

ANA JÚLIA DUTRA NUNES

PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO POR *Plasmodium* spp. E SUA ASSOCIAÇÃO COM
OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS DE *Alouatta guariba*
clamitans (CABRERA, 1940) (PRIMATES: ATELIDAE) DE VIDA LIVRE

JOINVILLE,
2019

ANA JÚLIA DUTRA NUNES

PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO POR *Plasmodium* spp. E SUA ASSOCIAÇÃO COM OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS DE *Alouatta guariba clamitans* (CABRERA, 1940) (PRIMATES: ATELIDAE) DE VIDA LIVRE.

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, na Universidade da Região de Joinville. Orientadora: Dra. Marta Jussara Cremer. Coorientadora: Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito.

JOINVILLE,
2019

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

N972p Nunes, Ana Júlia Dutra
Prevalência de infecção por *Plasmodium* spp. e sua associação com os parâmetros bioquímicos e hematológicos de *Alouatta guariba clamitans* (Cabrera, 1940) (Primates: Atelidae) de vida livre. / Ana Júlia Dutra Nunes; orientadora Dra. Marta Jussara Cremer, coorientadora Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito. – Joinville: UNIVILLE, 2019.

65 p.: il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente – Universidade da Região de Joinville)

1. *Alouatta guariba clamitans* Cabrera. 2. Malária. 3. Conservação de espécies. I. Cremer, Marta Jussara (orient.). II. Brito, Cristiana Ferreira Alves de (coord.). III. Título.

CDD 636.200896951

Elaborada por Christiane de Viveiros Cardozo – CRB-14/778

Termo de Aprovação

"Prevalência da Infecção por *Plasmodium* spp e sua Associação com os Parâmetros Bioquímicos e Hematológicos de *Alouatta guariba clamitans* (Cabrera, 1940) (Primates: Atelidae) de Vida Livre"

por

Ana Júlia Dutra Nunes

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestra em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração Saúde e Meio Ambiente e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente.

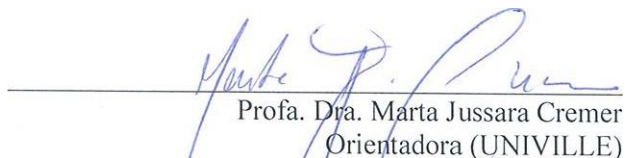

Prof. Dra. Marta Jussara Cremer
Orientadora (UNIVILLE)


Prof. Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito
Coorientadora (FIOCRUZ)

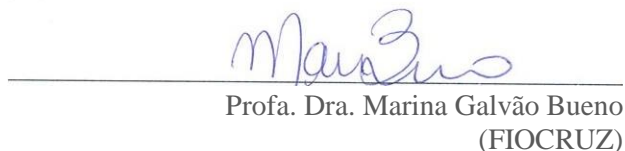


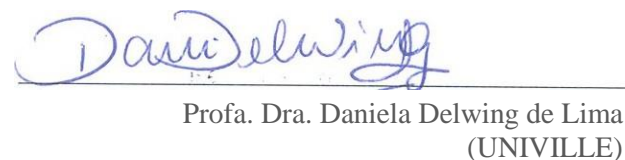
Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

Banca Examinadora:


Prof. Dra. Marta Jussara Cremer
Orientadora (UNIVILLE)


Prof. Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito
Coorientadora (FIOCRUZ)


Prof. Dra. Marina Galvão Bueno
(FIOCRUZ)


Prof. Dra. Daniela Delwing de Lima
(UNIVILLE)

Joinville, 22 de março de 2019

Dedico esse trabalho aos meus pais, meus grandes
incentivadores, e aos meus maiores parceiros de

campo, os BUGIOS-RUIVOS, que sempre me
deram forças para continuar a luta diária pela
conservação!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha orientadora, professora Marta, que topou entrar comigo nesse mundo da primatologia! Agradeço imensamente pela oportunidade, por toda paciência, compreensão, e por acreditar que seria possível a conclusão do trabalho, sua credibilidade me deixou sempre motivada a continuar, obrigada!

À minha mãe da malária, Cristiana, que me acolheu em casa, me acolheu no laboratório e na vida, me ensinou incansavelmente todos os detalhes minuciosos dessa doença e sua relação com os primatas. Obrigada pelo amadurecimento da ideia de projeto, por toda paciência e carinho!

À professora Daniela, quem fez grandes contribuições durante a banca da qualificação, e ao professor Helbert, quem conseguiu me dar todo o suporte nas análises estatísticas, com muita paciência.

Ao Julio, meu grande orientador da vida profissional e pessoal, inspirador, ao qual diariamente posso contar pra tudo, desde conselhos a dúvidas com medicação e tratamento em animal, e que tenho como exemplo a seguir. Obrigada pelo apoio motivacional durante todo o processo do mestrado e principalmente no trabalho, pelos grandes ensinamentos, discussões e por não me fazer desistir.

À Zelinda, minha mãe científica, orientadora, amiga e sempre chefe, obrigada por ter transbordado todo seu amor aos primatas para mim, lá no início da graduação!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pelo apoio financeiro.

Ao Programa de Conservação do Bugio-ruivo e Perini Business Park, que me oportunizou obter meus dados e resultados para realização do mestrado, e por me deixar empregada!

Ao meu atual colega de campo e trabalho, Denicris, por me aturar reclamando que não consigo escrever a dissertação porque chego cansada das horas (in)cansáveis no mato. E à Katiúscia, também colega de trabalho e grande amiga, por compartilhar de muitos sofrimentos durante as horas despendidas no trabalho, pelas terapias em dupla, e por compartilhar o amor aos bichos e mato, e tudo que remete a conservação!

À Denise que me ensinou com muito carinho e didática toda a parte laboratorial do diagnóstico da malária, e que aliás é mais difícil que estar a campo capturando os macacos (apesar de que ela

sempre diz ao contrário), obrigada por me emprestar sua “mãe”! E ao Laboratório da Malária da Fiocruz de Minas que permitiu minha entrada para conhecer esse submundo da bancada de laboratório!

À minha amiga desde a faculdade, Amanda, que me motiva o tempo todo. Obrigada Amandita pelo carinho sempre, e pelas grandes conversas e confissões! E obrigada pela ajuda na leitura das lâminas, sem você e as estagiárias não seria possível! Ao Gustavo, grande amigo que a FURB e os bugios me trouxeram, obrigada pela ajuda no lab de bioquímica e laboratório de análises clínicas do hospital veterinário da FURB! E também a todos que fizeram parte das campanhas de capturas dos bugios-ruivos, pois sem vocês esses dados nem existiriam!

Aos meus colegas de mestrado, por toda a companhia ao longo desses anos de aulas incansáveis.

Ao meu companheiro de vida e casa, meu noivo Jean, por me dar suporte emocional e motivacional ao longe desses 2 anos de muita ausência e falta de atenção! Obrigada por nunca desistir de me apoiar!

A minha família, principalmente minha bisavó e meus avós! Ao meu irmão, Eduardo, um grande incentivador dos meus estudos, e minha cunhada, Lais, que, juntos, me presentearam em 2018 com o melhor presente, quem me faz querer lutar ainda mais para a conservação do meio ambiente num todo, o Benjamin, meu sobrinho e afilhado mais amado do mundo!

E por fim, não menos importante, na verdade, OS MAIS IMPORTANTES, pois me permitiram a vida, de amor a natureza e paixão pelos animais, que me oportunizaram chegar até aqui e sempre me apoiaram! Sandra e Sadi, muito obrigada! Vocês são minha base!

RESUMO

O gênero *Alouatta* reúne o maior número de diferentes espécies naturalmente infectadas por *Plasmodium* spp., dentre os primatas neotropicais, sendo a principal o bugio-ruivo, *Alouatta guariba clamitans*, ameaçado de extinção. Acredita-se que primatas não humanos sejam reservatórios para a malária humana em regiões de florestas, mas pouco se conhece sobre as implicações da infecção na saúde e conservação desses animais. O objetivo foi identificar a prevalência da infecção por *Plasmodium* spp. em bugios-ruivos de vida livre em um fragmento de Mata Atlântica e associar a infecção com alterações hematológicas e bioquímicas. Os animais foram capturados com dardos anestésicos e o sangue coletado foi utilizado para extração de DNA e realização dos parâmetros hematológicos e bioquímicos. O diagnóstico molecular da infecção foi realizado por *Nested-PCR* (18S SSU rRNA ou *cox1*). Os parâmetros bioquímicos e hematológicos foram comparados utilizando o teste T de Student ou Mann-Whitney U. Foram capturados 40 animais, destes sete foram capturados duas vezes e um três vezes. A prevalência da infecção por *Plasmodium* foi estimada em 70% (28/40), sendo a maior descrita para primatas neotropicais. Os bugios infectados apresentaram valores médios mais elevados de linfócitos ($p=0,010$), de alanina amino transferase (ALT) ($p=0,003$) e aspartato aminotransferase (AST) ($p=0,037$). As fêmeas infectadas apresentaram valores médios de linfócitos ($p=0,014$) e ALT ($p=0,003$) elevados e os machos infectados valores elevados de ALT ($p=0,046$) e reduzidos de albumina ($p=0,049$). Os animais com infecção mista apresentaram valores médios mais elevados de ALT ($p=0,019$) e menores de proteínas totais ($p=0,023$). Em conclusão este trabalho mostra que a infecção malárica nos bugios provoca alterações hematológicas/bioquímicas, sugerindo um comprometimento hepático. Ainda é necessário estabelecer quais os impactos destas alterações, mas já está clara a necessidade de monitoramento da infecção nestes animais, principalmente durante as translocações, em fragmentos de matas próximas de humanos, para a vigilância eco-epidemiológica da malária na Mata Atlântica.

Palavras-chaves: *Plasmodium*, *Alouatta guariba clamitans*, malária, conservação de espécies.

