Estudo epidemiológico sobre a malária humana e simiana e infecção de anofelinos em áreas de baixa endemicidade no Estado de São Paulo

Izilda Curado

Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do Grau de Doutor.

Área de concentração: Epidemiologia

Orientadora: Profa. Dra. Eunice Aparecida Bianchi Galati

São Paulo

2003

Ao meu pai (*in memoriam*), à minha mãe e ao meu irmão, pela confiança, carinho e estímulo que sempre me deram,

Aos meus sobrinhos, Mariana, Thays e Luiz Fernando e ao meu afilhado Adriano, alegrias da minha vida,

Em especial às Amigas, Ana Maria R. C. Duarte, Rosely dos Santos Malafronte e Maria Stela Branquinho, por tudo que sempre fizeram por mim,

Aos demais Amigos, Dulce, Maura, Byanca, Adriana, Ana Marassá, Priscila e Fabiano, obrigada por tudo.

Às populações do PETAR e Intervales.

Agradecimentos

Em especial à Eunice Ap. Bianchi Galati, pela amizade, pela constante orientação, estímulo e compreensão em todas as etapas de elaboração deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Almério de Castro Gomes, pela amizade, pela idealização e concretização do Laboratório de Doenças Tropicais da Faculdade de Saúde Pública, onde desenvolvemos grande parte deste trabalho e pelo muito que sempre fez por mim;

Ao Dr. Ademir Galati, por tudo que fez por mim e toda nossa equipe junto aos trabalhos de campo, obrigada pela sua incansável ajuda;

Às Dras. Sandra Ávila e Carmem Sanchez do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo pelas orientações estatísticas proporcionadas;

Às Dras. Maria Eugênia Laurito Summa e Adriana M. J. Silva, pela solicitude no fornecimento dos sangues e soros de macacos do DEPAVE;

Às Dras. Karin Kirchgatter e Silvia di Santi do Laboratório de Malária da SUCEN, pela realização de algumas reações de PCR;

À Dra. Maria Esther de Carvalho, ao Rubens, à Elvira, à Iole, à Da. Benê e ao Lázaro do Laboratório de Imunoepidemiologia da SUCEN, por toda compreensão e cooperação que sempre tiveram comigo com relação à conclusão deste trabalho;

À toda equipe da Coordenação dos Laboratórios de Referência e Desenvolvimento Científico da SUCEN: Roberto, Paula, Julinha e Leonardo, obrigada pela cooperação;

À Márcia Bicudo, ao Aristides e à Edna, pela amizade e pelas orientações entomológicas;

Ao Almir e à Iranides da Programação Visual do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, obrigada por tudo;

Ao Luciano, do Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, obrigada pela solicitude de sempre;

À Sonia, da Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, obrigada pelas orientações;

Aos meus queridos Amigos, Maurício e Tina, Mauro, Tonico, Monique e Armando que sempre torceram por mim, obrigada por serem meus fiéis Amigos;

À todos os demais amigos que sempre me estimularam com carinho e compreensão à concluir este trabalho.

À Superintendência de Controle de Endemias – SUCEN pelo fornecimento de transporte e verba para realização deste trabalho;

Aos Laboratórios de Investigação Médica (LIM-49), pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

À FAPESP, pelo financiamento parcial deste Projeto (02/03869-3).

RESUMO

Foi realizado estudo epidemiológico de malária em duas localidades do Vale do Ribeira: Parque Estadual Intervales e Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira (PETAR). Nestas regiões circundadas por Mata Atlântica, são encontradas algumas espécies de macacos e anofelinos, estes últimos, representados em sua maioria pelo subgênero *Kerteszia*. Em nossas áreas de estudo e nos municípios que as circundam têm ocorrido anualmente casos de malária autóctone.

Os objetivos principais do estudo foram: avaliação da prevalência de anticorpos anti-formas assexuadas de *P. vivax* e *P. malariae*, de anticorpos anti-proteína circumsporozoíta de *P. vivax* "clássico", suas variantes e *P. malariae/P. brasilianum* e de infecção de populações humanas, de anofelinos (provenientes das áreas de estudo) e de macacos (provenientes do Estado de São Paulo) por plasmódios.

Foram feitas fichas de investigação e examinadas lâminas com esfregaços e gotas espessas de 318 indivíduos, que foram negativas. De 61 lâminas de macacos do DEPAVE, em 2 delas foram vistas formas trofozoítas semelhantes ao *P. vivax*. Os soros foram submetidos às reações de Imunofluorescência Indireta (IFI) com antígenos de formas assexuadas de *P. vivax* e *P. malariae* e à reação imunoenzimática (ELISA) com peptídeos sintéticos contendo as regiões repetitivas da proteína circunsporozoíta (CSP) de *P. vivax* "clássico" (Pvc), *P. vivax* VK247 (Pvk), *P. malariae/P. brasilianum* (Pm/Pb) e *P. vivax*-like humano/*P. simiovale* (Pvl). Das hemácias de humanos e macacos foi extraído DNA para ser submetido à Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) para detecção de plasmódios.

A positividade na IFI com antígeno de *P. vivax* da classe IgG foi surpreendentemente elevada nas 2 áreas em estudo: 49,0% no PETAR e 32% em Intervales. Nesse mesmo teste com antígeno de *P. malariae*, a positividade no PETAR foi de 19,3% e em Intervales, 16,0%. Na técnica de ELISA, foi encontrada maior prevalência para o peptídeo de Pvl (29,7%) no PETAR e em Intervales, para Pvc (35,0%).

Entre os macacos, a positividade na IFI com antígeno de *P. vivax* da classe IgG também foi elevada, ou seja, 44,0%. Com o antígeno de *P. malariae*, a positividade em IFI foi de 26,5%. Em ELISA, as maiores prevalências foram encontradas com os peptídeos de Pvc (23,0%) e Pm/Pb (18,0%).

No PCR em humanos, foi encontrado um indivíduo de Intervales com *P .malariae*, 2 indivíduos também de Intervales com *P. falciparum* e 3 indivíduos do PETAR positivos para *P. falciparum* e *P. vivax*.

No PCR em macacos, 3 deles (1 macaco prego e 2 bugios) foram positivos para o gênero *Plasmodium*.

Os anofelinos capturados no PETAR e no Parque Intervales tiveram PCR negativo.

A elevada positividade encontrada em IFI, especialmente com antígeno de *P. vivax*, foi surpreendente, mas reproduziu o resultado descrito em trabalhos anteriores. Dentre 318 indivíduos do PETAR e Intervales, 15 tiveram IFI da classe IgM positiva com antígeno de *P. malariae* e 3 deles, com antígeno de *P. vivax*, isso em regiões onde as pessoas não relatam sintomas típicos de malária, por vezes, queixam-se de sintomas semelhantes aos da gripe ou resfriado.

Diante dos casos de malária assintomática que foram encontrados nas áreas de estudo, preocupamo-nos com as diretrizes traçadas para o controle da malária em tais regiões. Assim sendo, pretendemos que nossos resultados venham contribuir para reformular o Programa de Controle de Malária desempenhado pela Superintendência de Controle de Endemias – SUCEN, a fim de procurar minimizar o aumento do número de casos de malária autóctone nessas áreas ou até mesmo diminuí-los e evitar que moradores dessas localidades funcionem como fonte de infecção.

Summary

A sero-epidemiological study of malaria in human and monkey populations was conducted at two localities in the Ribeira Valley region, SP (Brazil: Parque Estadual Intervales e Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira (PETAR). Malaria transmission has occurred in that area and it is known that several species of monkeys and anopheline mosquitoes of the subgenus *kerteszia* populate the Atlantic Forest that surrounds the studied localities.

This report presents data on the prevalence of antibodies against several *P. vivax* and *P. malariae* antigens in human and monkey sera, as well as the infection of human, monkeys and mosquitoes by *Plasmodium* parasites.

In this study, 318 human subjects and 61 monkeys had their blood analyzed for the presence of malaria parasites by thin and tick blood smears. All the human sera were negative while two of the simian sera were positive, in which *P. vivax* like forms were detected. The sera of those subjects were also analyzed by Immunofluorescence (IFI) for the presence of antibodies against asexual forms of *P. vivax* and *P. malariae*, and by ELISA for the presence of antibodies against circunsporozoite proteins (CSP) from *P. vivax* Pvc), *P. vivax* VK247 (Pvk), *P. malariae/P. brasilianum* (Pm/Pb) e *P. vivax*-like human/*P. simiovale* (Pvl). The presence of plasmodium parasites in the analyzed samples was further conducted by Polymerase Chain Reaction (PCR).

The IFI positivity for *P vivax* antigens was high in the two studied areas: 49,0% for PETAR and 32% for Intervales. IFI with *P. malariae* antigens resulted in lower positivity: 19,3% for PETAR and 16,0% for Intervales. ELISA tests showed higher prevalence when using the Pv1 peptide (29,7%) with samples from PETAR and using Pvc (35,0%) with samples form Intervales.

Among the monkeys, the positivity in IFI with *P. vivax* antigens was also high (44,0%). The *P. malariae* antigen resulted in a positivity of 26,5%. ELISA tests showed higher prevalences with the peptides Pvc (23,0%) and Pm/Pb (18,0%).
PCR reactions revealed the presence of parasites in several of the analyzed samples. For the human subjects from Intervales, one was infected with *P.*

malariae and 2 with *P. falciparum* while for the individuals from PETAR, 3 were positive for *P. falciparum* and *P. vivax*. Three of the monkey subjets were found to be positive for *Plasmodium* infection, when tested by PCR (1 macaco prego e 2 bugios.

All the anopheline mosquitoes captured in the area were negative for the presence of *Plasmodium* when tested by PCR.

It was surprising to find *P. falciparum* infections in human subjects (PCR) from São Paulo State. The high prevalence, found after IFI, especially with *P. vivax* antigens, was also surprising but those results are in accordance with those we found in similar studies conducted in the Ribeira Valley and coastal areas of São Paulo State. Fifteen of the human subjects analyzed had positive IFI results for IgM against *P. malariae* antigens and 3 were positive for *P. vivax* antigens.

Asymptomatic malaria cases have been detected in the studied localities, what brings concerns about the malaria control programs for those areas. Our results may serve as basic information for SUCEN (Superintendência de Controle de Endemias) to improve the existing malaria control programs and hopefully avoid an increase or even decrease malaria transmission in those areas.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO 01
1.1. Situação da malária no mundo e no Brasil 01
1.2. Situação da malária no Estado de São Paulo 03
1.3. Vetores 06
1.4. Ciclo da malária humana 09
1.5. Diagnóstico da malária humana 11
1.6. Técnicas para detecção de infecção plasmodial em anofelinos 15
1.7. Proteína Circumsporozoíta (CSP) 17
1.8. Variantes de *Plasmodium vivax* 18
1.9. *Plasmodium malariae*-like 21
1.10. Considerações sobre malária simiana 21
1.10.1. A malária simiana no Novo Mundo 22
1.10.1.1. *Plasmodium brasilianum* 23
1.10.1.2. *Plasmodium simium* 23
1.10.2. A malária simiana no Brasil 24
1.10.3. A proteína circumsporozoíta (CSP) e a correlação entre os plasmódios simianos e humanos 25
2. ANTECEDENTES 28
3. OBJETIVOS 33
3.1. Objetivos Gerais 33
3.2. Objetivos Específicos 33
4. MATERIAIS E MÉTODOS 34
4.1. Delineamento experimental e aspectos éticos da pesquisa 34
4.2. Áreas de estudo 34
4.3. Coleta de dados e material biológico de humanos 39
4.4. Coleta de material biológico de macacos 40
4.5. Reações sorológicas 41
4.5.1. Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI) 41

4.5.1.1. Obtenção de antígenos 41
4.5.1.2. Descrição da Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI) 42
4.5.1.3. Reação de IFI com antígeno de formas assexuadas de *P. malariae* 43
4.5.2. Reação ELISA (Enzyme Linked-Immunosorbent Assay) 43
4.5.2.1. Peptídeos Sintéticos 43
4.5.2.2. Descrição da técnica de ELISA 44
4.5.2.3. Determinação dos limiares de reatividade ("cut-off") 45
4.6. Biologia Molecular 46
4.6.1. Extração do DNA Genômico 46
4.6.2. Reação de Polimerização em Cadeia - PCR 46
4.6.2.1. Descrição da técnica 47
4.6.2.2. Eletroforese em Gel de Agarose 48
4.6.2.3. Controles positivos e negativos utilizados na reação de PCR 49
4.7. Estudo entomológico 49
4.7.1. Obtenção e identificação dos anofelinos 49
4.7.2. Identificação e preservação dos anofelinos 50
4.7.3. Extração de DNA de anofelinos 50
4.7.3.1. PCR de mosquitos 51
4.7.3.2. Descrição da técnica de PCR 51
5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS 52
6. RESULTADOS 53
6.1. Resultados dos dados epidemiológicos 53
6.2. Resultados das reações sorológicas 55
6.2.1. Limiar de reatividade ("cut-off") para a reação de IFI 55
6.2.2. Limiar de reatividade ("cut-off") para a técnica de ELISA 55
6.2.3. Sorologia das populações humanas 57
6.2.4. Sorologia de macacos 62
6.2.5. Avaliação da especificidade da reação de IFI com soros humanos 64
6.3. Testes parasitológicos 65
6.3.1. Esfregaço e gota espessa das populações humanas e de macacos 65

6.3.2. Reação de PCR 65
6.3.2.1. Controles da reação de PCR 65
6.3.2.2. PCR de amostras humanas do PETAR e Intervales 68
6.3.2.3. PCR de amostras de macacos 71
6.3.2.4. PCR de anofelinos 72
7. DISCUSSÃO 74
7.1. Discussão dos resultados dos dados epidemiológicos 75
7.2. Discussão dos resultados das reações sorológicas 77
7.2.1. Sorologia das populações humanas 77
7.2.2. Sorologia de macacos 83
7.2.3. Especificidade da reação de IFI com soros humanos 84
7.3. Discussão dos resultados dos testes parasitológicos 86
7.3.1. PCR de amostras humanas do PETAR e Intervales 86
7.3.2. PCR das amostras de macacos 90
7.3.3. PCR de anofelinos 92
7.4. Considerações finais 94
8. CONCLUSÕES 95
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 96
ANEXOS

1. INTRODUÇÃO

1.1. Situação da malária no mundo e no Brasil

A malária é a mais importante doença parasitária que ocorre nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, constituindo enorme problema de saúde pública, com considerável impacto econômico. Apesar dos esforços para o seu controle, continua em expansão, possuindo grande potencial de disseminação entre populações rurais e urbanas de 53 países da África, 21 das Américas, 4 da Europa, 14 da região leste do Mediterrâneo, 8 ao sudeste da Ásia e 9 a oeste do Pacífico (Bruce-Chwatt, 1985; WHO, 1994; WHO, 1996). Encontra-se em franco crescimento, especialmente na África sub-Sahara, devido a resistência às drogas e aos inseticidas e às mudanças sociais e no meio ambiente (Greenwood & Mutabingwa, 2002).

Estima-se que 300 a 500 milhões de pessoas sejam infectadas pelo plasmódio a cada ano e que 1,5 a 2,7 milhões de pessoas, em média, morrem desta doença nos trópicos. Mais de 90% dos casos concentram-se no continente africano, onde a maioria das mortes causadas pela doença acomete crianças (Butler *et al,* 1997; Phillipson, 1999). Segundo dados da OMS, a malária mata em regiões rurais da África, uma criança a cada 30 segundos. Em números absolutos, isto significa a morte de 3 mil crianças por dia. Pesquisas realizadas em Gâmbia, Gana, Quênia e Burkina Faso demonstraram que aproximadamente 30% dessas mortes poderiam ser evitadas com o emprego de mosquiteiros impregnados com inseticidas (WHO, 2000).

Nas Américas, 21 países apresentaram transmissão ativa da doença, dentre eles, Equador, Argentina, Belize, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, República Dominicana, El Salvador, Guiana Francesa, Guatemala, Guiana, Haiti, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname e Venezuela (PAHO, 1998).

Na América do Sul, a malária causada por *Plasmodium vivax* predomina em áreas onde ocorrem tanto casos sintomáticos quanto assintomáticos ou oligossintomáticos da doença (Zimmerman & Voorham, 1997; de Andrade *et al.* 1995; PAHO, 1998), ocorrendo também em algumas regiões casos de

malária por *Plasmodium falciparum,* sendo que casos atribuídos ao *Plasmodium malariae* podem ser abundantes localmente (Voorham *et al.*, 1993).

Os casos de malária no Brasil foram reduzidos em cerca de 50%, nos últimos dois anos, na região da Amazônia Legal (com exceção do Estado de Rondônia), que concentra quase todos os registros do país. Dados preliminares do ano 2002 indicam que nessa região, até o mês de outubro, 281.236 pessoas contraíram a malária, correspondendo a uma redução de 47,45% dos 535.203 casos registrados no mesmo período de 1999. As projeções da Fundação Nacional de Saúde – FUNASA (órgão executivo do Ministério da Saúde) para o ano de 2002 foi de que ocorressem cerca de 300 mil casos da doença, à semelhança dos registrados há 19 anos, em 1983, quando houve 298 mil notificações (FUNASA, 2002).

No ano 2000, dos casos notificados para o Brasil, aproximadamente 248 mil (40%) ocorreram no Estado do Pará, acometendo principalmente adultos jovens e do sexo masculino (MS/FNS, 2000). A maioria dos casos de malária no Brasil são atribuídos ao *P. vivax*, seguidos de casos por *P. falciparum* e em menor percentual por *P. malariae,* espécie que tem sido sistematicamente subnotificada na região amazônica brasileira (Cavasini *et al.*, 2000). Em área de mineração ao norte do Estado de Mato Grosso (1994), 30% dos casos de malária que haviam sido atribuídos ao *P. vivax*, na verdade foram causados por *P. malariae* (Arruda & Voorham, dados não publicados).

Hoje, acredita-se que a malária humana na Amazônia seja transmitida essencialmente pelo *Anopheles darlingi*, encontrado no peridomicílio, picando o homem, no início da noite. E também, essa é a única espécie com densidade e freqüência suficientes para veicular a malária no interior do domicílio (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).

A intervenção humana vem provocando alterações no meio ambiente, constituindo um fator muito importante na transmissão da malária na Região Amazônica. Essas alterações, aliadas à ausência de planejamento e infraestrutura para controlar a doença, podem favorecer a propagação de anofelinos, aumentando sua densidade e o contato vetor-homem, o que

causaria o aumento do número de casos de malária (Hayes & Ferraroni, 1980; Tadei *et al.*, 1998).

Apesar da malária ter sido erradicada no Sudeste do Brasil, ainda ocorrem casos autóctones em regiões litorâneas recobertas de Mata Atlântica. Nesta região, os vetores responsáveis pela transmissão da doença são mosquitos das espécies *Anopheles* (*Kerteszia*) *cruzii* e *Anopheles (Kerteszia) bellator* (Rachou, 1958; Forattini, 1962; Forattini *et al.*, 1986). A malária destas áreas, diagnosticada como malária vivax, acomete pacientes com sintomatologia bastante atípica: a parasitemia apresenta-se geralmente muito baixa e os indivíduos são na maioria das vezes oligossintomáticos (Carvalho *et al.*, 1988; SUCEN, 1993; SUCEN, 1995). Estudos sorológicos realizados em populações de algumas áreas onde ocorreram casos mostraram prevalência de anticorpos anti-*P. vivax* e anti-*P. malariae*. Por tratar-se de áreas não endêmicas, estes resultados evidenciam a presença de um quadro de transmissão peculiar, que talvez envolva reservatórios simianos, que possivelmente atuam como fonte de transmissão (Curado, 1995; Curado *et al.*, 1997; Duarte, 1998).

1.2. Situação da malária no Estado de São Paulo

A malária apresentou altos níveis de endemicidade no Vale do Ribeira, durante o período de 1940 a 1959. Caracterizou-se por ser autóctone e causada, em 99% dos casos, por *P. vivax*. Em 1943, *An. cruzii* é definitivamente incriminado como vetor de malária em toda área de Mata Atlântica, devido à sua antropofilia, alta densidade e suscetibilidade demonstrada por infecção experimental e natural (Corrêa, 1943), motivo pelo qual a malária passou a ser denominada "malária das bromélias", nessa região. Também foi comprovado o envolvimento de *An. bellator* e *Anopheles* (*Kerteszia*) *homunculus* em outras regiões fora do Estado de São Paulo (Deane, 1986). Especificamente na cidade de Iguape, a espécie incriminada na transmissão foi *Anopheles* (*Nyssorhyncus*) *albitarsis* por seu comportamento endofílico, abundância e infectividade (Schiavi, 1945).

A natureza extradomiciliar da transmissão, determinada pelo comportamento exófilo de *Kerteszia*, foi o motivo pelo qual a região foi

considerada "área problema" em relação à malária, durante a campanha de sua erradicação. Entretanto, em virtude dos diversos esforços empregados no combate à malária das bromélias, sobretudo o rociado com DDT e o tratamento dos enfermos, em 1964, é constatada a interrupção da transmissão no município de Cananéia (Guarita & Costa, 1965), o qual, na década de 40, apresentava a maior incidência da doença no Estado (Barata, 1998). Nos demais municípios, a incidência também foi diminuindo, passando a ser considerada residual, no Vale do Ribeira, na década de 80.

Mais recentemente, na área, ocorrem casos esporádicos – 214 no período de 1985 a julho de 2000 – isolados, de etiologia obscura (Branquinho *et al.* 1997), os quais correspondem à cerca de 45% da malária do Estado. Anualmente, esses casos ocorrem associados a baixa parasitemia de curta duração e sintomatologia, por vezes, branda. Geralmente, concentram-se em áreas de foco que se estendem do Vale do Ribeira às regiões litorâneas adjacentes (Carvalho *et al.*, 1988; SUCEN, 1995; Curado *et al.*, 1997; Duarte, 1998). Face a ocorrência desses casos de malária, o Vale do Ribeira é considerado área hipoendêmica.

As duas espécies do subgênero *Kerteszia*, incriminadas como vetoras no passado: *An. cruzii*, *An. bellator* e o *An. (Nys.) albitarsis* continuam ocorrendo na área, porém, não há programa de controle para as mesmas, visto que são consideradas "mosquitos de mata".

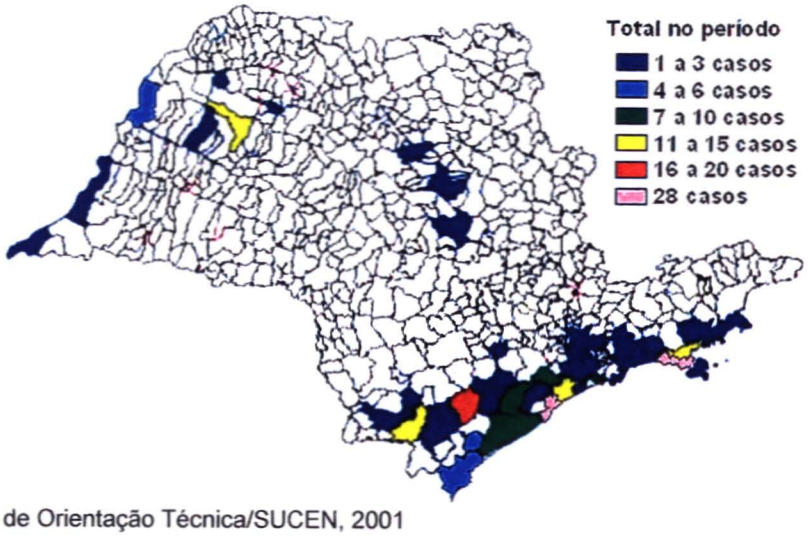
Com relação às pessoas infectadas, a estratégia de controle adotada pela Superintendência de Controle de Endemias – SUCEN, no presente, consiste no tratamento das mesmas e na busca ativa de casos suspeitos, no local referido pelo paciente.

A presença de anofelinos somada à circulação de pessoas provenientes de áreas de transmissão representa a possibilidade de reintrodução da doença em áreas hoje livres, principalmente as que não se apresentam economicamente desenvolvidas, como é o caso da maioria dos municípios do Vale do Ribeira. Além disso, boa parte do vale tem cobertura vegetal de Mata Atlântica e é considerada Área de Proteção Ambiental, com enorme potencial turístico, motivado pela pesca e práticas de ecoturismo nas ilhas Comprida, de Cananéia e do Cardoso e Parques Estaduais Intervales e Turístico do Alto Ribeira (PETAR). Como acréscimo, tem sido descrita a

aproximação domiciliar de *An. (Ker.) bellator* naquela área (Forattini *et al.*, 1999), fato que pode intensificar o contato homem-vetor e a proliferação de *An. albitarsis* associado à práticas agrícolas (Forattini *et al.*, 1993).

A transmissão da malária em São Paulo, concentra-se a leste do Estado, em regiões que pertencem aos Serviços Regionais da SUCEN, em Taubaté, São Vicente, Grande São Paulo e Sorocaba, as quais possuem municípios que se encontram associados ao complexo da Serra do Mar, com Mata Atlântica em distintos níveis de preservação e onde 90% dos casos autóctones foram registrados, nos últimos dez anos (Fig.1) (SUCEN, 2000).

Fig.1. Casos autóctones de malária. Estado de São Paulo, 1990 a 1999.



Fonte - Divisão de Orientação Técnica/SUCEN, 2001

A malária no interior do Estado, restringe-se em quase sua totalidade à região do Planalto Ocidental. Os casos distribuem-se principalmente ao longo das bacias hidrográficas dos rios São José dos Dourados, Tietê, Paraná e Turvo.

O Planalto Ocidental é recortado por inúmeras rodovias, além de ferrovia, que ligam o Estado às Regiões Centro-Oeste e Norte do país, representando desta forma, porta de entrada de indivíduos provenientes de áreas endêmicas de malária, como se depreende dos dados sobre casos importados apresentados na tabela 1. Esse fator, associado aos atrativos turísticos e à pesca nos inúmeros rios, torna a região do Planalto Ocidental receptiva para indivíduos portadores de gametas e com grande potencial de transmissão de malária (Andrade *et al.*, 1986).

A malária autóctone dessas regiões, em função de seu padrão epidemiológico peculiar e pela baixa especificidade diagnóstica da técnica parasitoscópica empregada, deixa uma lacuna que não permite excluir a participação de outras espécies de plasmódios na etiologia dos casos, como os plasmódios simianos *(Plasmodium brasilianum e Plasmodium simium)* e o *P. malariae* (Camargo, 1992).

Tab.1. Casos de malária segundo classificação epidemiológica. Estado de São Paulo, 1990 a 2000

Classificação epidemiológica												
Ano	Autóctone		Induzido		Importado		Recaída		Não Investigada		TOTAL	
	No	%	No	%	No	%	No	%	No	%	No	%
1990	28	1,6	26	1,4	1.587	88,3	157	8,7	-	-	1.798	100,0
1991	40	3,4	16	1,4	986	84,4	93	8,0	33	2,8	1.168	100,0
1992	11	1,1	5	0,5	849	86,7	115	11,7	-	-	980	100,0
1993	41	5,8	6	0,8	579	81,3	85	11,9	1	0,1	712	100,0
1994	28	4,3	2	0,3	588	89,9	36	5,5	-	-	654	100,0
1995	24	4,1	1	0,2	506	86,6	53	9,1	-	-	584	100,0
1996	12	2,6	-	-	423	91,0	30	6,4	-	-	465	100,0
1997	16	5,0	-	-	284	87,9	23	7,1	-	-	323	100,0
1998	15	4,1	2	0,6	304	83,7	42	11,6	-	-	363	100,0
1999	11	3,8	-	-	252	86,3	29	9,9	-	-	292	100,0
2000	21	7,1	3	1,0	236	80,8	32	10,9	1	0,3	292	100,0

Fonte - Divisão de OrientaçãoTécnica/SUCEN, 2001

3. Vetores

Os transmissores da malária humana no Brasil pertencem aos subgêneros *Nyssorhynchus* (Blanchard, 1902) e *Kerteszia* (Theobald, 1905).

A fauna culicidiana da Amazônia, como a de todos os demais grupos de insetos é pouco conhecida. Há deficiência de coletas em diversas localidades. O último trabalho sobre distribuição de mosquitos, abrangendo toda a Amazônia, foi realizado por Cerqueira em 1961, e reuniu 218 espécies, das quais, 152 ocorrem no Estado do Pará.

Os estudos de culicídeos da Amazônia, com coleta de grande número de exemplares, têm sido executados mais freqüentemente para realização de estudos de comportamento, tais como atividades horária, sazonal (Kumm & Novis, 1938; Galvão *et al.*, 1942; Tadei & Correia, 1982; Tadei *et al.*, 1983; Klein & Lima, 1990; Klein *et al.*, 1992; Rocha & Mascarenhas, 1994; Tubaki, 1994; Souto, 1994; Rocha, 1996; Rocha *et al.*,

1997) e estratificação arbórea (Deane *et al.*, 1953; Lopes *et al.*, 1983; Dégallier *et al.*, 1990; Souto, 1994; Rocha, 1996; Lourenço-de-Oliveira & Luz, 1996).

Alguns trabalhos foram realizados com o objetivo de procurar determinar a importância de várias espécies de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) como vetoras da malária. Das 33 espécies de *Anopheles* que ocorrem na região, somente nove foram encontradas infectadas com *Plasmodium* (Arruda *et al.*, 1986; Oliveira-Ferreira *et al.*, 1990; Póvoa *et al.*, 1993; Branquinho *et al.*, 1993; Segura, 1998; Póvoa *et al.*, 2000). *An. darlingi* (Root, 1926) é a principal espécie transmissora da malária na Amazônia, porque é altamente antropofílica (Arruda *et al.*, 1986; Deane, 1986; Tadei *et al.*, 1998), característica esta corroborada por testes de precipitina que demonstraram sua associação ao hospedeiro humano (Deane, 1986; Deane *et al.*,1988). Outra espécie, aparentemente menos importante que o *An. darlingi*, mas considerada vetor competente, é o *An. nuneztovari*. Encontrada naturalmente infectada por *P. vivax* em alguns locais da Amazônia brasileira, essa espécie poderia ser vetor secundário, devido a presença de *An. darlingi* na região (Arruda *et al.*, 1986).

Segundo Deane *et al.* (1948), *An. aquasalis* (Curry, 1932) atinge locais distantes mais de 100km do litoral, desde que o solo seja rico em cloretos, conseqüência da invasão das marés. Apesar de ser menos importante que *An. darlingi*, *An. aquasalis* é considerado vetor primário da malária em Belém e Amapá. No entanto, só é capaz de transmitir a doença quando está em elevada densidade, com oportunidade de obter repasto no homem em maior número, já que é uma espécie zoofílica.

A espécie *Anopheles oswaldoi* (Peryassú, 1922), recentemente, vem sendo considerada vetor potencial em algumas localidades da Amazônia. Apesar de não apresentar uma distribuição relacionada com a da malária, foi encontrado naturalmente infectado com *P. vivax* e *P. falciparum* nos Estados do Pará e Rondônia (Arruda *et al.*, 1986; Klein *et al.*, 1991a, b) e no Estado do Acre, com *P. falciparum, P. vivax, P. vivax* VK 247 e *P. malariae* (Branquinho *et al.*, 1993).

Nas regiões de Mata Atlântica, *An. (Ker.) cruzii* (Dyar & Knab, 1908) e *An. (Ker.) bellator* (Dyar & Knab, 1906) são as espécies responsáveis

pela transmissão de malária por *P. vivax*, sendo que *An. cruzii* é encontrado com mais abundância (Rachou, 1958; Forattini, 1962; Forattini *et al.*, 1986). Além de transmitir malária ao homem, *An. cruzii* é o único vetor natural conhecido de malária simiana no Brasil e nas Américas, veiculando os dois plasmódios de macacos do Novo Mundo - *P. brasilianum e P. simium* - ambos infectantes para o homem e freqüentemente encontrados nos macacos dos gêneros *Allouatta* e *Cebus,* existentes na Região Sudeste do Brasil (Vieira, 1955; Deane *et al.*, 1966a, b; Deane, 1969a,b,c; Deane, 1988; Consoli & Lourenço de Oliveira, 1994).

Os anofelinos deste subgênero sempre desenvolvem suas formas imaturas em criadouros do tipo "recipiente natural", principalmente em água que se acumula nas axilas das bromélias (Consoli & Lourenço de Oliveira, 1994).

As fêmeas são vorazes e picam durante o dia e a noite, exibindo pico de atividade hematofágica durante o período crepuscular noturno e um outro menor, durante o período crepuscular diurno, como por exemplo o *An. bellator*, que é essencialmente crepuscular vespertino, prolongando sua atividade hematofágica às primeiras horas da noite (Guimarães & Arlé, 1984; Guimarães *et al.*, 1985; Forattini *et al.*, 1986; Consoli & Lourenço de Oliveira, 1994). Alimentam-se preferencialmente no topo das árvores em florestas (acrodendrofilia), como é o caso do *An. cruzii*, que prefere picar nos níveis elevados das florestas, isto é, junto à copa das árvores, sendo que também picam ao nível do chão ou em áreas de mata devastadas, tendo portanto, capacidade de dispersão vertical (Deane *et al.*, 1984; Guimarães *et al.*, 1985; Forattini *et al.*, 1986; Gomes *et al.*, 1987). O raio de vôo desses anofelinos foi estimado em aproximadamente 1000 metros (Ferreira *et al.*, 1969). Em laboratório, adultos de *An. cruzii* têm vida longa, estimada em aproximadamente 31 dias (Luz *et al.*, 1977).

An. (Ker.) cruzii é uma espécie neotropical, que mostrava até a década de 70, extensa distribuição no Brasil, estendendo-se ao longo da Costa Atlântica desde o Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul (Zavortink, 1973). É um mosquito antropofílico e com hábitos exófilos, isto é, alimenta-se preferencialmente fora dos domicílios (Corrêa, 1961). As larvas são normalmente encontradas em bromeliáceas, sendo que a presença

acidental dessas espécies em poças d'água de chuva foi relatada por Rachou & Ferreira (1947). Estas desenvolvem-se muito lentamente (em laboratório, 35 dias do estádio de ovo a adulto). Luz *et al.* (1979), coletaram fêmeas de *An. cruzii* nas proximidades de domicílios e dentro das matas, observando que em ambos os casos as fêmeas possuíam idades fisiológicas similares.

A densidade populacional de *An. cruzii* é fortemente influenciada por fatores climáticos, sendo maior nos meses quentes e úmidos e menor nos meses frios e secos (Ciaravolo *et al.*, 1988). De maneira geral, as espécies pertencentes ao subgênero *Kerteszia* só transmitem malária quando encontradas em elevada densidade populacional (Consoli & Lourenço de Oliveira, 1994).

