

Tabela 6 – Bugios resgatados ao norte da região metropolitana da cidade de São Paulo (bu). Local de resgate segundo número de registro do DEPAVE (Reg.), data de coleta e número IMT (IMT).

N. Reg.	Data Col	N. IMT	Localização
28905	16/01/2006	bu 01	Horto Florestal
22.149	31/01/2006	bu 04	Parque Estadual da Cantareira
29.537	11/04/2006	bu 09	Mairiporã
30.109	17/10/2006	bu 11	Mairiporã
31536	20/03/2007	bu 39	Freguesia do Ó
30.500	08/10/2006	bu 14	Mairiporã
18.554	20/10/2006	bu 21	Parque Estadual da Cantareira
30.975	10/12/2006	bu 30	Mairiporã
31.012	19/12/2006	bu 31	Parque Estadual da Cantareira
31.429	27/02/2007	bu 38	Mairiporã
30.868	02/04/2007	bu 44	Mairiporã
27.128	05/04/2007	bu 51	Mairipora
20732	11/04/2007	bu 53	Horto Florestal
36130	06/04/2009	bu 95	Horto Florestal
36740	09/04/2009	bu 96	Horto Florestal
36962	11/05/2009	bu 97	Mairiporã
35260	09/04/2009	bu 98	Casa Verde
35.882	03/06/2009	bu 102	Franco da Rocha
35679	16/06/2009	bu 103	Cantareira
37110	24/06/2009	bu 105	Horto Florestal

Todos os animais tiveram seu sangue analisado por gota espessa e/ou esfregaço e apenas um animal, bu 67, procedente da zona sul, foi diagnosticado com formas sugestivas para plasmódios (figura 14).

Figura 14 – Esquizontes de *Plasmodium vivax*/*P. brasilianum*. Esfregaço sanguíneo do bugio 67, corado com Giemsa e observado em microscopia óptica.

4.2. Identificação molecular de plasmódios.

Na tentativa de se identificar e confirmar as espécies de plasmódios, dois testes foram realizados, PCR *multiplex* (Rubio *et al.*, 1999) e PCR *nested* (Singh *et al.*, 1999). As amostras que apresentaram resultados divergentes nas duas técnicas foram ensaiadas em uma terceira técnica *nested* PCR (Win *et al.*, 2002).

Observamos resultados divergentes entre as diferentes técnicas moleculares. Nos 10 animais positivos em PCR da região sul, os bugios

99, 101 e 107 apresentaram resultados positivos para *P. vivax* em apenas uma reação enquanto que os demais resultaram positivos em duas ou mais reações. Nenhuma das infecções mistas foi confirmada em mais de uma técnica. Observamos que não houve consenso entre as técnicas quando a amostra do bugio 67 com lâmina positiva para *P. vivax/P. simium* foi ensaiada. Considerando o consenso molecular, podemos dizer que 20% (06/30) das amostras da região sul foram positivas sendo 13,3% (04/30) para *P. vivax* e 6,6% (02/30) para *P. malariae* (tabela 7).

Tabela 7 – Amostras procedentes da zona sul que exibiram consenso molecular segundo as três diferentes técnicas aplicadas; Multiplex PCR (Rubio *et al.*, 1999), nested 1 (Singh *et al.*, 1999) e nested 2 (Win *et al.*, 2002).

Bugio	PCR			Consenso molecular
	Multiplex	Nested 1	Nested 2	
45	<i>Pv+Pm</i>	<i>Pv</i>	<i>Pv</i>	<i>Pv</i>
67*	<i>Pm</i>	Neg	<i>Pv</i>	?
80	Neg	<i>Pv</i>	<i>Pv</i>	<i>Pv</i>
84	<i>Pm</i>	<i>Pv</i>	<i>Pv</i>	<i>Pv</i>
89	<i>Pv</i>	<i>Pv</i>	Neg	<i>Pv</i>
93	<i>Pm</i>	Neg	<i>Pm</i>	<i>Pm</i>
94	<i>Pm</i>	<i>Pv + Pm</i>	Neg	<i>Pm</i>
99	Neg	<i>Pv</i>	Neg	Neg
101	Neg	<i>Pv</i>	Neg	Neg
107	Neg	<i>Pv</i>	Neg	Neg

(?) Sem consenso molecular.

* Lâmina positiva.

Ao observar as amostras provenientes da região norte, 50% (10/20) foram negativos para as três espécies de plasmódios. O restante, 50% (10/20), foram positivas para pelo menos uma espécie

em um ou mais testes. Considerando o consenso molecular, observamos 25% (05/20) de positividade exclusivamente por *P. vivax*.

Tabela 8 - Amostras procedentes da zona norte que exibiram consenso molecular segundo as três diferentes técnicas aplicadas; Multiplex PCR (Rubio et al., 1999), *nested 1* (Singh et al, 1999) e *nested 2* (Win et al., 2002).

Bugio	PCR			Consenso molecular
	Multiplex	Nested 1	Nested 2	
04	<i>Pv</i>	Neg	Neg	Neg
21	Neg	Neg	<i>Pv</i>	Neg
30	<i>Pv</i>	Neg	Neg	Neg
44	<i>Pm</i>	Neg	Neg	Neg
95	<i>Pv</i>	<i>Pv</i>	-	<i>Pv</i>
96	<i>Pv</i>	<i>Pv</i>	-	<i>Pv</i>
97	<i>Pv</i>	<i>Pv</i>	-	<i>Pv</i>
98	<i>Pv</i>	<i>Pv</i>	-	<i>Pv</i>
102	Neg	<i>Pv</i>	Neg	Neg
105	<i>Pv</i>	<i>Pv</i>	-	<i>Pv</i>

(?) Sem consenso molecular.

(-) Reação não realizada.

* Lâmina positiva.

Podemos observar nas figuras 15, 16 e 17 os padrões de amplificação para cada reação de PCR.