ABSTRACT

The *Alouatta* genus comprises the largest number of different species naturally infected by *Plasmodium* spp. among the neotropical primates, the main one is the Southern brown howler monkey, *Alouatta guariba clamitans*, which is threatened with extinction. Non-human primates are believed to be human malaria reservoirs in forest regions, but little is known about the implications of this infection on the health and conservation of these animals. The objective of this study was to determine the prevalence of *Plasmodium* spp. infection in free-living howler monkeys in an Atlantic Forest fragment and to associate the infection with hematological and biochemical alterations. The animals were captured with anesthetic darts and the collected blood was used for DNA extraction, blood count, and serum biochemical tests. The molecular diagnosis of the infection was performed by *Nested-PCR* (18S SSU rRNA or *coxI*). Blood count and biochemical tests were compared using the Student's t-test or Mann-Whitney U test. We captured 40 animals, from which seven were captured twice, and one three times. The estimated prevalence of *Plasmodium* infection was 70% (28/40), the highest reported for neotropical primates. Infected howler monkeys presented higher mean values of lymphocytes ($p=0.010$), alanine aminotransferase (ALT) ($p=0.003$), and aspartate aminotransferase (AST) ($p=0.037$). The infected females presented high mean values of lymphocytes ($p=0.014$) and high ALT ($p=0.003$); and infected males presented high ALT ($p=0.046$) and reduced albumin values ($p=0.049$). Animals with mixed infection displayed higher mean ALT values ($p=0.019$), and lower total protein levels ($p=0.023$). In conclusion, this work shows that malarial infection in howler monkeys causes hematological/biochemical alterations which suggest hepatic commitment. It is yet necessary to establish the impact of these changes, but it is already clear the need to monitor infection in these animals, especially during translocations, for the eco-epidemiological surveillance of malaria in the Atlantic Forest.

Key words: *Plasmodium*, *Alouatta g. clamitans*, Endangered Species, malaria, Primate Diseases.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Ciclo da infecção por <i>Plasmodium</i> spp. | 20 |
| Figura 2 - Esfregaço sanguíneo de bugio-ruivo com hemácia parasitada por <i>Plasmodium</i> spp. | 21 |
| Figura 3 - Fêmea e macho adultos de bugio-ruivo (<i>Alouatta g. clamitans</i>) de vida livre em um fragmento no município de Joinville, SC, sul do Brasil..... | 22 |
| Figure 1 (Artigo) - Location of the fragment of Ombrophilous Dense Lowland Forest and the captured free-living Southern brown howler monkey, in the city of Joinville, Santa Catarina, Brazil..... | 55 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Espécies de <i>Plasmodium</i> spp., com seus respectivos hospedeiros primatas não humanos – PNH. | 16 |
| Table 1 (Artigo) - Infection by <i>Plasmodium</i> spp. in captured Southern brown howler monkeys (<i>Alouatta g. clamitans</i>) from Joinville, SC..... | 51 |
| Table 2 (Artigo) - Infection by <i>Plasmodium</i> spp. in re-captured free-living Southern brown howler monkeys (<i>Alouatta g. clamitans</i>) in Joinville/SC..... | 52 |
| Table 3 (Artigo) - Hematological parameters of the free-living Southern brown howler monkeys (<i>Alouatta g. clamitans</i>), infected and uninfected by <i>Plasmodium</i> spp..... | 53 |
| Table 4 (Artigo) - Biochemical parameters of free-living Southern brown howler monkeys (<i>Alouatta g. clamitans</i>), infected and uninfected by <i>Plasmodium</i> spp..... | 54 |

LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

% - porcentagem

°C - graus Celsius

bpm - batimentos por minuto

cm - centímetro

DP - desvio padrão

fl - fentolitros

g/ μ L - gramas por microlitros

g/dL - gramas por decilitro

IC - intervalo de confiança

m - metro

mg/dL - miligrama por decilitro

mg/kg - miligrama por kilograma

min - minutos

mL - mililitro

mm - milímetros

mM - milimolar

mmol/L – milimol por litro

n - número de amostras

ng - nanogramas

pg - picograma

PN - primata neotropical

PNH - primata não humano

rpm - respirações por minuto

s - segundos

UI/L - unidades internacionais por litro

UV - ultravioleta

V - volts

x g - rotações por minuto

μ L - microlitros

μ m - micrometro

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| RESUMO | 9 |
| ABSTRACT | 10 |
| LISTA DE ILUSTRAÇÕES | 11 |
| LISTA DE TABELAS | 12 |
| LISTA DE ABREVIÇÕES E SÍMBOLOS..... | 13 |
| 1. INTRODUÇÃO | 14 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 15 |
| 2.1. História da malária no mundo e no Brasil..... | 15 |
| 2.2. A malária em primatas não humanos (PNH)..... | 16 |
| 2.3. O ciclo biológico de <i>Plasmodium</i> spp..... | 19 |
| 2.4. O bugio-ruivo (<i>Alouatta guariba clamitans</i>)..... | 21 |
| 2.5. Interdisciplinaridade..... | 23 |
| 3. OBJETIVOS | 24 |
| 3.1. Objetivo geral..... | 24 |
| 3.2. Objetivos específicos..... | 24 |
| 4. REFERÊNCIAS | 25 |
| 5. ARTIGO CIENTÍFICO..... | 30 |
| ANEXOS..... | 61 |

1. INTRODUÇÃO

A malária é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, família Plasmodiidae (Hommel & Gilles *et al.*, 1998). O parasita ocorre em múltiplas espécies de prosimianos, macacos do Novo Mundo e do Velho Mundo (Coatney *et al.*, 1971). Duas espécies de *Plasmodium* spp. parasitam primatas do Novo Mundo nas Américas Central e do Sul: *Plasmodium brasilianum* (Gonder & Berenberg-Gossler, 1908) e *Plasmodium simium* (Fonseca, 1939) (Deane *et al.*, 1966; Arruda *et al.*, 1989; Cerutti-Junior *et al.*, 2007).

O único relato de sintomatologia sugestiva de malária em primatas neotropicais (PNs) com avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos já descrito foi por Costa *et al.* (2014), para um bugio-ruivo, *Alouatta guariba clamitans*, mantido em cativeiro, positivo para *P. simium/P. vivax*. O animal apresentava inapetência, fraqueza, apatia, tremores musculares intermitentes, membranas mucosas secas e pálidas, desidratação leve, perda de massa muscular e peso corporal. Este animal também apresentou algumas alterações hematológicas e bioquímicas. A contagem de células sanguíneas evidenciou uma anemia através do nível baixo de hemácias e do hematócrito, e o animal apresentou leucopenia com neutropenia e trombocitopenia grave. As análises bioquímicas permitiram concluir um aumento da ureia, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), hipoalbuminemia e hipoproteinemia.

O primata da subespécie *A. g. clamitans*, tanto em nível nacional (MMA, 2014) quanto em nível estadual (Santa Catarina) (SDS, 2011), está classificado como ameaçado na categoria vulnerável. Conforme a *International Union for Conservation of Nature* (IUCN), a espécie está ameaçada principalmente por perda ou fragmentação de habitat e morte por doenças (Mendes *et al.*, 2008). O gênero *Alouatta* reúne o maior número de espécies infectadas com *Plasmodium* spp., quando comparado com os demais primatas neotropicais (Deane, 1992; Fandeur *et al.*, 2000). Dessa forma, ressalta-se a necessidade de estudar a malária simiana do ponto de vista da conservação, pois estudos da saúde animal são um ponto chave para a conservação de espécie, principalmente para as ameaçadas de extinção (Daszak *et al.*, 2000).

Ainda, é importante compreender as consequências do parasitismo nos animais de vida livre, pois pouco se conhece sobre a interação parasita-hospedeiro e implicações na saúde (Coatney *et al.*, 1971) e conservação de bugios-ruivos, espécie de primata ameaçada. Além disso, os PN podem agir como reservatórios para a malária humana na América do Sul (Coatney, 1971; Lal *et al.*, 1988; Arruda *et al.*, 1989; Davies *et al.*, 1991; Stewart *et al.*, 1998; Fandeur *et al.*, 2000; Volney *et al.*, 2002; Duarte *et al.*, 2008; Yamasaki *et al.*, 2008; Brasil *et al.*, 2017). Portanto, os estudos indicando a prevalência de *Plasmodium* spp em bugios-ruivos em fragmento de perímetro urbano, será importante também para o conhecimento da eco-epidemiologia da malária na região.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. História da malária no mundo e no Brasil

A malária é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, família Plasmodiidae, subordem Haemosporidae, classe Sporozoea, filo Apicomplexa, sub-reino Protozoa (Hommel & Gilles *et al.*, 1998). Também conhecida como febre terçã, febre quartã, maleita e paludismo, a doença afeta principalmente as áreas tropicais e subtropicais do planeta. A malária é uma doença infecciosa com manifestações episódicas de caráter agudo. É reconhecida como um dos maiores problemas de saúde pública no mundo (Garnham, 1966).

Provavelmente é a doença parasitária mais antiga de que se tem registro, conhecida na antiguidade como “febre intermitente”. Devido ao seu caráter endêmico, foi responsável por várias mortes quanto foram as próprias guerras em vários períodos da história (Garnham, 1966). Há registros de sua descrição clínica na antiguidade. Na Grécia, mil anos antes de Cristo, a doença “(...) já era caracterizada pelos médicos gregos, que descreveram os tipos febris cotidiano, terçã e quartã (...)”. Hipócrates de Cós (370 – 460 a.C.) fez uma descrição clínica detalhada da doença, mostrando inclusive a ocorrência de hepatomegalia e esplenomegalia (Thiago, 2003).

O parasito pode infectar mamíferos, aves e répteis. As espécies que causam infecção em seres humanos, conforme a *World Health Organization* (WHO) (2015), são *Plasmodium falciparum* (Welch, 1897), *Plasmodium vivax* (Grassi & Feletti, 1890), *Plasmodium malariae* (Laveran, 1881), *Plasmodium ovale* (Stephens, 1922), restrito ao continente africano, regiões da Ásia e Ilhas do Pacífico (Greenwood *et al.*, 2008), e *P. knowlesi* (Sinton and Mulliga, 1933), que ocorre no Sudeste Asiático e infecta primariamente primatas não-humanos do Velho Mundo.

Em 2017 foram registrados cerca de 219 milhões de casos de malária humana no mundo, ocasionando cerca de 435.000 mortes, sendo que 92% dos casos e 93% das mortes ocorreram na África. No Brasil, cerca de 217.928 casos de malária foram registrados no mesmo ano, sendo estimados 30 óbitos (WHO, 2018).