4. Ciclo da malária humana

Plasmódios são protozoários parasitas de répteis, aves e mamíferos (roedores e primatas), que possuem formas e dimensões variáveis de acordo com as fases do seu ciclo de vida (Rey, 1991).

Das várias espécies de plasmódios existentes na natureza, quatro são parasitas do homem: *P. falciparum, P. vivax, P. malariae* e *P. ovale.*

O ciclo de vida destes parasitas é complexo, com reprodução assexuada no homem e sexuada no inseto vetor. Tal ciclo inicia-se quando o *Anopheles* fêmea infectado inocula juntamente com sua saliva os esporozoítos (formas infectantes do *Plasmodium*) localizados nas suas glândulas salivares. Os esporozoítos inoculados migram para o fígado e invadem hepatócitos, dando início à fase exoeritrocítica, com formação de merozoítos. No caso de *P. vivax*, alguns esporozoítos originam, além do ciclo exoeritrocítico primário, as formas hipnozoítas, de desenvolvimento lento nos hepatócitos, responsáveis pelas recaídas da malária por esta espécie (Krotoski *et al.*,1982; Rey, 1991).

Após rompimento dos hepatócitos, os merozoítos invadem os eritrócitos, dando origem à fase eritrocítica. Alguns merozoítos diferenciam-se em formas sexuadas, os gametócitos masculinos e femininos, os quais, se

ingeridos pelo mosquito suscetível durante o repasto sangüíneo, originarão os gametas e o ciclo sexuado ou esporogônico.

O volume de sangue ingerido pelo mosquito fêmea é de 1-2 μl, podendo conter de 1-10 gametócitos, que dentro do tubo digestivo escapam do envelope eritrocítico. Cada gametócito masculino produz 8 microgametas (espermatozóide) e o gametócito fêmea produz um único macrogameta (ovo). O macrogameta fertilizado (zigoto) origina o oocineto, que migra para a região entre o epitélio e a lâmina basal do tubo digestivo transformando-se em oocisto. Através de multiplicação esporogônica, os esporozoítos são produzidos e liberados após rompimento do oocisto e invadem a glândula salivar, onde podem permanecer por longos períodos; somente 10-20 serão inoculados em um subseqüente repasto sangüíneo (Sinden, 1984; Sinden, 1999).

No processo esporogônico do *Plasmodium gallinaceum* foi observado que o parasito invade um tipo específico de célula no tubo digestivo do mosquito, as "células de Ross" (Shahabuddin & Pimenta, 1998). Entretanto, segundo os autores, estudos futuros serão necessários para determinar se estas células em anofelinos, são invadidas por plasmódios humanos e por plasmódios de outros primatas e roedores.

Aparentemente, a suscetibilidade do mosquito é determinada no momento da penetração tanto da matriz peritrófica quanto da parede do tubo digestivo pelo oocineto, fazendo supor que um receptor-alvo específico deve estar envolvido na interação entre oocineto e epitélio intestinal (Lensen, 1996). Além disto, a idade interfere no número final de oocistos. Mosquitos de 3-4 dias desenvolvem mais oocistos quando alimentados com sangue contendo *P. falciparum* do que mosquitos mais velhos, possivelmente porque os mais jovens digerem o sangue mais lentamente (Lensen, 1996).

1.5. Diagnóstico da malária humana

É difícil se estabelecer o diagnóstico da malária unicamente por meio do exame clínico, pois, a maioria de seus sintomas é inespecífico e presente em outras doenças. Desta forma, o diagnóstico definitivo da malária só é estabelecido quando do encontro de parasitas no sangue periférico e a identificação da espécie do parasita é essencial para orientar o tipo de tratamento, o prognóstico e o acompanhamento do paciente. O exame da gota espessa é o método utilizado nos programas de malária para determinar a ocorrência da infecção e mensurar os efeitos das atividades de combate à doença (WHO, 1988). Tal exame indica apenas a presença ou ausência de parasitemia patente no momento do exame. O resultado negativo pode levar a diagnóstico errado, pois, a patência é influenciada pelo estado imune do indivíduo e pela ação de drogas antimaláricas usadas na profilaxia ou terapia. O exame de sangue por meio da gota espessa apesar de ser simples e barato, consome muito tempo, exige pessoal técnico treinado e não é muito sensível em áreas com baixa incidência de malária (Kagan, 1992).

Novos métodos de diagnóstico foram desenvolvidos para detectar plasmódios no sangue, tais como análise de creme leucocitário (método de QBC - Quantitative Buffy Coat method) e Reação de Polimerização em Cadeia (PCR), método mais sofisticado e caro, que tem sido simplificado para uso em campo. Testes imunológicos tais como a Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI) e o Ensaio Imunoenzimático (ELISA), entre outros, são usados para inquéritos epidemiológicos.

A reação de PCR quando realizada em laboratório, pode chegar a detectar entre 0,0001% e 0,001% de parasitemia (aproximadamente 5-50 parasitas/μl) (Waters & McCutchan, 1989), em contraste com os 10-20 parasitas/μl detectados pela técnica de gota espessa (WHO, 1988). Estudo comparativo das técnicas de PCR e gota espessa, realizado com sangue de macacos das florestas da Guiana Francesa demonstrou que a técnica de PCR foi muito mais sensível, especialmente, para detectar baixas parasitemias, que passaram desapercebidas na técnica de gota espessa (Fandeur *et al.*, 2000). A técnica de PCR é particularmente importante na detecção de *P. vivax*, que não é cultivável e geralmente exibe parasitemias mais baixas que *P.*

falciparum. Além desses fatores, com a descoberta de formas variantes de *P. vivax*, o desenvolvimento de técnicas moleculares suplementares são cada vez mais necessárias para o estudo desse parasita.

Kain *et al.* (1993) utilizaram comparativamente as técnicas da gota espessa e PCR com "primers" específicos para proteína circumsporozoíta (CSP) de *P. vivax* e *P. vivax* VK247 em populações da Tailândia e verificaram que 10 indivíduos, supostamente negativos na gota espessa, pela técnica de PCR, estavam de fato infectados. Estudo similar ao anterior, conduzido por Snounou *et al.* (1993a) em 196 pacientes com malária da Tailândia, indicou que 32 deles (16%) tiveram lâminas negativas no exame de gota espessa, mas foram positivos para *P. falciparum* pela técnica de PCR.

No Estado de Rondônia, Amazônia Ocidental Brasileira, estudo similar aos citados acima, demonstrou a presença de infecções envolvendo mais de uma espécie de plasmódio em 30% (29/96) dos pacientes pesquisados pela técnica de PCR, quando nenhum caso havia sido encontrado pelo exame de gota espessa. Além disso, encontraram-se infecções por *P. malariae* por PCR em 9 dos 96 pacientes (10%), quando nenhuma havia sido detectada pelos microscopistas locais (Cavasini *et al.*, 2000).

Outro estudo comparativo, entre as técnicas de PCR e ELISA (teste imunoenzimático) com "primers" e formas esporozoítas de *P. vivax* "clássico" e *P. vivax* VK 247, respectivamente, demonstrou que houve 96% de concordância entre os dois testes dentre 182 indivíduos da Tailândia com malária por *P. vivax*. Contudo, tal concordância foi menor que 72% para casos identificados como mistos no PCR (Sattabongkot *et al.*, 1994).

Os métodos sorológicos são úteis tanto nas áreas endêmicas como nas não endêmicas. Em áreas onde a malária é ou foi endêmica, os métodos sorológicos são utilizados para: medir o nível de endemicidade; verificar a presença ou ausência de transmissão; delinear áreas malarígenas; detectar mudanças sazonais de transmissão; investigar a reintrodução da malária em áreas em fase de consolidação ou de manutenção; avaliar atividades antimaláricas (Ambroise-Thomas, 1978; Ambroise-Thomas, 1981; Beaudoin *et al.*, 1981; Bidwell & Voller, 1981; Jensen, 1978; Lobel, 1981; Lopez-Antunãno, 1984; Lopez-Antunãno & Schmunis, 1988). Em áreas onde a

malária não é endêmica, os métodos sorológicos são utilizados: para seleção de doadores de sangue; na elucidação de casos clínicos indefinidos; na avaliação de tratamento; na síndrome de esplenomegalia tropical; na detecção de indivíduos com formas latentes da doença, no diagnóstico diferencial e no diagnóstico de indivíduos com baixa parasitemia (Sadun, 1972; Ambroise-Thomas, 1978; Jensen *et al.*, 1978; Ambroise-Thomas, 1981; Beaudoin *et al.*, 1981; Bidwell *et al.*, 1981; Lopez-Antuñano, 1988; Ávila *et al.*, 1994).

A reação de Imunofluorescência Indireta (IFI) é considerada de referência no sorodiagnóstico e na soroepidemiologia da malária (Ambroise-Thomas, 1974; Collins *et al.,* 1975). O teste IFI emprega antígenos nativos (Ambroise-Thomas, 1981). Os resultados são expressos em títulos e estes são influenciados pelo tipo de antígeno empregado, por peculiaridades técnicas utilizadas, pela potência do conjugado, pelo sistema de microscopia e pelo observador. É um teste de leitura subjetiva, sendo que apresenta elevada sensibilidade e reprodutibilidade, com especificidade relativa (Sulzer *et al.*, 1969; Lopez-Antuñano & Schmunis, 1988). Estudos longitudinais em indivíduos infectados pela primeira vez mostram que os anticorpos fluorescentes aparecem logo após o início da parasitemia patente (Kuvin *et al.*, 1962). Os primeiros anticorpos detectados são os da classe IgM (presença de parasitas circulantes), aparecendo posteriormente os da classe IgG (existência passada de parasitas circulantes). A persistência desses anticorpos depende da duração e intensidade da infecção e da freqüência da exposição, podendo permanecer por anos em circulação (Luiby *et al.*, 1967, Collins *et al.*, 1968, Lopez-Antuñano & Schmunis, 1988).

No teste IFI, as formas em esquizonte são as mais reativas e tornam o teste mais sensível (Target, 1970; Hall *et al.*, 1978). Na literatura, há várias modificações técnicas para o teste de IFI, e mesmo o título limite de positividade varia de acordo com a técnica empregada (Collins & Skinner, 1972; Ferreira & Sanchez, 1988).

O teste imunoenzimático, ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) foi padronizado por Engvall & Perlmann (1971), como uma alternativa para o radioimunoensaio na pesquisa de antígenos e de anticorpos. Voller (1974) adaptou o teste para sorologia da malária, chamando a atenção para as vantagens que apresentava em relação a outros testes. A

especificidade e sensibilidade do teste dependem da qualidade dos antígenos e conjugados empregados (Ferreira, 1988; Sanchez, 1988). Podem ser utilizados extratos antigênicos bruto e purificado de plasmódios, polipeptídeos purificados e obtidos por fusão em culturas de *Escherichia coli*, peptídeos recombinantes e sintéticos (Engvall & Perlmann, 1971; Campbell *et al.*, 1987; Srivastava *et al.*, 1991). O teste ELISA foi aplicado a estudos soroepidemiológicos e na triagem de doadores de sangue e demonstrou ser tão ou mais eficiente que o teste de IFI (Voller, 1974; Wells & Ala, 1985; Sato *et al.*, 1990). É uma técnica de leitura objetiva, com possibilidade de avaliar o nível de anticorpos a partir de uma única diluição do soro (Kurstak, 1985; Lopez-Antuñano & Schmunis, 1988).

A utilização de peptídeos correspondentes à porção repetitiva da proteína circumsporozoíta (CSP) em ELISA, permite investigar se uma determinada população está ou esteve em contato com mosquitos anofelinos infectados. Porém, vale ressaltar que um resultado positivo não indica necessariamente que a pessoa desenvolveu a doença, pois, para seu prosseguimento é necessário que um número mínimo de esporozoítas penetre nos hepatócitos do hospedeiro, segundo a literatura, este número deve ser de aproximadamente 100 formas (Nussenzweig & Nussenzweig, 1985). Por se tratar de uma proteína com propriedades imunológicas, o contato entre o homem (ou macacos) e mosquitos infectados, mesmo com uma carga parasitária abaixo da "carga infecciosa", ao longo do tempo, gera uma resposta imune que varia conforme o tempo de residência no local e exposição aos mosquitos, mesmo na ausência de manifestação clínica da doença (Nardin *et al.*, 1979, Druilhe *et al.*, 1986, Greenwood, 1990, Philpott *et al.*, 1990).

Ávila *et al.* (1994) realizaram estudo comparativo entre o exame de lâminas com gota espessa e métodos alternativos de diagnóstico de malária como a imunofluorescência direta com anticorpo policlonal anti-*P. falciparum* e o método QBC em grupos populacionais de área endêmica de malária no Mato Grosso. Os autores concluíram que os métodos alternativos foram mais sensíveis do que a gota espessa. De modo geral, o teste IFI com anticorpo policlonal foi mais sensível do que o método de QBC e a gota espessa entre todos os grupos analisados, sendo que entre um grupo de

indivíduos moradores na área, mas não sintomáticos, o método de QBC demonstrou ser mais eficiente.

Existem alguns métodos que se destinam a detectar antígenos no sangue de pacientes com malária. Um exemplo é dado pelo teste ParaSight® F (imunoensaio cromatográfico que detecta um antígeno de *P. falciparum* no sangue total, que possui uma proteína rica em histidina - HRP-2) e foi desenvolvido para ser utilizado principalmente sob condições de campo em áreas endêmicas de malária por *P. falciparum*. Dietze *et al.* (1995) compararam os testes ParaSight® F e gota espessa em 121 indivíduos de área endêmica do Mato Grosso e verificaram que embora o teste ParaSight® F tenha se mostrado altamente sensível e específico, diagnosticando casos positivos nos quais a gota espessa mostrou-se negativa, este falhou, mostrando-se negativo em 7 indivíduos sabidamente positivos por meio da gota espessa.

Outra alternativa para detectar o antígeno HRP-2 no sangue de indivíduos moradores em áreas endêmicas de malária falciparum é o teste ELISA duplo, onde as placas de ELISA são sensibilizadas com anticorpos monoclonais, adicionando-se posteriormente, sangue total a ser testado. Esse método também foi desenvolvido para atender às condições de trabalho em campo, por ser de muito fácil execução. Namsiripongpun *et al.* (1993) e Taylor & Voller (1993) usaram esse teste ELISA em pacientes com malária por *P. falciparum* de áreas endêmicas da Tailândia. Os autores verificaram que o nível de sensibilidade desse método está muito próximo daquele obtido com o método convencional, ou seja, a gota espessa.

1.6. Técnicas para detecção de infecção plasmodial em anofelinos

Até o final de 1970, a detecção de plasmódios em mosquitos era feita por meio de dissecções individuais dos anofelinos, examinando-se suas glândulas salivares e tubos digestivos em preparações a fresco. Essa técnica não permite identificar a espécie do parasito. Em trabalhos experimentais, Zavala *et al.* (1982) utilizaram uma técnica imunológica (radiometria = IRMA) capaz de identificar a espécie do esporozoíto que está infectando o mosquito, utilizando anticorpos monoclonais específicos contra repetições

imunodominantes da proteína que reveste o esporozoíto (proteína circumsporozoíta = CSP). Essa técnica, mais tarde, foi padronizada por Burkot *et al.* (1984) para um ensaio imunoenzimático denominado ELISA (Enzyme Linked Immunobsorbent Assay). Nos imunoensaios é conveniente utilizar apenas a cabeça e a porção anterior do tórax do anofelino para elevar a possibilidade de, no caso de um anofelino ser positivo, estarmos detectando CSP procedentes de esporozoítos que se achavam albergados nas suas glândulas salivares. Se for incluído o abdome do anofelino, onde a maior parte do tubo digestivo do inseto está alojado, pode-se detectar CSP procedentes de oocistos maduros. Tais procedimentos justificam-se em virtude de um anofelino só poder ser incriminado como vetor de malária se for capaz de conduzir esporozoítos viáveis em suas glândulas salivares (Consoli & Lourenço de Oliveira, 1994).

Recentemente, foi desenvolvido o VecTest®, um teste similar ao ELISA para detectar infecção de anofelinos por plasmódios. É realizado em tubos para ser utilizado em campo. O "kit" contém fitas sensibilizadas com anticorpos monoclonais específicos para detecção de CSP de *P. falciparum*, *P. vivax* "clássico" e *P. vivax* VK 247 e a leitura do resultado é feita após 15 minutos, visualmente. Estudos comparativos entre este teste e o ELISA, feitos pelo Walter Reed Army Institute of Research (EUA), demonstraram haver sensibilidade equivalente entre ambos (Ryan *et al.*, 2001).

A densidade de oocistos em anofelinos coletados no campo é freqüentemente baixa e as infecções das glândulas salivares são leves, o que é comum em áreas endêmicas. Conseqüentemente, a análise da dinâmica de transmissão de um número relativamente grande de mosquitos e a validade das conclusões dependem do nível de sensibilidade dos testes para a detecção do parasito. Como as técnicas imunológicas, em geral, parecem ter baixa sensibilidade para discretos níveis de infecção, a técnica de PCR (para detecção de DNA de plasmódios) tem sido utilizada como alternativa para testar a infecção natural de mosquitos. São utilizadas seqüências de "primers" específicos que amplificam o DNA do *Plasmodium.* Trata-se de um método altamente sensível e específico, que possibilita a identificação do parasito, além de demonstrar sua diversidade genética (Snounou *et al.*, 1993b; Póvoa *et al.*, 2000; Arez *et al.*, 2000).

Antes do emprego das técnicas imunológicas e de biologia molecular, poucas espécies brasileiras de *Nyssorhynchus* haviam sido encontradas naturalmente infectadas com esporozoítos nas glândulas salivares. Apenas nesse caso a espécie era incriminada como transmissora. Dentre elas estão o *A. darlingi*, o *A. aquasalis* e o *An. albitarsis* e anofelinos do subgênero *Kerteszia*: *An. cruzii*, *An. bellator* e *An. homunculus*. Hoje, várias outras espécies são consideradas capazes de transmitir a doença, sendo, no entanto, consideradas secundárias ou vetores potenciais. Essas espécies têm sido encontradas naturalmente infectadas em algumas áreas endêmicas de malária, particularmente na Amazônia. Por exemplo, *An. deaneorum*, *An. braziliensis*, *An. nuneztovari*, *An. oswaldoi*, *An. triannulatus*, *An. strodei*, *An. evansae* e *An. galvaoi*. No entanto, além de não serem antropofílicas, elas são geralmente pouco suscetíveis aos *P. vivax* e *P. falciparum*, com exceção de *An. deaneorum* e *An. nuneztovari*.

1.7. Proteína circumsporozoíta (CSP)

Esporozoítas são o estágio infectivo dos parasitas da malária, presentes nas glândulas salivares de mosquitos anofelinos. Pouco mais que 100 esporozoítas são suficientes para infectar um hospedeiro suscetível. Eles desenvolvem-se exclusivamente no interior de hepatócitos e podem ser detectados poucos minutos após a sua inoculação (Nussenzweig & Nussenzweig, 1985), sendo sua membrana uniformemente coberta por polipeptídeos com massa molecular de 40 a 60 KDa, denominados como proteínas circumsporozoíta (CSP), (Nussenzweig *et al.*, 1984), estando provavelmente envolvidos em interações entre os esporozoítas e a membrana dos hepatócitos. Existe uma correlação temporal entre a aquisição da infectividade e o aparecimento da CSP na membrana do parasita, desde que esporozoítas imaturos encontrados no intestino médio de mosquitos vetores possuem pouca ou nenhuma CSP em suas membranas (Vanderberg, 1975).

A incubação de esporozoítas com soros ou anticorpos monoclonais protetores resulta na chamada reação de precipitação circumsporozoíta (Vanderberg *et al.*,1969; Nussenzweig *et al.*, 1973). Estudos de microscopia eletrônica revelaram que o antígeno envolvido nessa reação

de precipitação está uniformemente distribuído ao longo da superfície do parasita (Cochrane *et al.*, 1976).

Tal proteína é estritamente estágio-específica, não sendo encontrada nos estágios sanguíneos do parasita (Nussenzweig *et al.*, 1969). Essas proteínas possuem ainda propriedades imunológicas devido ao epitopo imunodominante que se apresenta duas ou mais vezes numa única molécula (Zavala *et al.*, 1983). Todos os anticorpos monoclonais desenvolvidos contra esporozoítas reconhecem esse epitopo.

O seqüenciamento da CSP de *Plasmodium* e a clonagem de genes correspondentes evidenciou a existência de seqüências repetitivas. Assim, a região central da CSP consiste de seqüências repetitivas de aminoácidos que são altamente conservadas entre isolados de diferentes áreas geográficas. Essas proteínas diferem entre espécies de plasmódios humanos, quanto ao tamanho, seqüência e número de seqüências repetitivas de aminoácidos (Kemp *et al.*, 1987). No entanto, existem homologias entre algumas espécies, podendo citar-se como exemplo a CSP do *P. vivax* que apresenta extensa homologia com a CSP do *Plamodium knowlesi* e *Plasmodium cynomolgi* (Arnot *et al.*, 1985).

No *P. falciparum*, a seqüência de aminoácidos apresenta-se altamente conservada, não mostrando variação entre as populações de parasitas das mais diversas áreas geográficas existentes. Entretanto, recentemente foram descritas variantes do antígeno circumsporozoíta de *P. vivax*: *P. vivax* VK 247 (Rosenberg *et al.*, 1989) e *P. vivax*-like humano (Qari *et al.*, 1993). Peptídeos e proteínas recombinantes, contendo epitopos imunodominantes das CSP das diferentes espécies de plasmódios e de variantes, estão sendo amplamente produzidos e estudados como candidatos à vacina no combate à malária (Nardin *et al.*, 1982; Knobloch *et al.*, 1987).

1.8. Variantes de *Plasmodium vivax*

Rosenberg *et al* (1989) clonaram e seqüenciaram a porção flanqueada pelas regiões I e II do gene CS de *P. vivax*, proveniente de amostras de sangue de pacientes da Tailândia e encontraram

heterogeneidade fenotípica na região correpondente à CSP em alguns dos indivíduos.

A CSP de esporozoítas, provenientes das glândulas salivares dos anofelinos alimentados com sangue de alguns desses pacientes não foi reconhecida por anticorpos monoclonais produzidos a partir de diferentes cepas de *P. vivax* e de outras espécies de malárias humana e simiana. A razão para essa não reatividade está na região repetitiva da variante VK 247 que difere em 6/9 aminoácidos [ANGA(G/D)(N/D)QPG] contidos nessa mesma seqüência encontrada em todas as CSP de *P. vivax* descritas até então [GDRA(D/A)GQPA].

Qari *et al* (1993) utilizando amostras de sangue de pacientes com malária diagnosticada como vivax, empregando os mesmos métodos usados na caracterização da variante VK 247, identificaram um parasita de malária humana microscopicamente semelhante ao *P. vivax*, mas com CSP diferente daquelas de *P. vivax* "clássico" e *P. vivax* VK 247. A porção repetitiva da CSP desse "*P. vivax*-like" [APGANQ(E/G)GGAA] é idêntica àquela de *Plasmodium simiovale*, um parasita de macaco morfologicamente semelhante ao *P. ovale*. Anticorpo policlonal produzido contra parte da seqüência repetitiva do *P.vivax*-like reagiu especificamente com esporozoítas de *P. simiovale*, mas não com aqueles de *P. vivax* "clássico", *P. vivax* VK 247, *P. ovale* e *P. simium*. Contudo, a identidade desses parasitas não está clara, visto que ainda não foi obtida uma linhagem isolada de humanos (Warhurst *et al.*, 1993) e não foi comprovado que *P. simiovale* é infectante para o homem (Qari *et al.*, 1993). Também não está claro se *P. vivax*-like é um membro da espécie *P. vivax* ou um novo parasita de malária humana (Oliveira *et al.*, 1995).

Até o momento, nada se sabe sobre manifestações clínicas e resposta imune do hospedeiro desencadeada por ambas as variantes referidas acima (Machado & Póvoa, 2000; Rodriguez *et al.*, 2000) ou sobre a contribuição das mesmas na prevalência da malária e sua interação com vetores anofelinos potenciais.

Gonzalez-Ceron *et al.* (1999) demonstraram *in vitro* que colônias de *An. albimanus* foram mais suscetíveis ao *P. vivax* "clássico" do que ao *P. vivax* VK 247 e colônias de *An. pseudopunctipennis* foram mais suscetíveis ao *P. vivax*

VK 247 que ao *P. vivax* "clássico". Mais recentemente, estudos sobre taxa de infecção confirmaram esses resultados com *An. albimanus* (mais suscetível ao *P. vivax* "clássico") e *An. pseudopunctipennis* (suscetível ao *P. vivax* "clássico" e *P. vivax* VK 247), (Rodriguez *et al.* 2000).

Ambas as variantes de *P. vivax* são amplamente distribuídas pelo mundo, sendo que reações sorológicas positivas contra o antígeno circumsporozoíta de *P. vivax* VK 247 foram encontradas em populações da Tailândia (Rosenberg *et al.*, 1989), populações indígenas do Brasil e da Índia (Cochrane *et al.*, 1990), Peru (Franke *et al.*, 1992), Bangladesh (Maheswary *et al.*, 1992), indígenas e residentes nos Estados do Acre e Pará, Brasil (Kremsner *et al.,* 1992; Oliveira *et al.,* 1995, Arruda *et al.*, 1998). *P. vivax*-like humano foi encontrada em populações de Papua Nova Guiné (Qari *et al.*, 1993; Warhurst *et al.*, 1993), Brasil, Madagascar e Indonésia (Qari *et al.*, 1993, Oliveira *et al.*, 1995, Marrelli *et al.*, 1998).

Estudo retrospectivo (Arruda *et al.*, 1998) sobre a prevalência das variantes de *P. vivax* em populações indígenas da Amazônia revelou que tanto o *P. vivax* VK 247 quanto o *P. vivax* like-humano estavam presentes nessas populações, coexistindo com *P. vivax* "clássico", há pelo menos 12 anos, visto que o primeiro estudo foi realizado em 1989 (Arruda *et al.*, 1989), com essas mesmas populações, e neste mesmo ano, Rosenberg *et al.* (1989) descreveram a variante *P. vivax* VK247.

No Brasil, variantes de *P. vivax* foram encontradas também em anofelinos submetidos ao teste ELISA com anticorpos monoclonais específicos, nos Estados do Acre e Amapá (Branquinho *et al.*, 1993; Póvoa *et al.*, 1993; Marrelli *et al.*, 1998).

Lim *et al.* (2001) identificaram uma nova variante de *P. vivax* ao seqüenciar a CSP de isolados da Coréia do Sul. Essas seqüências eram similares às encontradas em cepas da China e Coréia do Norte, sendo que as seqüências de aminoácidos das regiões repetitivas dos isolados da Coréia do Sul são similares àquela de *P. vivax* VK210 "clássico". Nos isolados das Coréias do Norte e Sul e da China, a seqüência de aminoácidos GGNAANKKAEDAGGNA foi encontrada na região posterior à região repetitiva, mas apenas nos isolados da Coréia do Sul, esta seqüência (GGNA) repete-se duas vezes. A análise desses dados indicam que, embora os

isolados das Coréias do Norte e Sul e da China sejam semelhantes, os da Coréia do Sul são filogeneticamente únicos. Em tais estudos, verificou-se também em pacientes de malária da Coréia do Sul a existência de um período pré-patente prolongado (>230 dias), fator que impede a rápida detecção e tratamento de infecções por *P. vivax* nessas áreas.

1.9. *Plasmodium malariae*-like

Kawamoto *et al.* (2002) descreveram duas formas peculiares de *P. malarie*-like em pesquisa realizada no Sudeste da Ásia. No aspecto morfológico, as formas trofozoítas eram distintas da forma típica de *P. malariae*, lembrando *P. vivax*, var. *minuta* (Emin, 1914) e *Plasmodium tenue* (Stephens, 1914). Ao realizarem PCR da pequena subunidade ribossômica (SSUrRNA), constataram pela análise da seqüência SSUrRNA e genes da CSP, que esses parasitas poderiam ser separados em dois tipos gênicos distintos. Esses resultados indicam que a morfologia de parasitas de *P. malariae,* vista ao microscópio, pode ser mais diversificada do que se sabia, até então.

1.10. Considerações sobre malária simiana

Segundo Collins (1988), vinte espécies de plasmódio infectam primatas não humanos. Dentre estas, oito infectam os "grandes macacos" (família Pongidae): *Plasmodium schwetzi, Plasmodium reichenowi*; *Plasmodium pitheci, Plasmodium silvaticum, Plasmodium hylobati, Plasmodium eylesi, Plasmodium youngi e Plasmodium jeffreryi* e duas espécies infectam os lêmures, ancestrais mais remotos dos primatas (prossímios): *Plasmodium lemuris* e *Plasmodium girardi.*

As dez espécies restantes possuem características biológicas muito semelhantes aos plasmódios humanos. Oito infectam macacos do Velho Mundo (família Cercopithecidae): *Plasmodium cynomolgi, Plasmodium gonderi, Plasmodium coatneyi, Plasmodium fragile, Plasmodium fieldi, Plasmodium simiovale, Plasmodium inui* e *Plasmodium knowlesi* e duas

infectam macacos do Novo Mundo (famílias Cebidae e Atelidae): *Plasmodium brasilianum* e *Plasmodium simium.*

Algumas destas espécies de plasmódios são amplamente utilizadas em estudos experimentais em macacos.

Em relação aos hospedeiros experimentais, diversos estudos foram realizados observando-se que plasmódios simianos da Ásia e África, desenvolvem-se em um grande número de espécies de macacos do Velho Mundo e em algumas espécies dos "grandes macacos". Somente um pequeno número de macacos do Novo Mundo dos gêneros *Aotus*, *Cebus*, *Saimiri*, *Callithrix* contraíram infecções experimentais com estes plasmódios.

O ciclo de vida dos plasmódios simianos é essencialmente igual ao dos parasitas humanos. Até onde se sabe, todos são transmitidos por mosquitos do gênero *Anopheles.* Os mosquitos injetam esporozoítos infectantes nos primatas, que ao chegarem no fígado, dão origem ao ciclo exoeritrocítico. Nesta fase, em algumas espécies, ocorrem formas persistentes que são responsáveis por recaídas, ou seja, o reaparecimento da parasitemia derivada do desenvolvimento secundário de esquizontes no fígado. Este fenômeno foi observado em *P. cynomolgi, P. fieldi e P. simiovale.*

A observação, assim como a descrição dos ciclos de vida de plasmódios simianos são baseadas em modelos experimentais, geralmente em macacos esplenectomizados infectados e anofelinos infectados em laboratório; portanto, na natureza, são poucas as informações disponíveis a respeito da dinâmica das interações do parasita, vetor e hospedeiros.

1.10.1. A malária simiana no Novo Mundo

Atualmente, em contraste com o número elevado de espécies de plasmódios simianos da África e Ásia, até hoje, somente duas espécies foram encontradas infectando os macacos do Novo Mundo: o *P. brasilianum e o P. simium.*

1.10.1.1. *Plasmodium brasilianum* (Gonder & von Berenberg-Gossler, 1908)

O *P. brasilianum* é considerado um excelente modelo experimental devido às suas similaridades biológicas com *P. malariae* e por se desenvolver em diferentes macacos do Novo Mundo (Collins, 1988).

O vetor natural do *P. brasilianum* nas Regiões Sudeste e Sul do Brasil foi identificado como sendo o *An. (Ker.) cruzii* (Deane *et al.*, 1966a; Deane, 1969a; Deane, 1992). Nas demais regiões da América onde ocorre este parasita, não foram identificados os vetores competentes na transmissão dos plasmódios simianos.

Sua distribuição geográfica é ampla, pois, foi encontrado na maioria das espécies de macacos da família Cebidae do Panamá (Clark, 1931; Porter *et al.*, 1966), Colômbia (Marinkelle & Grose, 1968; Dunn & Lambrecht, 1963), Venezuela (Serrano, 1967), Peru (Dunn & Lambrecht, 1963) e Brasil (Deane *et al.*, 1969b; Deane, 1992).

1.10.1.2. *Plasmodium simium* (Fonseca,1951)

O *P. simium* foi encontrado pela primeira vez em 1939, em um macaco bugio conhecido como guariba (*Alouatta fusca*), proveniente do município de Itapecerica da Serra, São Paulo, quando se realizava nesta área estudos relacionados à febre amarela (Fonseca, 1951).

Posteriormente, o parasita foi encontrado em bugios da região de Mata Atlântica dos Estados de Santa Catarina (Deane *et al.*, 1969c) e Rio Grande do Sul (Deane & Ferreira Neto, 1969b); contudo no Estado do Espírito Santo o parasita foi encontrado também no muriqui *Brachytlles arachnoides* (Deane *et al.*, 1968). Nesses Estados o vetor natural é o *An. (Ker.) cruzii* (Deane *et al.*, 1970).

Foi observado, que o ciclo de desenvolvimento do *P. simium*, no mosquito, é mais longo que o do *P. vivax*. Também foram feitas algumas tentativas de infecção experimental em voluntários humanos a partir de formas sangüíneas, porém todas falharam (Coatney *et al.*, 1971).

Curso natural de infecção foi observado nos macacos *Saimiri sciureus, Ateles paniscus, Lagothrix lagotricha e Alouatta fusca*, que apresentaram parasitemia baixa, tanto para *P. simium* quanto para *P. brasilianum,* sendo mais persistente neste último (Deane, 1992).

1.10.2. A malária simiana no Brasil

Dr. Leonidas de Mello Deane, pesquisador de Malária do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e da Fundação Oswaldo Cruz, dedicou boa parte de sua vida científica ao estudo da malária simiana. Seu interesse pelo assunto despertou no final da década de 30, trabalhando em pesquisas associadas à Campanha Nacional de Erradicação da Malária, quando pôde observar que o *P. malariae*, responsável pela febre quartã benigna humana, era mais prevalente nas regiões de floresta do que em cidades. Este fato associado às similaridades existentes com o *P. brasilianum*, isolado em 1908, em um macaco da região Amazônica, levantou a hipótese de que homem e macaco poderiam estar compartilhando o mesmo parasita.

Entre as décadas de 60 e 70, Deane publicou inúmeros trabalhos sobre infecção de macacos por plasmódios, vetores responsáveis pela transmissão da malária simiana e o único caso de infecção natural humana por plasmódio simiano.