Figura 15 - Perfil de amplificação em gel de agarose a 1,5% de acordo com Rubio *et al.*, 1999: (A e H) - DNA ladder (100bp, Invitrogen); (B, E, F, G) - *P. vivax*; (D) - Infecção mista *P. malariae* / *P. vivax*.

Figura 16 - Perfil de amplificação em gel de agarose a 1,5% de acordo com Singh *et al.*, 1999: (A) - DNA ladder (100bp, Invitrogen); (C, D e E) - *P. vivax*.

Figura 17 - Perfil de amplificação em gel de agarose a 1,5% de acordo com Win *et al.*, 2002: (A) - DNA ladder (100bp, Invitrogen); (B e C) – *P. vivax*.

4.3. Sorológicos

4.3.1. Detecção de anticorpos da classe IgG contra formas assexuadas pela reação de imunofluorescência indireta (IFI).

A tabela 9 mostra a média geométrica dos títulos dos anticorpos da classe IgG, contra as formas assexuadas das três espécies de plasmódios, nos soros de macacos resgatados nas regiões norte e sul.

Nos animais da zona sul, 20 foram ensaiados para as três espécies, sendo os 10 restantes apenas ensaiados para *P. malariae*. Nos animais da zona norte 12 foram ensaiados para as três espécies, sendo os oito restantes apenas ensaiados para *P. malariae*.

Não foi possível ensaiar algumas amostras tanto pela falta de

material biológico como por problemas na qualidade das lâminas de imunofluorescência (*Plasmodium vivax* e *P. falciparum*).

Tabela 9 – Médias geométricas dos títulos de anticorpos da classe IgG segundo espécies de plasmódio e região.

Espécie	Região	
	Norte	Sul
<i>P. vivax</i>	1940,11	452,54
<i>P. malariae</i>	348,96	422,24
<i>P. falciparum</i>	253,98	137,15

Na figura 18 podemos observar a distribuição dos títulos para anticorpos da classe IgG obtidos com os antígenos de *Plasmodium vivax*, *P. malariae* e *P. falciparum*.

Figura 18 – Distribuição dos títulos de anticorpos da classe IgG obtidos em IFI com os antígenos de *Plasmodium vivax* (PvS e PvN), *P. falciparum* (PfS e PfN) e *P. malariae* (PmS e PmN) nos soros de animais resgatados nas regiões norte (N) e sul (S). Conjugado anti-IgG de macaco (*Rhesus*). Linhas representando médias geométricas dos títulos. "cut-off" = 1:40.

4.3.2 Detecção de anticorpos da classe IgG contra a proteína CSP pela técnica imunoenzimática (ELISA).

O número de soros ensaiados foi variável dependendo da quantidade de amostra disponível. Verificamos as seguintes respostas de anticorpos da classe IgG contra os peptídeos correspondentes a proteína CSP de *Plasmodium vivax* e suas variantes, *P. malariae*/*P. brasilianum* assim como para *P. falciparum*, nas regiões norte e sul respectivamente: *P. vivax* VK210 10% (2/20) e 30% (9/30); *P. vivax* VK247 30,8% (4/13) e 13,6% (3/22); *P. vivax* like 11,1% (2/18) e 3,84% (1/26); *P. malariae*/*P. brasilianum* 15% (3/20) e 23% (7/30); *P. falciparum* 33,3% (6/18) e 27,6%. As absorbâncias estão representadas na figura 19.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as regiões sul e norte quando o teste não paramétrico de Mann Whitney foi aplicado.

Figura 19 - Distribuição das absorvâncias dos soros de animais resgatados nas regiões norte e sul por meio da técnica de ELISA com os peptídeos sintéticos correspondentes a Pvc, Pvk, Pvl, Pm e Pf. Limite superior da faixa amarela: "cut-off" ($M+3DP$): (A) Pvc= 0.148, (B) Pvk= 0.224, (C) Pvl= 0.251, (D) Pm= 0.223, (E) Pf= 0.261. As diferenças não são estatisticamente significantes segundo o teste de Mann-Whitney.

4.3.3. Detecção de anticorpos da classe IgG contra as proteínas PvMSP-1₁₉ e PfMSP-1₁₉, pela técnica imunoenzimática (ELISA).

As positivities de soros reagentes contra as proteínas recombinantes correspondentes às MSPs de *Plasmodium vivax* foram de 10% (2/20) para o norte e 30% (9/30) para o sul; para *P. falciparum* não foram encontradas amostras positivas em nenhuma das regiões. As absorbâncias estão representadas na figura 20.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as regiões sul e norte quando o teste não paramétrico de Mann Whitney foi aplicado.

Figura 20 - Distribuição das absorbâncias dos soros de animais resgatados nas regiões norte e sul por meio da técnica de ELISA com proteínas MSP-1₁₉ de *P. vivax* e *P. falciparum*. Limite superior da faixa amarela: "cut-off" (M+3DP): (A) MSPpV= 0,282; (B) MSPpF= 0,08. As diferenças não são estatisticamente significantes segundo o teste de Mann-Whitney.

5. Discussão.

A malária é uma doença grave acometendo atualmente milhões de pessoas e apesar dos esforços para o seu controle, estima-se que anualmente, cerca de 225 milhões de pessoas sejam infectadas em todo mundo com muitos casos evoluindo a óbito (OMS, 2010). Esta parasitose concentra-se em regiões tropicais e subtropicais abrangendo populações urbanas e rurais (Bruce-Chwatt, 1985; Avila, 2005). No Brasil, em 2008, aproximadamente 300.000 casos foram notificados pelo Ministério da Saúde (2009), sendo que aproximadamente 90% destes ocorreram na Região Amazônica.