Apesar de não ser considerada área endêmica de malária, na região extra-amazônica são registrados anualmente uma pequena porcentagem (cerca de 0,05%) de casos autóctones originados ao longo da Serra do Mar, que se estende através dos estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo, São Paulo, Paraná e Santa Catarina, pertencentes à região de Mata Atlântica (Pina-Costa *et al.*, 2014). Na região extra-amazônica foram notificados 310 casos autóctones confirmados de malária por *P. falciparum* ou mista, e 426 casos autóctones confirmados por *P. vivax*, no ano de 2018 (MS, 2019). O estado com maior número de casos foi o Espírito Santo, com 145 casos confirmados de malária autóctone, seguido pela Bahia com 77 casos e São Paulo com 11 casos autóctone de malária humana. No Rio de Janeiro foram confirmados 5 casos, Mato Grosso do Sul e Piauí 3 casos, Distrito Federal, Goiás e Paraná com um caso apenas. No estado de Santa Catarina houve 2 casos confirmados de malária autóctone em 2017, sendo que os dois casos ocorreram no município de Joinville (MS, 2019). Apesar de poucos casos, a taxa de

mortalidade na região extra-amazônica é 50 vezes superior à taxa na região amazônica (MS, 2019), o que demonstra a importância de uma vigilância da malária mais acurada na região de Mata Atlântica, incluindo treinamentos de médicos para diagnóstico diferencial rápido da malária.

Ainda é desconhecida a história de introdução no Brasil das espécies de *Plasmodium*. Rodrigues *et al.* (2017) sugere que o continente americano foi provavelmente colonizado pelo *P. vivax* em momentos diferentes da história, infectando primeiramente os seres humanos (a direção da transmissão lateral foi de humanos para macacos), pois há maior diversidade genética entre as diferentes amostras de *P. vivax* em comparação com *P. simium* testadas, e transmitindo assim para os primatas do Novo Mundo. Ainda, Brasil *et al.* (2017) sugere que a malária na Mata Atlântica seja possivelmente uma zoonose, pois possibilita a transmissão entre humanos e símios.

2.2. A malária em primatas não humanos (PNH)

O parasita ocorre em múltiplas espécies de prosimianos, macacos do Novo Mundo e do Velho Mundo (Coatney *et al.*, 1971). Já foram descritas 28 espécies de *Plasmodium* infectando PNH, mas apenas duas parasitam macacos do Novo Mundo nas Américas Central e do Sul: *P. brasilianum* (Gonder & Berenberg-Gossler, 1908) e *P. simium* (Fonseca, 1951) (Deane *et al.*, 1966; Arruda *et al.*, 1989; Cerutti-Junior *et al.*, 2007). O número de espécies hospedeiras pode ser uma subestimação, ao considerar a extensão da malária em primatas de vida livre, uma vez que muitos países e muitas espécies de PNH nunca foram testadas para diagnóstico dos parasitos.

Tabela 1 - Espécies de *Plasmodium* spp., com seus respectivos hospedeiros primatas não humanos – PNH.

| | HOSPEDEIRO | ESPÉCIE <i>Plasmodium</i> |
|---------|---|--|
| | <i>Macaca fascicularis</i> | <i>Plasmodium coatneyi</i> |
| | <i>Macaca</i> spp., <i>Presbytis cristatus</i> , <i>Presbytis entellus</i> | <i>Plasmodium cynomolgi</i> |
| | <i>Macaca nemestrina</i> | <i>Plasmodium fieldi</i> |
| | <i>Macaca sinica</i> , <i>Macaca radiata</i> | <i>Plasmodium fragile</i> |
| | <i>Cercocebus</i> spp., <i>Mandrillus leucophaeus</i> | <i>Plasmodium gonderi</i> |
| | <i>Cynopithecus Níger</i> , <i>Macaca</i> spp., <i>P. cristatus</i> , <i>Presbytis obscurus</i> | <i>Plasmodium inui</i> |
| | <i>M. fascicularis</i> , <i>M. nemestrina</i> , <i>Presbytis malalophus</i> | <i>Plasmodium knowlesi</i> |
| | <i>M. radiata</i> | <i>Plasmodium shortti</i> |
| | <i>M. sinica</i> | <i>Plasmodium simiovale</i> |
| | <i>Cercocebus albigena</i> , <i>Cercocebus galeritus</i> | <i>Plasmodium georgesio</i> |
| Macacos | <i>C. albigena</i> | <i>Plasmodium petersi</i> |
| do | <i>Pan troglodytes</i> , <i>Gorila gorilla</i> | <i>Plasmodium reichenowi</i> |
| Velho | <i>Pan troglodytes</i> , <i>Gorila gorilla</i> | <i>Plasmodium rodhaini</i> |
| mundo | | <i>Plasmodium schwetzi</i> |
| | <i>Pongo pygmaeus</i> | <i>Plasmodium pitheci</i> |
| | <i>Hylobates lar</i> | <i>Plasmodium silvaticum</i> |
| | | <i>Plasmodium eylesi</i> |
| | | <i>Plasmodium jefferyi</i> |
| | <i>Hylobates lar</i> , <i>Hylobates moloch</i> | <i>Plasmodium youngi</i> |
| | | <i>Plasmodium hylobati</i> |
| | <i>Lemur fulvus fulvus</i> , <i>Lemur fulvus rufus</i> | <i>Plasmodium foleyi</i> ; <i>P. girardi</i> |
| | <i>L. fulvus fulvus</i> | <i>Plasmodium uilenbergi</i> |
| | <i>Lemur macaco macaco</i> | <i>Plasmodium percygarnhami</i> |
| | <i>Lemur macaco macaco</i> | <i>Plasmodium coulangesi</i> |

| | | |
|-----------------------------|---|-------------------------------|
| | <i>Alouatta</i> spp., <i>Alouatta guariba clamitans</i> , <i>Alouatta caraya</i> , <i>Alouatta belzebul belzebul</i> , <i>Brachyteles arachnoides</i> , <i>Callicebus</i> <i>nigrifrons</i> , <i>Cacajao melanocephalus</i> , <i>Sapajus xanthosternos</i> , <i>Sapajus robustus</i> , <i>Cebus</i> spp. | <i>Plasmodium simium</i> |
| Macacos do Novo mundo | <i>Alouatta</i> spp., <i>Alouatta belzebul belzebul</i> , <i>Alouatta caraya</i> , <i>Alouatta fusca fusca</i> , <i>Alouatta guariba clamitans</i> , <i>Alouatta</i> <i>nigerrima</i> , <i>Alouatta palliata</i> , <i>Alouatta seniculus seniculus</i> , <i>Alouatta</i> <i>seniculus straminea</i> , <i>Alouatta villosa villosa</i> , <i>Ateles</i> spp., <i>Ateles</i> <i>belzebulth</i> , <i>Ateles fuscipes robustus</i> , <i>Ateles chamex</i> , <i>Ateles</i> <i>geoffroyi</i> , <i>Ateles geoffroyi grisescens</i> , <i>Ateles geoffroyi panamensis</i> , <i>Ateles paniscus</i> , <i>Aotus azarae azarae</i> , <i>Aotus nigriceps</i> , <i>Aotus</i> <i>trivirgatus</i> , <i>Aotus vociferans</i> , <i>Saimiri</i> spp., <i>Brachyteles</i> <i>arachnoides</i> , <i>Cacajao calvus</i> , <i>Cacajao melanocephalus</i> , <i>Cacajao</i> <i>rubicundus</i> , <i>Callicebus brunneus</i> , <i>Callicebus cupreus ornatus</i> , <i>Callicebus dubius</i> , <i>Callicebus moloch</i> , <i>Callithrix argentata</i> , <i>Callithrix geoffroyi</i> , <i>Callithrix humeralifer</i> , <i>Callithrix jacchus</i> , <i>Callithrix penicillata</i> , <i>Cebus</i> spp., <i>Cebuella pygmaea</i> , <i>Chiropotes</i> <i>satanas</i> , <i>Lagothrix</i> spp., <i>Lagothrix lagotricha</i> , <i>Lagothrix cana</i> <i>cana</i> , <i>Lagothrix poeppigii</i> , <i>Leontopithecus chrysomelas</i> , <i>Saguinus</i> <i>midas</i> , <i>Pithecia pithecia</i> ; <i>Leontopithecus rosalia</i> , <i>Mico humeralifer</i> , <i>Saguinus bicolor</i> , <i>Saguinus fuscicollis</i> , <i>Saguinus geoffroyi</i> , <i>Saguinus hibrido</i> , <i>Saguinus imperator</i> , <i>Saguinus labiatus</i> , <i>Saguinus</i> <i>martinsi martinsi</i> , <i>Saguinus martinsi oechraceous</i> , <i>Saguinus midas</i> , <i>Saguinus mystax</i> , <i>Saguinus niger</i> , <i>Saguinus nigricolis</i> , <i>Cebus</i> <i>albifrons</i> , <i>Cebus apela</i> , <i>Cebus capucinus capucinus</i> , <i>Cebus</i> <i>capucinus imitator</i> , <i>Cebus olivaceus</i> , <i>Saimiri boliviensis</i> <i>peruviensis</i> , <i>Saimiri oerstedii</i> , <i>Saimiri sciureus albigena</i> , <i>Saimiri</i> <i>sciureus macrodon</i> , <i>Saimiri sciureus peruviensis</i> , <i>Saimiri sciureus</i> <i>sciureus</i> , <i>Saimiri</i> spp., <i>Saimiri ustus</i> , <i>Sapajus flavius</i> , <i>Sapajus</i> <i>robustus</i> , <i>Sapajus apela</i> , <i>Sapajus xanthosternos</i> , <i>Cacajao calvus</i> , <i>Cacajao melanocephalus</i> , <i>Cacajao rubicundus</i> , <i>Callicebus</i> <i>brunneus</i> , <i>Callicebus caligatus</i> , <i>Callicebus cupreus ornatos</i> , <i>Callicebus dubius</i> , <i>Callicebus moloch</i> , <i>Callicebus personatus</i> , <i>Callicebus</i> spp., <i>Callicebus torquatus torquatus</i> , <i>Chiropotes</i> <i>satanas chiropotes</i> , <i>Chiropotes albinasus</i> , <i>Chiropotes satanas</i> <i>satanas</i> , <i>Pithecia irrorata irrorata</i> , <i>Pithecia monachus</i> , <i>Pithecia</i> <i>pithecia pithecia</i> , <i>Pithecia</i> spp. | <i>Plasmodium brasilianum</i> |

Referências: Clark 1931, Renjifo e Peidrahita 1949, Renjifo *et al.* 1952, Galindo 1963, Dunn e Lambrecht 1963, Porter *et al.* 1966, Garnham 1966, Serrano 1967, Marinkelle e Grose 1968, Dunn *et al.* 1968, Deane *et al.* 1969, Coatney 1971, Baerg *et al.* 1971, Ferreira Neto e Deane 1973, Collins *et al.* 1985, Arruda *et al.* 1985, Deane *e tal.* 1989, Davies *et al.* 1991, Deane *et al.* 1992, Lourenço-de-oliveira *et al.* 1995, Lourenço-de-oliveira e Deane 1995, Stuart *et al.* 1998, Fandeur 2000, Thoisy *et al.* 2001, Volney *et al.* 2002, Chinchilla *et al.* 2006, Duarte *et al.* 2008, Cormier *et al.* 2010, Guimarães *et al.* 2011, Yamasaki *et al.* 2011, Curotto *et al.* 2012, Bueno 2012, Araújo *et al.* 2013, Lalremruata *et al.* 2015, Fuentes-Ramirez *et al.* 2017, Alvarenga *et al.* 2017.