Estes importantes resultados culminaram com a publicação de uma extensa revisão bibliográfica do assunto, em 1992. Na realidade, trata-se de uma coletânea que abrange estudos realizados entre 1937 e 1990 pelo Dr. Deane e por pesquisadores a ele associados, referentes à infecções maláricas em macacos (Deane, 1976; Arruda, 1985; Lourenço-de-Oliveira, 1988, 1990; Deane *et al.*, 1989; Deane, 1992).

Basicamente, a identificação dos parasitas nesses levantamentos foi obtida por estudo morfológico, em microscopia óptica, de lâmina de esfregaço de sangue e gota espessa.

Segundo os dados dessa revisão, a malária simiana foi freqüente na região Amazônica, onde 10% dos macacos estavam infectados, sendo que em 99% dos casos, a infecção era causada por *P. brasilianum. P. simium* não foi detectado nos macacos da Região Norte. Porém, Deane não descartou a

possibilidade de ocorrência deste ou de outros plasmódios ainda não descritos. uma vez que, em alguns esfregaços, não foi possível identificar o parasita até o nível de espécie. Na Mata Atlântica das Regiões Sul e Sudeste, as positividades foram respectivamente, 17,9% e 35,6%, sendo que no Sul, *P. simium* foi o mais prevalente (48,4%), seguido do *P. brasilianum* (33,3%); no Sudeste o mais prevalente foi *P. brasilianum* (46,3%) seguido de *P. simium* (37,5%). Os macacos das Regiões Nordeste e Centro-Oeste, considerados neste estudo, foram negativos para ambos os plasmódios (Deane, 1992).

No Brasil, observou-se uma maior prevalência tanto do *P. brasilianum* quanto do *P. simium* no gênero *Alouatta*. *P. brasilianum* foi encontrado em todos os gêneros de macacos, exceto em *Aotus*, enquanto *P. simium* somente em *Alouatta* e *Brachyteles* (Deane, 1992).

1.10.3. A proteína circumsporozoíta (CSP) e a correlação entre os plasmódios simianos e humanos

Lal *et al.* (1988a,b) observaram que as seqüências repetitivas que codificam o gene CSP de *P. malariae* e *P. brasilianum* possuem identidade antigênica. A região central imunodominante consiste em 45 cópias da seqüência repetitiva (NAAG) e 6 cópias da seqüência (NDAG), sendo que a proteína CSP de *P. brasilianum* contém as mesmas seqüências repetitivas.

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

Outra descoberta surpreendente foi descrita por Goldman *et al.* (1993), onde o gene que codifica para a CSP de *P. simium* foi amplificado por "primers" correspondentes à CSP de *P. vivax*. A partir do fragmento de aproximadamente 1.2 Kb, 9 clones foram obtidos, dos quais 7 possuíam a seqüência repetitiva da proteína CSP idêntica ao *P. vivax* "clássico" (GDRAA/DGQPA) correspondente às linhagens "Belem", "Sal 1" e "North

Korean" que foram designados como PVCS type 1 (old type), e 2 clones que possuíam seqüência 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.*, 1984. Lal & Goldman (1991) observaram que a região repetitiva da proteína CSP de *P. reichenowi* (NVNP) possui grande similaridade com a de *P. falciparum* (NANP e NVDP).

Escalante *et al.* (1995), analisando 12 espécies de plasmódios, estudaram filogenéticamente as porções terminais (regiões não repetitivas) do gene que codifica a proteína CSP e constataram que nestas porções, *P. malariae*, *P. vivax*, e *P. vivax*-like humano são indistingüíveis de *P. brasilianum*. *P. simium* e *P. simiovale*, respectivamente. Também observaram uma grande proximidade filogenética entre *P. falciparum* e *P. reichenowi*, parasita de chimpanzés (*Pan troglodytes*). De acordo com estes 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 aquela proposta por Coatney (1971) que sugeriu que *P. vivax* e *P. malariae* foram transmitidos para os macacos do Novo Mundo quando humanos chegaram às Américas.

Um melhor conhecimento dos plasmódios simianos possibilitará também uma nova organização do gênero *Plasmodium,* já que tantas evidências mostram, hoje, a proximidade evolutiva entre as várias espécies, até então, consideradas (Escalante *et al.*, 1995).

Lal *et al.* (1988a) fazem uma interessante abordagem deste assunto. Consideram que, embora a presença de reservatórios animais seja provavelmente insignificante em termos de saúde pública, poderia exercer efeitos mais intensos no caso de aplicação de uma vacina anti-malárica, 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 erradicação poderiam ser afetados, por meio da conservação em primatas, de cepas, contra as quais, as

populações humanas não teriam imunidade, servindo também como uma fonte constante de infecção.

Estudos realizados no Gabão para avaliar a possibilidade de que macacos (gorilas e chimpanzés) habitantes das florestas locais estariam funcionando como reservatórios da doença, que vinha acometendo humanos (malária por *P. falciparum* e *P. malariae)*, evidenciaram que os exames parasitológicos (esfregaço e PCR) realizados com o sangue desses macacos foram negativos. A sorologia mostrou macacos positivos em ELISA com peptídeos da CSP de *P. falciparum,* porém com prevalência muito baixa para anticorpos contra formas sangüíneas, assim sendo, talvez não estivessem servindo como reservatórios, visto que, o quadro endêmico humano era bastante significante na população local (Ollomo *et al.*, 1997).

Estudo recente, realizado por Fandeur *et al.* (2000), com 214 macacos capturados em área de construção de Usina Hidrelétrica na Guiana Francesa, indicou a presença de *P. brasilianum* em 5% das lâminas com gota espessa feitas com o sangue dos macacos. A reação de PCR, utilizando "primers" de *P. brasilianum*, foi comparativamente mais sensível que o método parasitológico convencional para detectar baixas parasitemias em macacos positivos, visto que, pelo PCR, a infecção foi detectada em 11% dos macacos. Nenhuma amplificação foi obtida nas amostras submetidas ao PCR com "primers" de *P. falciparum* e *P. vivax*. Os autores concluíram que o aumento de casos de malária por *P. malariae* nas populações humanas locais ocorreu devido aos distúrbios ecológicos ocasionados pela construção da Usina e pelo estreitamento do contato entre homens e macacos, afirmando que na localidade estudada, os macacos desempenham o papel de reservatórios naturais das malárias simiana e humana.

No Brasil, alguns estudos sobre malária autóctone humana foram conduzidos em regiões da Mata Atlântica, onde humanos, macacos e vetores estão presentes.

Em 1992, Camargo estudou casos de "malária vivax" autóctone no sul do Estado de São Paulo e aventou a possibilidade da transmissão de plasmódios simianos ou mesmo de *P. malariae* ao homem, já que a técnica utilizada para o diagnóstico não era sensível, principalmente nos casos com baixa parasitemia. Sabido que nessas condições podem ocorrer diagnósticos

errôneos entre *P. vivax* e *P. malariae* (Lopez-Antuñano & Schmunis, 1988), tais fatos sugerem que possam ocorrer outros agentes etiológicos além do *P. vivax*.

Curado *et al.* (1997) realizaram estudos sorológicos com populações da Serra do Mar e Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, onde ocorre malária autóctone, verificando a prevalência de anticorpos contra peptídeos da região repetitiva da CSP de *P. vivax*, suas variantes e *P. malariae/P. brasilianum*, e também contra formas sangüíneas de *P. vivax e P. brasilianum*. Observaram que em algumas localidades houve uma alta prevalência para anticorpos anti-CSP de *P. vivax*-like humano/*P. simiovale* e *P. malariae/P. brasilianum*. Estes dados associados à presença de vetores competentes para transmissão de plasmódios simianos e a ocorrência de poucos casos sintomáticos sugerem que parasitas simianos possam estar circulando entre humanos. Trabalho semelhante foi realizado por Duarte (1998) com populações humanas e macacos que habitam a Serra da Mesa (Goiás) e Serra da Cantareira (São Paulo). Os exames parasitológicos de gota espessa (dos macacos) e PCR (dos macacos e humanos) foram negativos para todas as amostras de sangue colhidas. Contudo, nas duas localidades estudadas, algumas amostras de soro foram positivas para presença de anticorpos anti-CSP de *P. falciparum* (Serra da Mesa), *P. vivax* e *P. malariae* (Serra da Cantareira). Alguns macacos e humanos também tiveram reações positivas para presença de anticorpos anti-formas assexuadas, porém com baixa positividade. Os resultados obtidos indicam que, nas áreas estudadas, ocorre a circulação de esporozoítos, encontrados tanto em humanos quanto em macacos.

2. Antecedentes

No Brasil, casos de malária assintomática foram registrados com populações residentes em áreas endêmicas (Prata *et al.*, 1988; Arruda *et al.*, 1989; Silva *et al.*, 1993; Malafronte *et al.*, 1994, Camargo *et al.*, 1999a,b) e de baixa endemicidade de malária como o ocorrido em área serrana do Estado do Rio de Janeiro, com características muito semelhantes às estudadas por Curado (1995). Mattos *et al.* (1993), encontraram 6 casos

de malária (3 deles em turistas e 3 em moradores) no município de Nova Friburgo. Em todos os casos a parasitemia foi extremamente baixa sendo o parasita classificado como *P. vivax*. Somente os turistas tiveram sintomatologia e 65% dos indivíduos da população local que foram examinados apresentaram anticorpos anti-formas assexuadas de *P. vivax*, indicando que os mesmos contraíram malária em algum momento. O sangue de um paciente com parasitemia subpatente foi inoculado em macaco *S. sciureus*, que contraiu a infecção e teve cura espontânea.

Camargo *et al.* (1999a) realizaram estudo com populações ribeirinhas do Estado de Rondônia e verificaram que nos indivíduos residentes na região, a presença de parasitos no sangue, sejam eles *P. falciparum* ou *P. vivax*, sempre foi acompanhada de sintomas. Contudo, os poucos nativos que tinham parasitos no sangue não apresentavam sintomas. Os autores acompanharam 183 indivíduos, dentre os quais, 7,65% (14/183) tiveram malária vivax acompanhada por sintomas com gota espessa positiva e PCR positivo (todos menores de 16 anos e morando por pouco mais de um ano no local). Também foram constatados 13,66% (25/183) de malária vivax sem sintomas e com PCR positivo (maiores de 16 anos). Desses indivíduos, 16 tiveram acompanhamento médico por 30 dias, sendo que 8 deles apresentaram gota espessa positiva com parasitemia muito baixa. Após 2 semanas do primeiro PCR, 12 indivíduos tornaram-se negativos, mas 4 permaneceram positivos na PCR por 30 dias. Os autores concluíram que os nativos desenvolvem certo grau de imunidade à malária vivax e servem como reservatório da doença.

Estudo semelhante ao acima citado, também realizado com populações ribeirinhas residentes em Portuchuelo (assentamentos ao longo do Rio Madeira), Rondônia, indicaram que os moradores nativos e mais idosos (especialmente os acima de 50 anos) são aqueles que têm menor vulnerabilidade à contrair a malária (Camargo *et al.*, 1999b).

No presente trabalho pretendeu-se dar continuidade à pesquisa iniciada no ano de 1991 (Curado, 1995) agora, em duas outras localidades também pertencentes às regiões de Mata Atlântica do Vale do Ribeira (Parque Intervales: Bairros Tanquinho, Monte Rosa e Boa Vista e Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira – PETAR: Bairro Serra), áreas circundadas pelos

municípios de Guapiara, Ribeirão Grande, Iporanga, Eldorado e Sete Barras), Estado de São Paulo, áreas de foco de malária autóctone (quadro 1 e tabelas 2, 3 e 4).

Quadro 1 Localidades/Municípios com transmissão de malária na Região da Serra do Mar. Estado de São Paulo, 1995 a 2000.

Município	Localidade
Biritiba Mirim	Rio Guaca
Caraguatatuba	Intermediária
	Cond. Patrimônio
Embu-Guaçu	B. Paiol Velho
	B. Penteado
	B. Ponte Alta
Iguape	Despraiado
	Rio Verde
	Rocio
	Juréia
	B. Rio Pequeno
Iporanga	Núcleo Caboclo
	Parque Ecológico e Turístico do Alto Ribeira
	Espírito Santo
Juquiá	Faz. Iporanga
	Iporanga Dique
Miracatu	B. Alecrim
	Pedra do Largo
	B. Engenho
Natividade da Serra	Vargem Grande
Peruíbe	S. Francisco
	Aldeia dos Índios
	Rio Guanhaem
	Bananal
São Sebastião	Boissucanga
	Maresias
	B. Baraqueçaba
	B. Juquei
	Camburi
	Barra do Una
	Jaraguá
São Vicente	Pai Mathias
Sete Barras	Reserva Florestal
	Saibadela
	Formosa
	Palmital
	Guaxixi de Dentro
Guapiara	Faz. Intervales
Itanhaém	Faz. Ararau
	Faz. Mambu
	Faz. Rio Branco
Bertioga	Vista Linda
	Canal de Bertioga
Ilhabela	Centro Náutico
Pariquera-Açu	Pariquera Mirim
Juquitiba	Pesqueiro Vale do Peixe
Mongaguá	Bal. Flórida Mirim
	Poço das Antas
Pedro de Toledo	Ribeirão Grande
Registro	Vila São Francisco
Tapiraí	B. Limoeiro
	B. Comercial

Fonte – Divisão de Orientação Técnica – SUCEN, 2001

Tab. 2 Casos autóctones de malária, por ano e local provável de infecção. Região da Serra do Mar, 1990 a 2000* .

SR-2 SÃO VICENTE									
	Bertioga	Cananéia	Eldorado	Guarujá	Iguape	Itanhaém	Itariri	Juquiá	Miracatu
1990	-	1	2	-	-	3	-	-	2
1991	-	1	-	3	-	2	-	1	-
1992	-	1	-	-	-	1	-	-	1
1993	-	-	-	-	3	1	-	-	-
1994	-	-	-	-	1	-	-	1	-
1995	-	-	-	-	3	-	-	1	3
1996	-	-	-	-	1	-	-	-	-
1997	-	1	-	-	-	3	-	-	-
1998	1	-	-	-	-	1	-	-	-
1999	-	-	-	-	1	-	-	-	2
2000	2	-	-	-	-	-	-	1	-

* Dados até julho/2000
Fonte – Divisão de Orientação Técnica/ SUCEN, 2001
Obs.: No município de Eldorado ocorreu 1 caso de malária autóctone em 2001 e outro em 2002

Tab. 3 Casos autóctones de malária, por ano e local provável de infecção. Região da Serra do Mar, 1990 a 2000* .

SR-2 SÃO VICENTE (CONTINUAÇÃO)									
	Mongaguá	Praia Grande	Peruibe	Pariquera Açu	Pedro de Toledo	Registro	São Vicente	Sete Barras	Indeterminado (Cubatão/Mongaguá)
1990	-	-	4	-	-	-	-	1	-
1991	-	-	4	-	1	-	-	-	-
1992	-	1	1	-	-	-	-	-	-
1993	-	-	4	2	-	-	7	2	-
1994	-	-	2	1	-	-	1	2	-
1995	-	-	1	-	-	-	2	4	-
1996	-	-	5	-	-	-	-	3	-
1997	-	-	5	-	-	-	-	1	-
1998	-	-	2	1	-	-	-	-	1
1999	2	-	-	-	-	-	-	4	-
2000	1	-	2	-	2	1	-	-	-

* Dados até julho/ 2000
Fonte – Divisão de Orientação Técnica/ SUCEN, 2001

Tab. 4 Casos autóctones de malária, por ano e local provável de infecção. Região da Serra do Mar, 1990 a 2000*.

SR-4 SOROCABA					
	Apiaí	Guapiara	Iporanga	Salto de Pirapora	Tapiraí
1990	2	-	-	1	-
1991	-	-	1	-	-
1992	-	-	-	-	-
1993	-	-	-	-	-
1994	-	-	2	-	1
1995	-	-	1	-	-
1996	-	-	2	-	-
1997	-	1	-	-	-
1998	-	-	5	-	-
1999	-	-	-	-	-
2000	-	-	3	-	2

Dados até julho/ 2000
Fonte – Divisão de Orientação Técnica/ SUCEN, 2001
Obs.: No município de Iporanga ocorreu um caso de malária autóctone em 2001

E, considerando, a prática contínua do ecoturismo no Parque Intervales e PETAR; a inserção destas áreas em Mata Atlântica, ecossistema propício à ocorrência de vetores da malária; o registro de casos humanos de malária autóctone nas áreas de estudo; são necessários estudos que possibilitem traçar o perfil soroepidemiológico e parasitológico das populações humanas que residem nas referidas áreas, assim como investigar a presença de plasmódios em populações anofélicas locais, cujos resultados poderão contribuir para traçar novas diretrizes para o Programa de Controle de Malária desempenhado pela Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN, a fim de procurar evitar um aumento do número de casos de malária autóctone nessas áreas ou até mesmo diminuí-los.

Desta forma, acredita-se, ser de fundamental importância a presente pesquisa, para verificar a possibilidade da ocorrência da malária humana assintomática nas áreas de estudo e saber mais sobre a presença de plasmódios em macacos do Estado de São Paulo tentando responder à hipótese de que os mesmos possam servir como reservatório da doença.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

- Pesquisar a presença de anticorpos específicos e infecção de malária na população das regiões do PETAR e Intervales;

- Pesquisar a presença de anticorpos específicos e infecção malárica em macacos provenientes da Grande São Paulo;

- Pesquisar a presença de plasmódios em anofelinos coletados no PETAR e Intervales e correlacionar os resultados obtidos nos testes sorológicos e/ou parasitológicos com as populações humanas, anofélicas e dos macacos, visando esclarecer os fatores relacionados com a transmissão local.

3.2. Objetivos Específicos

- Verificar a ocorrência de anticorpos anti-regiões repetitivas das proteínas circumsporozoíta de *P. malariae*/*P. brasilianum*; *P. vivax* "clássico", *P.vivax* VK247 e *P.vivax*-like humano/*P.simiovale* em soros de macacos e humanos;

- Detectar a ocorrência de infecção em humanos e nos macacos considerados no estudo;

- Ampliar a sensibilidade da detecção de eventuais infecções nas amostras de macacos e humanos e identificar a espécie de plasmódios;

- Detectar DNA de plasmódios em anofelinos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Delineamento experimental e aspectos éticos da pesquisa

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo-COEP em Sessão Ordinária realizada em 11/09/01, de acordo com os requisitos da Resolução CNS/196/96 sob o número 545 **(Anexo I).**

Inicialmente os participantes foram esclarecidos no que diz respeito aos objetivos, riscos e benefícios da pesquisa, assim como sobre os procedimentos aplicados para as coletas das amostras de sangue das populações locais e dos dados epidemiológicos. Neste estudo a participação dos indivíduos foi condicionada a seu consentimento informado e envolveu autorização dos pais ou responsáveis no caso de menores de idade.

Os resultados do exame parasitológico (método da gota espessa) foram rapidamente informados às populações envolvidas na pesquisa. Os resultados de PCR foram posteriormente encaminhados aos interessados.

4.2. Áreas de estudo

As áreas amostradas situam-se em meio à Mata Atlântica entre os paralelos 24° 16' – 24° 32' S, 48° 25' – 48° 42' W, em um domínio de transição entre floresta de Araucária submontana e floresta tropical submontana, com formações rochosas dotadas de grandes cavernas, região sul do Estado de São Paulo.

Núcleo Santana - Localizado no Vale do rio Betary, em área com vegetação primária, bem preservada. Neste núcleo encontram-se três cavernas: A caverna **Santana** de grande desenvolvimento, cerca de 6 Km, atravessada por um rio; muito ornamentada, sendo que praticamente não se vê matéria orgânica em seu solo, apenas minerais. A caverna **Morro Preto** (290 m abaixo do solo), de médio desenvolvimento com três pavimentos e ampla boca, localiza-se a meia encosta

do morro, cujo acesso se dá por uma trilha que termina em sua boca. Próximo ao início desta trilha está uma das bocas de uma outra caverna, a do **Couto**, também percorrida por um rio, que ao deixá-la, forma uma cachoeira, indo desaguar no rio Betary. Todas essas cavernas são muito próximas e bem freqüentadas por turistas.

O Bairro Serra localiza-se também no vale do rio Betary e às margens deste. Dista cerca de 4 Km do Núcleo Santana, apresenta cerca de 200 residências, localizadas em estreita faixa ao longo da estrada de terra que liga a cidade de Iporanga a Apiaí (Fig. 4). Tem a sua economia basicamente alicerçada em pensões e discreto comércio. Conta com um Posto de Saúde e escolas de pré e de 1º Grau. A vegetação ao longo da estrada encontra-se bastante modificada, mas preserva ainda elementos arbóreos primitivos.

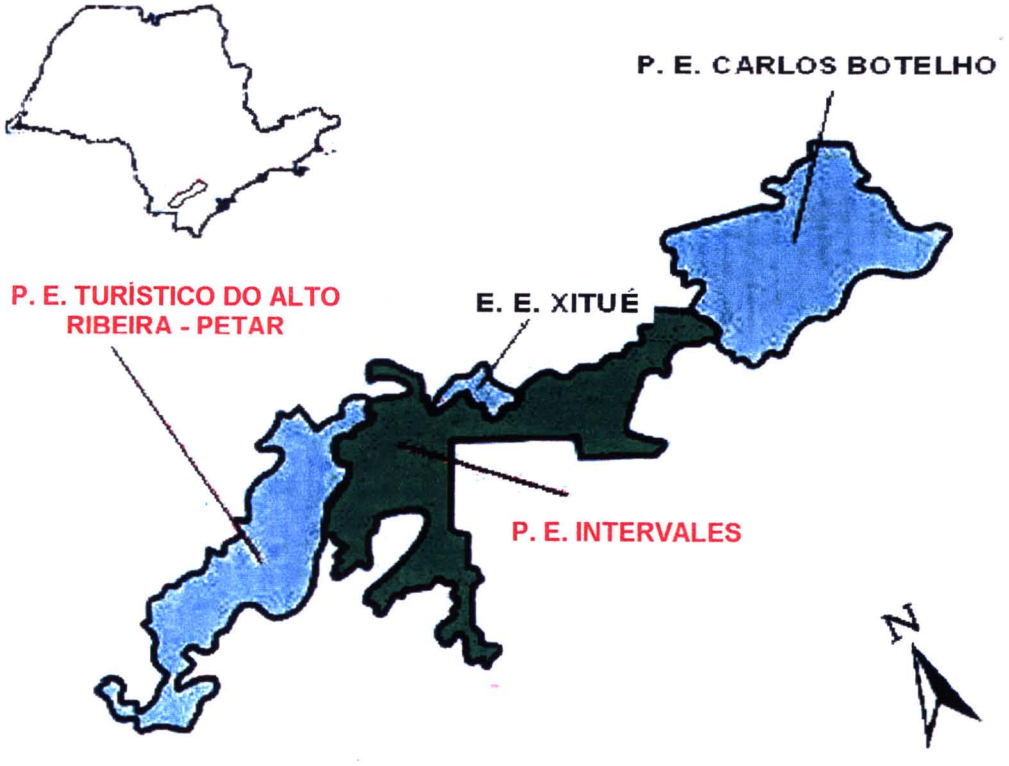
O setor paulista da Província Espeleológica do Vale do Ribeira localiza-se às margens do médio e alto curso do rio Ribeira, instalada no flanco sudeste da Serra de Paranapiacaba, apresentando relevo montanhoso e de amplitudes topográficas até 890 m acima do nível do mar, constituindo a Serraria do Ribeira (Gnaspini-Netto & Trajano, 1992; Karmann & Ferrari, 1999). Segundo Nimer (1977) o clima é subquente e superúmido, sem estação seca. As temperaturas médias anuais são amenas, sem grandes amplitudes térmicas, devido à proximidade com o oceano (Karmann & Ferrari, 1999). No Médio e Alto Ribeira, a vegetação, quando preservada, apresenta espécimens arbóreos de grande porte, 30-40 metros de altura. As epífitas, lianas, pteridófitas e briófitas são abundantes, assim como o palmito (*Euterpe edulis*), objeto de intensa ação predatória (Sánchez, 1984).

Com rica fauna, a floresta abriga animais em ameaça de extinção, resultante da caça predatória ou da destruição de hábitats naturais. Dentre os mamíferos destacam-se os primatas mono e bugio, o tatu-canastra, a lontra, a onça pintada e as aves: macuco, gavião penacho, papagaio de peito roxo, além de outros (Sánchez, 1984).

O Parque Estadual Intervales e o Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira (PETAR) são regiões declaradas como Reserva da Biosfera pela

UNESCO, devido à sua importante contribuição para a preservação dos recursos naturais e da diversidade biológica do planeta. A vasta região de Intervales forma o *continuum* ecológico de Paranapiacaba, juntamente com o Parque Estadual Carlos Botelho, Estação Ecológica de Xitué e PETAR. O Parque Estadual Intervales tem 49 mil hectares e situa-se em cinco municípios: Ribeirão Grande, Guapiara, Iporanga, Eldorado Paulista e Sete Barras (Figs. 2, 3 e 4) **(Boletim Informativo do Parque Estadual Intervales, Anexo II).**

Fig. 2 Localização do Parque Estadual Intervales e do Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira (PETAR) no Estado de São Paulo.

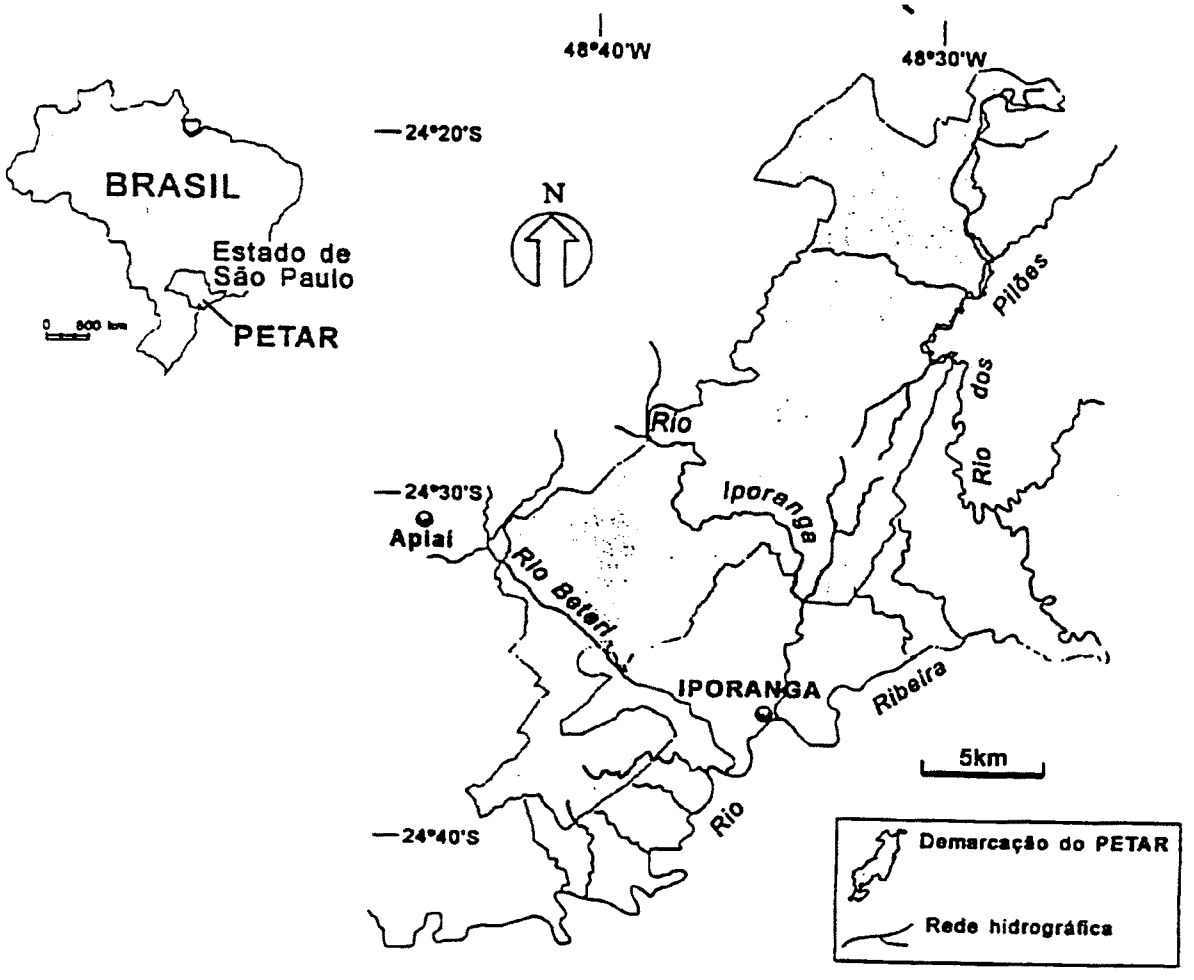


Fonte - Boletim informativo do Parque Estadual Intervales

Fig. 3 Vias de acesso ao Parque Estadual Intervales situado na região sul do Estado de São Paulo.

Fonte - Boletim informativo do Parque Estadual Intervales

Fig. 4 Localização do Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira (PETAR) no Estado de São Paulo e ampliação local.



Fonte – KARMANN, I. & FERRARI, J.A., 1999

As cavernas são um dos principais atrativos procurados por aqueles que visitam os Parques. Em sua maioria, concentram-se no PETAR, onde somam cerca de 200 cavernas, distribuídas em dois núcleos: do Espírito Santo ou dos Caboclos e do Vale do Rio Betary ou Santana, no qual se localiza a Caverna Santana, a de maior desenvolvimento planimétrico com 6300 metros (Karmann & Ferrari, 1999). O Bairro Serra localiza-se no Vale do Rio Betary e

dista 5 km da Caverna Santana, na estrada que liga o município de Iporanga ao de Apiaí.

No Parque Estadual Intervales e áreas adjacentes, foram descritas 42 cavernas, sendo a Caverna do Paiva a maior delas com 2880 metros (Gnaspini-Netto & Trajano, 1992). Os principais acessos às localidades de estudo, partindo-se de São Paulo, são através das Rodovias SP280 (Rodovia Castelo Branco) ou pela BR116 (Rodovia Regis Bittencourt).

Ambos os Parques são administrados, respectivamente, pela Fundação Florestal e Instituto Florestal, órgãos vinculados à Secretaria do Meio Ambiente do estado de São Paulo.

4.3. Coleta de dados e material biológico de humanos

De 09 a 14 de Janeiro de 2002 foi coletado sangue venoso em tubos "vacutainer" sem e com anticoagulante (EDTA) de 46,57% (163/350) dos moradores dos bairros Tanquinho, Monte Rosa e Boa Vista, situados ao lado do Parque Estadual Intervales (alguns dos moradores são funcionários do Parque) e de 44,28% (155/350) dos moradores do Bairro Serra, que localiza-se ao lado do PETAR (alguns moradores também são funcionários do Parque).

Foi solicitada uma autorização à Fundação Florestal para que realizássemos as coletas de sangue humano das pessoas que habitam o Parque Estadual Intervales. Nas duas localidades em estudo foi preenchida ficha de investigação epidemiológica e obtido termo de consentimento de cada indivíduo que teve sangue coletado **(Anexos III e IV)**.

No momento da coleta de sangue, foram confeccionadas lâminas com esfregaço e gota espessa de cada indivíduo participante do estudo, segundo metodologia preconizada pela OMS (Bruce-Chwatt, 1985), onde cada lâmina foi corada pelo método de Giemsa, sendo examinados 100 campos microscópicos de cada uma delas com objetiva de imersão (100x) e ocular (12,5x).

As amostras de sangue foram transportadas em gelo até as Sedes de Pesquisa de ambos os Parques, onde foram separados os soros (tubo seco) e as hemácias (tubo com EDTA).

As hemácias e os soros foram conservados em geladeira e congelador, respectivamente, sendo ambos, transportados em gelo até o Laboratório de Doenças Tropicais da Faculdade de Saúde Pública, onde os soros foram conservados à -70ºC. As amostras de soro foram glicerinadas volume a volume (v/v) e conjuntamente com as hemácias, foram conservadas em freezer a -20ºC.

4.4. Coleta de material biológico de macacos

Devido à grande dificuldade em se obter autorização junto ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA) para coleta de material biológico de macacos que habitam as áreas de estudo, visto a rigorosa legislação que protege esses animais (estando algumas espécies em extinção), acrescida à dificuldade de capturar macacos (que normalmente habitam as copas das árvores) segundo recomendações éticas, preservando sua integridade física, resolvemos solicitar tal material aos veterinários do Departamento de Parques e Áreas Verdes da Secretaria Municipal do Meio Ambiente/Prefeitura de São Paulo (DEPAVE), que concordaram em colaborar com nosso estudo.

A Divisão Veterinária de Animais Silvestres do DEPAVE eventualmente recebe macacos que foram acidentados e encaminhados para atendimento médico veterinário.

Assim sendo, foram feitas coletas de sangue venoso (pela veia femural) por meio de tubos "vacutainer" com e sem anticoagulante (EDTA), de macacos previamente anestesiados com Ketamina, de acordo com a recomendação ética do "Canadian Council on Animal Care" (1980/84).

Foi colhido sangue daqueles macacos cuja procedência é sabidamente do Estado de São Paulo (todas as amostras de sangue foram

colhidas de macacos capturados em municípios e bairros pertencentes à Grande São Paulo).

A confecção de lâminas de esfregaço e gota espessa de cada animal e a conservação do sangue e soro é a mesma do item 4.3.

Obtivemos 61 amostras de sangue, sendo 35 deles de macacos do gênero *Alouatta* (Bugio), 21 *Calithrix* (Sagui) e 5 *Cebus* (Macaco Prego). Desses sangues, 26 amostras foram colhidas de agosto a outubro de 1997; 5, janeiro a fevereiro de 1998; 8, junho a novembro de 1999; 5, abril a julho de 2000; 4, maio e junho de 2001 e 13, fevereiro a novembro de 2002.

4.5. Reações Sorológicas

4.5.1. Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI)

4.5.1.1. Obtenção de antígenos

Foram utilizados antígenos de *P. vivax* e *P. malariae* obtidos, respectivamente de pacientes primo-infectados e de macacos infectados experimentalmente.

As lâminas de *P. vivax* foram confeccionadas a partir de sangue de paciente com *P. vivax* cedido pelo Laboratório de Malária da Superintendência de Controle de Endemias – SUCEN e as de *P. malariae* foram fornecidas pelo Dr. Collins do "Centers for Disease Control" (CDC) – Atlanta, EUA.

No caso das lâminas com antígeno de *P. vivax*, o mesmo consistiu de uma suspensão de hemácias lavadas em PBS (Solução Tampão Fosfato), com parasitemia ideal, com predominância de formas trofozoítas maduros e esquizontes. Foram adicionados 10 µl desta suspensão sobre as áreas demarcadas de lâminas de vidro para imunofluorescência. Após secarem à temperatura ambiente, as mesmas foram embrulhadas e armazenadas a -70°C, até o momento do uso.