Porém, nas áreas extra amazônicas, com cobertura vegetal caracterizada pela Mata Atlântica, tais como os estados do Paraná, Espírito Santo e São Paulo, casos autóctones de malária residual denominados de "malária bromeliana" são notificados anualmente (Downs & Pittendrigh 1946 e Brasil, 2008). Pesquisas sorológicas realizadas em algumas populações residentes próximas a Mata Atlântica do estado de São Paulo evidenciaram a presença de anticorpos contra a proteína (CSP) de *Plasmodium vivax* VK210, *P. vivax* VK247, *P. vivax*-like e *P. malariae*/*P. brasilianum* como também contra formas sanguíneas de *P. vivax* (Curado, 1995; Curado *et al.*; 1997, 2006).

O conhecimento da circulação de plasmódios simianos, *Plasmodium simium* e *P. brasilianum*, nas regiões sul e sudeste do Brasil foi relatado há muitos anos por Deane (1992) e alguns autores verificaram que estes plasmódios apresentam semelhanças morfológicas, genéticas e imunológicas com os plasmódios humanos, *Plasmodium vivax* e *P. malariae* respectivamente (Coatney, 1971). Estas evidências conjuntamente com a demonstração da efetividade da transmissão de parasitos simianos entre a população humana (Fong et al., 1971; Deane, 1992), indicam a possibilidade de haver um possível quadro zoonótico nestes habitats.

Os seguintes gêneros de macacos podem ser encontrados na região sudeste do Brasil: *Alouatta*, *Brachyteles*, *Callicebus*, *Cebus*, *Callithrix* e *Leontopithecus*. Quando consideramos parasitemia nos símios notamos que esta é geralmente baixa, porém mais persistente se estes estiverem infectados por *Plasmodium brasilianum*. Alguns animais podem apresentar sintomas como febre, apatia, perda de apetite e de peso, porém, a maioria apresenta cura espontânea (Deane, 1992).

Neste sentido, nossa proposição foi descrever por meio de metodologia já preconizada por outros pesquisadores, a condição parasitológica, sorológica e molecular de alguns macacos resgatados pelo DEPAVE, nas áreas próximas as Matas Atlânticas da região metropolitana de São Paulo. Por se tratar de uma espécie endêmica

deste tipo de vegetação, supomos que estes animais originam-se das matas próximas de suas capturas, isto é, das zonas norte e sul de São Paulo onde se encontram resquícios de Mata Atlântica.

Após o resgate, os animais foram examinados hematológica e bioquimicamente, todos os animais estavam saudáveis sob o ponto de vista clínico. O exame de parasitos da malária fez parte de um destes exames.

Por serem animais sociais, estes são mantidos em cativeiro muito tempo, por vezes anos, até que os veterinários consigam formar famílias e fazer com estes se ambientem novamente às matas, já que a meta estabelecida pelos veterinários do DEPAVE durante este estudo, foi a soltura destes no sub distrito de Parelheiros, zona sul da cidade de São Paulo, onde se concentra a APA (Área de Proteção Ambiental) Kurucutu, coberta por Mata Atlântica. Esta meta não se cumpriu por problemas logísticos dentro da própria região de Parelheiros. O temor de todos envolvidos neste estudo sempre foi o de que a população, recebendo informações errôneas, começasse a perseguir e matar os animais culpando-os pelos casos notificados de malária.

Sendo assim, a análise das lâminas com esfregaços e gotas espessas foi realizada em todos os bugios, com posterior validação dos resultados pelos técnicos e pesquisadores do Núcleo de Estudos em Malária da SUCEN, os quais esclareceram qualquer resultado duvidoso.

Apenas uma lâmina de bugio, resgatado na zona sul da cidade São Paulo, mostrou-se positiva para *Plasmodium vivax*/*P. simium*.

Atualmente, o diagnóstico da malária humana é realizado por meio de testes parasitológicos (gotas espessas) e indiretamente por meio de testes sorológicos que detectam a presença de anticorpos contra o parasito. Infelizmente, a técnica parasitológica apresenta limitações com relação à especificidade e sensibilidade (Tham *et al.*, 1999) e a sorológica demonstra apenas contato prévio ou recente com a doença. Em casos de baixa parasitemia, a leitura de lâminas não apresenta grande eficácia e demanda muito tempo de análise. Além disto, o resultado deste tipo de exame é visual e pode prejudicar a identificação de diferentes espécies, já que algumas são morfológicamente semelhantes (Avila, 2005). Apesar destes fatores, a gota espessa é considerada, até hoje, como “padrão ouro”, apresentando custo reduzido, o que facilita sua aplicabilidade nas mais diversas condições (Datta *et al.*, 2010).

Ao se comparar os testes parasitológicos com os moleculares, diversos autores relataram a eficácia da PCR, que se mostrou mais precisa no diagnóstico de casos duvidosos (Waters & McCutchan., 1989; Avila, 2005; Nandwani *et al.*, 2005; Datta *et al.*, 2010).

Ao realizarmos a análise molecular das amostras, percebemos a quantidade significativamente maior de resultados positivos em PCR. Das 50 amostras ensaiadas, aproximadamente 20 resultaram positivas

contrastando com apenas uma lâmina positiva. Este fato se deve a maior sensibilidade da PCR em relação à lâmina (Avila, 2005; Nandwani et al., 2005; Datta et al., 2010).

A PCR pode ter sua eficácia comprometida respectivamente pela presença de fatores inibitórios como substâncias intracelulares ou até mesmo anticoagulantes que podem interferir na dinâmica da reação ou na qualidade da amostra. Apesar de apresentar elevada sensibilidade, esta técnica apresenta limitações como o alto custo de reagentes e instalações adequadas, demandando um maior período no processamento das amostras (Datta et al., 2010).

Quando nos vimos à frente de amostras provenientes de áreas com baixa endemicidade, surgiram dúvidas com relação à técnica de PCR mais adequada. As três técnicas moleculares que utilizamos, foram descritas com pacientes provenientes de áreas endêmicas (Rubio et al., 1999, Singh et al., 1999, Win et al., 2002).