P. brasilianum e *P. simium* são parasitas morfológicamente, geneticamente e imunologicamente semelhantes aos parasitas humanos, *P. malariae* e *P. vivax*, respectivamente (Deane, 1992, Leclerc *et al.*, 2004). Ambos parasitas foram diagnosticados pela primeira vez em primatas brasileiros. Em 1909 foi descrito *P. brasilianum* parasitando *Cacajao calvus* da região Amazônica (Gonder & Berenberg-Gossler, 1909) e *P. simium* foi identificado por Fonseca (1951), quando examinava primatas da espécie *Alouatta fusca* (Geoffroy, 1812) da floresta de Itapeperica da Serra, próxima da cidade de São Paulo.

Os PNs são suspeitos de desempenhar o papel de reservatório para a malária em humanos (Coatney, 1971; Lal *et al.*, 1988; Arruda *et al.*, 1989; Davies *et al.*, 1991; Stewart *et al.*, 1998; Fandeur *et al.*, 2000; Volney *et al.*, 2002; Duarte *et al.*, 2008; Yamasaki *et al.*, 2008; Brasil *et al.*, 2017). Há alguns trabalhos onde já foi descrito o parasitismo de *P. brasilianum* e *P. simium* em seres humanos (Deane *et al.*, 1966; Arruda *et al.*, 1989; Lalremruata *et al.*, 2015; Brasil *et al.*, 2017). Em condições experimentais, muitas espécies de macacos do Novo Mundo foram infectados com *P. falciparum* e *P. vivax*, incluindo bugios (*Alouatta* spp.), macacos-da-noite (*Aotus* spp.), macacos-aranha (*Ateles* spp.), macaco-de-cheiro (*Saimiri* spp.) e micos (*Saguinus* spp.) (Coatney *et al.*, 1971; Collins, 1994; Galland, 2000; Gilles, 2002; Sibal e Samson, 2001).

Deane (1964), trabalhando no Horto Florestal da Cantareira, na periferia da cidade de São Paulo, também relata a presença de macacos da espécie *Alouatta fusca*, naturalmente infectados por *P. simium/P. vivax* e por *P. brasilianum/P. malariae*. Em uma revisão realizada pelo mesmo autor, com mais de 4.500 amostras de PNs, as taxas de infecção encontradas foram de 35,6% na região sudeste, 17,9% na região sul, 10,1% na Amazônia e nenhuma na região nordeste do Brasil (Deane, 1992). Yamasaki *et al.* (2011) analisaram 50 bugios-ruivos de áreas de Mata Atlântica da região metropolitana de São Paulo, encontrando 18% de animais infectados com *P. simium/P. vivax* e 4% com *P. brasilianum/P. malariae*.

Sabe-se que os plasmódios simianos, *P. simium* e *P. brasilianum*, parecem desaparecer dentro de poucos meses nos exames diagnósticos, mas outros podem persistir por vários anos (Deane, 1964; Deane, 1967). Geralmente, a maioria dos animais apresenta baixa parasitemia, esporadicamente febre, apatia e perda de peso, e a doença pode ter cura espontaneamente (Deane, 1992). Em geral, poucas são as informações sobre a dinâmica desses parasitas e a interação com os hospedeiros, principalmente em PNs de vida livre (Coatney *et al.*, 1971).

O único relato de sintomatologia sugestiva de malária em PNs com avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos já descrito foi por Costa *et al.* (2014), para um bugio-ruivo, *Alouatta clamitans*, mantido em cativeiro, positivo para *P. simium/P. vivax*. O animal apresentava inapetência, fraqueza, apatia, tremores musculares intermitentes, membranas mucosas secas e pálidas, desidratação leve, perda de massa muscular e peso corporal. Este animal também apresentou algumas alterações hematológicas e bioquímicas. A contagem de células sanguíneas evidenciou anemia através do nível baixo de hemácias e do hematócrito, e o animal apresentou leucopenia com neutropenia e trombocitopenia grave. As análises bioquímicas permitiram concluir um aumento da ureia, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), hipoalbuminemia e hipoproteinemia. Nos animais que foram submetidos à esplenectomia experimental, observou-se que a infecção por *Plasmodium* spp pode causar fraqueza, febre, anemia, icterícia e insuficiência renal (Galland *et al.*, 2000; Fuentes-Ramirez *et al.*, 2017).

2.3. O ciclo biológico de *Plasmodium* spp.

Plasmodium spp. é inoculado no hospedeiro através de vetores, mosquitos fêmeas pertencentes à ordem Diptera, infraordem Culicomorpha, família Culicidae, gênero *Anopheles* (Meigen, 1818). Este gênero compreende cerca de 400 espécies, das quais cerca de 60 ocorrem no Brasil e são responsáveis por transmitir o parasito (Tuteja, 2007). Nas regiões de Mata Atlântica, os anofelinos do subgênero *Kerteszia* podem ser responsáveis por surtos ocasionais de malária (Deane, 1992; Marelli *et al.*, 2007). Essas espécies têm, como criadouros, plantas que acumulam água (fitotelmatas) (Pina-Costa *et al.*, 2014), como as bromélias, muito comuns nessa região (Gasper *et al.*, 2015).

O ciclo biológico do parasita da malária envolve dois hospedeiros (figura 1). Durante um repasto sanguíneo, uma fêmea de mosquito *Anopheles* infectada inocula esporozoítos no hospedeiro humano. Os esporozoítos infectam as células do fígado e amadurecem nos esquizontes, que rompem e liberam vesículas chamadas merossomos, as quais se rompem e liberam os merozoítos. Após essa replicação inicial no fígado (esquizogonia exo-eritrocítica), os merozoítos infectam os eritrócitos, onde sofrem uma multiplicação assexuada (esquizogonia eritrocitária). Os trofozoítos do estágio do anel amadurecem em esquizontes, que rompem liberando merozoítos. Alguns parasitas se diferenciam em estádios eritrocíticos sexuais (gametócitos). Os parasitas do estágio sanguíneo são responsáveis pelas manifestações clínicas da doença (CDC, 2017).

Os gametócitos, machos (microgametócitos) e fêmeas (macrogametócitos) são ingeridos por um mosquito *Anopheles* durante um repasto sanguíneo num hospedeiro infectado. A multiplicação dos parasitas no mosquito é conhecida como ciclo esporogônico. No estômago do mosquito, os microgametas penetram os macrogametas gerando zigotos. Os zigotos, por sua vez, tornam-se móveis e alongados (ocinetos) e invadem a parede do intestino médio do mosquito, onde se desenvolvem em oocistos. Os oocistos crescem, se rompem e liberam esporozoítos, que caem na hemolinfa e alguns invadem as glândulas salivares do mosquito. A inoculação dos esporozoítos em um novo hospedeiro humano completa o ciclo de vida do *Plasmodium* (CDC, 2017).

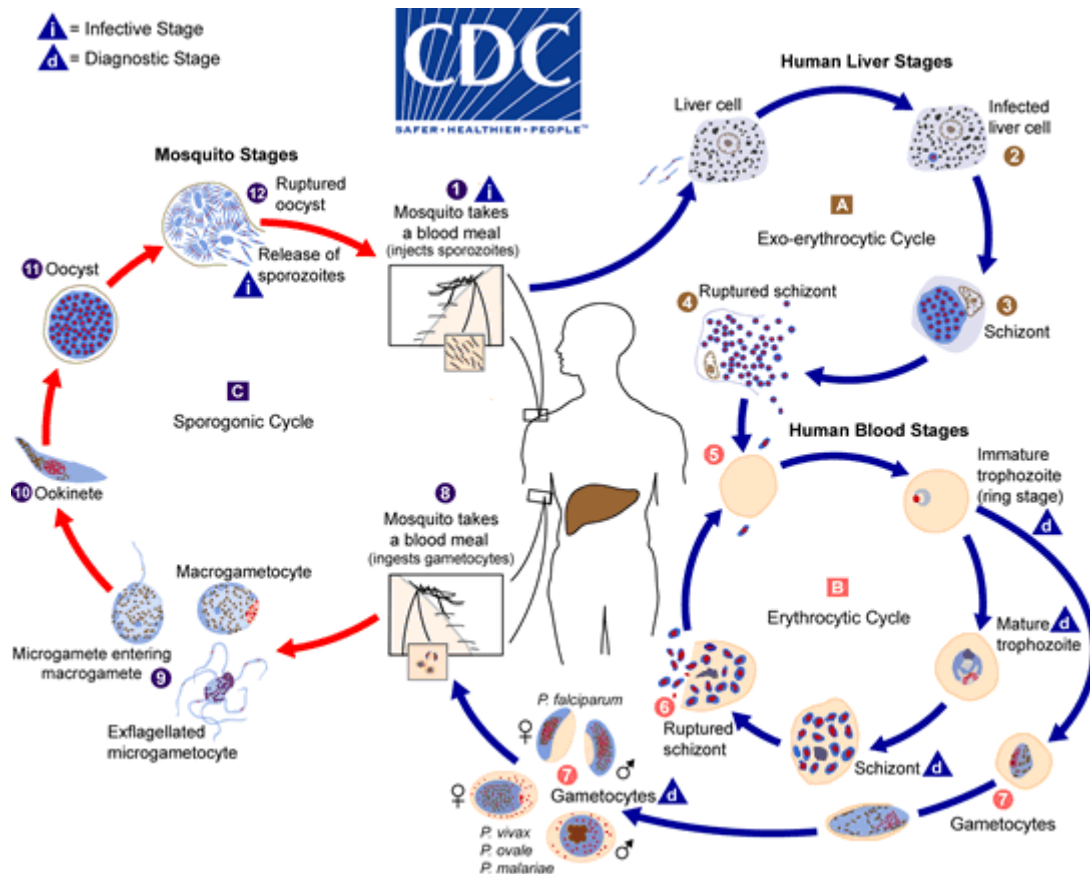


Figura 1 - Ciclo da infecção por *Plasmodium* spp. Fonte: *Centers for disease control and prevention – CDC, 2017.*

Em humanos, o período de incubação na maioria dos casos varia de 7 a 30 dias. Os sintomas comumente observados em casos não-complicados são: temperatura elevada, sudorese, fraqueza, baço e fígado aumentados, leve icterícia e aumento da taxa respiratória. Os achados laboratoriais adicionais podem incluir anemia leve, hipoglicemia, diminuição leve das plaquetas sanguíneas (trombocitopenia), elevação da bilirrubina e elevação das aminotransferases (ALT e AST) (MS, 2010).