4.5.1.2. Descrição da Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI)

A reação foi realizada segundo Ferreira & Sanchez (1988), conforme padronização de Curado (1995), com os antígenos de *P. malariae* e *P. vivax* para pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG e conforme Duarte, 1998, para IFI, com soro de macacos.

Todos os soros humanos e alguns soros de macacos foram testados para pesquisa de anticorpos anti-*P. vivax*, com o antígeno homólogo. Para tanto, estes foram diluídos em PBS contendo tween 80 a 0,5% à razão 2. Estes soros foram testados, a partir da diluição inicial de 1/20 e 1/40, respectivamente para anticorpos tanto da classe IgM quanto da classe IgG. Em todos os testes realizados foram incluídas diluições dos soros padrão positivo e negativo. O título do soro foi considerado como sendo a recíproca da diluição máxima capaz de fornecer reatividade com o antígeno.

Uma alíquota de 10 µl de cada diluição do soro foi depositada em cada área delimitada das lâminas com antígeno, incubadas em câmara úmida por 30 minutos a 37°C, lavadas 2 vezes com PBS (10 minutos cada) e secas. Em seguida, as áreas foram recobertas com conjugado previamente titulado e diluído em solução de azul de Evans (1/1500 para IgM e 1/1000 para IgG com soros humanos e 1/200 com soros de macacos e antígeno de *P. vivax*), incubado em câmara úmida a 37°C por 30 minutos. As lâminas foram lavadas 2 vezes com PBS, para remoção do excesso de conjugado, secas e montadas em glicerina pH 9,5.

Foram utilizadas imunoglobulinas anti-IgM e anti-IgG humanas (cadeias µ e γ específicas – Biolab Diagnóstica S.A.) e anti- IgG de macaco (cadeias µ e γ específicas – Sigma) conjugadas ao isotiocianato de fluoresceína.

Para a pesquisa de anticorpos anti formas assexuadas de *P. vivax*, o limiar de reatividade utilizado foi de 1/20 e 1/40, respectivamente para anticorpos das classes IgM e IgG.

4.5.1.3. Reação de IFI com antígenos de formas assexuadas de *P. malariae*

Alguns soros de macacos foram testados com hemácias infectadas por *P. malariae* para pesquisa de anticorpos da classe IgG.

Não foi possível realizar o teste IFI para pesquisa de anticorpos da classe IgM devido à não comercialização de imunoglobulina anti-igM de macacos conjugada ao isotiocianato de fluoresceína,

Todos os soros humanos reagentes em IFI com antígeno de *P. vivax* e positivos na reação de ELISA com peptídeo de *P. malariae/P. brasilianum*, foram testados também na reação de IFI com o referido antígeno, para pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG.

A reação com antígeno de *P. malariae* foi realizada nos moldes do item 4.4.1.2 com os mesmos conjugados anti-IgM e IgG humanos utilizados para *P. vivax* ambos na diluição de 1/1000. O conjugado anti-IgG de macacos (Sigma 3893) foi utilizado na diluição de 1/40. Para a pesquisa de anticorpos anti formas assexuadas de *P. malariae*, o limiar de reatividade foi de 1/40.

4.5.2. Reação ELISA (Enzyme Linked-Immunosorbent Assay)

4.5.2.1. Peptídeos Sintéticos

Os peptídeos utilizados foram sintetizados comercialmente pela Genemed Biotechnologies, Inc., EUA.

Para detecção de anticorpos da classe IgG contra a região repetitiva específica da proteína circumsporozoíta (CSP) foram usados os seguintes peptídeos:

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

- **AS-30: *P. vivax "clássico"* (GDRADGQPA)2 (GDRAAGQPA)2 (GDRADGQPA):** peptídeo com 45 aminoácidos, com 9 aminoácidos repetitivos (Arnot *et al.*, 1985; McCutchan *et al.*, 1985);

- **AS-27: *P. vivax* VK 247 (ANGAQNQPG)4:** peptídeo com 36 aminoácidos, contendo 9 aminoácidos repetitivos (Rosenberg *et al.*, 1989);

- **PL-35: *P. vivax*-like humano (APGANQEGGAA)3:** peptídeo com 33 aminoácidos, contendo 11 aminoácidos repetitivos (Qari *et al.*, 1993).

4.5.2.2. Descrição da técnica de ELISA

A reação foi desenvolvida segundo Zavala *et al.* (1986) com algumas modificações (Curado, 1995; Curado *et al.*, 1997; Duarte, 1998).

Placas de poliestireno maxisorp/NUNC® foram sensibilizadas com 100 µl/cavidade dos peptídeos de *P. malariae/P. brasilanum, P. vivax* "clássico", *P. vivax* VK 247 e *P. vivax*-like humano à concentração de 10 ug/ml. Os peptídeos foram diluídos em PBS 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 6 lavagens com PBS 7,2 + Tween 20 à 0,05% (PBS-T), estas foram bloqueadas com PBS-T-leite à 5% por 2 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 à 1:50 (soros humanos) ou 1:10 (soros de macacos) em PBS-T-leite 2,5%, foram depositados no volume de 100 µl/cavidade da placa, permanecendo por 1 hora em câmara úmida à 37°C. Após 6 lavagens com PBS-T, procede-se à segunda incubação por 1 hora com soro anti-IgG humano conjugado com peroxidase (Sigma A-8419), diluído à 1/250 ou com soro anti-IgG de macaco *Rhesus* (Sigma A-2054), diluído à 1/1000 com o peptídeo de *P. malariae/P. brasilianum*, 1/2000, com os peptídeos de *P. vivax* VK247 e *P. vivax*-like humano e 1/3800 e 1/530, com os peptídeos de *P. vivax* "clássico" e *P. falciparum* (somente com soro de macacos), respectivamente em PBS-T-leite

2,5%. Novamente foram realizadas 6 lavagens seguidas de uma lavagem final somente com PBS 7,2. As reações foram reveladas adicionando-se 100 µl/cavidade da placa de substrato ABTS (Kirkegaard & Perry Laboratory, Maryland, EUA).

Após 30 minutos, as reações foram interrompidas por adição de 50 µl/cavidade de solução aquosa de SDS (dodecil sulfato de sódio) à 10%.

As absorbâncias (Abs) foram obtidas por leitura a 414 nm em leitor de ELISA (Multiskan® MCC/340 P).

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

Os soros humanos e de macacos utilizados como controles positivos e negativos para cada peptídeo foram testados anteriormente e, portanto apresentavam absorbâncias conhecidas (CURADO *et al.* 1997, DUARTE, 1998).

4.5.2.3. Determinação dos limiares de reatividade ("cut-off")

Para estabelecermos os limiares de reatividade ("cut-off"), testamos cada peptídeo com soros humanos e de macacos sabidamente negativos.

- **Soros controles negativos humanos:** 40 soros testados no Banco de Sangue do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de são Paulo (BS-HCFMUSP).

- **Soros controles negativos de macacos:** 40 soros negativos, sendo que 7 soros são de macacos nascidos em cativeiro do Centro Nacional de Primatas/Pará: 3 amostras de espécimes do gênero *Saimiri* (macaco-de-cheiro), 2 amostras de *Aotus* (macaco-da-noite e 2 amostras de *Cebus* (macaco-prego).
- O limiar de reatividade foi determinado a partir de soros obtidos da área de estudo, acrescentando-se às médias aritméticas das absorbâncias, 3 desvios-padrão.

4.6. Biologia Molecular

Todos os procedimentos de Biologia Molecular foram realizados em área reservada do laboratório, com materiais de consumo novos e estéreis e equipamentos específicos exclusivos para este fim.

4.6.1. Extração do DNA Genômico

DNA de 300 μl de cada amostra de sangue (humano ou de macaco) foi extraído utilizando-se o kit Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega-A-1125), segundo o protocolo do fabricante **(Anexo V)**.

As amostras de DNA foram ressuspendidas em 50 μl de água bidestilada estéril e armazenadas a 4° C até a sua utilização na técnica da Reação de Polimerização em Cadeia (PCR).

Para evidenciar possíveis contaminações, concomitantemente foram extraídos DNA de amostras de sangue humano não parasitado, que serviram como controles negativos para os ensaio de extração e para a reação de PCR.

4.6.2. Reação de Polimerização em Cadeia – PCR

Os oligonucleotídeos foram sintetizados comercialmente pela GIBCO® BRL (Invitrogen do Brasil).

Em uma triagem inicial, todas as amostras de DNA humano e de macacos foram testadas com os "primers" que amplificam uma seqüência gênero-específica da região 18S rRNA de plasmódios (OLIVEIRA *et al.* 1995):

ALBI01 – ATC AGC TTT TGA TGT TAG GGT ATT G

AL553 - TCC TAT TAA TCG TAA CTA AGC

As amostras que apresentaram resultado positivo com o marcador gênero específico, foram testadas então com os seguintes "primers":

- "Primers" que amplificam a seqüência completa do gene CS de *P. vivax* (QARI *et al.* 1993). Os produtos amplificados com este marcador podem ser hibridizados com sondas específicas para diferenciação das variantes: *P. vivax* "clássico" (VK210), *P. vivax* VK247 e *P. vivax* like-humano/*P.simiovale*

AL60 – GTC GGA ATT CAT GAA GAA CTT CAT TCT C

AL61 – CAG CGG ATC CTT AAT TGA ATA ATG CTA GG

- "Primers" que amplificam a seqüência completa do gene CS de *P. malariae/P. brasilianum* (cedido juntamente com protocolo da reação, pelo Dr. Shoukat Qari, da Divisão de Doenças Parasitárias do Centro de Controle de Doenças – CDC, Atlanta, Georgia, EUA.

AL62 – GTC GGA ATT CAT GAA GAA GTT ATC TGT CTT A

AL63 – CAG CGC ATC CTT AGT CAA AGA GTA TTA AGA C

- "Primers" que amplificam a região central do gene CS de *P. falciparum* (Ranjit & Sharma, 1999).

ALF1 – AGA GAT GGA AAT AAC GAA GAC AAC GAC

ALF2 – GTC ATT TGG CAT CAT TAA GTG ACC TTG TCC

4.6.2.1. Descrição da técnica

Utilizamos 5 μl de DNA de cada amostra acrescidos de 1 μl de cada "primer" (na concentração de 100 ng/μl suspendidos em água bidestilada estéril), 5 μl de Tampão de Reação da Taq polimerase (10x concentrado), 0,5 μl de dNTP mix (concentração final 20 mM), 0,5 μl de Taq Polimerase (concentração final 2,5 U) e 37 μl de água bi-destilada estéril, perfazendo 50 μl de volume final.

As amostras preparadas foram incubadas no Termo-Ciclador Genius (Techne).

Os ciclos utilizados foram os seguintes:

Para amplificação de fragmentos correspondentes à região gênero-específica 18S rRNA: 94°C/5' seguido de 35 ciclos; 94°C/1' (desnaturação), 42°C/ 50" (alinhamento) e 72°C/90" (extensão).

Para amplificação de fragmentos correspondentes à seqüência do gene CS de *P. malariae/P. brasilianum* e *P. vivax*: 94°C/5', seguido de 35 ciclos: 93°C/ 45" (desnaturação), 42°C/45" (alinhamento) e 72°C/2' minutos (extensão).

Para amplificação de fragmentos correspondentes à seqüência do gene CS de *P. falciparum:* 94°C/1' seguido de 35 ciclos (desnaturação), 58°C/1' (alinhamento) e 72°C/1' (extensão).

Em todas as reações, foram incluídos controles negativos: um tubo contendo uma amostra de DNA humano sem plasmódio e um tubo com todos os reagentes do PCR, menos DNA e controles positivos: DNA de plasmódios correspondentes a cada par de "primers" utilizado. Com isso, foi possível evitar possíveis contaminações e falhas no método.

4.6.2.2. Eletroforese em Gel de Agarose

Após a amplificação, a cada 10 μl de cada produto obtido foi adicionado 2 μl de tampão de amostra (Ficoll 400 15%, Azul de Bromofenol 0,25%, EDTA 5mM). O produto amplificado foi colocado em um gel de agarose 1,4%, imerso em tampão TBE (0,089M Trizma base, 0,089M ácido bórico, 0,5mM EDTA). A corrida eletroforética foi feita no mesmo tampão TBE, por 1 hora a 80 V (EPS 200 Power Supply PHARMACIA BIOTECH). Utilizamos 6 μl de DNA do 100 bp Ladder (1μg/μl) (GIBCO), como padrão de peso molecular (PM). O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 μg/ml) e o produto foi visualizado e fotodocumentado no Sistema Labworks (UVP).

4.6.2.3. Controles positivos e negativos utilizados na reação de PCR

Realizamos testes preliminares para verificarmos a validade do método de extração de DNA dos protocolos da reação com cada par de "primers", assim como o funcionamento de nosso termociclador com os respectivos ciclos de amplificação.

Após os testes preliminares, em todas as reações, foram incluídas amostras de DNA humano sem parasitas e um tubo com todos os reagentes menos DNA ("blank"), que nos serviram como controles negativos.

4.7. Estudo entomológico

As coletas de anofelinos foram realizadas nos Parques Intervales e PETAR mediante autorização prévia formal dos Diretores desses Parques e no Bairro Serra, vizinho ao PETAR.

4.7.1. Obtenção e identificação dos anofelinos

As capturas de anofelinos foram realizadas mensalmente, pelo período de um ano para identificação da diversidade de espécies, variação sazonal e nas fêmeas, infecção por plasmódios (PCR), em diferentes pontos dos Parques Intervales e PETAR (onde foram pesquisados cavernas e ecossistemas em seus arredores) e no Bairro Serra (em domicílios e peridomicílios).

Para as capturas, foram providenciadas licenças junto ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA) e também do Instituto Florestal e Fundação Florestal da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo.

Armadilhas luminosas do tipo CDC foram utilizadas (Sudia & Chamberlain, 1962) e Shannon (Shannon,1939) As coletas com armadilhas CDC foram feitas das 18:00 às 6:00 horas do dia seguinte (12 horas).

Nas capturas feitas com armadilha de Shannon foram utilizados aspiradores ligados à bateria de 6 volts e tubos de coleta de mosquitos. Estas

coletas foram realizadas das 18:00 às 22:00 horas (áreas florestais) e das 18:00 às 6:00 horas do dia seguinte (12 horas) no bairro Serra (peridomicílio).

Nas duas áreas de estudo, em período diurno e noturno, foram realizadas capturas com aspiradores movidos à bateria, dos anofelinos que se aproximaram de pessoas que estavam nos locais de coleta.

Em todas as capturas foram anotados os dados relativos às coletas, tais como: características do hábitat, tipo de armadilha empregada, horário das coletas, número de exemplares obtidos, proximidade dos sítios de captura com residências e/ou peridomicílios, coleções hídricas ou mata, coletas feitas dentro de cavernas, na entrada de cavernas e em diferentes extratos arbóreos.

4.7.2. Identificação e preservação dos anofelinos

Após as coletas, os anofelinos foram mortos em clorofórmio e armazenados em tubos "eppendorf" contendo álcool isopropílico, a fim de preservar o DNA para reação de PCR. A identificação taxonômica dos mesmos foi baseada em Forattini (1965a, b), Faran & Linthicum (1981), Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994) e em consultas à coleção entomológica da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo com o auxílio de técnicos do Laboratório de Entomologia da referida faculdade. A nomenclatura adotada segue Reinert, 1975.

4.7.3. Extração de DNA de anofelinos

A Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) de anofelinos foi feita com orientação da Dra. Rosely dos Santos Malafronte do Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo.

DNA de "pool" de até 10 anofelinos da mesma espécie/tubo, foi extraído conforme protocolo preconizado por Oskam *et al.* (1996) com pequenas modificações. Após o DNA ser extraído com o tampão de lise (NaCl 50 mM, EDTA 10 mM pH 8,0, Tris-HCl 50 mM pH 7,4, Triton X-100 1% e DTT 10 mM)

acrescido de 200 μg/ml de proteinase K, este foi precipitado com AcNa 3M e álcool absoluto.

O precipitado foi ressuspendido em 50 μl de T.E. (Tris-HCl 0,01 M e EDTA 1 mM pH 8,0).

4.7.3.1. PCR de mosquitos

Os oligonucleotídeos foram sintetizados comercialmente pela Invitrogen, Life Technologies do Brasil. Este protocolo baseia-se em duas reações seqüenciais onde a primeira emprega "primers" gênero-específico P1UP: 5' TCC ATT AAT CAA GAA CGA AAG TTA AG 3' e P2: 5' GAA CCC AAA GAC TTT GAT TTC TCA T 3', que amplificam um fragmento de aproximadamente 130 pares de base (pb) do gene que codifica o rRNA 18S do plasmódio.

Uma segunda reação é realizada com o "primer" gênero específico P1: 5' CAA TCT AAG AAT AAA CTC CGA AGA GAA A 3'; *P. falciparum* F2: 5' CAA TCT AAA AGT CAC CTC GAA AGA TG 3' e *P. malariae* M1: 5' GGA AGC TAT CTA AAA GAA ACA CTC ATA T 3'.

4.7.3.2. Descrição da técnica de PCR

O protocolo utilizado para o PCR foi desenvolvido por Kimura *et al.* (1997) e modificado por Win *et al.* (2002).

A primeira reação foi realizada em volume final de 20 μl contendo 0,8 μl de cada "primer" (10mM), 0,25 μl de dNTP (Amersham Pharmacia Biotech, 20 mM dNTP mix, diluído em água estéril v/v), 2 μl PCR buffer (Amersham Pharmacia Biotech, 10x), 0,16 μl de Taq DNA polymerase (Amersham Pharmacia Biotech, 5U/μl) e 5 μl de DNA extraído conforme protocolo acima descrito. Esta mistura foi incubada em termociclador descrito no item 4.6.2.1, em programa: 92°C/2' seguido de 35 ciclos: 92°C/30", 60°C/90" e 1 ciclo 60°C/5'.

O produto desta reação foi diluído 1:50 em água estéril e submetido à segunda reação com o "primer" gênero específico-específico P1 em combinação

com cada um dos "primers" reversos espécie-específicos para *P. vivax* V1, *P. falciparum* F2 e *P. malariae* M1. Esta reação foi realizada também em volume final de 20 µl contendo 2 µl de cada "primer" (10mM), 0,62 µl de dNTP (Amersham Pharmacia Biotech, 20 mM dNTP mix, diluído em água estérilv/v), 2 µl PCR buffer (Amersham Pharmacia Biotech, 10x), 0,16 µl de Taq polymerase (Amersham Pharmacia Biotech, 5U/µl) e 2 µl de DNA diluído. Esta mistura foi incubada em termociclador em programa: 92°C/2' seguido de 18 ciclos: 92°C/30", 60°C/60" e 1 ciclo 60°C/5'.

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE. Após a corrida, o gel foi corado em brometo de etídio e o produto com aproximadamente 100 pb foi visualizado e fotodocumentado em aparelho "eagle eye" da Stratagene.

5. Análises estatísticas

Foram utilizados testes de correlação de Pearson e teste t não paramétrico Mann-Whitney com o Programa Sigma Stat. Os gráficos e análises entre freqüências foram feitas pelo teste de X^2 em tabelas 2x2 pelo programa Prisma Graph Pad.

6. RESULTADOS

6.1. Dados epidemiológicos

A partir das fichas de investigação epidemiológica das populações de PETAR e Intervales (Anexo III), foram feitas análises quanto ao tempo de residência, ocupação, deslocamento e sintomatologia dos residentes nas duas áreas em estudo.

As freqüências de reações positivas, por meio da técnica de ELISA, segundo o tempo de residência no PETAR e em Intervales, são demonstradas na tabela 5.

Tab. 5 Freqüência (%) de reações positivas em ELISA com os peptídeos de Pvc, Pm/Pb, Pvk e Pvl em relação ao período de zero a 10 anos e de mais de 20 anos de residência nas localidades do PETAR e Intervales.

Pvc				Pm/Pb				Pvk				Pvl			
0-10 anos		>20 anos		0-10 anos		>20 anos		0-10 anos		>20 anos		0-10 anos		>20 anos	
I	P	I	P	I	P	I	P	I	P	I	P	I	P	I	P
11/24	1/31	30/85	10/77	7/24	5/31	17/85	27/77	6/24	3/31	22/85	17/77	7/24	8/31	21/85	28/77
45,8%	3,2%	35,2%	12,9%	29,2%	16,1%	20%	35%	25%	9,7%	25,8%	22,0%	29,2%	25,8%	24,7%	36,3%

I=Intervales P=PETAR

As freqüências de indivíduos do PETAR e Intervales que apresentaram ou não sintomas no momento de preenchimento das fichas de investigação e que responderam para os diferentes peptídeos utilizados em ELISA, são demonstradas nas tabelas 6 e 7.

Tab. 6 Freqüência (%) de indivíduos do PETAR segundo a sintomatologia com os peptídeos de Pvc, Pm/Pb, Pvk e Pvl em relação à idade de 0 a 10 anos e de 20 anos ou mais.

Pvc				Pm/Pb				Pvk				Pvl			
0-10 anos		>20 anos		0-10 anos		>20 anos		0-10 anos		>20 anos		0-10 anos		>20 anos	
S	N	S	N	S	N	S	N	S	N	S	N	S	N	S	N
0/31	1/31	4/77	6/77	4/31	1/31	11/77	16/77	2/31	1/31	3/77	14/77	5/31	3/31	9/77	19/77
0%	3,2%	5,2%	7,8%	13%	3,2%	14,3	20,8	6,4%	3,2%	3,8%	18.2%	16,1%	9,7	11.7%	24.7%

S (sim)=com sintomas N (não)=sem sintomas

Tab. 7 Freqüência (%) de indivíduos de Intervales segundo a sintomatologia com os peptídeos de Pvc, Pm/Pb, Pvk e Pvl em relação à idade de 0 a 10 anos e de 20 anos ou mais.

Pvc				Pm/Pb				Pvk				Pvl			
0-10 anos		>20 anos		0-10 anos		>20 anos		0-10 anos		>20 anos		0-10 anos		>20 anos	
S	N	S	N	S	N	S	N	S	N	S	N	S	N	S	N
9/24	2/24	25/85	5/85	6/24	2/24	14/85	3/85	4/24	2/24	17/85	5/85	5/24	1/24	15/85	5/85
37,5%	8,3%	29,4%	5,8%	25%	8,3%	16,5%	3,5%	16,6%	8,3%	20%	5,8%	20,8%	4,1%	17,6%	5,8%

S (sim)=com sintomas N (não)=sem sintomas

As freqüências de reações positivas e negativas, por meio da técnica de ELISA, com e sem deslocamento no PETAR e em Intervales, são demonstradas nas tabelas 8 e 9.

Tab. 8 Freqüência (%) de indivíduos do PETAR segundo o deslocamento e que responderam ou não com os peptídeos de Pvc, Pm/Pb, Pvk e Pvl .

Pvc				Pm/Pb				Pvk				Pvl			
SIM		NÃO		SIM		NÃO		SIM		NÃO		SIM		NÃO	
P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N
9/103	94/103	3/52	49/52	31/103	72/103	9/52	43/52	19/103	84/103	9/52	43/52	32/103	71/103	14/52	38/52
8,9%	91,3	5,7%	94,2%	30%	69,9%	17,3%	82,6%	18,4%	81,5%	17%	82%	31%	68,9%	26,9%	73%

sim=com deslocamento não=sem deslocamento P=positivo N=negativo

Tab. 9 Freqüência (%) de indivíduos de Intervales segundo o deslocamento e que responderam ou não com os peptídeos de Pvc, Pm/Pb, Pvk e Pvl .

Pvc				Pm/Pb				Pvk				Pvl			
SIM		NÃO		SIM		NÃO		SIM		NÃO		SIM		NÃO	
P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N
50/134	84/134	8/29	21/29	21/134	113/134	6/29	23/29	32/134	102/134	5/29	24/29	31/134	101/134	9/29	20/29
30,6%	69,3%	4,9%	12,8%	12,8%	69,3%	3,6%	14,1%	19,6%	62,5%	3,0%	14,7%	19%	61,9%	5,5%	12,3%

sim=com deslocamento não=sem deslocamento P=positivo N=negativo

Na tabela 10 são apresentadas as frequências de reações positivas na técnica de ELISA segundo a ocupação das populações do PETAR e Intervales.

Tab. 10 Freqüência de reações positivas em ELISA com os peptídeos de Pvc, Pm/Pb, Pvk e Pvl segundo a ocupação no PETAR e Intervales.

Pvc				Pm/Pb				Pvk				Pvl			
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
3/45*	4/18	0/17	1/10	9/45	8/18	5/17	2/10	6/45	6/18	5/17	1/10	8/45	8/18	8/17	3/10
6.6%	22,2%	0%	10,0%	20,0%	44,4%	29,5%	20,0%	13,3%	33,3%	29,5%	10,0%	17,7%	44,4%	47,0%	30,0%
9/38**	15/21	8/27	7/10	4/38	10/21	4/27	4/10	7/38	6/21	6/27	3/10	7/38	7/21	6/27	2/10
23.6%	71,4%	29,6%	70,0%	10,5%	47,6%	14,8%	40,0%	18,4%	28,5%	22,2%	30,0%	18,4%	33,3%	22,2%	20,0%

1=aposentados, do lar 2=monitor,guarda Parque, vigia florestal 3=servente, pedreiro,serralheiro
4=lavrador, vaqueiro *PETAR **Intervales

6.2. Reações sorológicas

6.2.1. Limiar de reatividade ("cut-off") para a reação de IFI

A determinação do limiar de reatividade ("cut-off") da reação de IFI para detecção de anticorpos anti-formas assexuadas das classes IgM e IgG de *P. vivax* foi feito segundo Curado *et al.* (1995), sendo que o mesmo foi expresso pela recíproca da diluição, resultando em 20 para IgM e 40 para IgG.

6.2.2. Limiar de reatividade ("cut-off") para a técnica de ELISA

Para uma melhor especificidade dos resultados da técnica de ELISA, os limiares de reatividade foram determinados acrescentando às médias aritméticas das absorbâncias dos soros negativos humanos e de macacos, 3 desvios-padrão, obtendo-se assim, os resultados dos cálculos demonstrados nas tabelas 8 e 9. Estes valores foram considerados em uma primeira discriminação dos soros positivos após os testes dos soros com os peptídeos Pvc, Pm/Pb, Pvk, Pvl e *P. falciparum* (Pf) para macacos.

Nas mesmas tabelas, também demonstra-se os resultados dos limiares de reatividade da área de estudo, calculados a partir das absorbâncias de 50 soros negativos da amostra humana e de 26 da amostra de macacos.

Optou-se por utilizar os valores obtidos neste segundo "cut-off", pois, consideramos a discriminação dos soros, estabelecida desta maneira, mais representativa e com menor possibilidade de ocorrência de falso-positivos. Assim sendo, os resultados retratam mais fielmente o perfil sorológico da população estudada face ao quadro epidemiológico da região.

Tab. 11 Determinação dos limiares de reatividade ("cut-off") das reações de ELISA com os 4 peptídeos usados com soros humanos. Soros do Hemocentro do HC-FMUSP (N=40) e soros negativos da área (N=70). Soro: 1:50, conjugado anti-IgG humano: 1:250. Resultados expressos em absorbância a 414 nm.

Soros	Hemocentro			Área de estudo		
Peptídeos [10 μg/ml]	Média Abs	D.P.	"Cut-off" M+3DP	Média Abs	D.P.	"Cut-off" M+3DP
*Pvc P	0,105	0,054	0,267	0,113	0,066	0,311
*Pvk P	0,129	0,038	0,243	0,153	0,059	0,330
*Pm/Pb P	0,040	0,020	0,100	0,047	0,028	0,131
*Pvl P	0,133	0,050	0,283	0,168	0,059	0,345
*Pvc I	0,105	0,054	0,267	0,157	0,059	0,334
*Pvk I	0,129	0,038	0,243	0,141	0,060	0,321
*Pm/Pb I	0,040	0,020	0,100	0,042	0,025	0,117
*Pvl I	0,133	0,050	0,283	0,203	0,050	0,353

*Pvc=*P. vivax* "clássico"
Pvk=*P. vivax* VK247
Pm/Pb=*P. malariae/P. brasilianum*
Pvl=*P. vivax* like-humano
I=Intervales
Abs= absorbâncias
DP=Desvio-Padrão

Tab. 12 Determinação dos limiares de reatividade ("cut-off") das reações de ELISA com 5 peptídeos. Soros de macacos de cativeiro (N=40) e soros negativos da área (N=26). Soro: 1:10, conjugado anti-IgG de macaco: 1:3000. Resultados expressos em absorbância a 414 nm.

Soros	Cativeiro			Área de estudo		
Peptídeos [10μg/ml]	Média Abs	D.P.	"Cut-off" M+3DP	Média DO	D.P.	"Cut-off" M+3DP
*Pm/Pb	0,066	0,042	0,192	0,046	0,045	0,181
*Pvc	0,062	0,018	0,116	0,073	0,035	0,210
*Pvk	0,092	0,048	0,236	0,111	0,054	0,273
*Pvl	0,150	0,039	0,267	0,135	0,049	0,282
*Pf	0,085	0,043	0,214	0,079	0,054	0,241

* Pm/Pb= *P.malariae/P.brasilianum* Pf=*P.falciparum*
Pv c= *P.vivax* "clássico"
Pv k=*P.vivax* VK247
Pvl =*P.vivax*-like humano
DP=Desvio-Padrão
Abs=absorbâncias

6.2.3. Sorologia das populações humanas

Os resultados obtidos na técnica de ELISA com soros das localidades de PETAR e Intervales estão apresentados nas figuras 5 e 6.

Adotou-se como limiar de reatividade em todos os resultados obtidos a partir da técnica de ELISA, a média das absorbâncias de soros negativos acrescida de 3 desvios padrão (DP).

Na figura 5, apresenta-se a distribuição das absorbâncias de soros positivos e negativos, no PETAR, quanto à presença de anticorpos anti-CSP com peptídeos de Pvc, Pm/Pb, Pvk e Pvl . Na comparação das absorbâncias obtidas com os peptídeos de Pvc e Pm, não houve diferença estatisticamente significante entre eles. Entre os demais peptídeos a diferença estatística é altamente significante ($p<0,0001$).

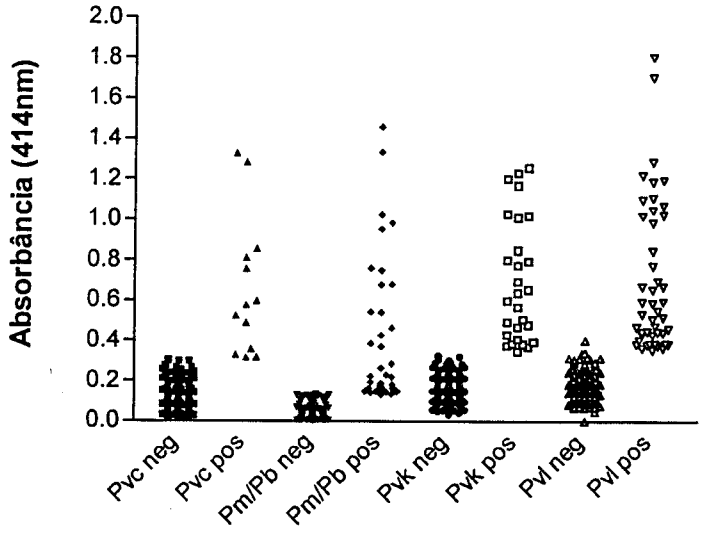


Fig.5 Distribuição das absorbâncias a 414 nm, obtidas em ELISA com soros positivos e negativos da população do PETAR, para cada peptídeo correspondente ao *P.vivax* (Pvc), *P.malariae/P.brasilianum* (Pm/Pb), *P.vivax* VK 247(Pvk) e *P.vivax* like (Pvl). Cada ponto representa um soro.
Limiar de positividade: Pvc=0,311; Pm/Pb=0,131; Pvk=0,330 e Pvl=0,345.
As absorbâncias para os peptídeos PvcXPm não foi estatísticamente significante. Para os demais peptídeos, as absorbâncias foram significantes com p<0,0001.

A distribuição das absorbâncias de soros positivos e negativos, em Intervales, quanto à presença de anticorpos anti-CSP com peptídeos de Pvc, Pm/Pb, Pvk e Pvl esta expressa na figura 6. Não houve diferença estatisticamente significante entre as absorbâncias obtidas com os peptídeos de Pvc e Pvl,. Aquelas obtidas com os peptídeos de Pvk e Pvl resultaram em diferença estatisticamente significante (p=0,0165). Para os demais peptídeos, ocorre diferença estatística significante (p<0,0001).

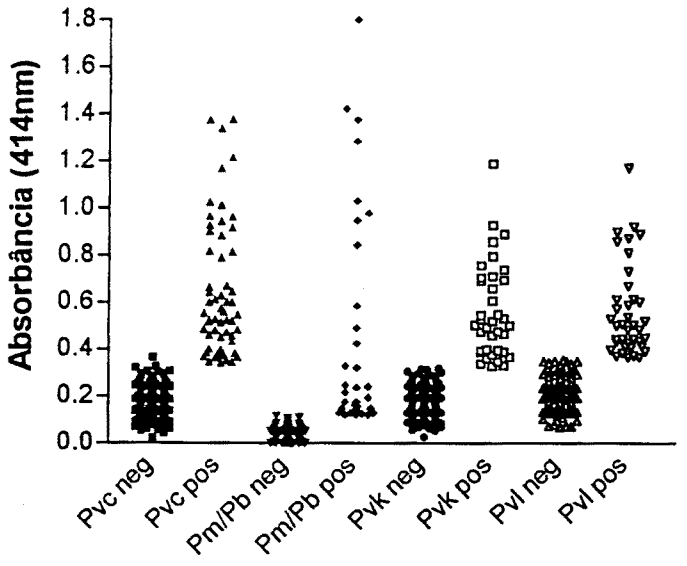


Fig.6 Distribuição das absorbâncias a 414 nm, obtidas em ELISA com soros positivos e negativos da população de Intervales, para peptídeos correspondentes ao *P.vivax* (Pvc), *P.malariae/P.brasilianum* (Pm/Pb), *P.vivax* VK 247(Pvk) e *P.vivax* like (Pvl). Cada ponto representa um soro. Limiar de reatividade: Pvc=0,334; Pm/Pb=0,117; Pvk=0,321 e Pvl=0,353. As absorbâncias para os peptídeos PvcXPvl não foram estatísticamente significantes. Para os peptídeos PvkXPvl houve significância com p=0,0165. Para os demais peptídeos, as absorbâncias foram significantes com p<0,0001.