Com a finalidade de alcançar um consenso molecular, utilizamos três protocolos de PCR, duas técnicas *nested* e uma *semi-nested* multiplex. Verificamos que entre as três técnicas, os resultados mostraram-se discordantes, fato também observado por Boonma et al. (2007) ao realizar estudos comparativos utilizando três protocolos diferentes (*nested* PCR, multiplex PCR e real-time PCR) .

Neste trabalho, Boonma et al. (2007), utilizando o consenso molecular, encontrou 67% (91/16) de amostras positivas em PCR e

65.4% (89/136) positivas na lâmina. Em nosso estudo, nos deparamos com 2% (01/50) de positividade em lâmina e 22% (11/50) em PCR. Ao contrário de nosso estudo, os autores estudaram pacientes da Tailândia com sintomatologia, encontrando amostras positivas em lâminas que não foram diagnosticadas em PCR. Diante deste comentam sobre o fenômeno do “tudo ou nada” que ocorre em amostras com parasitemia muito baixa e relataram que, nestes casos, quando são realizadas diversas amplificações com a mesma amostra, as reações podem apresentar resultados divergentes, fato que ocorreu em nosso estudo.

Com relação à sensibilidade, nossos resultados são concordantes com os descritos por Boonma *et al.* (2007) e outros autores, a PCR, devido a sua sensibilidade, foi capaz de detectar mais amostras positivas que a análise das lâminas.

Os exames sorológicos nos dão indícios de contato prévio ou recente com o parasito, sendo assim, ensaiamos os soros destes animais tanto para a detecção de anticorpos contra a proteína CSP quanto contra formas assexuadas do parasito. Na reação de IFI, observamos para ambas as zonas, médias geométricas dos títulos de anticorpos maiores contra *Plasmodium vivax* seguidas de *P. malariae* e *P. falciparum* e observamos que apesar de uma alta frequência de soros positivos para *P. falciparum*, seus títulos não foram tão elevados.

Acreditamos que as elevadas freqüências encontradas se devem a reações cruzadas entre as espécies de plasmódios.

Nesta técnica utilizamos antígenos de cultura (*Plasmodium falciparum*) ou de sangue de pacientes primo infectados (*P. vivax*), porém, em regiões de Mata Atlântica, a parasitemia de pacientes infectados por *P. vivax* é baixíssima, por outro lado, praticamente não se encontram pacientes positivos para *P. malariae* visto que estas formas em gotas espessas são semelhantes a *P. vivax* e estes também não são diagnosticados com alta parasitemia para a confecção de lâminas. Apenas antígenos de *Plasmodium falciparum* são facilmente encontrados já que esta espécie é cultivável. Em síntese, antígenos para reações de IFI não são fáceis de serem encontrados.

No intuito de conseguirmos substituir as reações de IFI por outra técnica, detectamos os anticorpos contra *Plasmodium vivax* e *P. falciparum* utilizando a técnica de ELISA com as proteínas recombinantes PvMSP-1₁₉ e PfMSP-1₁₉. Continuamos a utilizar a técnica de IFI para a detecção de anticorpos contra *Plasmodium malariae*, por não ter, até o momento da tese, recombinante para esta espécie de plasmódio. Até 2010, apenas as proteínas MSP-1 para *Plasmodium vivax* e *P. falciparum* haviam sido descritas, porém Birkenmeyer *et al.* (2010) caracterizaram e isolaram os genes da MSP1 de *P. malariae* e *P. ovale*, permitindo futuramente que a técnica de IFI com antígenos de *P. malariae* possa também ser substituída. Sendo assim, continuamos

realizando as análises da detecção de anticorpos totais contra *Plasmodium malariae* em IFI com lâminas provenientes de macaco esplenectomizado mantido no CDC de Atlanta.

As análises estatísticas realizadas com o teste não paramétrico de "Mann-Whitney" mostraram não haver diferença estatisticamente significativa na frequência de anticorpos totais contra as três espécies de plasmódios entre as zonas norte e sul.

Na técnica de ELISA para detecção de anticorpos contra a proteína CSP, verificamos que a maioria dos animais possuía anticorpos contra *Plasmodium vivax* VK210, variante VK247 e também contra *Plasmodium malariae*.

O que nos surpreendeu foi a frequência elevada de soros que reagiram contra a proteína CSP de *Plasmodium falciparum* já que em regiões de Mata Atlântica não foi relatado o encontro de mosquitos infectados por este parasito. Não sabemos até que ponto estas reações são cruzadas, porém se esperaria que tais reações ocorressem entre *Plasmodium vivax* e suas variantes e não com peptídeos sintéticos correspondentes à CSP de outra espécie de plasmódio. Alguns autores acreditam que parte da resposta imune contra esporozoítas de *Plasmodium falciparum* seja, na verdade, consequência de uma reação cruzada, causada por proteínas ricas em asparagina que são produzidas durante a reprodução assexuada do parasito, resultando em uma interpretação errônea da reatividade

contra a CSP (Volney *et al.*, 2002). Apesar de se notar uma tendência maior nas absorbências das amostras da zona sul, novamente, os testes estatísticos não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre as amostras de ambas as zonas.

A região sul do município de São Paulo apresenta história pregressa de malária autóctone, sendo a área de ocorrência de casos extensa, envolvendo a região do sub-distrito de Parelheiros, bairros de Engenheiro Marcilac e Evangelista de Souza, sendo que em 2006 ocorreu um surto de malária no Bairro de Engenheiro Marcilac e imediações (SUCEN, 1995; CVE, 2007). Na zona norte, região que compreende o Parque Estadual da Cantareira e proximidades, até o momento, não foram verificados casos humanos da doença (Mazzei *et al.*, 2009), porém, Duarte em 1998, detectou anticorpos contra a proteína CSP em funcionários deste Parque demonstrando que há circulação de mosquitos infectados no local. Pesquisas entomológicas realizadas na região demonstraram ausência de anofelinos do subgênero *Kerteszia* (Montes, 2005), provavelmente pelo fato do ambiente ter sofrido, ao longo dos anos, modificações ambientais devido à ação humana.