O diagnóstico humano preconizado pela WHO é a realização de microscopia óptica (figura 2), com gota espessa e esfregaço sanguíneo, ou testes imunocromatográficos, por serem rápidos e de fácil acesso (WHO, 2015). O diagnóstico molecular tem se mostrado uma das ferramentas mais promissoras na detecção de *Plasmodium* spp. por possuir alta sensibilidade e especificidade, alcançando até mesmo infecções subpatentes (Demas *et al.*, 2011). A técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), baseada na amplificação de DNA presente em uma amostra, é capaz de identificar o material genético alvo em um processo cíclico através da geração de milhares de cópias idênticas, que poderão ser analisadas em pouco tempo. A *Nested* - PCR é um protocolo útil para diagnóstico por apresentar dois passos de amplificação, o que aumenta a capacidade de detecção do parasito tanto em sensibilidade quanto em especificidade (Snounou *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1998).

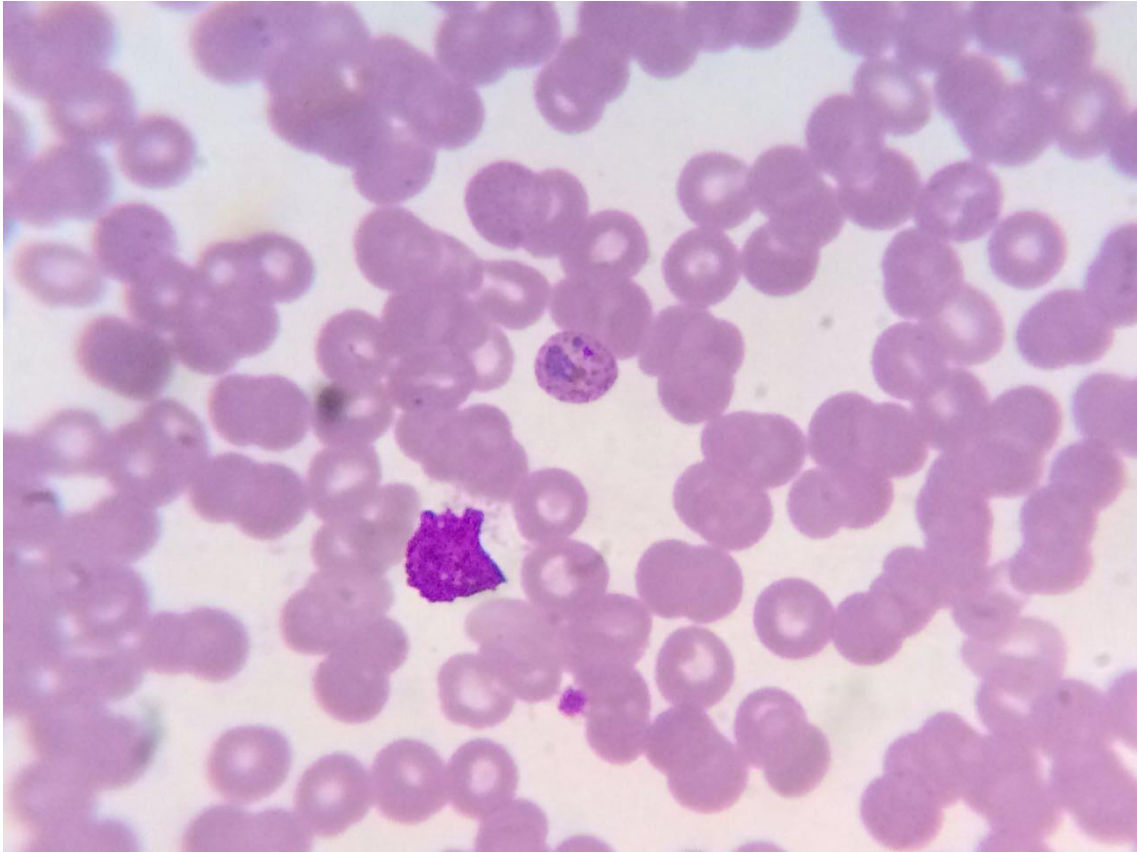


Figura 2 - Esfregaço sanguíneo de bugio-ruivo com hemácia parasitada por *Plasmodium* spp. Fonte: arquivo pessoal.

2.4. O bugio-ruivo (*Alouatta guariba clamitans*)

O Brasil é o país com o maior número de primatas conhecidos. São cerca de 140 táxons (espécies e subespécies) distribuídos em 5 famílias (Callitrichidae, Cebidae, Aotidae, Pitheciidae e Atelidae) e 19 gêneros. São 83 táxons endêmicos do Brasil. De acordo com a literatura, cerca de 40% das espécies de primatas brasileiros se encontram ameaçados de extinção (MMA, 2014).

Pertencente à família Atelidae, o gênero *Alouatta* divide-se em 9 espécies no Brasil: *Alouatta caraya* (Humboldt, 1812), *A. guariba* (Humboldt, 1812), *A. palliata* (Gray, 1849), *A. pigra* (Lawrence, 1933), *A. coibensis* (Thomas, 1902), *A. seniculus* (Linnaeus, 1766), *A. sara* (Alliot, 1910), *A. nigerrima* (Lönnberg, 1941) e *A. belzebul* (Linnaeus, 1766) (Rylands *et al.*, 2000). A espécie *A. guariba* se divide em duas subespécies: *Alouatta guariba guariba* (Humboldt, 1812) e *Alouatta guariba clamitans* (Cabrera, 1940).

Popularmente conhecido como bugio, barbado ou guariba, animais da subespécie *Alouatta g. clamitans* (figura 3) são primatas neotropicais que ocorrem no Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, no Brasil, e em Misiones, na Argentina. Tanto em nível nacional (MMA, 2014) quanto em nível estadual (Santa Catarina) (SDS, 2011) é classificada como ameaçada na categoria vulnerável. Conforme a IUCN, a espécie está ameaçada principalmente por perda ou fragmentação de habitat e morte por doenças, principalmente pela febre amarela (Mendes *et al.*, 2008).



Figura 3 - Fêmea e macho adultos de bugio-ruivo (*Alouatta g. clamitans*) de vida livre em um fragmento no município de Joinville, SC, sul do Brasil. Fonte: arquivo pessoal.

A saúde dos animais silvestres tem sido prejudicada pela fragmentação e degradação de habitats, pelo isolamento de populações, e pela maior proximidade com humanos e seus animais domésticos (Daszak *et al.*, 2000). É claro também que a proximidade filogenética entre primatas não humanos e humanos permite a susceptibilidade a vários agentes etiológicos em comum (Bennett *et al.*, 1995), sendo que aproximadamente 150 enfermidades compartilhadas já foram reconhecidas e descritas (Fiennes *et al.*, 1967).

As doenças parasitárias e infecciosas, bem como as coinfeções, estão envolvidas em eventos de extinção ou declínios populacionais. O aumento das taxas de doenças infecciosas emergentes está relacionado ao aumento das pressões antrópicas e é uma das manifestações da diminuição da saúde ecológica (Tabor, 2002). Enfermidades da fauna silvestre têm também resultado em perda de biodiversidade, devido ao incremento nas taxas de mortalidade e à diminuição das taxas de natalidade (Daszak *et al.*, 2000). O gênero *Alouatta* reúne o maior número de espécies infectadas com *Plasmodium* spp. quando comparado com os demais primatas neotropicais (Deane, 1992; Fandeur *et al.*, 2000).

Vale ainda ressaltar que estes animais silvestres, em quase sua totalidade, mascaram os sinais clínicos, não permitindo o levantamento de suspeitas clínicas e ressaltando a necessidade

de investigações periódicas de agentes etiológicos (Acha e Szyfres, 2003). Devido a isso, estudos da saúde animal são um ponto chave para a conservação. Já foi relatado malária sintomática em símio de cativeiro (Costa *et al.*, 2014), o que ressalta a necessidade de estudar a malária simiana do ponto de vista da conservação, principalmente de espécies ameaçadas de extinção.

2.5. Interdisciplinaridade

Este estudo é uma pesquisa interdisciplinar que abrange a área da saúde animal, saúde humana e saúde ambiental, o que se entende como “*One Health*” (Saúde Única). De modo geral, os benefícios que serão proporcionados a partir do presente estudo de pesquisa se estenderão à saúde animal, visto que não há conhecimentos de como o parasito se comporta naturalmente em bugios-ruivos (*Alouatta guariba clamitans*) de vida livre, espécie ameaçada de extinção. Bem como para a humana, visto que a malária é uma importante doença parasitária no mundo e no Brasil, causando inúmeras mortes nos seres humanos. Além disso, a transmissão zoonótica já foi demonstrada para algumas espécies de *Plasmodium*, *P. knowlesi*, *P. brasilianum* e *P. simium* (Sing *et al.*, 2004; Lalremruata *et al.*, 2015; Brasil *et al.*, 2017). Para o meio ambiente a importância se deve ao fato de que o bugio-ruivo possui um importante papel em seu habitat, Mata Atlântica, como a dispersão de sementes e por servirem como sentinelas para diversas doenças importantes para a saúde pública, como a febre amarela (Jerusalinsky *et al.*, 2008), devendo assim aumentar o conhecimento da espécie, principalmente de vida livre, para buscar ações de manejo para conservação da espécie.

Os resultados do presente trabalho serão apresentados em formato de artigo científico, ao qual pretende-se submeter à revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Identificar a prevalência da infecção das diferentes espécies de *Plasmodium* spp. em uma população de *Alouatta guariba clamitans* de vida livre e associar a infecção com alterações na saúde dos mesmos em um fragmento de Floresta Ombrófila Densa de Terras Baixas no município de Joinville, Santa Catarina.

3.2. Objetivos específicos

Identificar a ocorrência de infecção por *Plasmodium* spp. nos bugios-ruivos (*Alouatta guariba clamitans*), determinando as espécies responsáveis pela infecção;

Determinar a prevalência da infecção por *Plasmodium* spp. na população de *Alouatta g. clamitans* de vida livre em Joinville/SC;

Comparar a infecção por *Plasmodium* spp. nas amostras de animais capturados em diferentes momentos;

Investigar se há associação entre a infecção por *Plasmodium* spp. e alterações nos valores hematológicos e bioquímicos de bugios-ruivos, comparando os animais infectados e os não infectados, bem como nos valores morfométricos e parâmetros clínicos analisados.