Em ambas as localidades, alguns soros reagiram positivamente para mais de um peptídeo.

No PETAR, 14,83% (23/155), 5,81% (9/155) e 1,29% (2/155) dos soros reagiram com 2, 3 ou 4 peptídeos, enquanto 51,61% (80/155) foram positivos com pelo menos um peptídeo e 48,38% (75/155) não reagiram com nenhum peptídeo.

Em Intervales, 15,95% (26/163), 11,04% (18/163) e 3,68% (6/163) dos soros reagiram com 2, 3 ou 4 peptídeos, enquanto 53,37% (87/163) foram positivos com pelo menos um peptídeo e 46,62% (76/163) dos soros não reagiram com nenhum dos peptídeos.

Na figura 7, apresenta-se a freqüência de anticorpos, da classe IgG, anti-formas assexuadas de *P. vivax* e *P. malariae*. A prevalência de reações positivas em IFI no PETAR e Intervales com antígeno de *P. vivax* foi de 49% (76/155) e 32% (52/163), respectivamente, enquanto que a prevalência dessas mesmas

reações no PETAR e Intervales com antígeno de *P. malariae* foi de 19% (30/155) e 16% (26/163), respectivamente. Entre as duas localidades, há diferença significante quanto à presença de anticorpos da classe IgG, anti-formas assexuadas de *P. vivax* (p=0,0079).

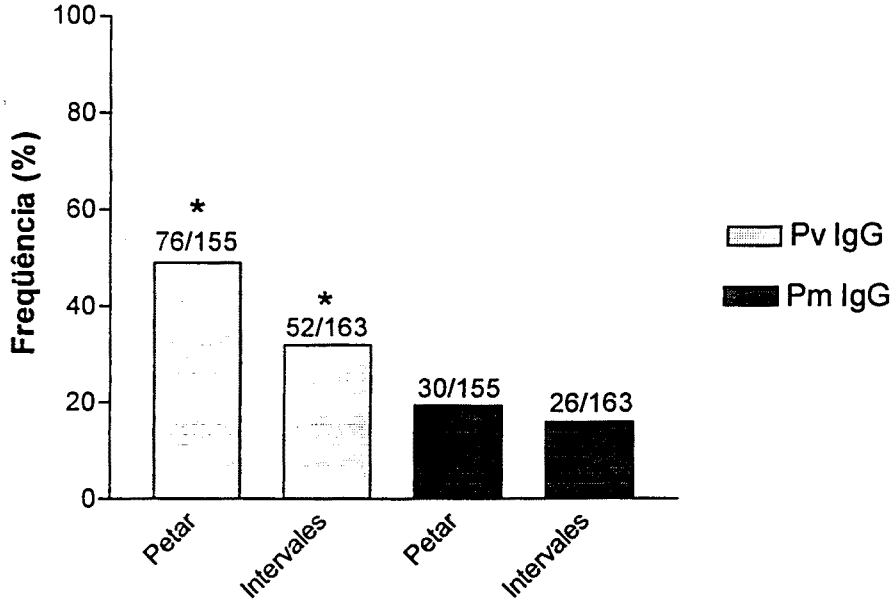


Fig.7 Freqüência (%) de anticorpos da classe IgG, anti formas assexuadas de *P.vivax* e *P.malariae* determinada por IFI, nos soros das populações de PETAR e Intervales. Os dados sobre as colunas representam o número de soros positivos/total. Limiar de positividade para detecção de anticorpos anti-IgG:1/40.

*= estatísticamente significante, p=0,0079.

Na figura 8, pode-se observar as médias geométricas dos títulos (MGT) dos soros positivos, obtidas em IFI, nas duas localidades em estudo. Com o antígeno de *P. vivax*, no PETAR e Intervales, as MGT foram de 823,5 e 255, respectivamente. Com o antígeno de *P. malariae*, as MGT foram de 686 para o PETAR e 1091 para Intervales.

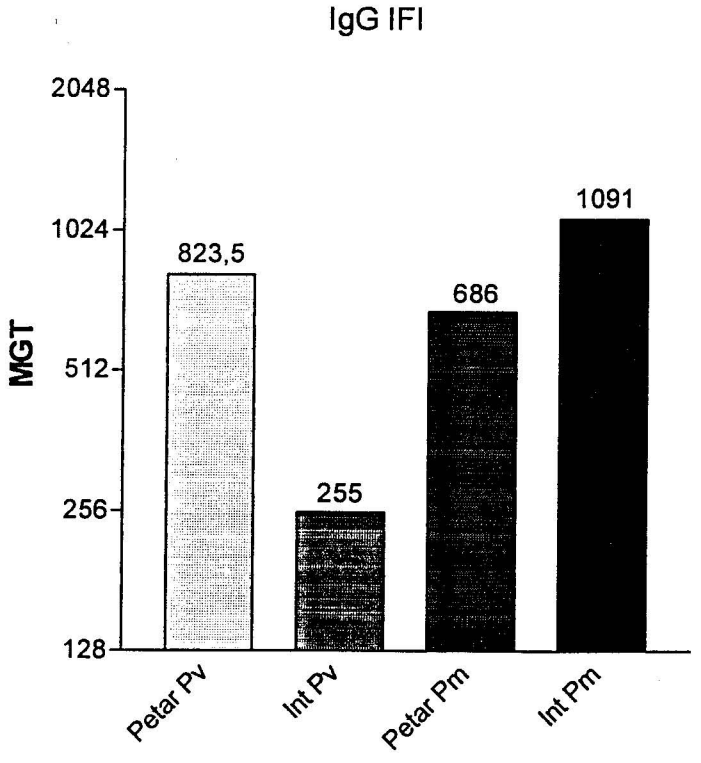


Fig.8 Média Geométrica dos Títulos (MGT) de anticorpos da classe IgG, anti formas assexuadas de *P.vivax e P.malariae*, obtida em IFI com soros positivos das populações de PETAR e Intervales. Os números sobre as colunas representam as respectivas MGT.

Na tabela 13, estão apresentados os resultados, obtidos em IFI, dos títulos de anticorpos da classe IgM contra formas assexuadas de *P. vivax* e *P. malariae.* Foram utilizados todos os soros positivos na técnica de ELISA com Pm/Pb.

localidade soro nº	IFI *P. vivax* título*	IFI *P. malariae* título*
P 04	0	80
P 12	0	80
P 18	0	80
P 20	0	80
P 21	0	80
P 32	80	0
P 34	80	0
P 44	0	160
P 91	0	1280
P 110	0	80
P 115	0	80
P 125	0	80
P 146	80	0
P 148	0	160
P 156	0	640
I 01	0	80
I 11	0	640
I 13	0	1280
I 42	0	80
I 65	0	1280
I 68	0	80

Tab. 13 Reações de IFI com antígeno de formas assexuadas de *P. vivax* e *P. malariae* para detecção de anticorpos da classe IgM nas localidades de PETAR e Intervales.
* Limiar de reatividade com antígeno de *P. vivax* e *P. malariae*: 1/20
negativo=0 (zero)

6.2.4. Sorologia de macacos

Devido à pequena quantidade de soro de macacos obtida da totalidade das 61 amostras que nos foram doados pelo DEPAVE, foi possível realizar reações de IFI e ELISA com somente 34 e 39 deles, respectivamente. Destes soros, 5

pertencem a macacos do gênero *Cebus* (macaco prego) e os demais ao *Alouatta* (bugio).

Os resultados obtidos na técnica de ELISA com soros de macacos do DEPAVE estão demonstrados na figura 9, onde, se pode observar a distribuição das absorbâncias de soros positivos e negativos quanto à presença de anticorpos anti-CSP com peptídeos de Pvc, Pvk, Pvl, Pm/Pb e Pf. Quando confrontadas as absorbâncias obtidas com os peptídeos de Pvk e Pm/Pb e entre os peptídeos de Pvc, Pvl e Pf, ocorreu diferença estatística altamente significante entre eles (p<0,0001).

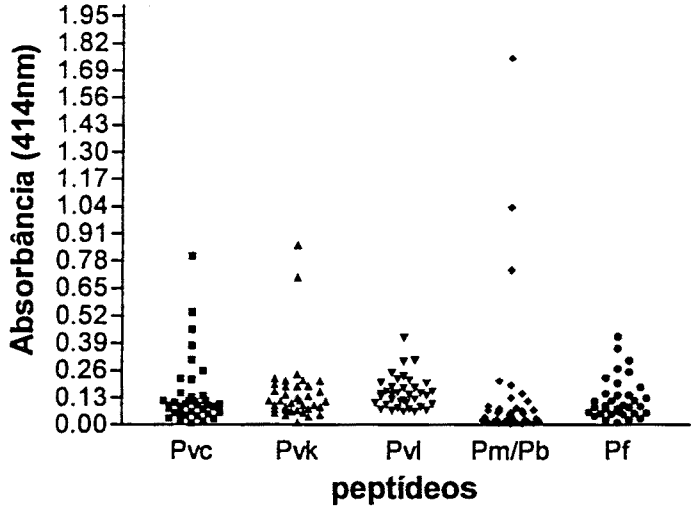


Fig.9 Distribuição das absorbâncias a 414 nm, obtidas em ELISA com soros de macacos capturados na grande São Paulo, para cada peptídeo correspondente ao *P.vivax* (Pvc), *P.malariae/P.brasilianum* (Pm/Pb), *P.vivax* VK 247(Pvk), *P.vivax* like (Pvl) e *P.falciparum* (Pf). Cada ponto representa um soro.
Limiar de positividade: Pvc=0,148; Pm/Pb=0,223; Pvk=0,244; Pvl=0,251 e Pf= 0,261. Houve diferença altamente significante entre os diferentes peptídeos analisados (p<0,0001).

A freqüência de anticorpos, da classe IgG, em soros de macacos do DEPAVE, anti-formas assexuadas de *P. vivax* e *P. malariae* estão apresentadas na figura 10. A prevalência de reações positivas em IFI com antígeno de *P. vivax* e de *P. malariae* foi de 44,12% (15/34) e 26,47% (09/34), respectivamente.

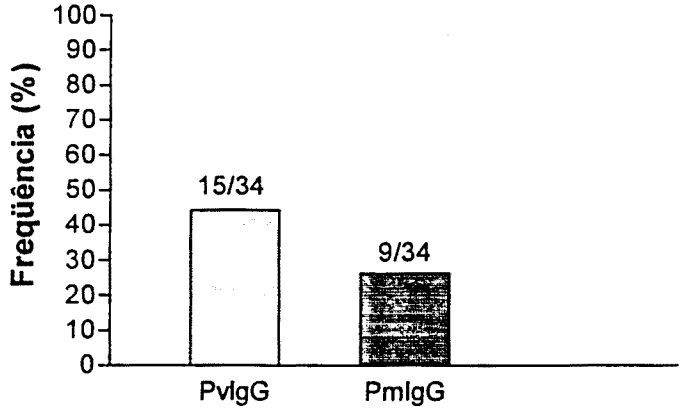


Fig. 10 Freqüência (%) de anticorpos da classe IgG, anti-formas assexuadas de *P.vivax* e *P.malariae* determinada por IFI, nos soros de macacos capturados na Grande São Paulo. Os dados sobre as colunas representam o número de soros positivos/total. Limiar de reatividade para detecção de anticorpos anti-IgG: 1/40.

Devido à não comercialização de conjugado anti-monkey marcado com fluoresceína da classe IgM, não foi possível realizar a reação de IFI para pesquisa de anticorpos anti-formas assexuadas de *P. vivax* e *P. malariae*.

6.2.5. Avaliação da especificidade da reação de IFI com soros humanos

A elevada prevalência de reações positivas em IFI com antígeno de *P. vivax*, em ambas localidades: PETAR (49%; 76/155) e Intervales (32%; 52/163), sugeriu a possibilidade de haver reação cruzada com algum outro antígeno que pudesse estar presente nestas áreas. Como a localidade do PETAR é foco de leishmaniose tegumentar e apresenta grande quantidade de exemplares de flebotomíneos, vetores dessa parasitose (comunicação pessoal com a Profa. Dra. Eunice Galati), foi feita a investigação sobre a ocorrência de anticorpos contra infecção por leishmanias nas amostras positivas por nós coletadas. Para tanto, alíquotas destas amostras foram enviadas à Dra. Beatriz J. Celeste do Instituto de

Medicina Tropical de São Paulo, que analisou, por meio da técnica de ELISA com antígeno de *Leishmania* major-like (antígeno não purificado que detecta anticorpos para as formas de leishmaniose tegumentar e visceral) a possibilidade de se encontrar anticorpos da classe IgG contra leishmaniose. Não houve reação cruzada, na técnica de ELISA para leishmaniose, com nenhum dos soros testados em IFI para malária.

6.3. Testes parasitológicos

6.3.1. Esfregaço e gota espessa das populações humanas e de macacos

Foram investigadas 318 lâminas das populações do PETAR e Intervales tanto em esfregaço, quanto em gota espessa. Todas foram negativas quanto à presença de plasmódios.

Das 61 lâminas de macacos apreendidos pelo DEPAVE, contendo esfregaço e gota espessa, detectou-se, em duas delas, a presença de 2 trofozoítas com morfologia semelhante ao *P. vivax*. Estas lâminas foram cuidadosamente analisadas por técnicas do laboratório de malária da SUCEN. Tentou-se documentar as imagens do parasita na lâmina, mas, infelizmente, tais imagens não ficaram nítidas o suficiente para apresentar neste trabalho.

6.3.2. Reação de PCR

6.3.2.1. Controles da reação de PCR

Na figura 11, estão demonstrados os produtos das amplificações com os "primers" 18S rRNA gênero-específico, de 6 amostras de DNA de plasmódio, obtidos de sangue: 2 *P. vivax* (pacientes), 2 *P. falciparum* (cultura), 1 *P. chabaudi* e 1 *P. berghei* (plasmódios de roedores).

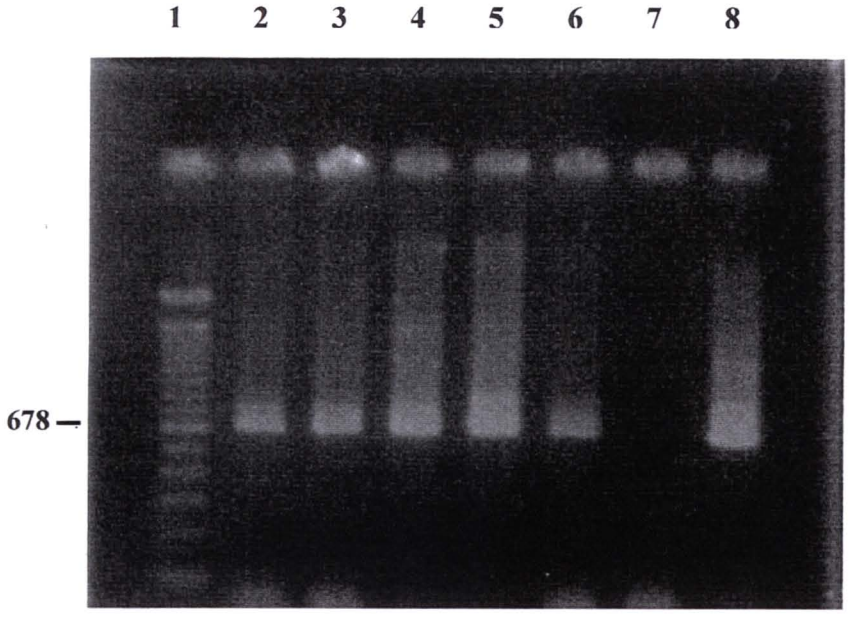


Fig. 11 Eletroforese em gel de agarose 1,4%. Produtos de PCR amplificados com "primers" correspondentes à região 18S de rRNA gênero específica de plasmódio (678 pb). 1 - Padrão de peso molecular (100pb DNA ladder, GIBCO); 2, 3 - *P. vivax* (amostras de pacientes), 4, 5 - *P. falciparum* (amostras de culturas), 6 – *P. berghei* (amostra de sangue de roedor) 7 – "blank" da reação (tubo sem DNA), 8 – *P. chabaudi* (amostra de sangue de roedor).

Na figura 12, pode-se observar 5 amostras de DNA de pacientes infectados, amplificadas com os "primers" de *P. falciparum* correspondentes à porção central do gene CS de *P. falciparum.* O fragmento amplificado possui tamanho de aproximadamente 685 pares de base (pb).

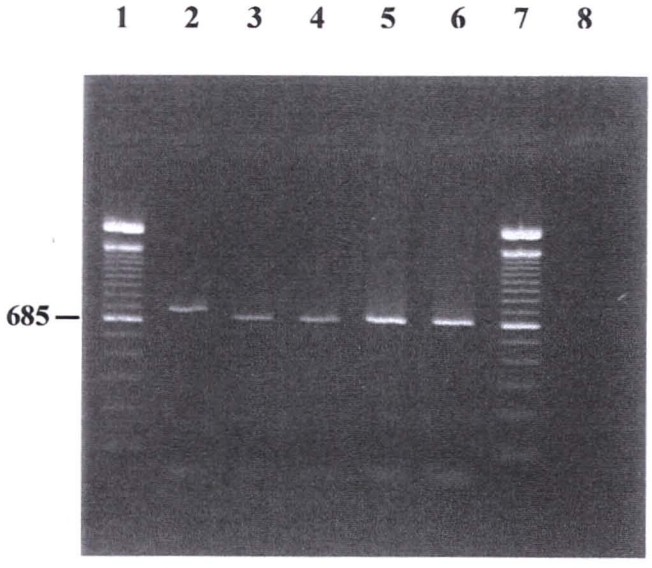


Fig. 12 Eletroforese em gel de agarose 1,4%. Produtos de PCR amplificados com "primers" correspondentes a porção central do gene CS de *P. falciparum* (685 pb).1 e 7 - Padrão de peso molecular (100pb DNA ladder, GIBCO); 2,3 e 4 – *P. falciparum* - amostras de pacientes de área endêmica com parasitemias medianas; 5 e 6 – *P. falciparum* – amostras de pacientes graves, com alta parasitemia.

Amostras de DNA de pacientes infectados com *P. vivax* amplificadas com os "primers" que correspondem ao gene CS de *P.vivax e P. malariae*, (fragmentos amplificados com aproximadamente 1200 pares de base) são apresentadas na figura 13.

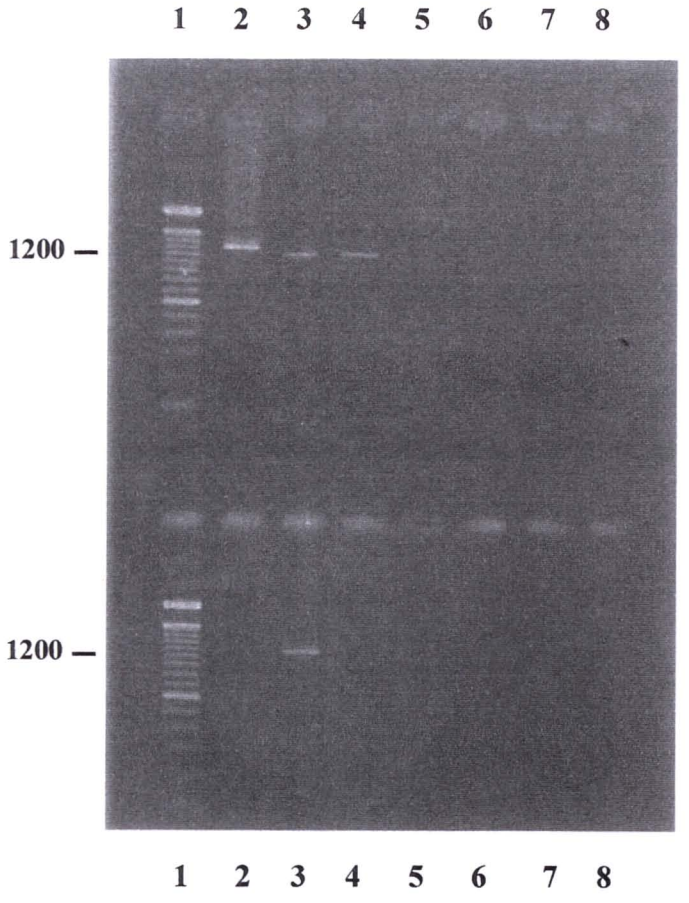


Fig.13 Eletroforese em gel de agarose 1,4%. Produtos de PCR amplificados com "primers" correspondentes a porção terminal do gene CS de *P. vivax*.
Parte superior: 1 - Padrão de peso molecular (100pb DNA ladder , GIBCO); 2, 3 e 4 – *P. vivax* - amostras de pacientes de área endêmica. 2: primo-infectado com até 200 parasitas/campo; 3 e 4: pacientes com até 20 parasitas/campo.
Parte inferior: 1 – Padrão de peso molecular, 2 – amostra de DNA humano não infectado (controle negativo) e 3 – *P. malariae* (amostra de sangue de macaco infectado experimentalmente)

6.3.2.2. PCR de amostras humanas de PETAR e Intervales

A análise por PCR foi realizada com amostras de sangue de todos os moradores de PETAR e Intervales que foram positivos com pelo menos um dos peptídeos testados na técnica ELISA e/ou na reação de IFI com antígenos de *P. vivax* e *P. malariae*. Além disso, também foram submetidos ao PCR, 10% das amostras que foram negativas em ambas reações sorológicas utilizadas.

Devido ao fato, de todas os PCR serem negativas tanto com a utilização de "primers" 18S rRNA gênero-específico quanto com "primers" de *P. falciparum*, *P.*

vivax e *P. malariae* correspondentes à porção central do gene CS, foi solicitado à Dra. Karin Kirchgatter, Laboratório de malária da SUCEN, que realizasse PCR pelas técnicas de Snounou *et al.* (1993) e Kimura *et al.* (1997) de todas as amostras de sangue do PETAR e Intervales que foram positivas na reação de IFI para presença de anticorpos anti-formas assexuadas da classe IgM de *P. vivax* e *P. malariae* (tabela 13).

Na figura 14, pode-se verificar o produto de PCR amplificado com "primers" espécie-específicos correspondentes ao *P. malariae* com sangue de morador de Intervales (I 11) em ambos os protocolos utilizados.

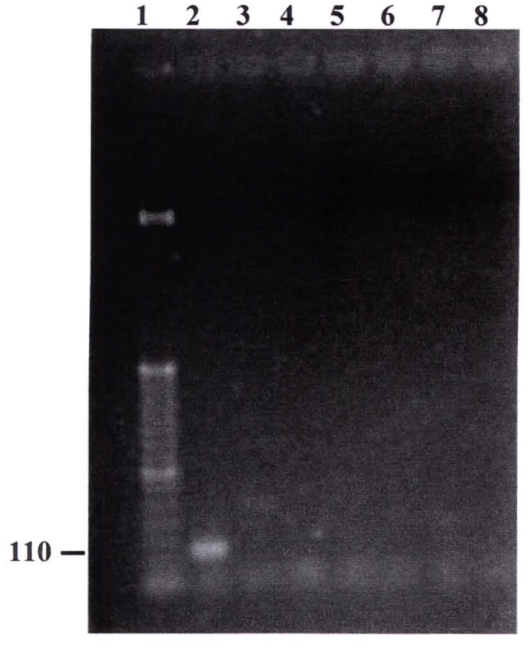


Fig. 14 Eletroforese em gel de agarose 1,5%. Produto de PCR amplificado com "primers" espécie-específicos, correspondentes ao *Plasmodium malariae* (aprox.110pb). 1 - Padrão de peso molecular (50pb DNA ladder, FERMENTAS); 2 – *P. malariae* (amostra I11, residente em Intervales).

O produto de PCR amplificado com "primers" espécie-específicos, correspondentes ao *P. falciparum* com sangue de moradores de Intervales (I1 e I13) e PETAR (P146, P125, P156 e P148), segundo protocolo preconizado por Kimura *et al.* (1997), encontra-se na figura 15.

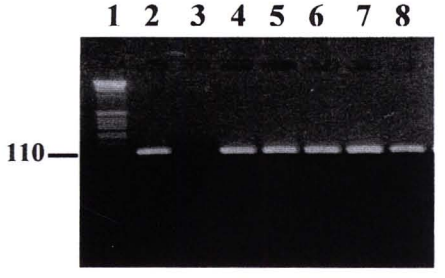


Fig. 15 Eletroforese em gel de agarose 1% Produto de PCR amplificado com "primers" espécie-específicos, correspondentes ao *Plasmodium falciparum*. 1 – Padrão de peso molecular (1Kb DNA ladder, GIBCO), 2 e 4– *P.falciparum* (amostras I1 e I13, residentes em Intervales); 5, 6, 7 e 8 – *P.falciparum* (amostras P146, P125, P156 e P148, residentes no PETAR).

Na figura 16, verificamos o produto de PCR amplificado com "primers" espécie-específicos, correspondentes ao *P. vivax* com sangue de moradores do PETAR (P125, P146, P148) segundo protocolo preconizado por Kimura *et al.* (1997).

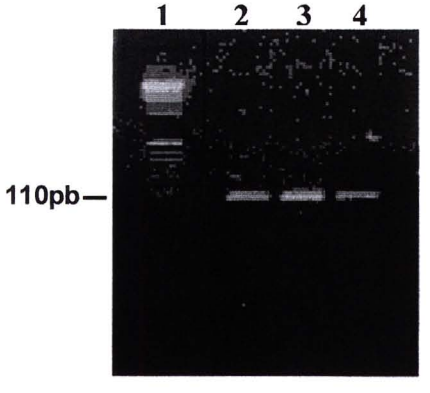


Fig. 16 Eletroforese em gel de agarose 1%. Produto de PCR amplificado com "primers" espécie-específicos, correspondentes ao *Plasmodium vivax*. 1– Padrão de peso molecular (1Kb DNA ladder, GIBCO), 2, 3 e 4– *P.vivax* (amostras P125, P146 e P148, residentes no PETAR).

6.3.2.3. PCR de amostras de macacos

As 61 amostras de sangue de macacos foram submetidas à PCR com "primers" 18S rRNA gênero-específico e quando positivos neste, foram testadas com "primers" de *P. falciparum, P. vivax* e *P. malariae* correspondentes à porção central do gene CS.

Na figura 17, verifica-se o produto de PCR amplificado com "primers" correspondentes ao gene 18S rRNA gênero-específico de 2 macacos do DEPAVE (98, 102).

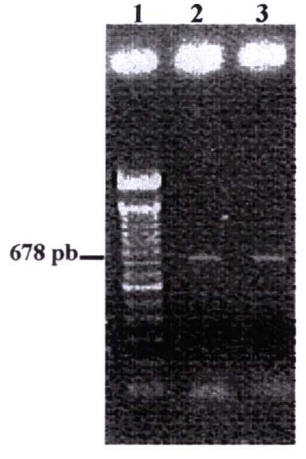


Fig. 17 Eletroforese em gel de agarose 1,4%. Produto de PCR amplificado com "primers" correspondentes ao gene 18S rRNA gênero-específico. 1 - Padrão de peso molecular (100pb DNA ladder, GIBCO); 2 e 3– amostras extraídas de sangue de *Alouatta* amplificadas para gênero *plasmodium* (678pb), 2- amostra 98, 3- amostra 102.

Pode-se verificar na figura 18, o produto de PCR amplificado com "primers" correspondentes ao gene 18S rRNA gênero-específico de macaco do DEPAVE (65).

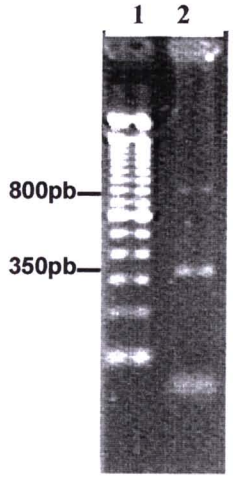


Fig. 18 Eletroforese em gel de agarose 1,4%. Produto de PCR amplificado com "primers" correspondentes ao gene 18S rRNA gênero-específico. 1- Padrão de peso molecular (100 pb DNA ladder, GIBCO); 2– amostra 65, extraída de sangue de macaco *Cebus* amplificada para gênero *plasmodium* demonstrando duas bandas (350 e 800pb).

6.3.2.4. PCR de anofelinos

Os anofelinos foram coletados mensalmente, pelo período de um ano, tanto no PETAR quanto em Intervales, conforme descrito no item 4.7.1. de Materiais e Métodos.

Foram capturadas, no PETAR, um total de 1002 anofelinos fêmeas e sua distribuição mensal entre abril de 2001 e abril de 2002, está demonstrada na Tabela 14.

Tab. 14 - Distribuição mensal do número de fêmeas de anofelinos por espécies coletadas no PETAR, SP, abril de 2001 a abril de 2002, com armadilha de Shannon e automática luminosa. As abreviações dos nomes genéricos dos anofelinos seguiram Reinert (1975) *. Houve 85 anofelinos que não puderam ser identificados.

Espécies de anofelinos	abr/01	mai/01	jun/01	jul/01	ago/01	set/01	out/01	nov/01	dez/01	jan/02	Fev/02	Mar/02	Abr/02	Total (%)
**An.(Ker.) cruzii*	135	13	8	35	31	16	17	14	100	45	131	49	200	794 79,2
**An.(Nys.) strodei*	1	-	-	-	5	-	1	12	7	-	-	1	-	27 2,7
**An.(Ano.) fluminensis*	-	4	-	-	5	2	-	8	1	-	1	1	5	27 2,7
**An.(Nys.) lutzii*	-	-	-	2	7	-	1	1	7	-	1	-	3	22 2,3
**An.(Ker.) homunculus*	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	31	-	35	68 6,7
**An.(Nys.) galvaoi*	-	-	-	6	2	4	1	6	3	-	5	1	3	31 3,1
**An.(Nys.) evansae*	-	-	-	8	4	-	-	5	2	-	-	1	-	20 2,0
**An.(Nys.) triannulatus*	-	-	-	-	-	1	-	1	1	-	-	-	-	3 0,3
**An.(Ano.) intermedius*	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	5	1	2	10 1,0

Em Intervales, foram coletados apenas 179 fêmeas de anofelinos, no período de um ano. Destas, 135 exemplares pertencem a *An. (Ker.) cruzii*, 1 a *An. (Ker.) homunculus*, 3 a *(An.) fluminensis*, 9 a *An. (Nys.) strodei*, 5 a *An. (Nys.) lutzii*, 19 a *An. (Nys.) galvaoi*, 6 a *An. (Ano.) intermedius* e 1 a *An. (Nys.) triannulatus*.

A determinação de infecção, por espécies de *plasmodium*, de anofelinos capturados nas duas localidades, por meio do PCR com "primers" gênero-específico e espécie-específico, conforme item 4.7.3.1. de Materiais e Métodos, resultou negativa.

7. DISCUSSÃO

As variantes da malária, no Estado de São Paulo, têm sido objeto de estudo desde nossa dissertação de mestrado. Estes estudos demonstraram a existência de indivíduos portadores de anticorpos não só contra a proteína CS de *P.vivax* "clássico", como também, contra as variantes *P. vivax* VK247, *P. vivax* like e *P. malariae* (Curado *et al.*, 1997).

As regiões analisadas no presente estudo, Intervales e PETAR, estão inseridas no Complexo da Mata Atlântica e casos de malária têm sido notificados, o que é preocupante, dada a intensa atividade turística que tem aumentado, nestas áreas, nos últimos anos. Diante do quadro sintomatológico dessa malária, no qual se observa pequeno número de casos oligossintomáticos, com baixa parasitemia e de curta duração, analisou-se estas regiões, localizadas no Vale do Ribeira, utilizando-se métodos sorológicos, entomológicos e moleculares.

Em malária, a aquisição de anticorpos é estágio-específica, o que tem dificultado os estudos sobre uma futura vacina. Porém, estudos soroepidemiológicos têm auxiliado no entendimento das relações parasita-hospedeiro, suas manifestações clínicas e imunológicas (Ferreira *et al.*, 1994; Billinsgley, 1994) Foi analisado, sob o ponto de vista imunológico, a resposta contra as formas existentes no mosquito, os esporozoítas, por meio do perfil de anticorpos contra a proteína CS, correspondente ao *P. vivax* e suas variantes e ao *P. malariae/P.brasilianum*. O encontro de anticorpos das classes IgG e IgM, para as formas assexuadas do parasita, também foi analisado. Esclarece-se que, o encontro de anticorpos anti-CSP, não significa que o indivíduo contraiu a doença mas, este resultado, indica que há anofelinos, na área, veiculando estes parasitas. Já, o encontro de anticorpos contra as formas assexuadas, indica que o indivíduo contraiu a doença embora, em muitos casos analisados, estes relataram não ter sintomatologia, indicando que, possivelmente, sejam casos assintomáticos.

Independentemente dos vários resultados apresentados, esta discussão concentrar-se-á nos dados de fato relevantes para o entendimento da etiologia da malária, nestas duas regiões.

7.1. Discussão dos resultados dos dados epidemiológicos

Alguns estudos sorológicos têm demonstrado correlação positiva entre idade/tempo de residência, com a aquisição de anticorpos contra as várias formas do parasita (Nardin *et al.*, 1982; Arruda *et al.*, 1989).

Comparando-se as duas regiões estudadas em relação às prevalências de respostas positivas para anticorpos das variedades de esporozoítas de *Plasmodium* Pvc, Pm/Pb, Pvk e Pvl, obteve-se, para o Pvc, entre os residentes por menos de 10 anos, quantidade 8,0 vezes mais elevada em Intervales quando comparada com a do PETAR ($p < 0,01$). Já, para aqueles que residem por 20 anos ou mais, a razão entre as prevalências das duas regiões equivale a 2,72 ($p < 0,001$). A prevalência de respostas positivas para Pm/Pb e Pvl no primeiro dos intervalos de tempo, em Intervales é ligeiramente maior, em relação à do PETAR, porém, o oposto ocorre no segundo intervalo de tempo, todavia, em ambas as situações não existe significância estatística, ao nível de $p < 0.05$. Já, para a variedade Pvk, a prevalência em Intervales em ambos os intervalos de tempo foi pouco mais elevada que no PETAR, mas, também sem significância estatística a nível de $p < 0.05$.