Cabe ressaltar o clássico caso relatado por Deane em 1992, nesta ocasião, ele e sua equipe realizaram estudos de malária simiana na região do Horto Florestal da Cantareira onde nenhum caso humano havia sido detectado.

Levando em consideração o comportamento dos símios que raramente se aproximam do solo da mata, plataformas para captura de mosquitos foram construídas em árvores a 10 e 15 metros de altura e outras no solo da mata para comprovar o comportamento acrodendrofilico do vetor *Anopheles (Kerteszia) cruzii*. Duas pessoas ficavam no solo e duas nas plataformas servindo de isca para atrair os mosquitos.

Alguns dias após a coleta, um funcionário do Parque que permaneceu na plataforma reclamou de alguns sintomas como dor de cabeça, calafrios e febre. Ao realizar análise do sangue constatou-se a presença de diversas formas de plasmódio, que se assemelhavam ao *Plasmodium simium*. O funcionário recusou o tratamento e alguns dias após a infecção, este se curou espontaneamente. O caso foi interpretado como uma infecção natural de plasmódio simiano em humanos.

Sob o ponto de vista epidemiológico, estes dois ambientes parecem ter características diferenciadas. Independente de haver dois cinturões de Mata Atlântica na região metropolitana de São Paulo, um ao norte e outro ao sul, estes cinturões não possuem comunicação entre si que permita aos animais circularem entre estas zonas.

Na zona sul, a presença de macacos com respostas sorológicas, diagnósticos parasitológicos e moleculares positivos, aliada a presença

de vetores competentes, processo acelerado de desmatamento e entrada da população em regiões de mata para atividades de caça ou lazer, levanta a possibilidade de transmissão da malária em um contexto de zoonose.

A resposta sorológica, parasitológica e molecular dos símios oriundos da zona norte, pode indicar a ocorrência de um quadro preferencialmente silvestre, já que nesta região anofelinos do subgênero *Kerteszia* não foram encontrados nas áreas mais próximas às habitações. Porém, estudos sistematizados sobre a fauna anofélica e sua infecção natural deverão ser realizados na zona norte a fim de que estas questões sejam elucidadas.

A zona norte da cidade de São Paulo sofreu há alguns anos um acelerado processo de desmatamento e assentamento humano com construção de casas ao redor do Parque Estadual da Cantareira e entradas mais frequentes para lazer nas matas que circundam estas regiões. Provavelmente os anofelinos e símios responsáveis pela manutenção do ciclo silvestre estejam na mata adentro onde a população humana não tem fácil acesso, diferente daqueles da zona sul cujo processo de desmatamento e ocupação humana está em franco progresso, acarretando um maior contato de anofelinos com a população.

Recentemente, pesquisadores encontraram anofelinos do subgênero *Kerteszia* infectados por *Plasmodium vivax* e *P. malariae* na

zona sul, em Evangelista de Souza e Embura, sub distrito de Parelheiros, (Duarte *et al*, 2010) assim como casos humanos assintomáticos foram notificados em Engenheiro Marsilac (CVE, 2007).

A problemática envolvendo malária, anofelinos, população humana e simiana em regiões cuja cobertura vegetal é constituída pela Mata Atlântica, deve continuar sendo o foco das investigações pelas agências de controle. Sendo assim, o aumento de amostragem de símios, estudos da fauna anofélica nas zonas norte e sul, assim como a pesquisa de casos assintomáticos e determinação das espécies de plasmódios ocorrentes nestas regiões deve ser intensificada para se determinar o real quadro desta doença.

6. Referências.

Agoramoorthy G, Rudran R. Field application of Telazol (tiletamine hydrochloride and zolazepam hydrochloride) to immobilize wild red howler monkeys (*Alouatta seniculus*) in Venezuela. *J Wild Dis* 1994; 30(3): 417-20.

Ambroise-Thomas P. La réaction d'immunofluorescence dans l'étude séroimmunologique du paludisme. *Bull WHO* 1974; 50:267-276.

Arnot DE, Barnwell JW, Tam JP, Nussenzweig V, Nussenzweig RS. Circumsporozoite protein of *P. vivax* gene cloning and characterization of the immunodominant epitope. *Science* 1985; 30: 815-18.

Ávila SL, Ferreira AW. Malaria Diagnosis: a review. *Braz J Med Biol Res* 29: 431-43, 1996.

Ávila JG. Sensitivity of malaria diagnosis in blood samples by PCT assay: A comparison with microscopy. United States Army Center for Health Promotion and Prevention-West, Fort Lewis Division 2005.

Babiker H, Ranford-Cartwright L, Sultan A, Satti G, Walliker D. Genetic evidence that RI chloroquine resistance of *P. falciparum* is caused by recrudescence of resistant parasites. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994; 88(3):328-31

Birkenmeyer L, Muerhoff AS, Dawson GJ, Desai SM. Isolation and characterization of the MSP1 genes from *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*. *Am J Trop Med Hyg*. 2010; 82(6):996-1003.

Black IV WC, Munstermann LE. Molecular taxonomy and systematics of arthropod vectors. In. *The biology of disease vectors*. USA University Press Colorado 1996; 438-70.

Blackman MJ, Heidrich HG, Donachie S, McBride JS, Holder AA. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. *JEM* 1990; 172: 319-382.

Blackman MJ, Whittle H, Holder AA. Processing of the *P. falciparum* major merozoite surface protein-1: identification of a 33-kilodalton secondary processing product which is shed prior to erythrocyte invasion. *Mol Biochem Parasito* 1991; 49: 35-44.