REFERÊNCIAS

Acha PN. 2003. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3 ed. Publicación Científica n. 580. Washington: OPS/OMS.

Arruda ME, Nardini EH, Nussenzweig RS, Cochrane AH. 1989. Sero-epidemiological studies of malaria in indian tribes and monkeys of the Amazon basin of Brazil. *Am J Trop Med Hyg.*; 41(4): 379-85.

Bennett BT, Abee CR, Henrickson R. 1995. Nonhuman Primates in biomedical research. *Biological and Managment*. Academic Press, Inc. pp. 341-410.

Brasil P, Zalis MG, Pina-Costa A, Siqueira AM, Bianco Júnior C, Silva S, Areas ALL, Pelajo-Machado M, de Alvarenga DAM, Santelli ACFS, Albuquerque HG, Cravo P, de Abreu FVS, Peterka CL, Zanini GM, Mutis MCS, Pissinatti A, Lourenço-de-Oliveira R, de Brito CFA, Ferreira-da-Cruz MF, Culleton R, Daniel-Ribeiro CT. 2017. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. *Lancet Glob Health*, 5:1038–46.

Brasil. Ministério da Saúde (MS). 2019. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Região Extra-Amazônica. Disponível em: <https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/>. Acesso em 04.02.19.

Brasil. Ministério do Meio Ambiente (MMA). 2014. Portaria nº 444, de 17 de dezembro de 2014. Diário Oficial da União 18/12/14. Brasília, DF, p. 121-126.

Brasil. Secretaria do Estado do Desenvolvimento Econômico Sustentável (SDS). 2011. Resolução CONSEMA nº 002, de 06 de dezembro de 2011. Lex: Diário Oficial do Estado de Santa Catarina, Florianópolis, p. 02-08.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2017. Malaria. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html>. Acesso em: 10 de abril de 2017.

Cerutti-Júnior C, Boulos M, Coutinho AF, Hatab Mdo C, Falqueto A, Rezende HR, Duarte AM, Collins W, Malafronte RS. 2007. Epidemiologic aspects of the malaria transmission cycle in an area of very low incidence in Brazil. *Malar J.*; 6: 33.

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

Coatney GR, Collins WE, McWilson W, Contacos PG 1971. The Primate Malaria. U.S. Department of Health, Education, and Welfare: Bethesda, MD, USA.

Collins WE. 1994. The owl monkey as a model for malaria. In *Aotus: The Owl Monkey*. Baer, J., Weller, RE., Kakoma, I., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, USA; pp. 217-244.

Costa DC, da Cunha VP, de Assis GM, Souza Junior JC, Hirano ZM, de Arruda ME, Kano FS, Carvalho LH, de Brito CF. 2014. *Plasmodium simium/Plasmodium vivax* infections in southern brown howler monkeys from the Atlantic Forest. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*;109:641–53.

Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. 2000. Emerging infectious diseases of wildlife—threats to biodiversity and human health. *Science*. 287:443–9.

Davies CR, Ayres JM, Dye C, Deane LM. 1991. Malarial infection rate of Amazonian primates increases with body weight and group size. *Funct. Ecol.*, 5, 655-662.

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

Deane LM. 1964. Studies on Simian Malaria in Brazil. *Bull World Health Organ*. 31:752–753. pmid:14278011.

Deane LM. 1967. Monkey malaria in Brasil. A summary of studies performed in 1964–1966. *Rev. Brasil. Biol.* 27(3): 213–228.

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

Demas A, Oberstaller J, DeBarry J, Lucchi NW, Srinivasamoorthy G, Sumari D, Kabanyanyi AM, Villegas L, Escalante AA, Kachur SP, Barnwell JW, Peterson DS, Udhayakumar V, Kissinger JC. 2011. Applied genomics: data mining reveals species-specific malaria diagnostic targets more sensitive than 18S rRNA. *J Clin Microbiol*. 49: 2411-2418. 10.1128/JCM.02603-10.

Duarte AM, Malafrente R dos S, Cerutti C Jr, Curado I, de Paiva BR, Maeda AY, Yamasaki T, Summa ME, Neves D do V, de Oliveira SG, Gomes A de C. 2008. Natural *Plasmodium* infections in Brazilian wild monkeys: reservoirs for human infections? *Acta Trop.*; 107(2): 179-85.

Duarte AM, Porto MAL, Curado I, Malafrente RS, Hoffman EHE, de Oliveira SG, da Silva AMJ, Kloetzel JK, Gomes AC. 2006. Widespread occurrence of antibodies against circumsporozoite

protein and against blood forms of *Plasmodium vivax*, *P. falciparum*, and *P. malariae* in Brazilian wild monkeys. *J. Med. Primatol.*, 35, 87-96.

Fandeur T, Volney B, Peneau C, de Thoisy B. 2000. Monkeys of the rainforest in French Guiana are natural reservoirs for *P. brasilianum*/*P. malariae* malaria. *Parasitology.*; 120(Pt 1): 11-21.

Fiennes RN, Carrington R, Matthews LH. 1967. Zoonoses of Primates. The epidemiology and ecology of simian diseases in relation to man, Itaca, N.Y. Corell University Press.

Fonseca F. 1951. Plasmódio de primata do Brasil. *Mem. Inst Osw Cruz.* 49: 543-555.

Galland GG. 2000. Role of the squirrel monkey in parasitic disease research. *Inst. Anim. Lab. Res.*, 41, 37-43.

Garnham PCC. 1966. Malaria parasites and other heamosporidia. Blackwell Scientific, Oxford.

Gasper AL, Lichtenfelz FA e Leitempergher L. 2015. Levantamento Florístico e Fitossociológico da vegetação do Condomínio Perini Business Park, Joinville, Santa Catarina. Relatório Técnico. Blumenau, SC.

Gilles HM. 2002. Historical outline. In *Essential Malariology, Fourth Edition*; Warell, D.A., Herbert M., Gilles, H.M., Eds.; Oxford University Press: New York, NY, USA; pp. 1-7.

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

Jerusalinsky L, Martins AB, Laroque PO, Levacov D, Ferreira JG, Fialho MS. 2008. Nota Técnica. Nota técnica não publicada do Centro de Proteção de Primatas Brasileiros, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade.

Lal AA, de la Cruz VF, Collins WE, Campbell GH, Procell PM, McCutchan TF. 1988. Circumsporozoite protein gene from *Plasmodium brasilianum*: Animal reservoirs for human parasites? *J. Biol. Chem.*, 263, 5495-5498.

Lalremruata A, Magris M, Vivas-Martínez S, Koehler M, Esen M, Kempaiah P, Jeyaraj S, Perkins DJ, Mordmüller B, Metzger WG. 2015. Natural infection of *Plasmodium brasilianum* in humans: man and monkey share quartan malaria parasites in the Venezuelan Amazon. *EBioMedicine*; 2:1186–1192. doi: 10.1016/j.ebiom.2015.07.033.

- Leclerc M, Hugot J, Durand P, Renaud F. 2004. Evolutionary relationships between 15 *Plasmodium* species from new and old world primates (including humans): an 18S rDNA cladistic analysis. *Parasitology* 129, 677-684.
- Liu Q, Zhu S, Mizuno S, Kimura M, Liu P, Isomura S, Wang X, Kawamoto F. 1998. Sequence variation in the small-subunit rRNA gene of *Plasmodium malariae* and prevalence of isolates with the variant sequence in Sichuan, China. *J Clin Microbiol.* 36: 3378-3381.
- Marelli L, Stigliano R, Triantos C, Senzolo M, Cholongitas E, Davies N, Tibballs J, Meyer T, Patch DW, Burroughs AK. 2007. Transarterial therapy for hepatocellular carcinoma: Which technique is more effective? A systematic review of cohort and randomized studies. *Cardiovasc Interv Radiol* 30:6–25.
- Mendes SL, Rylands AB, Kierulff MCM & de Oliveira MM. 2008. *Alouatta guariba ssp. clamitans*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T39918A10285929. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T39918A10285929.en>. Downloaded on 12 October 2018.
- Pina-Costa A, Brasil P, Di Santi SM, Araujo MP, Suárez-Mutis MC, Santelli ACFS, Oliveira-Ferreira J, Lourenço-de-Oliveira R, Daniel-Ribeiro CT. 2014. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* v. 109, n.5.
- Rodrigues PT, Valdivia HO, de Oliveira TC, Alves JMP, Duarte AMRC, Cerutti-Junior C, Buery JC, Brito CFA, de Souza JC Jr, Hirano ZMB, Bueno MG, Catão-Dias JL, Malafronte RS, Ladeia-Andrade S, Mita T, Santamaria AM, Calzada JE, Tantular IS, Kawamoto F, Raijmakers LRJ, Mueller I, Pacheco MA, Escalante AA, Felger I, Ferreira MU. 2017. Human migration and the spread of malaria parasites to the New World. *bioRxiv* doi:10.1101/141853.
- Rylands AB, Schneider H., Langguth A., Mittermeier A., Groves CP. & Rodrigues-Luna E. 2000. Na assessment of the diversity of new word monkeys. *Neotrop. Primates* 8: 61 – 93.
- Sibal LR, Samson KJ. 2001. Nonhuman primates: A critical role in current disease research. *Inst. Anim. Lab. Res.*, 42, 74-84.
- Singh B, Lee KS, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SSG, Cox-Singh J, Thomas A, Conway D. 2004. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *The Lancet.*;363:1017–1024.

Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN. 1993. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol.* 58(2): 283-92.

Stewart M, Pendergast V, Rumfelt S, Pierberg S, Greenspan L, Glander K, Clarke M. 1998. Parasites of wild howlers. *Int. J. Primatol.*, 19, 493-512.

Tabor GM. 2002. Defining Conservation Medicine. In: *Conservation Medicine Ecological Health In Practice*. Aguirre, AA.; Ostfeld, R.S.; Tabor, G.M.; House; Pearl, M.C. Oxford University Press. p. 8 -16.

Thiago PTS. 2003. História da Malária em Santa Catarina. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública. Florianópolis, Santa Catarina.

Tuteja R. 2007. Malaria - an overview. *FEBS J.*; 274(18): 4670-4679.

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

World Health Organization (WHO). 2015. Guidelines for the treatment of malaria – 3rd edition.