Do exposto, se depreende que as duas espécies de esporozoítas (Pvc e Pm/Pb) e esporozoítos das variantes de *P. vivax* estão circulando entre as populações de ambas as áreas estudadas, porém, apenas para Pvc, evidencia-se que existe uma associação estatisticamente significante entre residir em Intervales e probalidade maior para se adquirir a infecção por este esporozoíta, quando comparada com a do PETAR, independente do tempo considerado. Mas, para o primeiro intervalo de tempo essa probabilidade é bem mais elevada do que para o segundo, o que sugere nível mais intenso de exposição em Intervales, sobretudo em período mais recente, o que de certa forma é coerente, pois neste Parque a população reside no interior das matas primárias e/ou secundárias, estas em franco processo de regeneração da vegetação, ao passo que no PETAR, a comunidade reside no Bairro Serra, mais afastado da mata primária preservada, onde circulam primatas e os anofelinos, principalmente, as espécies do subgênero

Kerteszia que têm os seus criadouros associados às bromeliáceas. Acresce que em tempos mais recentes o Bairro Serra, vem ampliando a área residencial, com a implementação de pousadas e pequeno comércio, que leva à substituição de vegetação de maior porte nas proximidades das moradias.

A análise estatística quanto à idade das populações em estudo não foi realizada, pelo fato de que, parte dos indivíduos com idade acima de 40 anos estavam morando há pouco tempo nessas áreas. Assim sendo, preferiu-se realizar análise dessas populações em relação ao tempo de residência.

Quanto à presença ou ausência de sintomatologia, dados estes coletados durante as entrevistas nas duas populações, verificou-se que as queixas de sintomatologia foram referidas nas pessoas do PETAR com sorologia positiva com freqüências maiores contra CS de *P.malariae/P.brasilianum* e para *P. vivax*-like humano. Contudo, entre os indivíduos sem sintomas maiores de 20 anos, foram registradas freqüências maiores de anticorpos anti-CSP de Pm/Pb, Pvk e Pvl. Em Intervales, maiores freqüências de anticorpos anti-CSP de Pvc foram encontradas nas duas faixas etárias analisadas, anti-CSP de Pm/Pb na faixa etária menor, anti-CSP de Pvk na faixa etária maior e Pvl na menor, quando ocorrem sintomas . Quando não foram relatados sintomas, as freqüências de anticorpos anti-CSP sempre foram baixas para todos os peptídeos.

Quanto ao deslocamento, quando se compara as populações do PETAR e Inrtervales, verifica-se diferenças estatisticamente significantes quanto à presença de anticorpos, da classe IgG, anti-CSP de Pvc e Pm/Pb ($p<0,01$), sendo que o risco de contrair anticorpos anti-Pvc é 6 vezes maior em Intervales do que no PETAR e anti-Pm/Pb é 2,3 vezes maior no PETAR do que em Intervales quando há deslocamento para outras áreas, ou seja, as pessoas das populações de Intervales e PETAR, que costumam viajar para os municípios ou bairros vizinhos aos Parques, têm maior chance de entrarem em contato com esporozoítas das referidas espécies.

Analisando-se os indivíduos das duas populações que não referem deslocamento, verificamos que não houve diferença significante entre as mesmas.

Sob o ponto de vista ocupacional, verificou-se, em ambas as localidades, que as ocupações nas quais existe maior mobilidade dos indivíduos são as que apresentaram maior freqüência de positividade, fato compreensível e esperado.

A ocupação 1 (aposentados, do lar) apresentou, na maioria das vezes, uma resposta para peptídeos com percentuais menores ou iguais aos menores obtidos em outras ocupações. Isto indica que tais pessoas, provavelmente, por terem menor contato com a mata, estão mais protegidas de picadas de anofelinos e portanto, menos propensas a serem expostas aos esporozoítas.

Ressalta-se, o fato de que as ocupações constantes neste estudo foram selecionadas em função do número mais representativo de pessoas que ocupam tais atividades. Nas duas localidades em estudo, existem pessoas que exercem várias outras atividades, porém em número muito reduzido para cada uma delas.

A análise estatística quanto ao sexo demonstrou que as pessoas do sexo masculino que moram no PETAR apresentam diferença estatística altamente significante em relação ao sexo feminino quanto à presença de anticorpos anti-CSP de Pvc ($p<0,0001$). Para esta mesma localidade, verifica-se diferença estatística significante em pessoas do sexo feminino, quanto à presença de anticorpos anti-CSP de Pm/Pb ($p<0,0036$).

7.2. Discussão dos resultados das reações sorológicas

7.2.1. Sorologia das populações humanas

Os soros dos indivíduos das duas regiões foram analisados pela técnica de ELISA para a detecção de anticorpos anti-CSP de *P.vivax*, suas variantes e Pm/Pb. Verificou-se que a freqüência de indivíduos com sorologia positiva para as variantes de *P.vivax* foi semelhante em ambas as regiões, sendo que através desta análise, pode-se inferir que a área onde se concentra a maior exposição aos esporozoítas e conseqüentemente maior freqüência de soros positivos para anticorpos contra CS de *P.vivax* é Intervales (figuras 5 e 6).

No passado, anticorpos contra a proteína CS, foram o alvo principal para a fabricação de uma vacina que impedisse a transmissão da malária. Há muitos anos, pesquisadores verificaram que anticorpos de animais inoculados com esporozoítas irradiados e depois desafiados, demonstraram um nível bastante significativo de proteção contra a doença. Mais tarde porém, verificou-se que uma vacina fabricada a partir destes experimentos não foi eficaz na proteção contra a malária (Spitalny & Nussenzweig, 1973; Billingsley, 1994; Dye & Targett, 1994). Atualmente, sabe-se que a presença de anticorpos contra CSP não indica necessariamente que o indivíduo tenha contraído a doença, mas a presença de anticorpos anti-estágios assexuados de plasmódio indica a existência passada ou presente de parasitas circulantes. Estas afirmativas estão bem elucidadas no presente estudo. A freqüência de indivíduos com anticorpos contra CSP e também contra as formas assexuadas foram analisadas e pode-se traçar um paralelo do quanto, nestas regiões, os anticorpos contra a CSP podem ser protetores, e verificou-se que não há correlação entre estas positividades, visto que, tanto em Intervales quanto no PETAR, a freqüência de soros positivos para anticorpos da classe IgG é semelhante. Se estes anticorpos fossem protetores, esperaria-se uma freqüência de indivíduos, com anticorpos contra formas assexuadas, menor em Intervales do que no PETAR, já que, 35% da população de Intervales possui anticorpos contra CSP de *P. vivax*. Outro dado que não deve ser desprezado é o fato desta população exibir mais sintomatologia do que a população do PETAR.

Outra pergunta que foi feita neste estudo e, com certeza, não será elucidada apenas com estes dados, é se, por acaso, está havendo diminuição da transmissão de *P. vivax* na região do PETAR, pois, a positividade para anticorpos contra CSP desta espécie é de apenas 8,5%. Alguns autores relataram que a menor prevalência de anticorpos anti-CSP, quando comparada com aquela dos anticorpos contra formas assexuadas de *P. vivax*, poderia ser explicada pelo fato de que repetidos desafios são necessários para elicitar anticorpos anti-CSP, sendo que a presença de tais anticorpos em áreas hiper ou holoendêmicas de malária está diretamente relacionada com a idade, podendo refletir o grau de imunidade anti-malárica (Nardin *et al.*, 1979; Greenwood, 1990).

Outros estudos associam os níveis desses anticorpos ao grau de transmissão da malária numa determinada área, ou seja, estão diretamente associados ao número de esporozoítas inoculados (Espósito *et al.*, 1988). As diferenças nas prevalências desses anticorpos, encontradas entre populações de áreas endêmicas brasileiras e de outras regiões do mundo, poderiam ser explicadas pelo tempo de exposição ao parasita e pela menor taxa de inoculação de esporozoítas pelos anofelinos vetores do Brasil (Deane, 1986; Oliveira-Ferreira *et al.*, 1990). Além disso, a existência das duas variantes de *P. vivax* descritas (Rosenberg *et al.*, 1989; Qari *et al.*, 1993) e a possibilidade de que outras possam existir (Kawamoto *et al.*, 2002), poderia alternativamente explicar a ocorrência da menor prevalência de anticorpos anti-CSP verificada em nossas regiões quando comparada com a prevalência de anticorpos anti-estágios assexuados de *P. vivax*.

A análise de anticorpos contra as formas assexuadas de *P. malariae* mostrou que as prevalências foram semelhantes, nas duas regiões, e não desprezíveis, mostrando que os indivíduos estão contraindo malária de espécies não só correspondentes ao *P.vivax* e suas variantes (figura 7).

Comparando-se esses resultados com aqueles obtidos por Curado *et al.* (1997), em estudo realizado em localidades pertencentes também ao Vale do Ribeira, verificou-se que as prevalências, na localidade de Juquiazinho, em ELISA com os 4 peptídeos utilizados foram de 5,95% (15/84), 2,38% (2/84), 15% (13/84) e 0%, respectivamente para Pvc, Pm/Pb, Pvk e Pvl. Em Shangrilá, estas prevalências foram de 2,56% (2/78), 3,84% (3/78), 2,56% (2/78) e 17% (13/78), respectivamente para Pvc, Pm/Pb, Pvk e Pvl. As prevalências de reações positivas em IFI com antígeno de *P. vivax* nas populações de Shangrilá e Juquiazinho como um todo, foram de 21% (16/77) e 52% (38/73), respectivamente. Quando essas populações de Shangrilá e Juquiazinho foram analisadas separadamente, ou seja, entre "caseiros" e "proprietários", as freqüências em IFI com *P. vivax* entre "caseiros", ou seja, população fixa, se elevou para 35% (16/46) e 73% (33/45), respectivamente. É importante lembrar que no estudo realizado no PETAR e em Intervales, apesar de ter sido registrada alta prevalência de anticorpos da classe IgG, verificou-se, através da análise das

fichas de investigação epidemiológica (Anexo III), que tais populações, em sua maioria, não apresentaram sintomas clínicos típicos de malária no passado ou no momento da coleta de sangue. A sintomatologia referida é branda, relatando por vezes, dores de cabeça, mal estar ou febre, quadro que lembra os sintomas da gripe ou resfriado.

Nota-se que, no estudo atual, ou seja, no PETAR e em Intervales, em relação ao estudo efetuado por Curado *et al* (1997), um aumento das prevalências obtidas em ELISA com os quatro peptídeos utilizados foram encontradas, sendo que, ambas as regiões possuem ecossistemas semelhantes, porém, no PETAR e em Intervales, observou-se uma maior prevalência de anticorpos anti-CSP de Pvl (29,7%) e de Pvc (35,0%), respectivamente. Em relação à prevalência de anticorpos anti-formas assexuadas de *P. vivax*, diferença significante entre PETAR (49,0%) e Juquiazinho (52,0%) não foi verificada, tendo ocorrido diferença um pouco maior com relação à localidade de Shangrilá (31,9%).

Estudo realizado por Arruda *et al.* (1996) com 4 tribos indígenas que vivem ao longo do rio Xingu, Pará, indicou uma soroprevalência muito elevada pela técnica ELISA com peptídeos de *P. malariae* e *P. vivax.* Para anticorpos anti-CSP de *P. malariae* nas tribos Parakanã, Arara, Assurini e Metuktire, a soropositividade encontrada foi de 11,5%, 77,6%, 34,2% e 83,8%, respectivamente, enquanto que para *P. vivax*, foi de 71,6%, 55,2%, 52,6% e 60,8%, respectivamente. Em outro estudo, também com tribos indígenas, Arruda *et al.* (1998), também encontraram soroprevalências muito elevadas com o peptídeo de *P. vivax* VK247 para as tribos Parakanã, Arara, Metuktire e Assurini (soroprevalência entre 73% e 85%) e para as tribos Pukanuv e A-Ukre (soroprevalência entre 76% e 86%). Com o peptídeo de *P. vivax*-like, a soroprevalência para as 4 primeiras tribos foi de 80% a 88% e para as outras duas tribos, variou entre 88% e 92%.

Branquinho (2001), realizou estudo de malária com três populações ribeirinhas do Estado do Amapá (Santo Antonio, São João e São Raimundo), tendo encontrado elevados níveis de anticorpos anti-formas assexuadas de *P. vivax* da classe IgG com soroprevalência total de 71,2% (52/73). Ainda nesse trabalho, foi realizada pesquisa de anticorpos anti-CSP com os 4 peptídeos

utilizados no estudo atual, sendo que a autora encontrou uma prevalência de 38,4% (28/73), 36,9% (27/73), 20,5% (15/73) e 17,8% (13/73), respectivamente para Pvc, Pm/Pb, Pvk e Pvl. Nesse estudo, realizado em área endêmica de malária, as prevalências encontradas em ELISA são muito próximas daquelas registradas no PETAR e em Intervales. Nesta região do Amapá, a autora registrou o encontro de 14 lâminas com gota espessa positivas (7 pelo *P. falciparum*, 6 pelo *P. vivax* e 1 pelo *P. falciparum* e *P. vivax*), sendo que os moradores dos quais foram coletadas amostras de sangue, não relataram sintomas no momento da coleta.

Na técnica de ELISA, alguns soros reagiram positivamente com mais de um peptídeo utilizado. Com tais resultados, a possibilidade da existência de respostas cruzadas entre peptídeos não pode ser descartada. Cochrane *et al.* (1990), verificaram através de ELISA a ocorrência de reações cruzadas entre Pm/Pb e Pvk em alguns soros de índios do Brasil. Contudo, Curado *et al.* (1997), não encontraram reações cruzadas em seu estudo no Vale do Ribeira, visto que apenas 4 da totalidade de 439 soros testados reagiram com os peptídeos de Pm/Pb e Pvk. A reação cruzada entre esses plasmódios pode ser devida à similaridade entre a seqüência repetitiva NGAGN do Pvk e a seqüência NAAGN do Pm/Pb, havendo 80% de homologia entre as mesmas. Os autores ainda discutem a possibilidade de que tais reações cruzadas podem estar relacionadas à idade do indivíduo, ou seja, ao maior tempo de exposição à CSP de *P. brasilianum*, visto que a maioria dos moradores da região que apresentaram altos títulos de anticorpos anti-CSP de Pvk, tinham mais de 20 anos de idade. Duarte (comunicação pessoal), em sua tese de doutorado realizada em área de influência da Usina Hidrelétrica de Porto Primavera, divisa entre Mato Grosso do Sul e São Paulo, não encontrou reações positivas para mais de um peptídeo dentre os 216 soros humanos testados no estudo, sendo que, dentre 239 soros de macacos da região, verificou que apenas 5 deles reagiram com mais de um peptídeo (2,0%). Branquinho (2001), indica que em seu trabalho realizado com populações ribeirinhas no Amapá, encontrou reações cruzadas entre anticorpos anti-CSP de diferentes peptídeos. Na localidade de São Raimundo, observou que 8,6% dos

soros reagiram com Pm/Pb, Pvc e Pvl. Em São João, 21,4% dos soros reagiram com Pm/Pb, Pvc e Pvk, enquanto na localidade de Santo Antonio a porcentagem foi de 12,5% para Pm/Pb, Pvl e Pvk.

Bruce (2002), analisando geneticamente os parasitas de malária que infectam humanos, verificou que indivíduos residentes em áreas endêmicas de malária podem ser cronicamente infectados com várias espécies de plasmódios. O acúmulo de infecções é uma conseqüência da superinfecção por picadas de anofelinos infectados. Desse modo, pode-se inferir se a resposta positiva com mais de um peptídeo, realmente representa uma reação cruzada, ou apenas indica uma infecção por diferentes espécies de esporozoítas. Ao mesmo tempo, sabe-se que tais peptídeos possuem seqüências de aminoácidos específicas, contudo, podem existir regiões, na proteína total, que exibam alguma homologia. Uma maneira de minimizar a ocorrência de reações cruzadas é pelo método de absorção dos soros com os respectivos peptídeos. Porém, devido ao alto custo da síntese destes e da pequena quantidade disponível para a realização dos experimentos, a resposta à questão sobre as reações cruzadas continua em aberto.

Observa-se que as MGT das reações de IFI, registradas nas duas localidades, indicam uma tendência de correlação positiva com a elevada prevalência de anticorpos anti-formas assexuadas de *P. vivax* e *P. malariae* encontrados (figura 8). Além disso, as menores freqüências de reações positivas encontradas com o antígeno de *P. malariae* contribuíram para validar os resultados de elevada freqüência de reações positivas com formas assexuadas de *P. vivax*. Em alguns casos, ocorreram reações positivas tanto com o antígeno de *P. malariae* quanto com *P. vivax*. Sabe-se da existência de antígenos comuns aos estágios assexuados de várias espécies de plasmódios (Ceneviva & Camargo, 1979), contudo, os autores recomendam que a provável última infecção de um indivíduo por dada espécie de plasmódio, seja distingüida pelo título mais elevado obtido dentre os antígenos utilizados.

Os resultados obtidos com os 21 soros das duas localidades em estudo que foram positivos na técnica de ELISA com peptídeo de *P. malariae/P. brasilianum* e

em IFI com antígeno de *P. malariae* (18 soros) e *P. vivax* (3 soros) para presença de anticorpos da classe IgM anti-formas assexuadas (tabela 13), demonstraram que, provavelmente, os esporozoítas de *P. malariae* e *P. vivax* nesses indivíduos, alcançaram o fígado e que a infecção prosseguiu até o parasita invadir as hemácias e completar seu ciclo evolutivo, causando ou não sintomatologia da doença. A presença de anticorpos anti-formas assexuadas de *P. malariae* nas amostras de sangue humano e de macacos pode ser considerada um indicativo da possibilidade da existência de um quadro zoonótico em macacos, nas áreas de baixa endemicidade de malária cobertas pelo presente estudo. Em sendo isto verdadeiro, implicaria em modificações na análise dos modelos de vigilância local, uma vez que este plasmódio, além de gerar um quadro de malária assintomática ou sub-clínica e com parasitemia sub-patente em áreas endêmicas do Brasil, é sub-notificado em exames microscópicos, por dificuldades na diferenciação morfológica entre *P. malariae* e *P. vivax* (Cavasini *et al.*, 2000).

7.2.2. Sorologia de macacos

A prevalência, nos soros de macacos, de anticorpos anti-CSP para os peptídeos de Pvc, Pm/Pb, Pvk, Pvl e Pf, foi de 23,0%, 17,9%, 7,7%, 7,7% e 12,8% (figura 9), respectivamente e verificou-se que a freqüência de anticorpos anti-formas assexuadas da classe IgG com antígeno de *P. vivax* e *P. malariae* foi de 44,12% e 26,47%, respectivamente (figura 10). Apenas 2 soros, dos 34 submetidos a IFI, foram positivos para ambos os antígenos utilizados, indicando não haver respostas cruzadas. Em populações de macacos capturados nas Usinas Hidrelétricas de Balbina e Samuel, Amazonas, o exame de gota espessa mostrou que dentre 126 macacos de Balbina, 20 (15,8%) estavam positivos para *P. brasilianum* e na Usina de Samuel, 9,9% (25/252) dos macacos foram positivos com esse mesmo plasmódio (Lourenço de Oliveira & Deane, 1995). Em 3 localidades da Guiana Francesa, foi detectado na IFI com antígenos de *P. falciparum, P. vivax* e *P. malariae* da classe IgG que dentre 152 macacos, 82,7% (125/152), 38,5% (58/152) e 98,0% (149/152), respectivamente, estavam positivos

para essa reação; na IFI com *P. falciparum* em humanos, foram encontrados nas áreas de Maroni, Oyapock e Litoral, 65,6% (64/98), 71,1% (31/44) e 20,8% (08/38), respectivamente de reações positivas; na ELISA, entre 113 macacos, 72,6% (82/113), 53,0% (60/113), 20,3% (23/113) e 9,7% (11/113) foram positivos, respectivamente para Pm/Pb, Pf, Pvk e Pvl; nas 3 populações humanas estudadas, foram encontradas respostas positivas em ELISA com percentuais de 47,4 (103/218) para Pm/Pb, 23,4 (51/218) para Pf, 22,8 (50/218) para Pvk e 19,3% (42/218) para Pvl (Volney *et al.* 2002). Estes autores concluíram que os vários grupos étnicos foram igualmente expostos ao risco de contrair malária, sendo que Pm/Pb foi detectado em alta freqüência em todos os grupos e que a transmissão de malária de macacos para humanos e vice versa pode não ser um fenômeno raro nas regiões amazônicas.

Pelo fato dos macacos do DEPAVE terem sido capturados na Grande São Paulo, não se sabe sobre a real interferência que os macacos do PETAR e Intervales têm no provável ciclo zoonótico existente nessas regiões; contudo, foram detectados casos de malária por *P. malariae* nessas populações, além de anticorpos anti-CSP de Pm/Pb. O fato de se ter trabalhado com macacos de São Paulo, constitui apenas uma tentativa de mostrar a prevalência de reações positivas pelas duas técnicas sorológicas utilizadas (além do PCR, como veremos posteriormente). É preciso considerar, que tais macacos (DEPAVE) em seu hábitat natural podem funcionar como reservatório de malária.

7.2.3. Especificidade da reação de IFI com soros humanos

Com relação à especificidade, é conhecida a existência de antígenos comuns aos estágios assexuados de várias espécies de plasmódios (Camargo, 1979) como citado anteriormente. Também pode ocorrer reatividade cruzada entre soros de indivíduos portadores de leishmaniose e antígeno de formas assexuadas de *P. vivax* (Duxbury & Sadun, 1964). Neste caso, reações cruzadas poderiam ser resultantes de ativação policlonal, que resulta em produção de anticorpos

inespecíficos, dirigidos contra grande variedade de epítopos (Galvão-Castro *et al.*, 1984; Abramo *et al.*, 1995).

É sabido também, devido à reações inespecíficas em IFI, que pode haver reação cruzada com soros de portadores de Doença de Chagas, toxoplasmose e nematóides, diluídos a baixas concentrações (Abramo *et al.*, 1995).

Abramo *et al.* (1995), recomendam que em países onde essas doenças ocorrem comumente, seja adotado como limiar de reatividade da reação de IFI um título a partir de 1/80, o que resultaria em especificidade de 90% e sensibilidade de 96%. Se o ponto de "cut-off" fosse estabelecido em título a partir de 1/160, a especificidade e sensibilidade da reação de IFI seriam de 98% e 87%, respectivamente. No presente estudo, caso esta metodologia fosse adotada como critério, ainda assim, a porcentagem de soros positivos seria elevada (passaria, por exemplo, de 49,0% de anticorpos para *P. vivax* da classe IgG para 41,29% no PETAR e em Intervales, para esse mesmo antígeno, passaria de 31,9% para 24,53%).

Devido a todos esses fatores, como relatado no item 6.2.5 de Resultados, resolveu-se investigar a ocorrência de anticorpos contra leishmaniose nas amostras coletadas, visto que o PETAR é área de foco dessa doença. Como dito anteriormente, através da técnica de ELISA realizada com antígeno de *Leishmania* major-like, não foram encontradas reações cruzadas com nenhum dos soros testados em IFI para malária.

Guimarães *et al.* (1983), realizaram estudo na Amazônia Legal com 550 soros que foram submetidos à sorologia para evidenciar anticorpos da classe IgG anti-*Leishmania* por reações de IFI e ELISA e à sorologia para malária (anticorpos IgG e IgM). Destes soros, 229 tinham sorologia positiva para malária na reação de IFI-IgG e 21 deles, foram também positivos para anticorpos IgM. Outros 125 soros, possuíam anticorpos anti-*Leishmania* e 68 deles (29,7%) foram positivos para ambas as infecções. Outros 264, foram negativos para ambas as infecções; 214/229 (93,4%) eram soros provenientes do Amapá. O índice de Youden foi de 0,1194, indicando haver baixa correlação entre as reações. Concluiu-se que a

presença de anticorpos anti-malária não interfere, pelo menos para propósitos de sorologia, com anticorpos anti-Leishmania e vice-versa.

7.3. Discussão dos resultados dos testes parasitológicos

7.3.1. PCR de amostras humanas do PETAR e Intervales

Independente de todas as 318 amostras coletadas serem negativas ao exame parasitológico (gotas espessas/esfregaços) e tendo em mente os resultados sorológicos, com positividade expressiva para anticorpos contra as diversas espécies de plasmódios, realizou-se a reação de PCR, mais sensível que o esfregaço e gota espessa (Kimura *et al.*, 1997) com o DNA extraído do sangue destes indivíduos, a fim de detectar casos assintomáticos nestas regiões.

Um resultado surpreendente pode ser visto na figura 14, onde, através da reação de PCR com a utilização de "primers" espécie-específicos correspondentes ao *P. malariae,* apresentou-se a amplificação de fragmento de 110pb no sangue extraído de um morador de Intervales (Snounou *et al.*,1993; Kimura *et al.*,1997). Trata-se do morador de Intervales I11 que tem 46 anos e é guarda do Parque. Ele nasceu em Iporanga e viaja constantemente pelos municípios de Sete Barras, Iporanga, Ribeirão Grande e Guapiara, que circundam o Parque Intervales. No momento da coleta de sangue, queixou-se de calafrio e dores de cabeça e relatou ter tido gripe há uma semana atrás. Este indivíduo apresentou sorologia positiva em ELISA com os peptídeos de Pvc (0,369), Pm/Pb (1,800) e Pvl (0,371) e em IFI para *P. vivax* da classe IgG (1/320) e *P. malariae* das classes IgM (1/640) e IgG (1/5120). A reação positiva para *P. malariae* por PCR e por IFI (IgM) indica uma infecção recente.

Neste caso, possivelmente, tal indivíduo esteja funcionando como reservatório de malária na região e pode ter adquirido a doença de fonte de infecção representada pelos macacos que transitam pelas áreas pelas quais ele circula. O exemplo apresentado chama a atenção para a necessidade de se rever as ações de controle de malária praticadas na região.

Em discussão sobre a prevalência de *Plasmodium malariae* em área endêmica (Rondônia) da Amazônia Ocidental brasileira Cavasini *et al.* (2000) comparam resultados obtidos com a microscopia convencional (gotas espessas coradas por Giemsa) e com um protocolo utilizando PCR "semi-nested" com sangue de 96 pacientes da região com infecção patente. Infecções envolvendo mais de uma espécie (infecções mistas) foram detectadas pelo PCR em 30% dos pacientes, mas nenhum caso havia sido encontrado pelo exame de gotas espessas. Além disso, infecções por *P. malariae* detectadas por PCR foram encontradas em 10% dos pacientes, mas nenhuma havia sido encontrada pelos microscopistas locais. Sabe-se que existem possibilidades de que infecções por *P. malariae* ocorram como uma zoonose em algumas áreas da Amazônia (Arruda *et al.*, 1989; 1996; 1998) e até em áreas não endêmicas de malária (Curado *et al.*, 1997, Duarte, 1998). Tais casos representam implicações para o controle da doença, visto que pacientes com *P. malariae*, geralmente apresentam baixa parasitemia e podem ser assintomáticos ou oligossintomáticos. Outro fator agravante é que muitas vezes o *P. malariae* é confundido ao microscópio com o *P. vivax*, resultando, que tais infecções sejam subnotificadas, como no caso relatado recentemente por Kawamoto *et al.* (2002), no qual o diagnóstico microscópico apresentou 2 formas trofozoítas morfologicamente identificadas como *P. vivax* var. *minuta* ou *P. tenue*. A confirmação do diagnóstico foi dada pela comparação de seqüências do SSUrRNA e da proteína CS, revelando que essas formas pertenciam ao *P. tenue*-like, espécie próxima ao *P. brasilianum*.

Com a utilização do protocolo preconizado por Kimura *et al.* (1997) foi possível identificar em algumas amostras, evidência de infecção por *P. falciparum* e *P. vivax*. Os moradores do Parque Intervales I1 e I13 e do PETAR P156 foram positivos no PCR para *P. falciparum* (figura 15) e os moradores do PETAR P146, P125 e P148 foram positivos nessa mesma reação para *P. falciparum* e *P. vivax* (figura 16). O morador I1 tem 52 anos, nasceu em Guapiara, é motorista e em função do trabalho, sempre viaja pelos municípios vizinhos ao Parque. No momento da coleta de sangue, queixou-se de sudorese. O morador I13 tem 32 anos é auxiliar de serviços gerais e nasceu em Intervales, também trabalha como

lavrador e na coleta de sangue, relatou alguns sintomas e que freqüentemente tem gripe. A moradora P125 tem 28 anos, é do lar, nasceu no PETAR e faz trilhas e visita cavernas constantemente. Não apresentou sintomas. O morador P146, tem 55 anos, é lavrador, vive no PETAR há 40 anos e queixou-se de vários sintomas, inclusive de gripe. O morador P148 tem 25 anos, é motorista, viaja pelos municípios vizinhos freqüentemente, mora no PETAR há 6 anos e queixou-se de febre, dores de cabeça e no corpo. O morador P156 tem 33 anos, é recepcionista e monitor do Parque, nasceu no PETAR e não apresentou sintomas. Todas essas pessoas apresentaram sorologia positiva em ELISA e/ou em IFI e alegaram não ter contato com pessoas de áreas endêmicas ou tampouco viajarem para as mesmas.

Em estudos realizados no município de Peruíbe, situado no litoral sul de São Paulo, verificaram que a grande maioria dos casos autóctones de malária aí gerados caracterizavam-se como oligossintomáticos ou assintomáticos, com baixas parasitemias detectáveis ou mesmo subpatentes, sempre identificados como malária *vivax* (Carvalho *et al.* 1985; 1988). Também, Curado *et al.* (1995; 1997) relatam que todos os casos autóctones ocorridos nas áreas de estudo do Vale do Ribeira e litorais norte e sul do Estado de São Paulo apresentaram baixas parasitemias e infecção identificada como malária *vivax*. Portanto, no presente estudo, foi surpreendente o encontro de casos de *P. falciparum* nas áreas em estudo. Na tentativa de explicar o achado, aventou-se algumas possibilidades. A primeira delas, é a de que poderia ter ocorrido um erro técnico ao realizar as reações de PCR. Contudo, tal possibilidade de se ter as amostras contaminadas por DNA genômico foi descartada, visto que todas as reações foram repetidas, com amostras de sangue diferente, em laboratórios diferentes e mesmo assim, tiveram resultados coincidentes. A hipótese de que os "primers" utilizados para a amplificação das espécies de *P. vivax* e *P. falciparum* fossem muito similares, podendo ser que a temperatura baixa de "annealing" causasse uma reação cruzada, foi descartada, neste caso, pois, na mesma reação, encontrou-se casos só de *P.vivax,* só de *P.falciparum* e infecções mistas, assim como, o caso de *P. malariae*. Finalmente, outra possibilidade seria a de que o *P. falciparum* realmente

pudesse estar circulando na região entre os anofelinos dos subgêneros *Anopheles* ou *Nyssorhynchus* que são encontrados na região e potencialmente poderiam estar transmitindo tal parasito, os quais representaram 20% do total de anofelinos capturados na área. Em relação à oligossintomatologia relatada pelos casos, esta pode ser atribuída à variabilidade antigênica encontrada em diversos isolados de *P. falciparum* (Awadalla *et al.*, 2001; Rich *et al.*, 2000).

A existência de malária assintomática em populações ribeirinhas de Rondônia e o risco representado pelo fato de tais casos funcionarem como reservatório da doença na região, foi alertado por Camargo *et al.* (1999a). Estes autores relataram que nos indivíduos residentes, porém não naturais da região, a presença de parasitos no sangue, sejam eles *P. falciparum* ou *P. vivax*, sempre foi acompanhada de sintomas. Contudo, os poucos nativos que tinham parasitos no sangue não apresentavam sintomas. Os autores acompanharam 183 indivíduos, dentre os quais, 7,65% tiveram malária por *P. vivax* acompanhada por sintomas diagnosticada por gota espessa e PCR positivos (todos menores de 16 anos e morando por pouco mais de um ano no local). Também foram constatados 13,66% de malária *vivax* sem sintomas e com PCR positivo (maiores de 16 anos). Desses indivíduos, 16 tiveram acompanhamento médico por 30 dias, sendo que 8 deles apresentaram gota espessa positiva com parasitemia muito baixa. Após 2 semanas do primeiro PCR, 12 indivíduos tornaram-se negativos, mas, 4 permaneceram positivos no PCR por 30 dias. Estudo semelhante ao acima citado, também realizado com populações ribeirinhas residentes em Portochuelo (assentamentos ao longo do Rio Madeira), Rondônia, indicaram que os moradores nativos e mais idosos (especialmente os acima de 50 anos) são aqueles que têm menor vulnerabilidade a contrair malária (Camargo et al., 1999b).

Outro estudo sobre malária assintomática foi realizado por Alves *et al.* (2002), com populações ribeirinhas de Portuchuelo, distante 34 km de Porto Velho e 6 comunidades ribeirinhas em Ji-Paraná, região de difícil acesso em Rondônia. Em Portuchuelo, foram feitos estudos seccionais cruzados, com indivíduos que apresentaram PCR e gota espessa positivos e sem sintomas, ou seja, tais pessoas foram acompanhadas ao longo do tempo, sem que fosse administrado

tratamento, pelo menos enquanto estivessem assintomáticas. Em Ji-Paraná, por ser região de muito difícil acesso, as pessoas com gota espessa e/ou PCR positivos, mas com sintomas foram tratadas, enquanto que os sem sintomas, foram acompanhados por 10 dias sem medicação. Em Portochuelo, nas 3 pesquisas feitas em momentos diferentes, observou-se uma redução, ao longo do tempo, da prevalência de lâminas com gotas positivas de 4,6%, 4,2%, 0% e também no PCR de 31,7%, 23,8%, 6,4%. Em Ji-Paraná, a prevalência de gotas espessas positivas foi de 16,9% e de PCR positivo de 64,8% com 23,4% de infecções mistas. A conclusão foi de que, em ambos os estudos, o PCR foi de 6 a 7 vezes mais eficiente que a microscopia para detecção de infecções. Os indivíduos sem sintomas, mas com gota espessa positiva, tinham muito baixa parasitemia. O PCR foi 30 vezes mais eficiente que a microscopia para detectar infecções mistas, sendo que nunca ocorreu uma reação falso positiva no PCR. Essa pesquisa mostrou que a malária assintomática foi altamente prevalente nas duas comunidades estudadas, assim como nas de Intervales e PETAR.

7.3.2. PCR das amostras de macacos

As amostras 98 e 102 (figura 17), do DNA extraído de 2 macacos *Alouatta* (bugios) do DEPAVE, resultaram positivas em PCR utilizando-se os "primers" correspondentes ao gene 18S rRNA gênero-específico (Oliveira *et al.*, 1995). Na tentativa de diagnóstico da espécie de plasmódio, estas foram testadas com "primers" de *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae* correspondentes à porção central do gene CS (Qari *et al.*, 1993) e por protocolos de Snounou *et al.* (1993) e Kimura *et al.* (1997) e o resultado foi negativo em todas essas reações. Face a isto, estas amostras de DNA foram encaminhadas para seqüenciamento, a fim de identificar a espécie destes plasmódios simianos ou não e saber se os mesmos poderiam ou não ser transmitidos ao homem.