Bonilla JÁ, Validum L, Cummings R, Palmer CJ. Genetic diversity of *P. vivax* pvcsp and pvmsp1 in Guyana, South America. *Am J Trop Med Hyg* 2006. 75: 830–835.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Publicação: Situação Epidemiológica da Malária no Brasil ano de 2007. Brasília (DF), 2008.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de diagnóstico laboratorial da malária / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde (2ed) Brasília (DF), 2009.

Biota. Disponível em
<http://www.biota.org.br/info/saopaulo/remam_atlan>. Último acesso em: 15 fevereiro de 2009.

Bronner U, Divis PC, Farnert A, Singh B. Swedish traveller with *P. knowlesi* malaria after visiting Malaysian Borneo. *Malar J* 2009: 8-15.

Bruce-Chwatt IJ. Essencial Malariology. Heinemann Medical Books, London, 2ed, 1985.

CDC. Centers For Disease Control And Prevention. Disponível em <<http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>> último acesso em 08 de novembro de 2009.

CDC. Centers For Disease Control And Prevention. U.S. Department Of Health And Human Services. Disponível em <http://www.cdc.gov/malaria/about/index.html> último acesso em 14 de março de 2010.

Chadee DD & Kitron U. Spatial and temporal patterns of imported malaria cases and local transmission in Trinidad. *AJTMH* 1999, 61:513–517.

Coatney GR. The simian malarias: zoonoses, anthroponoses, or both? *Am J Trop Med Hyg* 1971; 20(6) p 795-803.

Cochrane AH, Collins WE, Nussenzweig RS. Monoclonal antibody identifies circumsporozoite protein of *P. malariae* and detects a common epitope on *P. brasilianum* sporozoites. *Infect Immun* 1984; 45(3): p 592-5.

Collins WE, Lunde MN, Skinner JC. Development of antibodies to *P. vivax* as a measured by two different techniques. *Am J Trop Med Hyg* 1975; 24: 412-16.

Collins WE. Major animal models in malaria research: simian. In: Wernsdorfer, WH & McGregor, I. ed. *Principles and Practice of Malariology*. London, 1988: vol 2., Churchill Livingstone. Medical Division of Longman Group UK Limited 1988; p: 1973-501.

Couto RD, Latorre MRDO, Di Santi SM, Natal D. Malária autóctone notificada no Estado de São Paulo: aspectos clínicos e epidemiológicos de 1980 a 2007. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010, 43(1):52-8.

Curado I. Soroepidemiologia de malária em áreas de baixa endemicidade no Estado de São Paulo [Dissertação]. Instituto de Ciências Biomédicas (MO): Universidade de São Paulo 1995.

Curado I, Duarte AMRC, Lal AA, Oliveira SG, Kloetzel JK. Antibodies anti-bloodstream and circumsporozoite antigens (*P. vivax* and *P. malariae/P.brasilianum*) in areas of very low malaria endemicity in Brazil.

Mem Inst Oswaldo Cruz Rio J 1997; (92) p 235-43.

Curado I, Malafronte RS, 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.

CVE. Centro de Vigilância Epidemiológica. Caso Autóctones de Malária no Estado de São Paulo. Dados até 01/06/07 Disponível em <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/malaria07_cmec.htm>.

Dame JB, Williams JL, McCutchan TF, Weber JL, Hockmeyer WT, Maloy WL, Haynes JD, Schneider I, Roberts D. Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria parasite *P. falciparum*. *Science* 1984; 225: 593-99.

Datta S, Basu B, Chandra CY, Nagendra A. Newer versus Conventional Methods in the Diagnosis of Malaria : A Comparison. *MJAFI* 2010, (66):2.

Deane LM, Deane MP, Neto JF. Studies on transmission of simian malaria and on a natural infection of man with *P. simium* in Brazil. *Bull World*

Health Organ 1966; (35): 805-8.

Deane LM, Deane MP, Neto JF. Estudos sobre la transmision de la malaria simica y sobre una infeccion natural del hombre por *P. simium* en el Brasil. *Bol Ofic Sanit Panam* 1967; (13): 101-5.

Deane LM, Neto JF, Sintonio JG. Novo hospedeiro natural do *P. simium* e do *P. brasilianum*: o mono, *Brachyteles arachnoides*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1968; (10): 287-8.

Deane LM. Plasmodia of monkey and malaria eradication in Brazil. *Ver Lat Amer Microbiol Parasitol* 1969; (11) 69-73.

Deane LM, Neto JAF. Malária em macacos do Estado do Rio Grande do Sul. Observações preliminares. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1969a; (11): 299-305.

Deane LM, Neto JAF, Okumura M, Ferreira MO. Malaria parasites of Brazilian monkeys. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1969b; (11): 71-86.

Deane LM, Deane MP, Neto JAF, Almeida FB. On the transmission of

simian malaria in Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1971; (13): 311-9.

Deane, L. M. Simian malaria in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro 1992; (87):1-20.

Downs WG, Pittendrigh CS. Bromeliad Malaria in Trinidad, British West Indies. *Am J Trop Med* 1946; pp. 47-66.

Duarte AMRC. Estudo de Malaria em Macacos Silvetres Brasileiros. [Dissertação]. Instituto de Ciências Biomédicas (MO): Universidade de São Paulo 1998.

Duarte AMRC, Porto MAL, Curado I, Malafronte RS, Hoffmann EHE, Oliveira SG, Silva AMJ, Kloetzel JK and Gomes AC. 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.

Duarte AMRC, Malafronte R, Cerutti C, Curado I, Paiva B, Maeda A, Yamasaki T, Summa M, Neves D, Oliveira S. Natural Infections in Brazilian Wild Monkeys: Reservoirs for human infections? *Acta Tropica* 2008;

(107): 179-185.

Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochem* 1971; (8): 871-4.

Escalante AA, Barrio E, Ayala F. Evolutionary origin of human and primate malarias: Evidence from the circumsporozoite protein gene. *Mol Biol Evol* 1995; (12): 616-26.