World Health Organization (WHO). 2018. World malaria report 2018. Geneva: World Health Organization. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Yamasaki T, Duarte AM, Curado I, Summa ME, Neves DV, Wunderlich G, Malafrente RS. 2011. Detection of etiological agents of malaria in howler monkeys from Atlantic Forest, rescued in regions of São Paulo city, Brazil. *J Med Primatol.*; 40(6): 392-400.

PREVALENCE OF INFECTION BY *Plasmodium* spp. AND ITS ASSOCIATION WITH BIOCHEMICAL AND HEMATOLOGICAL PARAMETERS IN *Alouatta guariba clamitans* (CABRERA, 1940) (PRIMATES: ATELIDAE) OF FREE-LIVING IN SOUTHERN BRAZIL.

Infection by *Plasmodium* spp. in *Alouatta guariba clamitans*.

Ana Júlia Dutra Nunes¹, Denise Anete Madureira de Alvarenga², Julio Cesar de Souza Junior³, Zelinda Maria Braga Hirano³, Cristiana Ferreira Alves de Brito^{2,#} e Marta Jussara Cremer^{1,4}.

¹ Health and Environment Graduate Program - Joinville Region University (UNIVILLE), Joinville, Santa Catarina, Brazil;

² René Rachou Institute – Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz Minas Gerais), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil;

³ Blumenau Regional University (FURB) / Bugio Project, Blumenau, Santa Catarina, Brazil.

⁴ Laboratory of Ecology and Conservation of Marine and Coastal Tetrapods – UNIVILLE, São Francisco do Sul, Santa Catarina, Brazil.

Corresponding author: Cristiana Ferreira Alves de Brito, cristiana.brito@fiocruz.br; René Rachou Institute - Fiocruz Minas - Av. Augusto de Lima 1715, Barro Preto, Belo Horizonte/MG, Brazil. 30190-009.

ABSTRACT

BACKGROUND *Alouatta* comprises the largest number of different species naturally infected by *Plasmodium* spp. among the neotropical primates, the main one is the Southern brown howler monkey, *Alouatta guariba clamitans*, which is threatened with extinction. Non-human primates are believed to be malaria reservoirs in forest regions, but little is known about the implications of infection on the health and conservation of these animals.

OBJECTIVES The aim of this study was to determine the prevalence of *Plasmodium* spp. infection in free-living howler monkeys in an Atlantic Forest fragment in Joinville/SC and to associate the infection with hematological and biochemical alterations.

METHODS The howler monkeys were captured with anesthetic darts and the collected blood was used for DNA extraction and hematological and biochemical tests. The molecular diagnosis of *Plasmodium* infection was performed by *Nested-PCR* (18S SSU rRNA or *coxI*). Hematological and biochemical tests were compared among infected and non-infected animal using the Student's t-test or Mann-Whitney U test.

FINDINGS Forty animals were captured, from which seven were captured twice, and one three times. The estimated prevalence of *Plasmodium* infection was 70% (28/40), the highest reported for neotropical primates. Infected howler monkeys showed higher mean values of lymphocytes ($p=0.010$), alanine aminotransferase (ALT) ($p=0.003$), and aspartate aminotransferase (AST) ($p=0.037$) comparing to non-infected ones. Comparing infected males and females, females presented higher mean values of lymphocytes ($p=0.014$) and ALT ($p=0.003$); and males showed higher ALT ($p=0.046$) and reduced albumin values ($p=0.049$). Animals with mixed infection displayed higher mean ALT values ($p=0.019$), and lower total protein levels ($p=0.023$) comparing to animals infected with *P. simium* or *P. brasilianum*.

MAIN CONCLUSIONS This work shows that malarial infection in howler monkeys causes hematological/biochemical alterations which suggest hepatic commitment. It is yet necessary to establish the impact of these changes, but it is already unambiguous the

need to monitor infection in these animals, especially during translocations, for the eco-epidemiological surveillance of malaria in the Atlantic Forest.

Key words: *Plasmodium simium* - *Plasmodium brasilianum* – *Alouatta guariba clamitans*
- Endangered Species – Malaria - Primate Diseases

Financial support: Fundação de amparo a pesquisa do estado de Minas Gerais (Fapemig), Coordenação para o aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

INTRODUCTION

Malaria is an important parasitic disease caused by obligate intracellular protozoa of the genus *Plasmodium*, family Plasmodiidae, Suborder Haemosporidae, order Coccidia, which infects mammals, birds, and reptiles. The species that cause infection in humans are *Plasmodium falciparum* (Welch, 1897), *Plasmodium vivax* (Grassi & Feletti, 1890), *Plasmodium malariae* (Laveran, 1881), *Plasmodium ovale* (Stephens, 1922), restricted to the African continent, regions of Asia and Pacific Islands, and *Plasmodium knowlesi* (Sinton and Mulliga, 1933), which occurs in Southeast Asia and, originally, infects non-human primates in the Old World.⁽¹⁾

Infection by *Plasmodium* in non-human primates (NHPs) occurs in several prosimians, apes, Old World and New World monkey species.⁽²⁾ Twenty-eight species of *Plasmodium* have been described infecting NHPs, but only two parasite New World primates (NWP) in Mexico, and in different countries of the Central and South America: *Plasmodium brasilianum* (Gonder & Berenberg-Gossler, 1908), and *Plasmodium simium* (Fonseca, 1951). These parasites are morphologically, genetically and immunologically similar to the human parasites *Plasmodium malariae*, and *Plasmodium vivax*, respectively.⁽³⁻⁶⁾ Lalremruata *et al.*⁽⁷⁾ and Brasil *et al.*⁽⁸⁾ molecularly characterized *P. brasilianum* and *P. simium* infections in humans and NHPs, suggesting their zoonotic transmission.

In 2017, around 219 million human malaria cases were recorded worldwide, causing about 435,000 deaths, of which around 90% of cases and deaths occurred in African continent.⁽¹⁾ In Brazil, 217,928 cases of malaria were registered in 2017.⁽⁹⁾ In the extra-Amazon region, 310 confirmed cases of *P. falciparum* or mixed malaria, and 422 confirmed cases of *P. vivax* were reported in 2018.⁽⁹⁾ Brasil *et al.* reported a *P. simium* outbreak in the mountain region of the Rio de Janeiro State, suggesting a zoonotic transmission of malaria in the Atlantic Forest regions.⁽⁸⁾ Zoonotic malaria represents a unique problem for the efforts in malaria control and hinders eventual elimination of malaria, because NHPs may act as reservoirs for malaria in forest regions.^(2-3,8)

Among the species of NWP, a large number are susceptible to malaria infection, and amidst the species infected by *P. simium* and *P. brasilianum* are the howler monkey, *Alouatta guariba clamitans*, belonging to the family Atelidae. This is a NWP endemic of the Atlantic Forest and is considered vulnerable at regional and national levels.⁽¹⁰⁻¹¹⁾ According to the International Union for Conservation of Nature (IUCN, <https://www.iucn.org>), the subspecies is threatened mainly by habitat loss or

fragmentation and death caused by diseases, especially yellow fever.⁽¹²⁾ Although malaria infection has already been described in these animals^(4,13-16) the impact on animal health and conservation has not been elucidated yet.

The only report of suggestive symptoms of malaria in NWP was described by Costa *et al.* for a captive howler monkey in the municipality of Indaial/SC, infected by *P. simium*, however other infections were not investigated.⁽¹⁶⁾ The animal showed anorexia, weakness, apathy, intermittent muscle tremors, pale mucous membranes, mild dehydration, and loss of muscle mass and body weight. Additionally, it presented some hematological and biochemical alterations, such as anemia, leucopenia with neutropenia, and severe thrombocytopenia. Biochemical analyzes showed a significant increase in urea, alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), hypoalbuminemia, and hypoproteinemia.⁽¹⁶⁾

The present study aimed at determining the prevalence of *Plasmodium* spp. infection in a population of free-living *A. g. clamitans* in a fragment of ombrophilous dense lowland forest in urban perimeter in southern Brazil, in the years 2015 and 2017, identifying the species of *Plasmodium* spp. responsible for the infection, and the occurrence of variations in hematological and serum biochemical values of infected and uninfected individuals, as well as morphometric, and clinical parameters.

MATERIALS AND METHODS

Study Area - The study was performed in a 163 ha fragment of ombrophilous dense lowland forest,⁽¹⁷⁾ located in a private property in the northern region of the city of Joinville, in Santa Catarina State, southern Brazil (26° 14' 41.78" S; 48° 53' 02.87" W) (Figure 1). This municipality is the largest in the state, with 583,144 people and 1,126,106 km² of territorial unit (IBGE, <http://www.ibge.gov.br>). The fragment is located in the border of an industrial area and rural area, being part of the River Basin of the Rio do Braço (Arm River). In this area, the density of the brown howler monkey is 0.82 individuals/hectare, total of 133 animals.⁽¹⁸⁾

The hydrographic basin relief is constituted by alluvial-sedimentary plains with great pedogenetic development, in the region is formed by a single littoral plain. The area is characterized by strongly degraded Atlantic Forest vegetation cover, which also affects watercourses. Although fragmented, the area presents secondary vegetation at an advanced stage of regeneration, where there is a predominance of zoochoric species.⁽¹⁹⁾

According to the Köppen's classification, the predominant climate in the region is mesothermal, humid, without dry season. The annual average relative humidity of the air is 76%. It presents a humid mesothermal subtropical climate type with hot summer. The region is greatly influenced by the relief, particularly the sea ridge, which acts as a natural barrier to the humidity brought from the ocean. For this reason, the moisture and rainfall indexes are higher than in the plateau areas.

Procedure of capture and biological material sampling - Two campaigns were performed to capture howler monkeys, from July to December in 2015 and 2017. The search for the animals was performed through linear transects, formed by perpendicular trails of 300 to 1,000 meters in length, with a distance of 100 meters between them, previously open for the estimation of the density of individuals in the area. We have also done an active search in the forest sites where the permanence of the animals was already known. To capture the howler monkeys, we employed an injector dart projector model 70, of carbon dioxide (CO₂) from Dist Inject®, using butane gas for pressure.⁽²⁰⁾ The darts (Mini-ject®), caliber 11mm, with wool stabilizer, and 25mm needle with bush, and counterweight were used. The anesthetic used in chemical containment was the combination of tiletamine hydrochloride and zolazepam hydrochloride at a dose of 5.5mg/kg. The site selected for dart insertion in the animal was the lower forth, giving preference to gluteus and thigh.⁽²⁰⁾ The captured animals were protected during the fall with a safety net or rescued by abseiling and tree climbing.