Juntamente com as amostras acima, foi encaminhada a amostra 65 (figura 18), referente ao macaco-prego *Cebus* do DEPAVE para seqüenciamento. Esta amostra resultou positiva em PCR utilizando-se "primers" correspondentes ao

gene 18S rRNA gênero-específico (Oliveira *et al.*, 1995). Contudo, neste caso, observou-se a formação de 2 bandas, uma delas com aproximadamente 350pb e outra com aproximadamente 800 pb, quando se esperaria encontrar uma banda de 678 pb. Essas são bandas alteradas. Essa amostra também foi submetida aos testes com outros protocolos, como relatado acima, mas em todos os casos os resultados em PCR foram negativos. Tal amostra, como as acima citadas, também foi encaminhada para seqüenciamento.

Estudo recente, realizado por Fandeur *et al.* (2000), com 214 macacos capturados em área de construção de Usina Hidrelétrica na Guiana Francesa, indicou a presença de *P. brasilianum* em 5% das lâminas com gota espessa feitas com o sangue de macacos. A reação de PCR, utilizando "primers" de *P. brasilianum*, foi comparativamente mais sensível que o método parasitológico convencional para detectar baixas parasitemias em macacos positivos, visto que, pelo PCR, a infecção foi detectada em 11% dos macacos. Nenhuma amplificação foi obtida nas amostras submetidas ao PCR com "primers" de *P. falciparum* e *P. vivax*. Os autores concluíram que, o aumento de casos de malária por *P. malariae*, nas populações humanas locais, ocorreu devido aos distúrbios ecológicos ocasionados pela construção da Usina e pelo estreitamento do contato entre homens e macacos, afirmando que na localidade estudada, os macacos desempenham o papel de reservatórios naturais das malárias simiana e humana.

Não foi possível obter amostras de sangue de macacos dos Parques em estudo, contudo, por meio dos dados da sorologia, especialmente os casos de IFI, positivos para anticorpos da classe IgM para *P. malariae* e dos PCR de humanos, acredita-se na possibilidade de que os macacos da região possam desempenhar o papel de reservatórios de plasmódios, que eventualmente, podem ser transmitidos ao homem.

7.3.3. PCR de anofelinos

Foi realizada reação de PCR, preconizada por Kimura *et al.*(1997), com "primers" gênero-específicos e espécie-específicos a fim de detectar infecção em todos os anofelinos que foram capturados no PETAR e em Intervales, sendo que a mesma resultou negativa em todos os anofelinos testados.

A potencialidade de um anofelino transmitir malária é estimada baseando-se no modelo de transmissão de MacDonald, 1957, cujos componentes referem-se ao número de picadas por pessoa por dia, antropofilia, duração do ciclo gonotrófico, sobrevivência diária do anofelino e duração do período extrínseco de incubação do *Plasmodium*. Estes fatores definem o modelo clássico de Capacidade Vetorial de Garrett-Jones (1964) e medem o grau de potencial contato infeccioso (Molineaux, 1978).

A taxa de inoculação humana é um dos parâmetros bastante empregados, principalmente na África (Beier *et al.*, 1994; 1999; Hay *et al.*, 2000). Outro parâmetro é a relação entre índice de antropofilia e taxa de esporozoítas (Cattani et al., 1986), cujo resultado apontou uma relação direta entre as duas variáveis em *An. punctulatus*. Nas Américas, os trabalhos dessa natureza são escassos. A variável mais usada é a que mede a densidade do vetor em relação ao número de mosquitos coletados no ato de pousar para se alimentar no homem (Rubio-Palis & Curtis, 1992; Zimmerman, 1992). É de fundamental importância, ir além da incriminação vetorial, examinando a complexidade da associação das múltiplas espécies, assim como esclarecer o papel desempenhado pelas espécies crípticas na transmissão da malária. Além disso, é extremamente necessário realizar um mapeamento dos anofelinos em microregiões, incluindo-se áreas recém desmatadas, posto que a substituição das espécies anofélicas relaciona-se às mudanças no meio ambiente e à plasticidade genética dos mosquitos em se adaptar a essas mudanças.

Estudo com anofelinos do subgênero *Kerteszia*, coletados no município de Cananéia, Vale do Ribeira, utilizando-se da medida da capacidade vetorial desses anofelinos, indicou por modelo matemático, que *An. (Kerteszia)* em ambiente

natural, possui pequena possibilidade de veiculação malárica, a despeito das afirmações sobre sua participação na transmissão dessa doença (Santos, 2001).

Comparação do sucesso de desenvolvimento de 11 isolados do Velho e Novo Mundo de *P. vivax* em *An. albimanus* e *An. freeborni* (espécie de laboratório), foi realizado, verificando-se que nestes, a taxa de infecção para os isolados do Novo Mundo foi de 30,6% e 51,9% respectivamente, sendo que essa taxa caiu para 0,25% em *An. albimanus* comparada a 63,4% no *An. freeborni*, entre isolados do Velho Mundo. Estes resultados indicaram que, embora as espécies de plasmódios sejam as mesmas, a veiculação destas está diretamente relacionada ao vetor existente na área (Li *et al.* 2001).

Nas áreas investigadas, os resultados do PCR com anofelinos foram negativos. Apesar do estudo referido acima, conduzido em Cananéia, indicar que o subgênero *Kerteszia* parece ter pouca possibilidade de veiculação de plasmódios, nas aqui estudadas, acredita-se que os mesmos oferecem condições para a veiculação da doença, isto, principalmente, diante dos dados sorológicos que foram obtidos no estudo. Acresce ainda, que o estudo realizado por Li *et al.* (2001), sobre o sucesso da infecção de anofelinos pode estar diretamente relacionado com os isolados existentes dentro de uma mesma espécie de plasmódio.

7.4. Considerações finais

O presente estudo destaca a presença de malária assintomática nas regiões investigadas, chamando a atenção para a necessidade de medidas suplementares para controlar a infecção em regiões de Mata Atlântica.

Destaca ainda, a possibilidade de que macacos funcionem como reservatório da malária.

Dentre as abordagens possíveis, com o objetivo de controlar a malária nas regiões de estudo, estão:

- que na ocorrência de casos de malária e durante busca ativa, também fosse incluído estudo sorológico, semelhante a este e quando fosse registrada reação positiva de IFI com anticorpos da classe IgM, deveria ser instituído imediatamente tratamento, independentemente de achado de parasitas.

8. Conclusões

1 – A prevalência de anticorpos anti-formas assexuadas de *P. vivax* detectados pela reação de IFI foi muito elevada nas duas áreas em estudo e também entre os macacos do DEPAVE;

2 – Devido à prevalência de anticorpos anti-CSP de variantes de *P. vivax* registrada nas áreas de estudo, aventa-se a possibilidade de que alguns desses casos poderiam ser devidos à essas variantes, explicando a sintomatologia branda que, por vezes, ocorre nessas localidades;

3 – Devido à presença de: i) anticorpos anti-formas assexuadas da classe IgM e de anticorpos anti-CSP de *P. malariae*, ii) caso de malária humana por *P .malariae* diagnosticado por PCR em morador do Parque Intervales, iii) vetores anofelinos competentes para transmissão de plasmódios simianos e iv) a ocorrência de poucos casos de malária sintomática notificados nas regiões estudadas, sugere-se a possibilidade de que parasitas de macacos estejam circulando entre humanos;

4 – Foram registrados alguns casos de malária por *P. vivax* e *P. falciparum* diagnosticados por PCR em indivíduos assintomáticos ou oligossintomáticos;

5 – Habitantes das regiões estudadas apresentaram malária assintomática, funcionando como possível fonte de infecção;

6 – Foram encontrados macacos capturados pelo DEPAVE que foram positivos para o gênero *Plasmodium* no PCR e que apresentaram alta prevalência de reações positivas na IFI com *P. vivax* e *P. malariae*, podendo estar servindo de reservatório da doença pelas regiões em que circulam.

9. Referências bibliográficas

Abramo C.; Fontes C. J. F.; Krettli, A. U. Cross-reactivity between antibodies in the sera of individuals with leishmaniasis, toxoplasmosis and chagas disease and antigens of the blood-stage forms of Plasmodium falciparum determined by indirect immunofluorescence. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1995; 83: 202-5.

Alves, F. P.; Durlacher, R. R.; Menezes, M. J.; Krieger, H., Pereira da Silva, L. H. Camargo, E. P. High prevalence of assymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native amazonian populations. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 2002; 66: 641-48.

Ambroise-Thomas P. La reaction d´immunofluorescence dans l´etude seroimmunologique du paludisme. **Bull W. H. O.** 1974; 50: 267-76.

Ambroise-Thomas P. Diagnosis and seroepidemiologic studies of malaria by immunofluorescence, indirect haemaglutination and immunoenzymology. **Israel J. Med. Sci.**1978;14: 690-91,

Ambroise-Thomas P. L´immunofluorescence dans la serologie du paludisme. **Bull. W. H. O./Malariol.** 1981; (953): 1-6,

Andrade J. C. R., Anjos C. F. D, Wanderley, D. M. V., Alves, M. J. P. C., Campos, P. C. Foco de malária no estado de São Paulo (Brasil). **Rev. Saúde Pública,** 1986; 20: 323-26,

Andrade A. L. de, Martelli C. M., Oliveira R. M., Arias J. R., Zicker F., Pang L. High prevalence of asymptomatic malaria in gold mining areas in Brazil. **Clin. Infect. Dis.** 1995; 20: 475.

Arez A. P., Lopes D., Pinto J., Franco A. S., Snounou G., Rosário V. E. *Plasmodium* sp.: Optimal protocols for PCR detection of low parasite numbers from mosquitos (*Anopheles sp.*) samples. **Exp. Parasitol.** 2000; 94: 269-72.

Arnot D.E., Barnwell J.W., Tam J.P., Nussenzweig V., Nussenzweig R.S. Circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax* gene cloning and characterization of the immunodominant epitope. **Science** 1985; 30: 815-18.

Arruda M.E. Presença do *Plasmodium brasilianum* em macacos capturados na área de enchimento do reservatório da Usina Hidroelétrica de Tucuruí, Pará. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio J.** 1985; 80: 367-69.

Arruda M.; Carvalho M. B., Nussenzweig R.S., Maracic M., Ferreira A. W., Cochrane A. H. Potencial vectors of malaria and their diferent susceptibility to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in northern Brazil identified by immunoassay. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1986; 35:873-81.

Arruda M. E., Nardin E. H., Nussenzweig R. S., Cochrane A. H. Seroepidemiological studies of malaria in indian tribes and monkeys of the Amazon Basin of Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1989; 41: 379-85.

Arruda M. E., Aragaki C., Gagliardi F., Haile R. W. A seroprevalence and descriptive epidemiological study of malaria among Indian tribes of the Amazon basin of Brazil. **Ann. Trop. Med. Parasit.** 1996; 90: 135-43.

Arruda M. E., De Souza R. C., Veiga M. E., Ferreira A. F., Zimmerman R. H. Prevalence of *Plasmodium vivax* variants VK247 and *P. vivax*-like human malaria: a retrospective study in Indian populations of the Amazon region of Brazil. **Trans. Roy. Soc. Trop. Méd. Hyg.** 1998; 92: 628.

Ávila S. L. M., Leandro M. C., Carvalho N. B., Oliveira M. S., Arruk V. C., Sanchez M. C.; Boulos M., Ferreira A. W. Evalution of different methods for *Plasmodia* detection in well defined population groups in an endemic area of Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 1994; 36: 157-62.

Awadalla, P.; Walliker, D.; Babiker, H.; Mackinnon, M. The question of Plasmodium falciparum population structure. **T. Parasit.** 2001; 17: 35-7.

Barata, R. B. **Malária e seu controle**. São Paulo: Hucitec; 1998.

Beaudoin R. L.; Ramsey J. M.; Pacheco N. D. Antigens employed in immunodiagnostic tests for the detection of malarial antibodies.**W. H. O./MAL** 1981; (952): 1-11.

Beier, J. C.; Oster, C. N.; Onyango, F. K.; Bales, J. D.; Sherwood, J. A.; Perkins, P. V.; Chumo, D. K. Koech, D. V.; Whitmire, R. E.; Roberts, C. R.; Diggs, C. L.; Hoffman, S. L. *Plasmodium falciparum* incidence relative to entomologic inoculation rates at a site proposed for testing malaria vaccines in western Kenya. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1994; 50: 529-36.

Bidwell D. E. & Voller A. Malaria diagnosis by enzyme linked immunosrbent assays. **Brit. Med. J.** 1981; 282: 1747-8.

Branquinho M. S.; Lagos C. B. T.; Rocha R. M.; Natal D.; Barata J. M. S.; Cochrane A. H.; Nardin E.; Nussenzweig R. S.; Kloetzel J. K. Anophelines in the State of Acre, Brazil, infected with *Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax*, the variant *Plasmodium vivax* VK 247 and *Plasmodium malariae*. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1993; 87: 391-94.

Billingsley, P. F. Vector-parasite interactions for vaccine development. **Int. J. Parasit.** 1994; 24:53-8.

Branquinho M. S., Marrelli M. T., Curado I., Natal D., Barata J. M. S., Tubaki R. M., Carréri-Bruno G. C., Menezes R. T., Kloetzel J. K. Infecção do *Anopheles (Kerteszia) cruzii* por *Plasmodium vivax* e *Plasmodium vivax* variante VK247 nos Municípios de São Vicente e Juquitiba, São Paulo. **Rev. Panam. Salud Publica** 1997; 2: 189-93.

Branquinho M. S. **Estudo da transmissão de malária em população ribeirinha do estado do Amapá, Brasil – sorologia humana e uso de ELISA em anofelinos**. São Paulo, 2001. 146 p. [Tese de doutorado, Depto. Epidemiologia. Faculdade de Saúde Pública, USP].

Bruce M. D. K. Cross-species regulation of malaria in the human host. **Curr. Opin. Microbiol.** 2002; 5: 431.

Bruce-Chwatt L.J. **Essential Malariology.** 2.ed. London, William Heinemann Medical Books, 1985.

Burkot T. R.; Zavala F.; Gwadz R. W.; Collins F. H.; Nussenzweig R. S., Roberts D. R. Indentification of malaria-infected mosquitoes by a two-site enzyme-linked immunosorbent assay. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1984; 33: 227-31.

Butler D.; Maurice J.; O'Brien C. Time to put malaria control on the global agenda **Nature** 1997; 386: 535-36.

Camargo L.M.A. **A malária autóctone do litoral sul do estado de São Paulo.** São Paulo, 1992. 69p. [Dissertação de Mestrado - Escola Paulista de Medicina].

Camargo E. P.; Alves F.; Silva L. H. P. Symptomless *Plasmodium vivax* infections in native Amazonians. **Lancet** 1999a; 353: 11-3.

Camargo L. M. A.; Noronha E.; Salcedo J. M. V.; Dutra A. P.; Krieger H.; Silva L. H. P.; Camargo E. P. The epidemiology of malaria in Rondonia (Western Amazon region, Brazil): study of a riverine population. **Acta Trop.** 1999b; 72: 1-11.

Campbell, G. H.; Aley, S. B.; Ballou, W. R.; Hoffman, S. L.; Nardin, E. H.; Nussenzweig, R. S.; Nussenzweig, V.; Young, J. F.; Zavala, F. Use of synthetic and recombinant peptides in the study of host-parasite interactions in the malarias. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1987; 37: 428-44,.

Canadian Council on Animal Care. **Guide to the Care and Use of Experimental Animals**. 2 vols. Ottawa, 1980-1984.

Carvalho, M. E.; Glasser, C. M.; Santos, L. A.; Ciaravolo, R. M. C.; Nota sobre o encontro de casos autóctones de malária vivax por meio de técnica sorológica em São Paulo. **Cad. Saúde Pública, R. J.** 1985; 1: 251-53.

Carvalho, M. E.; Glasser, C. M.; Ciaravolo, R. M. C.; Etzel, A.; Santos, L.A.; Ferreira, C.S. Sorologia de malária vivax no foco Aldeia dos índios, município de Peruíbe, estado de São Paulo, 1984 a 1986. **Cad. Saúde Pública, R.J.,** 1988; 4: 276-92.

Cavasini, M.T.V.; Ribeiro, W. L.; Kawamoto, F.; Ferreira, M. U. How prevalent is *Plasmodium malariae* in Rondônia, Western Brazilian Amazon? **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 2000; 33: 489-92.

Ceneviva, A. C. & Camargo, M. E. *Plasmodium gallinaceum* parasitized chicken erythrocytes in a practical hemagglutination test for IgM antibodies in human malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1979; 28: 622-26.

Cerqueira, N. L. Distribuição geográfica dos mosquitos da Amazônia (Diptera: Culicidae: Culicinae). **Rev. Brasil. Ent.** 1961; 10:111-68.

Ciaravolo, R. M. C.; Carreri, G. C. B.; Glasser, C. M.; Tubaki, R. M. Resultados preliminares de atividade de culicídeos em foco de malária em Peruíbe, São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, Curitiba, PR, 1988. **Resumos** p. 81.

Consoli, R. A. G. B. & Lourenço-de-Oliveira, R. **Principais mosquitos de importância epidemiológica no Brasil**. Editora Fiocruz, 228p, 1998.

Clark, H.C. Progress in the survey for blood parasites of the wild monkeys of Panamá. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1931; 11: 11-20.

Coatney, G.R.; Collins, W.E.; Warren, M.; Contacos, P.G. **The primates malaria.** U.S. Government printing office, Washington, 1971.

Cochrane, A.H.; Aikawa, M.; Jeng, M.; Nussenzweig, R.S. Antibody-induced ultrastructural changes of malarial sporozoites. **J. Immunol.** 1976; 116: 859-67.

Cochrane, A.H.; Collins, W.E.; Nussenzweig, R.S. Monoclonal antibody identifies circumsporozoite protein of *Plasmodium malariae* and detects a common epitope on *Plasmodium brasilianum* sporozoites. **Infect. Immun.** 1984; 45: 592-95.

Cochrane, A H.; Nardin, E. H.; Arruda, M. E.; Maracic, M.; Clavijo, P.; Collins, W. E.; Nussenzweig, R. S. Widespread reactivity of human sera with a variant repeat of the circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1990; 43: 446-51.

Colllins, W. E.; Skinner, J. C.; Jeferry, G. M. Studies of the persistence of malarial antibody response. **Am. J. Epidemiol.** 1968; 87: 592-98.

Collins, W. E. & Skinner, J. C. The indirect fluorescent antibody test for malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1972; 21: 690-95.

Collins, W. E.; Lunde, M. N.; Skinner, J. C. Development of antibodies to *Plasmodium vivax* as mesured by two different techniques. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1975; 24: 412-16.

Collins, W.E. Major animal models in malaria research: simian. In: **Principles and Practices of Malariology.** 1.ed., Edinburgh, Churchill Livingston, p.1473-501, 1988.

Consoli, R. A. G. B. & Lourenço-de-Oliveira, R. **Principais mosquitos de importância epidemiológica no Brasil**. Editora Fiocruz, 228 p., 1994.

Corrêa, R. R. Os vetores de malária no Estado de São Paulo. **Arq. Hyg. Saúde Públ., 19**: 119-32, 1943.

Corrêa, R. R. Observações sobre o vôo de *Anopheles (Kerteszia) cruzii* e do *An. (Ker.) bellator*, vetores de malária. **Arq. Hig. Saúde Públ., 26:** 333-42, 1961.

Curado, I. **Soroepidemiologia de malária em áreas de baixa endemicidade no Estado de São Paulo**. São Paulo, 1995. 131p. [Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biomédicas USP].

Curado, I.; Duarte, A.M.R.C.; Lal, A.A.; Oliveira, S.G. Kloetzel, J.K. Antibodies anti-bloodstream and circumsporozoite antigens (*Plasmodium vivax* and *Plasmodium malariaeIP.brasilianum*) in areas of very low malaria endemicity in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, R. J.** 1997; 92: 235-43.

Dame, J.B.; Williams, J.L.; McCutchan, T.F.; Weber, J.L.; Hockmeyer, W.T.; Maloy, W.L.; Haynes, J.D.; Schneider, I.; Roberts, D. Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Science** 1984; 225: 593-99.

Deane, L. M.; Causey, O. R. & Deane, M. P. Notas sobre a distribuição e a biologia dos anofelinos das regiões Nordestina e Amazônica do Brasil. **Rev. Serv. Esp. Saúde Públ.** 1948; 1: 827-966.

Deane, L. M.; Damasceno, R. G. & Arouck, R. Distribuição vertical de mosquitos em uma floresta dos arredores de Belém, Pará. **Folia Clinica et Biologica** 1953; 20: 101-10.

Deane, L. M.; Deane, M. P.; Ferreira Neto, J. Studies on transmission of simian malaria and on a natural infection of man with *Plasmodium simium* in Brazil. **Bull. W.H.O.** 1966a; 35: 805-8.

Deane, L. M.; Okumura, M.; Souza, H. B. W. T. Malária de macacos dos arredores de São Paulo, VI: infecção experimental de macaco coatá *Ateles paniscus* pelo *Plasmodium simium*. **Rev. Paul. Med.** 1966b; 68: 181-92.

Deane, L.M.; Ferreira Neto, J.A.; Sitônio, J.G. Novo hospedeiro natural do *Plasmodium simium* e do *Plasmodium brasilianum*: O mono, *Brachyteles arachnoides*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 1968; 10: 287-8.

Deane, L.M.; Ferreira Neto, J.A.; Okumura, M.; Ferreira, M.O. Malaria Parasites of Brazilians Monkeys. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 1969a ; 11: 71-86.

Deane, L. M. & Ferreira Neto, J. A. Malária em macacos do Estado do Rio Grande do Sul. Observações preliminares. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 1969b; 11: 299-305.

Deane, L. M. Plasmodia of monkeys and malaria erradication in Brazil. **Rev. Lat. Amer. Microbiol. Parasitol.** 1969c ; 11: 69-73.

Deane, L. M.; Ferreira Neto, J. A.; Deane, M. P.; Silveira, I. P. S. *Anopheles (Kerteszia) cruzii,* a natural vector of the monkey malaria parasites, *Plasmodium simium* and *Plasmodium brasilianum.* **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1970; 64: 647.

Deane, L.M. Epidemiology of simian malaria in the American Continent. **Pan Am. Health Organ Sci. Publ.** 1976; 317: 144-63.

Deane, L. M.; Ferreira Neto, J. A.; Lima, M. M. The vertical dispersion of *Anopheles (Kerteszia) cruzii* in a forest in southern Brazil suggests that human cases of malaria of simian origin might be expected. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, R. J.** 1984; 79: 461-63.

Deane, L. M. Malaria vectors in Brazil. **Mem Inst. Oswaldo Cruz** 1986; 81:5-14.

Deane, L. M.; Ribeiro, C. D.; Lourenço de Oliveira, R.; Oliveira Ferreira, J.; Guimarães, A. E. Study on the natural history of malaria in areas of the Rondonia State, Brazil and problems related to its control. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 1988; 30: 153-56.

Deane, L.M.; Lourenço-de-Oliveira, R.; Ziccardi, M.; Luz, S.L.B. Simian plasmodia and trypanosomes in Rondônia State, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, R. J.** 1989; 84: 143.

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

Dégallier, N.; Filho, G. C. S. Silva, O. V. Da & Travassos da Rosa, A. P. A. (1990). Comportamento de pouso sobre partes do corpo humano em mosquitos da Floresta Amazônica (Diptera: Culicidae). **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi, sér. Zool.** 1990; 6:97-108.

Dietze, R.; Perkins, M.; Boulos, M.; Corey, R. The diagnosis of *Plasmodium falciparum* infection using a new antigen detection system. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1995; 52: 45-9.

Downs, W. G. & Pittendrich, C. S. Bromelian malaria in Trinidad, British West Indies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1946; 26: 47-66.

Druilhe, P.; Pradier, O.; Mazier, D.; Parent, G. Levels of antibodies to *Plasmodium falciparum* sporozoite surface antigens reflect malaria transmission rates and are persistent in the absence of reinfection. **Infect. Immun.** 1986; 53: 393-97.

Duarte, A. M. R. C. **Estudo de malária em macacos silvestres brasileiros.** São Paulo, 1998. 115p. [Dissertação de mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].

Dunn, F.L. & Lambrecht, F.L. The host of *Plasmodium brasilianum* Gonder e von Berenberg-Gossler. **J. Parasitol.** 1963; 49: 316-19.

Duxbury, R. E. & Sadun, E. H. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1964; 13: 525-29.

Dye, C. & Targett, G. A theory of malaria vaccination. **Nature.**1994; 370: 95-6.

Engvall, E. & Perlmann, P. Enzyme linked-immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochem.** 1971; 8: 871-74.

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

Esposito, F.; Lombardi, S.; Modiano, D.; Zavala, F.; Reeme, J.; Lamizana, L.; Coluzzi, M.; Nussenzweig, R. S. Prevalence and levels of antibodies to the circumsporozoite protein of Plasmodium falciparum in an endemic area and their relationship to resistance against malaria infection. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1988; 82: 827-32.

Fandeur, T.; Volney, B.; Peneau, C.; Thoisy, B. De. Monkeys of the rainforest in French Guiana are natural reservoirs for *P. brasilianum/ P. malariae* malaria. **Parasitology** 2000; 120: 11-21.

Faran, M. E. & Linthicum, K. J. A handbook of the Amazonian species of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae). **Mosq. Syst.** 1981; 13: 1-81.

Ferreira, E.; Corrêa, R. R.; Tomich, A.; Sá, F. T. Estudo sobre o raio de vôo do *Anopheles (Kerteszia) cruzii* e do *Anopheles (Kerteszia) bellator* em Guaratuba, litoral do Estado do Paraná, Brasil. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.** 1969; 21: 819-22.

Ferreira, A. W. Immunodiagnosis of Malaria. In: Antuñano, F. J. & Schmunis, G. Diagnostico de la Malaria. Washington. **Organizaction Panamericana de la Salud., p.65-67 (Publicacion Cientifica n. 512), 1988.**

Ferreira, A.W. & Sanchez, M.C. A. Malária humana: padronização e optimização de testes sorológicos para diagnóstico individual e inquéritos soroepidemiológicos. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 1988; 30: 137-46.

Ferreira, M. U.; Kimura, E. S.; Camargo, L. M. A.; Alexandre, C. O. P.; Pereira da Silva, L. H.; Katzin, A. M. Antibody response against *Plasmodium falciparum* exoantigens and somatic antigens: a longitudinal survey in a rural community in Rondônia, Western Brazilian Amazon. **Act. Trop.** 1994; 57: 35-46.

Fonseca, F. Plasmódio de Primata do Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio J.** 1951; 49: 543-51.

Forattini, O.P. **Entomologia Médica**. 6.ed. São Paulo, Edgard Blucher,. V.4 p.316-402, 1962.

Forattini, O. P. **Entomologia Médica**. 6.ed. São Paulo. Edgard Blucher,. V.1. 506p, 1965a.

Forattini, O. P. **Entomologia Médica**. 6ed. São Paulo. Edgard Blucher,. V.3 416p, 1965b.

Forattini, O. P.; Gomes, A.; Natal, D.; Santos, J. L. F. 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.

Forattini, O. P., Kakitani, I., Massad, E., Gomes, A. C. Studies on mosquitoes (Díptera: Culicidae) and anthropic environment. 1. Parity of blood seeking Anopheles (Kerteszia) in South-Eastern Brazil. **Rev. Saúde Pública** 1993; 27: 1-8.

Forattini, O. P., Kakitani, I., Santos, R. La C., Ueno, H. M., Kobayashi, K. M. Role of *Anopheles (Kerteszia) bellator* as malaria vector in southastern Brazil (Díptera: Culicidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1999; 94: 715-18.

Franke, E. D.; Lucas, C. M.; Roman, E. S.; Wirtz, R. A. Prevalence of antibody to the variant repeat of the circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax* in Peru. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1992; 46: 708-10.

Fundação Nacional da Saúde. Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Amazônia Legal, 2002 (Ministério da Saúde/FUNASA). Disponível: http//www.funasa.gov.br [2002] (FUNASA: on line)

Galvão, A.; Damasceno, R. G.; MArques, A. P. Algumas observações sobre a biologia de anofelinos de importância epidemiológica em Belém, Pará. **Arquivos de Higiene, R. J.** 1942; 12:51-111.

Galvão-Castro, B.; Sá-Ferreira, J. A.; Marzochi, K. F.; Coutinho, M. C.; Coutinho, S. G.; Lambert, P. H. Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human american visceral leishmaniasis. **Clin. Exp. Immunol.** 1984; 56: 58-66.

Garrett-Jones, C. Prognosis for the interpretation of malaria transmition through assessment of the mosquitos vectorial capacity. **Nature** 1964; 204: 1173-175.

Gnaspini-Netto, P. & Trajano, E. Província espeleológica do Vale do Ribeira, região da Fazenda Intervales, São Paulo: exploração, topografia e biologia **Espeleo-Tema** 1992; 16: 41-74.

Goldman, I.F.; Qari, S.H.; Millet, P.G.; Collins, W.E.; Lal, A.A. Circumsporozoite protein gene of *Plasmodium simium*, a *Plasmodium vivax*-like monkey malaria parasite. **Mol. Biochem. Parasitol.** 1993; 57: 177-80.

Gomes, A. C.; Forattini, O. P.; Natal, D. Composição e atividade de mosquitos Culicidae. Emprego de armadilha CDC no Vale do Ribeira, estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Pública, São Paulo** 1987; 21: 363-70.

Gonzalez-Ceron, L.; Rodríguez, M. H.; Entel, J. C.; Villarreal, C.; Kain, K. C.; Hernández, J. E Differential susceptibilities of *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis* to infections with coindigenous *Plasmodium vivax* variants VK210 and VK247 in southern Mexico. **Infect. Immunity** 1999; 67: 410-12.

Greenwood, B. M. Immune responses to sporozoite antigens and their relationship to naturally acquired immunity to malaria. **Bull. W. H. O.** 1990; 68: 184-90.

Greenwood, B. & Mutabingwa, T. Malaria in 2002. **Nature** 2002; 415: 670-72.

Guarita, O. F. & Costa, F. D. A. Interrupção da transmissão de malária no município de Cananéia. **Arq. Hyg. Saúde Públ.** 1965; 30: 47-60.

Guimarães, M. C. S.; Celeste, B. J.; Oliveira, V. P. Q.; Franco, E. L. F. Soroepidemiologia de leishmaniose mucocutânea. Concomitância de anticorpos anti-*P. falciparum*. Rev. Inst. Méd. trop. São Paulo. 1983; 25:108-12.

Guimarães, A. E. & Arlé, M. Mosquitos no Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. I - Distribiução estacional. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, R. J.** 1984; 79: 309-23.

Guimarães, A. E.; Arlé, M.; Machado, R. N. M. Mosquitos no Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. II - Distribuição vertical. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, R. J.** 1985; 80: 171-85.

Hall, C. L.; Haunes, J. D.; Diggs, C. L. Cultured *Plasmodium falciparum* used as in a malaria indirect fluorescent antibody test. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1978; 27: 849-52.

Hay, S. I.; Rogers, D. J.; Toomer, J. F.; Snow, R. W. Annual P. falciparum entomological inoculation rates (EIR) across Africa: literature survey, internet access and review. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** 2000; 94: 13-127.

Hayes, J. & Ferraroni, J. Malaria along pionneer highways in the Brazilian Amazon. **Ciência e Cultura** 1980; 33: 924-28.

Jensen, J. B. Concentrationfrom continuos culture of erythrocytes infected with trophozoites and schizonts of *Plasmodium falciparum*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1978; 27: 1274-276.

Kagan, I. G. Evaluation of the indirect hemmaglutination test an epidemiologic technique for malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1992; 25: 683-89.

Kain, C. K.; Brown, A. E.; Lanar, D. E.; Ballou, W. R.; Webster, H. K. Response of *Plasmodium vivax* variants to chloroquine as determined by microscopy and quantitative polymerase chain reaction. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1993; 49: 478-84.

Karmann, I. & Ferrari, J. A. Carste e cavernas do Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira (PETAR), sul do estado de São Paulo, 1999 (www.unb.br/sigep) sigep 43.

Kawamoto, F.; Win, T. T.; Mizuno, S.; Lin, K.; Tantulart, I. S.; Mason, D.P.; Kimura, M.; Wongsrichanalai, C. Unusual *Plasmodium malariae*-like parasites in southeast Asia. **J. Parasitol.** 2002; 88: 350-57

Kemp, D. J.; Coppel, R. L.; Anders, R. F. Repetitive proteins and genes of malaria. **Annu. Rev. Microbiol.** 1987; 41: 181-208.

Kimura, M.; Kaneko, O.; Liu, Q.; Zhou, M.; Kawamoto, F.; Wataya, Y.; Otani, S.; Yamaguchi, Y.; Tanabe, K. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. **Parasitol. Intern.** 1997; 46: 91-95.

Klein, T.A. & Lima, J. C. B. P. Seasonal distribution and biting patterns of *Anopheles* mosquitoes in Costa Marques, Rondonia, Brazil. **J. Am. Mosq. Control Assoc.** 1990; 6:700-707.

Klein, T.A.; Lima, J. C. B. P.; Tada, M. S. Comparative susceptibility of anopheline mosquitoes to *Plasmodium falciparum* in Rondônia, Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1991a ; 44:598-603.

Klein, T.A.; Lima, J. C. B. P.; Tada, M. S.; Miller, R. Comparative susceptibility of anopheline mosquitoes in Rondônia, Brazil, to infection by *P. vivax*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1991b; 45:463-70.

Klein, T.A.; Lima, J. C. B. P ; Tang, A. T. Seasonal distribution and diel biting patterns of Culicine mosquitoes in Costa Marques, Rondonia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, R. J.** 1992; 87:141-148.

Knobloch, J.; Schreiber, M.; Grokhovsky, S.; Scherf, A. Specific and nonspecific immunodiagnostic properties of recombinant and synthetic *Plasmodium falciparum* antigens. **Eur. J. Clin. Microbiol.** 1987; 6: 547-51.

Kremsner, P. G.; Zotter, G. M.; Rocha, R. M.; Maracic, M.; Clavijo, P.; Nussenzweig, R. S.; Cochrane, A. H. Prevalence and level of antibodies to the circumsporozoite proteins of human malaria parasites, including a variant of *Plasmodium vivax*, in the population of two epidemiologically distinct areas in the State of Acre, Brazil. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1992; 86: 23-7.