Escalante AA, Freeland DE, Collins WE and Lal AA. The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome b from the linear mitochondrial genome, *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, pp. 8124–8129.

Fedoroff NV. On spacers. *Cell* 1979; (16): 697–710.

Ferreira AW, Sanchez MCA. Malária humana. Padronização e otimização de testes sorológicos para diagnóstico individual e inquéritos soropidemiológicos. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1988; (30):137-146.

Ferreira MS. Malária. In: Veronesi R. Tratado de Infectologia. São Paulo:

Editora Atheneu 2004; p1280-308.

Fong YL, Candigan FC, Coatney GR. A presumptive case of naturally occurring *Plasmodium knowlesi* malaria in man in Malaysia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1971; 65(6): 839-40.

Fonseca F. Plasmódio de Primata do Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1951; 543–551.

Forattini OP, Gomes AC, Natal D, Santos JLF. Observações sobre a atividade de mosquitos Culicidae em matas primitivas da planície e perfis epidemiológicos de vários ambientes do Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Pública* 1986; (20): 178 – 203.

Goldman IF, Qari SH, Millet PG, Collins WE, Lal AA. Circumsporozoite protein gene of *P. simium*, a *P. vivax*-like monkey malaria parasite. *Mol Biochem Parasitol* 1993; (57): 177-80.

Gomes AP, Batista RS, Gonçalves MLC, Igreja RP, Huggins WD. *Medicina Tropical – Uma abordagem Atual das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica 2001; p149-62.

Gonder R and von Berenberg-Gossler H. Untersuchungen über die Malaria plasmodien der Affen. *Malaria Lpz* 1908; (1): 47–56.

Hall CL, Haunes JD, Diggs CL. Cultured *P. falciparum* used as antigen in a malaria indirect fluorescent antibody test. *Am J Trop Med Hyg* 1978; (27): 849-52.

Hillis DM, Dixon MT. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quart Rev Biol* 1991; 411-53.

Holder AA, Blackman MJ, Burghaus PA, Chappel JA, Ling IT, McCallum-Deighton N, Shai S. A malaria merozoite surface protein (MSP1)—structure, processing and function. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992; 87: 37–42.

Hwang UW, Kim W. General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *Korean J Parasitol* 1999; 7(4): 215-28.

Igreja, RP, Gomes, AP, Batista, RS, Gonçalves, MLC. Malária In: Medicina Tropical – Uma abordagem Atual das Doenças Infecciosas e

Parasitárias. Rio de Janeiro, Editora Cultura Médica, 2001, p.149-62.

Kimura M, Kaneko O, Liu Q, Kawamoto F, Wataya Y, Otani S, Yamaguchi Y, Tanabe K. Identification of the four species of human parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. *Parasitol Internation* 1997; 91-5.

Kuvn SF, Tobie JE, Evans CB, Coatney GR, Contacos PG. Fluorescent antibody studies on the course of antibody production and serum gamaglobulin level in normal volunteers infected with human and simian malaria. *Am J Trop Med Hyg* 1962; (11): 429-36.

Kurstak E. Progress in enzyme imunoassays: production of reagents, experiemental design and interpretation. *Bull W H O* 1985; (63): 793-811.

Lal AA, De La Cruz VF, Collins WE, Campbell GH, Procell PM, McCutchan TF. Circumsporozoite protein gene from *P. brasilianum*. Animal reservoirs for human malaria parasites? *J Biol Chem* 1988a; (263): 5495-498.

Lal AA, De la Cruz VF, Campbell GH, Procell PM, Collins WE, McCutchan

TF. Structure of the circumsporozoite gene of *P. malariae*. *Mol Biochem Parasitol* 1988b; (30): 291-94.

Lal AA, Goldman IF. Circumsporozoite protein gene from *P. reichenowi*, a chimpanzee malaria parasite evolutionary related to the human malaria parasite *P. falciparum*. *J Biol Chem* 1991; (266): 6686-9.

Li J, McConkey GA, Rogers MJ, Waters AP, McCutchan, TF. The developmentally regulated ribosome. *Exp Parasitol* 1994a; (78): 437-441.

Li J, Wirtz RA, McConkey GA, Sattabongkot J, McCutchan TF. Transition of *P. vivax* ribosome types corresponds to sporozoite differentiation in the mosquito. *Mol Biochem Parasitol* 1994b; (65): 283-89.

López Antuñano FJ, Schmunis G. Diagnostico de malaria. *Pan Am Health Organ* 1998; 512.

Lucchi NW, Tongren JE, Jain V, Nagpal AC, Kauth CW, Woehlbier U, Bujard H, Dash AP, Singh N, Stiles JK, Udhayakumar V. Antibody responses to the merozoite surface protein-1 complex in cerebral malaria patients in India. *Malaria J* 2008; 7-121.

McCutchan TF, Lal AA, Cruz VF, Miller LH, Maloy WL, Charoenvit Y, Beaudoin RL, Guerry P, Wistar R, Hoffman SL, Hockmeyer WT, Collins WE, Wirth D. Sequence of the immunodominant epitope for the surface protein on sporozoites of *P. vivax*. *Science* 1985; (230): 1381-383.

Montes J. Fauna de Culicidae da Serra da Cantareira, São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Pública* 2005; 39(4): 578-84.

Nandwani S, Mathur M, Rawat S. Evaluation of the polymerase chain reaction analysis for diagnosis of falciparum malaria in Delhi, Índia. *ASM* 2005, (23):176-8.

OPAS. Organización Panamericana de La Salud, Organización Mundial de la Salud. Manual para el diagnóstico microscópico de la malaria. Washington DC 1975.

OMS. Organização Mundial da Saúde. Malaria diagnosis. Memorandum from a Organização Mundial da Saúde. *Bulletin World Health Organization* 1988; 66: 575-594.