Krotoski, W. A.; Collins, W. E.; Bray, R. S.; Garnham, P. C. C.; Cogswell, F. B.; Gwadz, R. W.; Killick-Kendrick, R.; Wolf, R.; Sinden, R.; Koontz, L. C.; Stanfill, P. S. Demonstration of hipnozoites in sporozoite-transmitted *Plasmodium vivax* infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1982; 31: 1291-293.

Kumm, H. W. & Novis, O. Mosquito studies on the Ilha do Marajó, Pará, Brazil. **Amer. Jour. Hyg.** 1938; 27:498-515.

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

Kuvin, S. F.; Tobie, J. E.; Evans, C. B.; Coatney, G. R.; Contacos, P. G. 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.

Lal, A.A.; De La Cruz, V.F.; Collins, W.E.; Campbell, G.H.; Procell, P.M.; McCutchan, T.F. Circumsporozoite protein gene from *Plasmodium brasilianum*. Animal reservoirs for human malaria parasites? **J. Biol. Chem.** 1988a; 263: 5495-498.

Lal, A.A.; De la Cruz, V.F.; Campbell, G.H.; Procell, P.M.; Collins, W.E.; McCutchan, T.F. Structure of the circumsporozoite gene of *Plasmodium malariae*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 1988b; 30: 291-94.

Lal, A.A. & Goldman, I.F. Circumsporozoite protein gene from *Plasmodium reichenowi*, a chimpanzee malaria parasite evolutionary related to the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **J. Biol. Chem.** 1991; 266: 6686-689.

Lensen, A. H. W. Infectivity of malarial parasites to mosquitoes: "the interdependence roles of parasites, vector and host". **Annals of Trop. Med. Parasit.** 1996; 90: 359-65.

Li, J.; Collins, W. E.; Wirtz, R. A.; Rathore, D.; Lal, A.; McCutchan, T. F. Geographic subdivision of the range of the malaria parasite *Plasmodium vivax*. **Em. Inf. Dis.** 2001; 7: 35-41.

Lim, C. S.; Kim, Y. K.; Lee, S. H.; Kim, K. J.; Hoffman, K. J.; Song, J. W. The analysis of circumsporozoite-protein gene sequences from South Korean isolates of *Plasmodium vivax*. **An. Trop. Med. Paras.** 2001; 95: 229-35.

Lobel, H. O. Indications and usefulness of serological techniques in epidemiological investigation and assesment. **WHO/MAL** 1981; 967: 1-11.

Lopes, J.; Arias, J. R.; Yood, D. C. Evidências preliminares de estratificação vertical de postura de ovos por alguns Culicidae (Diptera), em floresta no município de Manaus - Amazonas. **Acta Amazon.** 1983; 13: 431-39.

López Antuñano, F. J. Estandarización de las pruebas de immunofluorescencia indirecta (IFI) para malaria. **PAHO/WHO Interoffice Memorandum**, 1984.

López Antuñano, F.J. & Schmunis, G. Diagnóstico de malária. **Pan. Am. Health Organ. Publ. Cient** 1988; 512.

Lourenço-de-Oliveira, R. & Deane, L. M. Simian malaria at two sites in the Brazilian Amazon. I – The infection rates of *Plasmodium brasilianum* in non-human primates. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, R. J. 1995; 90: 331-39.

Lourenço-de-Oliveira, R. & Luz, S. L. B. Simian malaria at two sites in the Brasilian Amazon - II. Vertical distribution and frequency of anopheline species inside and outside the forest. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1996; 91: 687-94.

Lourenço-de-Oliveira, R. Hemoparasitos encontrados em alguns mamíferos de Balbina. Estado do Amazonas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, R. J.** 1988; 83: 233.

Lourenço-de-Oliveira, R. Natural infection of golden lion tamarin, *Leontopithecus rosalia*, with *Trypanosoma cruzi*, in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio J.** 1990; 85: 15.

Luiby, J. P.; Collins, W. E.; Kaiser, R. L. Persistence of malarial antibody: findings in patients infected during the outbreak of malaria in Lake Vera, California, 1952-1953. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1967; 16: 255-57.

Luz, E.; Consolim, J.; Vieira, A. M.; Borba, A. M. Sobre a longevidade de *Anopheles cruzii* em laboratório (Diptera, Culicidae). **Arq. Biol. Tecnol.** 1977; 20: 27-30.

Luz, E.; Consolim, J.; Vieira, A. M.; Borba, A. M. Alguns aspectos epidemiológicos da persistência de transmissão de malária no litoral paranaense. I - Idade fisiológica de *Anopheles cruzii* (Diptera, Culicidae). **Arq. Biol. Tecnol.** 1979; 22: 68-88.

Machado, R. L. D. & Povoa, M. M. Distribution of *Plasmodium vivax* variants (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) in three endemic areas of the Amazon region of Brazil and their correlation with chloroquine treatment. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** 2000; 94: 377-81.

MacDonald, G. **The epidemiology and control of malaria**. Oxford Press, 1957.

Maheswary, N. P.; Perpanich, B.; Rosenberg, R. Presence of antibody to a heterologous circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax* (VK247) in south-eastern Bangladesh. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1992; 86: 28.

Malafronte, R. S.; Valdívia, J. L.; Nakaie, C. R.; Kloetzel, J. K. Seasonal variation of anti-RESA/Pf155 *Plasmodium falciparum* antibodies in three localities from the State of Amapá, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 1994; 36: 237-43.

Marinkelle, C.J. & Grose, E.S. *Plasmodium brasilianum* in colombian monkeys. **Trop. Geogr. Med.** 1968; 20: 276-80.

Marrelli, M. T.; Branquinho, M. S.; Hoffmann, H. E.; Taipe-Lagos, C. B.; Natal, D.; Kloetzel, J. K. Correlation between positive serology for *Plasmodium vivax*-like/*Plasmodium simiovale* malaria parasites in the human and anopheline populations in the State of Acre, Brazil. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1998; 92: 149-51.

Mattos, M. S.; Oliveira-Ferreira, J.; Castro, M. G.; Oliveira, R. L. Malária autóctone no município de Nova Friburgo - R. J. IV Reunião Nacional dos Pesquisadores em Malária, Manaus, AM, Brazil. Proceedings, p. 23, **Summary** 13, 1993.

McCutchan, T. F.; Lal, A. A.; Cruz, V. F.; Miller, L.H.; Maloy, W.L.; Charoenvit, Y.; Beaudoin, R. L.; Guerry, P.; Wistar, R.; Hoffman, S.L.; Hockmeyer, W. T.; Collins, W. E.; Wirth, D. Sequence of the immunodominant epitope for the surface protein on sporozoites of *Plasmodium vivax*. **Science** 1985; 230: 1381-383.

Ministério da Saúde, Brasil. Fundaçâo Nacional de Saúde, 2000. **Casos de malária no Brasil**. *DATASUS, Internet.*

Molineaux, L. Entomological parameters in the epidemiology and control of vector-borne diseases. **In: Medical Entomology Centenary. Sym. Proc. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** 100-105, 1978.

Namsiripongpun, V.; Wilde, H.; Tiersansem, P. Field study of an antigen-detection ELISA specific for *Plasmodium falciparum* malaria. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1993; 87: 32-4.

Nardin, E. H.; Nussenzweig, R. S.; Bryan, J. H. Antibodies to sporozoites: their frequent occurence in individuals living an area of hyperendemic malaria. **Science** 1979; 206: 597-99.

Nardin, E.H.; Nussenzweig, V.; Nussenzweig, R.S.; Collins, W.E.; Harinasuta, K.T.; Tapchaisri, P.; Chomcham, Y. Circumsporozoite proteins of human malaria parasites *Plasmodium falciparum* and *P.vivax*. **J. Exp. Med.** 1982; 156: 20-30.

NIMER, E. **Geografia do Brasil** - Região Sudeste. IBGE - Rio de Janeiro. 667 p. 1977.

Nussenzweig, R. S.; Vanderberg, J.; Most, H. Protective immunity by the injection of X-irradiated sporozoite of *Plasmodium berghei* IV: dose response. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1969; 22: 170-75.

Nussenzweig, R.S.; Montuori, W.; Spitalny, G.L.; Ghen, D. Antibodies against sporozoites of human and simian malaria produced in rats. **J. Immunol.** 1973; 110: 600-01.

Nussenzweig, R.S. & Nussenzweig, V. Development of sporozoite vaccines. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.)** 1984; 307: 117.

Nussenzweig, V. & Nussenzweig, R. S. Circumsporozoite proteins of malaria parasites. **Cell** 1985; 42: 401-03.

Oliveira, D.A., Qari, S.; Machado, R.L.D.; Oliveira, S.; Póvoa, M.; Collins, W.; Lal, A.A. Prevalence of *P.vivax*-like malaria parasite in a malaria endemic region of Brazil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA 14, **Resumos.** p. 236, 1995.

Oliveira-Fereira, J.; Lourenço-de-Oliveira, R.; Teva, A.; Deane, L. M.; Daniel-Ribeiro, C. T. Natural malaria infections in anophelines in Rondonia State, Brazilian Amazon. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** ; 1990; 43: 6-10.

Ollomo, B.; Karch, S.; Bureau, P.; Elissa, N.; Georges, A.J.; Millet, P. Lack of malaria parasite transmission between apes and humans in Gabon. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1997; 56: 440-45.

Oskam, L.; Schoone, G. J.; Kroon, C. M.; Lujan, R.; Davies, J. B. Polymerase chain reaction for detecting Onchocerca volvulus in pools of blackflies. **Trop. Med. Intern. Health** 1996; 4: 522-27.

Pan American Health Organization (PAHO). **Status of malaria in the Americas.** PAHO/HCP/HCT/98, 1998.

Phillipson, J. D. New drugs from nature - It could be yew. **Phytotherapy Research** 1999; 13: 2-8.

Philpott, J.; Reid, A.; Wirtz, R. A.; Szarfman, A. Effect of malaria chemoprofylaxis on the development of antibodies to *Plasmodium falciparum* in expatrietes living in West Africa. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1990; 42: 28-35.

Porter, J.A.; Johnson, C.M.; Souza, L. Prevalence of malaria in Panamanian primates. **J. Parasitol.** 1966; 52: 669-70.

Póvoa, M. M.; Segura, M. N. O.; Lacerda, R.; Vaz da Silva, O.; Almeida, R. N.; Lesse, R.; Rosário, V.; Milesma,; Warhust, D. C. Anophelines infected with human *Plasmodium* in the Serra do Navio region of Amapá State, Brazil. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1993; 87:381.

Póvoa, M. M.; Machado, R. L. D.; Segura, M. N. O.; Vianna, M. R.; Vasconcelos, A. S.; Conn, J. E. Infectivity of malaria vector mosquitoes: correlation of positivity between ELISA and PCR-ELISA tests. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** 2000; 94: 106-07.

Prata, A.; Urdaneta, M.; McGreevy, P. B.; Tada, S. Infrequency of asymptomatic malaria in an endemic area in Amazonas, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**1988; 21: 51-4.

Qari, S.H.; Shi, Y.; Goldman, I.F.; Udhayakumar,V.; Alpers, M.P.; Collins, W.E.; Lal, A. A. Identification of *Plasmodium vivax*-like human malaria parasite. **Lancet** 1993; 341: 780-83.

Rachou, R.G. Anofelinos no Brasil: comportamento das espécies vetoras de malária. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.** 1958; 10: 145-81.

Rachou, R. G. & Ferreira, M. O. As *Kerteszias* como as grandes responsáveis pela malária no litoral do estado de Santa Catarina. **Folha Médica** 1947; 28: 1-3.

Ranjit MR & Sharma YD. Genetic polymorphism of falciparum malaria vaccine candidate antigen genes among field isolates in India. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1999; 61: 103-08.

Reinert, J. F. Mosquito generic and subgeneric abbreviations (Diptera Culicidae). **Mosq. Syst.** 1975; 7: 105-10.

Rey, L. **Parasitologia**. 2. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.286-287, 1991.

Rich, S. M.; Ferreira, M. U.; Ayala, F. J. The origin of antigenic diversity in *Plasmodium falciparum*. **Parasit Today** 2000; 16: 390-96.

Rocha, J. A. M. & Mascarenhas, B. M. Observações sobre atividade de mosquitos (Diptera: Culicidae) nos arredores de Belém, Pará, Brasil. **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi, sér. Zool.** 1994;10:225-33.

Rocha, J. A. M. **Os mosquitos (Diptera: Culicidae) da Estação Científica Ferreira Penna - ECFPn, Caxiuanã, Melgaço, Pará, Brasil: ataque, sazonalidade e estratificação arbórea.** Universidade Federal do Pará/Museu Paraense Emílio Goeldi/Empresa de Pesquisas Agropecuárias, 1996, 129p. [Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Pará/PA].

Rocha, J. A. M.; Mascarenhas, B. M.; Barata, J. M. S. Os mosquitos da Estação Científica Ferreira Penna, Caxiuanã, Pará, Brasil. In: **Caxiuanã**. 440p, 1997.

Rodríguez, M. H.; Gonzalez-Ceron, L.; Hernández, J. E.; Entel, J. A.; Villarreal, C.; Kain, K. C.; Wirtz, R. A. Different prevalences of *Plasmodium vivax* phenotypes VK210 and VK247 associated with the distribution of *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis* in Mexico. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 2000; 62: 122-27.

Rosenberg, R.; Wirtz, R. A.; Lanar, D. E.; Sattabongkot, J.; Hall, T.; Waters, A.P.; Prasittisuk, C. Circumsporozoite protein heterogeneity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. **Science** 1989; 245: 973-76.

Rubio-Palis, Y.; & Curtis, C. F. Biting and resting behaviour of anophelines in western Venezuela and implications for control of malaria transmission. **Med. Vet. Entomol.** 1992; 6: 325-34.

Ryan, J. R., Dave, K., Garcia, L., Yl, L., Coleman, R. E., Sattabongkot, J., Dunton, R., Chan, A. S. T., Wirtz, R. A. Dipsticks for rapid detection of *Plasmodium* in vectoring *Anopheles* mosquitoes. **Med. Vet. Entomol.** 2001; 15: 225-30.

Sadun, E. H. The research and development of serologic test for malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1972; 21: 10-14.

Sánchez, L. E. Cavernas e paisagem cárstica do Alto Vale do Ribeira. Uma proposta de tombamento. **Espeleotema** 1984; 14: 9-21.

Sanchez, M. C. **Malária humana: avaliação do teste imunoenzimático, ELISA, na determinação de níveis de anticorpos antiplasmodiais, para estudos soroepidemiológicos e diagnóstico individual.** São Paulo, 1988. 160p. [Dissertação de doutorado - Depto. Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP].

Santos, R. C. **Medida da capacidade vetorial do *Anopheles albitarsis* e de *Anopheles (*Kerteszia*)* no Vale do Ribeira, São Paulo**, 2001. 81 p. [Tese de doutorado, Depto. De Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, USP].

Sato, K.; Yamaguchi, H.; El Gaddal, A. A.; Suzuki, M. An ABC-ELISA for malaria serology in the field. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1990; 42: 24-7.

Sattabongkot, J.; Suwanabun, N.; Rongnoparut, P.; Wirtz, R. A.; Kain, K. C.; Rosenberg, R. Comparative test of DNA probes for detection of *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein polymorphs VK 247 and VK 210. **J. Infect. Dis.** 1994; 169: 464-66.

Schiavi, A. Nota sobre mosquitos vetores em Iguape. **Arq. Hig. Saúde Pública** 1945; 10: 69-75.

Segura, M. N. O. **Estudo do *Anopheles (Nys.) darlingi* (Root, 1926) e *Anopheles (Nys.) albitarsis* (Arribalzága, 1878) (Díptera: Culicidae) como vetores de malária numa mesma área de transmissão e caracterização de espécies do complexo albitarsis.** 1998, 152 p. [Dissertação de Mestrado, UFPA/PA],.

Serrano, J.A. Infección natural de um araguato *Alouatta seniculus straminea*, por *Plasmodium brasilianum* en Venezuela. **Acta Cientif. Venezoelana** 1967; 18: 13-5.

Shahabuddin, M. & Pimenta, P. F. P. *Plasmodium gallinaceum* preferentially invades vesicular ATPase-expressing cells in *Aedes aegypti* midgut. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 1998; 95: 3385-389.

Shannon, R. Methods for collecting and feeding mosquitoes in jungle yellow fever studies. **Am. Journ. Trop. Med.** 1939; 19: 131-40.

Silva, R. S. U.; Santos, E. C. O..; Loureiro, E. C. B.; Jesus, I. M.; Camera, V. M.; Brabo, E. E. S., Fernandes, A. S.; Souza, D. M. Malária assintomática - uma das causas da perpetuação da cadeia de transmissão da malária. IV Reunião Nacional de Pesquisadores em Malária, Manaus, AM, Brazil. Proceedings, p. 31, **Summary** 21, 1993.

Sinden, R. E. The biology of *Plasmodium* in the mosquitos. **Experientia** 1984; 40: 1330-343.

Sinden, R. E. *Plasmodium* differentiation in the mosquito. **Parassitologia** 1999; 41: 139-48.

Snounou, G.; Viriyakosol, S.; Jarra, W.; Thaithong, S.; Brown, K. N. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infection. **Mol. Biochem. Parasitol.** 1993a ; 58: 283-92.

Snounou, G.; Viriyakosol, S.; Zhu, X. P.; Jarra, W.; Pinheiro, L.; do Rosário, V. E.; Thaithong, S.; Brown, K. N. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. **Mol. Bioch. Parasitol.** 1993b ; 1: 315-20.

Souto, R. N. P. **Sazonalidade de culicídeos e tentativas de isolamento de arbovírus em floresta e savana no estado do Amapá.** 1994, 98p. [Dissertação de Mestrado, UFPA/PA].

Spitalny, G. L. & Nussenzweig, R. S. *Plasmodium berghei*: relationship between protective immunity and anti-sporozoite (CSP) antibody in mice. **Exp. Parasit.** 1973; 33: 168-78.

Srivastava, I. K.; Schmidt, M.; Bouvier, M.; Dobeli, H.; Perrin, L. H. Comparative evaluation of an ELISA based on recombination and IFA for serology of malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1991; 94: 189-94.

Sudia, W. D. & Chamberlain, R. W. Battery operated light trap, an improved model. **Mosquitos News** 1962; 22:126-29.

Sulzer, A. J.; Wilson, M.; Hall, E. C. Indirect fluorescent antibody test for parasitic diseases. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1969; 18: 199-205.

Superintendência de Controle de Endemias - Relatório de foco de Malária, Engenheiro Ferraz. São Paulo, SUCEN, 1993.

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

Superintendência de Controle de Endemias – Dados epidemiológicos da malária em São Paulo. Disponível em URL:http//www.sucen.sp.gov.br [2000] (SUCEN – on line).

Tadei, W. P. & Correia, J. M. Biologia de anofelinos amazônicos. IV. Observações sobre a atividade de picar de *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). **Acta Amazon.** 1982; 12:71-4.

Tadei, W. P.; Mascarenhas, B. M.; Podestá, M. G. Biologia de anofelinos amazônicos. VII. Conhecimentos sobre a distribuição de espécies de *Anopheles* na região de Tucuruí-Marabá (Pará). **Acta Amazon.** 1983; 13:103-40.

Tadei, W. P.; Dutary, T. B., Santos, J. M. M.; Scarpassa, V. M.; Rodrigues, I. B.; Rafael, M. S. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1998; 59: 325-35.

Target, G. A. T. Antibody response to *Plasmodium falciparum* malaria: comparison of immunoglobulin concentration antibody titers and antigenicity of different assexual stages of the parasite. **Clin. Exp. Immunol.** 1970; 7: 501-17.

Taylor, D. W. & Voller, A. The development and validation of a simple antigen detection ELISA for *Plasmodium falciparum* malaria. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1993; 87: 29-31.

Tubaki, R. M. **Observações sobre o comportamento de culicídeos com ênfase em anofelinos (Diptera: Culicidae) em área endêmica de malária em Porto Velho, RO.** 1994. 56p. [Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].

Vanderberg, J.P.; Nussenzweig, R.S.; Most, H. Protective immunity by the injection of X-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*: in vitro effects of immune serum on sporozoites. **Mil. Med.** 1969; 134: 1183-190.

Vanderberg, J. P. Development of infectivity by the *Plasmodium berghei* sporozoite. **J. Parasitol.** 1975; 61: 43-50.

Vieira, C. V. Lista remissiva dos mamíferos do Brasil. **Arq. Zool. Estado de São Paulo** 1955; 8: 375-98.

Voller, A. A microplate method of enzyme linked immunosorbent assay and its application to malaria. **Bull W. H. O.** 1974; 51: 10-15.

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

Voorham, J., Os N. van, Kaay, H. J. van der. Reappearance of *Plasmodium malariae* in Suriname? **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1993; 87: 243-44.

Warhurst, D. C.; Tucker, J. M.; Póvoa, M. M.; Grenn, P. J. Unusual *Plasmodium* related to *P. simiovale*. **Lancet** 1993; 341:1408.

Waters, D. C. & McCutchan, T. F. Rapid, sensitive diagnosis of malaria based on ribosomal RNA. **Lancet** 1989; 1: 343-44.

Wells, L. & Ala, F. A. Malaria and blood transfusion. **Lancet** 1985; 1: 1317-318.

Win, T.T.; Lin, K.; Mizuno, S.; Zhou, M.; Liu, Q.; Ferreira, M. U.; Tantular, I. S.; Kojima, S.; Ishii, A.; Kawamoto, F. Wide distribution of *Plasmodium ovale* in Myanmar. **Trop. Med. Intern. Health** 2002; 7: 231-39.

World Health Organization. Malaria diagnosis. **WHO/TDR/MAL**, 1045, 1988.

World Health Organization (WHO). World malaria situation in 1992. **Weekly Epidemiol. Rec.** 1994; 69: 309-16.

World Health Organization. Tratamento da malária não complicada e uso de medicamentos antimaláricos para a proteção de viajantes. Brasília, 1075, 1996.

World Health Organization. Expert Committee on malaria. WHO Tech Rep Ser; 2000. (WHO – Twentieth Report, 892).

Zavala, F.; Gwadz, R. W.; Collins, F. H.; Nussenzweig, R. S.; Nussenzweig, V. Monoclonal antibodies to circumsporozoite proteins identify the species of malaria parasite in infected mosquitoes. **Nature** 1982; 299: 737-38.

Zavala, F.; Cochrane, A H.; Nardin, E. H.; Nussenzweig, R. S.; Nussenzweig, V. Circumsporozoite proteins of malaria parasites contain a single immunodominant regin with two or more identical epitopes. **J. Exp. Med.** 1983; 157: 1947-957.

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

Zavortink, T. J. Mosquito studies (Diptera, Culicidae). XXIX. A review of the subgenus *Kerteszia* of *Anopheles*. **Contrib. Am. Entomol. Inst. (Ann Arbor)** 1973; 9: 1-54.

Zimmerman, R. H.; Berti, J. The importance of integrated control of malaria for the preservation of wetlands in Latin America. **In: Global Wetlands, Old and New.** New York (NY): ed. W. J. Mitsch. Elsevier Press. 1992. p.530.

Zimmerman R. H. & Voorham J. The use of impregnated bed nets and other materials for the control of malaria in the Americas. **Pan. Amer. J. Public Health** 1997; 2: 18-25.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – COEP
Av. Dr. Arnaldo, 715 – CEP 01246-904 – São Paulo – Brasil
Telefones: (55-11) 3066- 7779 – fone/fax (55-11) 3064 -7314 – e-mail: mdgracas@usp.br

Of.COEP/190/01 **Anexo I**

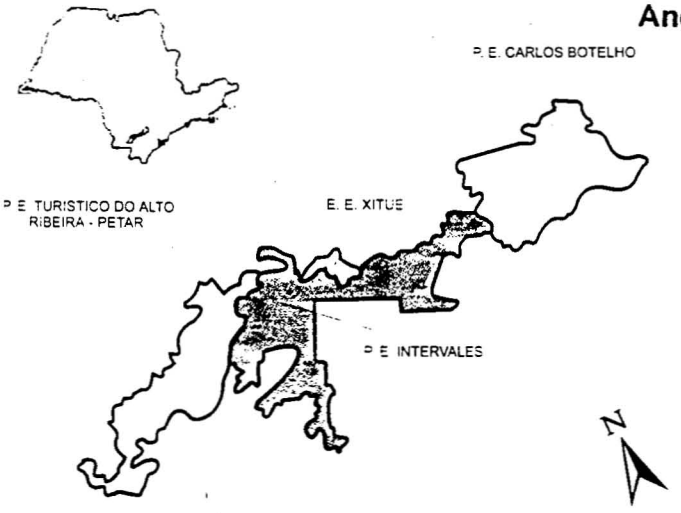
12 de setembro de 2001

Pelo presente, informo que o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo-COEP, **analisou e aprovou** em sua 7.ª/01 Sessão Ordinária, realizada em 11.09.01, de acordo com os requisitos da Resolução CNS/196/96, o protocolo de pesquisa n.° 545, intitulado "ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO SOBRE A MALÁRIA HUMANA E SIMIANA E INFECÇÃO DE ANOFELINOS EM ÁREAS DE BAIXA ENDEMICIDADE NO ESTADO DE SÃO PAULO", apresentado pela pesquisadora Izilda Curado.

Atenciosamente,

Paulo Antonio de Carvalho Fortes
Professor Associado
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da FSP-COEP

Anexo II



ÁREAS PROTEGIDAS

O Parque Estadual Intervales juntamente com as unidades de conservação vizinhas - Parque Estadual Carlos Botelho, Estação Ecológica de Xitué e Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira (PETAR) - representam uma das áreas prioritárias da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica. Em associação com a Zona de Vida Silvestre da Área de Proteção Ambiental (APA) da Serra do Mar e a parte norte do Parque Estadual de Jacupiranga, compõem o chamado *continuum* ecológico de Paranapiacaba, com mais de 120.000 ha, um dos mais significativos trechos protegidos da Mata Atlântica.

FUNDAÇÃO FLORESTAL

A Fundação Florestal, órgão vinculado à Secretaria de Estado do Meio Ambiente, administra o Parque Estadual Intervales segundo as diretrizes básicas de integração regional, gestão aberta e participativa e busca da sustentabilidade econômica. O Parque Estadual Intervales desenvolve vários programas, tendo como objetivo principal a conservação da Mata Atlântica:

- a visitação pública, que gera recursos financeiros aplicados no próprio Parque
- a vigilância, que assegura de forma rigorosa a integridade da área
- as pesquisas científicas, que ampliam o conhecimento sobre a floresta
- o programa de integração regional, que procura envolver as comunidades vizinhas

O Parque Estadual Intervales faz ainda parcerias com prefeituras, cooperativas, associações, secretarias de Estado e outros órgãos, para garantir a execução de suas várias atividades.

PARA RESERVAR

Somente serão aceitas reservas antecipadas. As diárias incluem o pernoite, as programações de passeios e três refeições - café da manhã, almoço e jantar.

PARQUE ESTADUAL INTERVALES
Ribeirão Grande - SP
Tel.: (015)542.1511/542.1245 - horário comercial

Secretaria do Meio Ambiente

FUNDAÇÃO FLORESTAL

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO

INTER VALES

RESERVA DA BIOSFERA DA MATA ATLÂNTICA · MAB-UNESCO

Veado (*Mazama* sp.)
Mauricio Simonetti

Onça-pintada (*Panthera onca*)
Mauricio Simonetti

Onça-parda (*Puma concolor*)
Mauricio Simonetti

ANEXO III

Ficha de Investigação Epidemiológica

N°_____Data:____/_____/_____

1. Localidade:_____ 2. Sub-localidade:_____

3. Sangue colhido sim (1) não (2)

4. Nome:_____

5. Endereço:_____

6. Idade:_____ Sexo M (1) F (2)

7. Profissão:_____

8. Residências anteriores (locais, período)

_____

_____

9. Atividades desenvolvidas no trabalho (quais, onde?)

_____

_____

10. Outras atividades cotidianas (cortar lenha, lavar roupa, buscar água, etc)

_____

_____

Lazer

_____

11. Deslocamento para outras áreas (época, período de permanência).

Sabe se lá houve malária?

_____

_____

12. Teve contato com suspeitos de malária no último ano? sim (1) não (2)

Onde?_____

13. Já teve malária? sim (1) não (2) Se sim, onde, quando, que tipo de plasmódio, que tratamento recebeu?

_____

14. Apresenta ou apresentou recentemente sintomas, tais como:

(1) febre (2) calafrio (3) sudorese (4) dor de cabeça (5) dor no corpo

(6) dor abdominal (7) perda de apetite (8) náuseas e/ou vômitos

(9) não apresenta (10) outros

15. Esteve doente nos últimos 6 meses? sim (1) não (2) Se sim, quando e qual a doença?

_____

_____

16. Doou sangue nos últimos 6 meses? sim (1) não (2) Se sim, onde?

_____

17. Recebeu sangue nos últimos 6 meses? sim (1) não (2) Se sim, onde?

_____

18. Presença de mosquitos (quantidade relativa em diferentes épocas do ano, horário de maior incidência):

- no domicílio

_____

- no peridomicílio _____

- outros _____

19. Resultado da gota espessa_____

20. Resultado da sorologia_____

21. Resultado do PCR_____

22. Observações_____

_____

_____

Entrevistador

ANEXO IV

TERMO DE CONSENTIMENTO

Trabalhamos na Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP/USP) e estamos fazendo um estudo aqui na região para saber se existem casos de malária. Esta doença é transmitida por um tipo de mosquito muito comum nesta área (mosquito prego) e precisa ser tratada para que o paciente se cure.

Para melhor atendimento de saúde da comunidade é necessário que os Serviços de Saúde tenham informações sobre a ocorrência dessa doença aqui na região. Portanto, sua colaboração é muito importante.

Precisamos que as pessoas que moram aqui permitam que retiremos uma pequena amostra de sangue para que verifiquemos se existem pessoas infectadas com os parasitas que causam essa doença e também, para evitar que ela se espalhe para outras pessoas da família ou vizinhos. A coleta de sangue será feita por um técnico experiente que fará uso de material descartável (sem risco de transmissão de outras doenças).

Quando encontrarmos alguma pessoa infectada, nós informaremos ao paciente e ao Serviço de Saúde responsável para que sejam providenciadas as medidas adequadas. Nós nos comprometemos a manter sigilo sobre o nome dos doadores de sangue e seus resultados

De acordo,

Assinatura:_____
Nome do doador de sangue:_____
Idade:_____
Local:_____ Data:_____/_____/____

Para qualquer informação necessária sobre a malária e este estudo, estamos na **Faculdade de Saúde Pública/USP** em São Paulo no endereço:

Av. Dr. Arnaldo, 715 - CEP 01246-904 , falar com os responsáveis pela pesquisa: **Dra. Eunice Ap. Bianchi Galati (R. G. 5. 119. 362, Pesquisadora da Faculdade de Saúde Pública da USP, tel. (011) 30667786, FAX (011) 30812108) e Izilda Curado (R. G. 10. 134. 896-4, Pesquisadora da Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN, tel. (011) 2270622, ramal 2078).**

Wizard® Genomic DNA Purification Kit

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A1120, A1123, A1125 AND A1620.

Quick Reference

Isolation of Genomic DNA from Whole Blood

Sample Size	Lysis Solution: Cell	Lysis Solution: Nuclei	Protein Precipitation Solution	Isopropanol	DNA Rehydration Solution
20µl	60µl	20µl	6.7µl	20µl	10µl
50µl	150µl	50µl	16.5µl	50µl	25µl
300µl	900µl	300µl	100µl	300µl	100µl
1ml	3ml	1ml	330µl	1ml	150µl
3ml	9ml	3ml	1ml	3ml	250µl
10ml	30ml	10ml	3.3ml	10ml	800µl

RBC Lysis

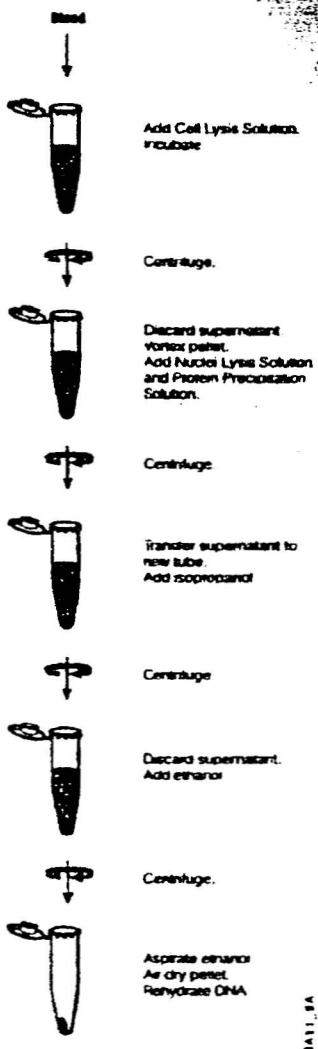
1. Using volumes from the table above, combine the appropriate volumes of Cell Lysis Solution and blood. Mix by inversion.
2. Incubate for 10 minutes.
3. Centrifuge:
   ≤300µl sample 13,000–16,000 × *g* *; 20 seconds
   1–10ml sample 2,000 × *g*; 10 minutes
4. Discard supernatant. Vortex pellet.

Nuclei Lysis and Protein Precipitation

5. Using the volumes from the table above, add Nuclei Lysis Solution and mix by inversion.
6. Add Protein Precipitation Solution; vortex for 20 seconds.
7. Centrifuge:
   ≤300µl sample 13,000–16,000 × *g* *; 3 minutes
   1–10ml sample 2,000 × *g*; 10 minutes
8. Transfer supernatant to a new tube.

DNA Precipitation and Rehydration

9. Using volumes from the table above, add room temperature isopropanol. Mix.
10. Centrifuge as in Step 7.
11. Discard supernatant. Add 70% ethanol (same volume as isopropanol).
12. Centrifuge as in Step 7.
13. Aspirate the ethanol and air dry the pellet.
14. Rehydrate the DNA in the appropriate volume of DNA Rehydration Solution for 1 hour at 65°C or overnight at 4°C.



* *Maximum speed on a microcentrifuge.*

See additional protocol information in Technical Manual #TM050, available upon request from Promega or online at www.promega.com

ORDERING/TECHNICAL INFORMATION:
www.promega.com • Phone 608-274-4330 or 800-356-9526 • Fax 608-277-2601

Promega

©1999 Promega Corporation. All Rights Reserved
Prices and specifications subject to change without prior notice.

Printed in USA 12/99
Part #9KB322