OMS. Organização Mundial da Saúde. Basic malaria microscopy. WHO

Genebra 1991.

OMS. Organização Mundial da Saúde. New perspectives in malaria diagnosis. Report of a joint WHO/USAID informal consultation, WHO/MAL/2000.1091. Genebra, 2000.

OMS. Organização Mundial da Saúde, International travel and health. Geneva: WHO Press, 2010. Disponível em <<http://www.who.int/ith/ITH2010.pdf>>.

Qari SH, Shi YP, Goldman IF, Udhayakumar V, Alpers MP, Collins WE, Lal AA. Identification of *Plasmodium vivax*-like human malaria parasite. *Lancet* 1993; 341(8848):780-3.

Qari SH, Shi YP, Pieniazek NJ, Collins WE and Lal AA. Phylogenetic relationship among the malaria parasites based on small subunit rRNA gene sequences: monophyletic nature of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, *Mol. Phylogenet Evol* 1996; pp 157–65.

Rey L. Parasitologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 1991.

Rosenberg R, Wirtz RA, Lanar DE, Sattabongkot J, Hall T, Waters AP, Prasittisuk C. Circumsporozoite protein heterogeneity in the human malaria parasite *P. vivax*. *Science* 1989; (245): 973-6.

Ross R. An improved method for microscopical diagnosis of intermittent fevers. *Lancet* 1903; 86-87.

Rubio JM, Benito A, Roche J, Berzosa PJ, Garcia ML, Micó M, Edu M, Alvar J. Semi-nested, multiplex polymerase chain reaction for detection of human malaria parasites and evidence of *P. vivax* infection in equatorial guinea. *Am J Trop Med* 1999; (60): 183-7.

Singh B, Bobogare A, Cox-Singh J, Snounou G, Abdullah MS and Rahman HA. A genus species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *ASTMH* 1999; (60): 687-92.

Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN. Identification of the four human malarial species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Molec Biochem Parasitol* 1993; (58): 283-92.

Soares IS, Levitus G, Souza JM, Del Portillo HA, Rodrigues MM. Acquired immune responses to the N- and C-terminal regions of *P. vivax* merozoite surface protein 1 in individuals exposed to malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102(3):313-7.

Sulzer AJ, Wilson M. The use of thick-smear in malaria indirect fluorescent antibody test. *J Parasitol* 1967; 53:1110-1.

SUCEN. Superintendência de Controle de Endemias. Avaliação do Programa de Controle de Malária. Estado de São Paulo - período de 1992 a 1994. São Paulo, 1995.

SUCEN. Superintendência de Controle de Endemias. São Paulo, disponível <<http://www.sucen.sp.gov.br/downl/malaria/mal1.pdf>> Último acesso em 19 de outubro 2008.

SUCEN. Superintendência de Controle de Endemias. São Paulo. (<http://www.sucen.sp.gov.br/atuac/malari.html>). Último acesso em: 16 de fevereiro 2009.

Target GAT. Antibody response to *P. falciparum* malaria: comparison of immunoglobulin concentration antibody titers and titers and

antigenicity of different asexual stages of the parasites. *Clin Exp Immunol* 1970; (7): 501-17.

Tham JM, Hee Lee S, Tan TMC, Ting RCY, Kara UAK. Detection and Species determination of malaria parasites by PCR: comparison with microscopy and with Para-Singht-F and ICT malaria Pf tests in a clinical enviroment. *JCM* 1999, (37):1269-73.

Vanderberg J P, Nussenzweig R S, Most H. Protective immunity produced by the injection of X-irradiated sporozoites os *Plasmodium berghei*. V. In vitro effects of immune serum on sporozoites. *Mil Med* 1969; 134 p 1183-90.

Vie JC, De Thoisy B, Fournier P, Fournier-Chambrillon C, Genty C, Keravec J. Anesthesia of wild red howler monkeys (*Alouatta seniculus*) with medetomidine / ketamine and reversal by atipamezole. *Am J Primatol* 1998; 45(4) p 399-410.

Voller A. A microplate method of enzyme linked imunosorbent assay and its application to malaria. *Bull W H O* 1947; 51.

Voller A, Bidwell D, Huldft G, Engvall E. A microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay and its application to malaria. *Bull W H O* 1974; 51:209-211.

Volney B, Pouliquen JF, Thoisy B and Fandeur T. A sero-epidemiological study of malaria in human and monkey populations in French Guiana. *Acta Trop* 2002; (82): 11-23.

Zavala F, Tam JP, Masuda A. Synthetic peptides as antigens for the detection of humoral immunity to *P. falciparum* sporozoites. *J Immunol Met* 1986; (93): 55-61.

Wanderley DMV, Ciaravolo RMC, Barbosa GL, Spínola R, Leite RM. Malária no Estado de São Paulo: aspectos da vigilância epidemiológica. *BEPA* 2006; 5(32).

Waters AP, McCutchan TF. Rapid, sensitive diagnosis of malaria based on ribosomal RNA. *Lancet* 1989, (1):1343-6.

Waters AP, Higgins DG, Mccutchan TF. *P. falciparum* appears to have arisen as a result of lateral transfer between avian and human hosts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 3140-3144.

Waters AP, Higgins DG, Mccutchan TF. Evolutionary relatedness of some primate models of *Plasmodium*. *Molec Biol and Evolut.* 1993; (10): 914–923.

Wellems TE, Walliker D, Smith CL, Rosario VE, Maloy WL, Howard RJ, Carter R. McCutchan TF. A histidine-rich protein gene marks a linkage group favored strongly in a genetic cross of *P. falciparum*. *Cell* 1987; (49): 633–842.

Win TT, Lin K, Mizuno S, Zhou M, Liu Q, Ferreira MU, Tantular IS, Kojima S, Ishii A, Kawamoto F: Wide distribution of *P. ovale* in Myanmar. *Trop Med Int Health* 2002, (7):231-9.