We used a protocol of clinical evaluation, collection of biological material, and morphometric measures, adapted from the one proposed by the Chico Mendes Institute of Biodiversity Conservation - ICMBio,⁽²¹⁾ where records and information from each animal captured were performed, such as capture date, capture identification (ID), microchip number implanted in the subcutaneous region of the intra-scapular region, sex, and age group (estimated as proposed by Carpenter).⁽²²⁾ Furthermore, we performed the clinical evaluation of the individual, considering rectal temperature, respiratory and heart rates, palpation of the abdomen, as well as visual inspection of the eyes and nostrils, skin, hair, among others. The effects of anesthesia were monitored every ten minutes collecting information such as heartbeat, respiratory movements, rectal temperature, and O₂ saturation. All the procedure was performed in the place of the capture.

The morphometric parameters of the howler monkeys were measured with a pachymeter (head width, face, ear width, ear length, forearm length, arm, hand, scrotum

or vulva width, scrotum or vulva length) and with a measuring tape (head-tail length, tail, chest circumference, arm circumference, thigh circumference) (Figure S1).

Blood collection (4 mL/kg) was performed, after weighing the animal, by puncturing the femoral or brachial vein using a needle, and vacuum tubes without and with anticoagulant (5% EDTA). After sampling, the tubes were stored refrigerated (12°C) or in a water bath (35°C for blood clot retraction and serum collection, after centrifugation at 3,000 x g for 5 minutes - tubes without EDTA), for further analyses in the laboratory to be performed. All unused biological material was deposited in the collection of biological material of howler monkeys of CEPESBI under registration in CEGEN Process n° 02000.003226/2006-91. After the procedure, the animals were kept in the transport box for approximately 5 hours after the term of the procedures and released at the same capture site after the anesthetic effect ended.

Hematological analysis - To perform the blood count, we used total blood in a tube containing EDTA and performed the analysis in the automated veterinary hematological counter pocH-100iV Diff® (Sysmex, Japan), immediately after collection. We performed differential count of leukocytes (neutrophils, eosinophils, basophils, lymphocytes, monocytes, and rods) by reading the blood smear slides stained with quick panoptic under an optical microscope. The quick panoptic was performed according to the manufacturer's specifications.

Biochemical analysis - The biochemical exams were performed in duplicate of aliquots of serum stored in a freezer at -12 °C. In 2015, dosages were performed with the use of commercial BIOSYSTEMS® kits and read in BIO-2000® photocolormeter (Bioplus, Brazil). In 2017, we employed the Cobas® C111 analyzer (Roche, Switzerland), according to the manufacturer's instructions, in the clinical laboratory of the Veterinary hospital of FURB.

The biochemical dosages included glucose, total cholesterol, triglycerides, total proteins (TP), albumin, urea, creatinine, ALT, AST, gammaglutamyltransferase (GGT), alkaline phosphatase (FA), creatine kinase (CK), lactate dehydrogenase (LDH), and iron (evaluated only in samples collected in 2017).

Plasmodium spp. diagnosis - We added 4 mL of RNAlater (QIAGEN, Minneapolis, USA) to 1 mL of whole blood, and 300 µL were used for DNA extraction using the

QIAamp DNA mini Kit (QIAGEN, Minneapolis, USA) according to the manufacturer's specifications. For DNA extraction control, the samples were submitted to PCR for amplification of the mammalian cytochrome B gene,⁽²³⁾ which amplifies a 350 bp fragment in Neotropical primates (data not shown).

The molecular diagnosis was performed by *Nested*-PCR targeting the 18S SSU rRNA or the mitochondrial *coxI* gene. The *Nested*-PCR reactions targeting the 18S SSU used the protocol and primers described by Snounou *et al.* for diagnosis of *Plasmodium* species infecting humans.⁽²⁴⁾ The primers described for *P. malariae* were employed to identify *P. brasilianum* infection in NWPs and the primers for *P. vivax* were used to identify *P. simium* infection in NWPs, because those primers do not discriminate among these two pairs of *Plasmodium* species. Briefly, the reactions were performed in a 20 μ L volume using: 100-200 ng of DNA, 0.25 μ M of each of the primers, 10 μ L of Master Mix (PROMEGA- 0.3U Taq DNA Polymerase, 200 μ M each of dNTPs and 1.5 mM MgCl₂). Amplifications were performed on the PTC-100 automatic thermocycler Version 7.0 (MJ Research Inc, Watertown, MA, USA) and the cycling conditions were, for the first reaction: a cycle of 95°C for five minutes, 24 cycles of 58°C for two minutes, 72°C for two minutes, and 94°C for one minute, followed by a final cycling of 58°C for two minutes, and 72°C for five minutes, and 4°C for unlimited time. The second reaction was performed under the same conditions, but with 29 cycles, using 1.0 μ L of the amplified product of the first reaction as template DNA.

The differential diagnosis of *P. simium* in relation to *P. vivax* was based on the *Nested*-PCR of a *coxI* gene fragment and subsequent enzymatic digestion, using primers and protocol described by Alvarenga *et al.*⁽²⁵⁾ Briefly, the first reaction was performed in 20 μ L volume containing 0.5 μ M of each primer, 2 μ L of DNA, 0.2 μ L of Taq DNA polymerase (5 U/ μ L) (Invitrogen) 0.2 mM dNTPs, and 1.5 mM MgCl₂. PCR assays were performed in a thermocycler (Veriti 96 wells, Applied Biosystems) with the following cycling parameters: initial denaturation at 94°C for 2 min, followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 54°C for 20 sec, extension at 72°C for 30 s, followed by a final extension incubation at 72°C for 2 min. The temperature was then reduced to 4°C until the samples were removed. For the second PCR, 1-3 μ L of the primary product was used as the template. The cycling parameters for the second PCR cycle were the same as for the first cycle. Amplified fragments were visualized by electrophoresis on 2% agarose gels in 1x TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA)

with 5 µg/mL ethidium bromide (Invitrogen) in a horizontal system (Bio-Rad) at 100V for 30 minutes.

The PCR products (verified by agarose gel electrophoresis) were digested with the restriction enzyme *HpyCH4III* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Digestion was performed in 10 µL containing 0.5 µL of the enzyme (5 U/µL), 1 µL of the enzyme buffer, and 2-7 µL of the PCR product according to its intensity in the agarose gel. The digestion was incubated at 37°C for 3 hours. The whole products of the digestion and the equivalent amount of DNA were visualized in 3% agarose gel electrophoresis and examined under a UV transilluminator.

Statistical analysis - The variable distribution was measured by the Kolmogorov Smirnov and Shapiro Wilk tests, and analysis of the variables performed using the Student's t-test or the Mann-Whitney U test. For the categorical variables, Chi-square test or Fisher's exact test was used. For some statistical analyzes only adult and subadult individuals were considered, because juvenile showed different parameters.⁽²⁶⁾ The effect size (r) in the categories with statistical difference ($p \leq 0.05$) was calculated for the non-parametric variables, and eta squared (η^2) for the parametric variables. The data were analyzed in the program SPSS version 23.

Ethical and legal considerations - The study was approved by the Ethical Committee on the Use of Animals of the Regional University of Blumenau – FURB, under the protocol n° 012/15 and authorized by the System of Authorization and Information in Biodiversity - SISBIO n° 43375-6.

RESULTS

The first campaign of monkeys capture occurred from July to December 2015, totaling 22 days in the field, and 30 captures of 29 different howler monkeys. The second campaign was carried out in the period from July to December 2017, totaling 22 days in the field, and 19 catches of 11 different howler monkeys. The capture balance in both campaigns was 1.1 monkey/day.

We captured animals of both sexes and of different age groups. In total, 40 individuals (21 females and 19 males) were captured (Table 1). Seven howler monkeys were captured twice, and one was captured three times, the others were captured only once (Table 2).

The total number of captured animals corresponded to 30% of the total population estimated for this fragment area.⁽¹⁸⁾

The diagnosis of *Plasmodium* spp. resulted from the combined diagnosis of the two molecular methodologies; initially used to identify infection by *P. simium*/*P. vivax* and by *P. brasilianum*/*P. malariae*, and, subsequently, for differential diagnosis of infection by *P. simium* (Table S1, Figure S2). The differential diagnosis between *P. brasilianum* and *P. malariae* has not been available yet. The prevalence of *Plasmodium* spp. in the captured animals was estimated at 70% (28/40) (Table 1). In 2015, the prevalence was 75.86% (22/29) and in 2017 the prevalence decreased for 55.6% (10/18), considering only different animals in each capture.

There was no difference in the prevalence of *Plasmodium* spp. between the sex (Chi-square test, $p=1.00$), as well as for the sexes within the adults' age group (Fisher's exact test, $p=1.00$). The prevalence of *Plasmodium* spp. in non-adults was 83.33% (5/6), only one animal was not infected. The prevalence of infection in adults was 67.65% (23/34) (Table 1). However, there was no statistical difference between the infection prevalence in two age groups (Fischer's exact test, $p=0.326$).

For animals captured more than once, it was observed that animals 1, 7 and 9 had the same diagnosis in the two captures, however the other monkeys showed distinct diagnosis at different times (Table 2). The animal 8, the only one caught 3 times, presented positive diagnosis for *P. simium* in 2015 (sample 9), in the first capture of 2017 presented mixed infection (sample 39), and in its last capture (2 months later) (sample 42) it was positive for *P. simium* again. Animal 10 in 2015 was positive for *P. simium* (sample 11) and it was negative for *Plasmodium* spp. infection in 2017 (sample 40). Animals 12 and 20 were diagnosed with *P. brasilianum*/*P. malariae* (samples 13 and 21), and in 2017 were positives for *P. simium* (samples 48 and 44). Animal 17, in 2015, was diagnosed as negative (sample 18), and, in 2017, positive for *P. simium* (sample 34).

Females and males presented body weight of 3.91 kg (± 0.90) and 5.23 kg (± 0.73), respectively. This analysis was based only in adults and subadults, excluding juveniles, because they presented weight significantly lower (Student's t-test, $p=0.003$). The mean of the clinical parameters evaluated was: rectal temperature - 37.37°C (± 1.65); heart rate - 154.96 bpm (± 27.40) and respiratory rate - 21.41 breaths per minute (± 7.23). Upon palpation, two howler monkeys presented splenomegaly, animal 6 and 20 (sample 44) (Table S1). All monkeys had normally colored mucosa and normal hydration. There were no statistical differences for weight and for all morphometric measures evaluated, when

comparing infected and uninfected males, and infected and uninfected females (Table S2).

For the statistical analyzes of hematological (Table 3) and biochemical (Table 4) parameters comparing infected and uninfected animals, only adults and subadults were considered (n = 34), because juveniles (n = 6) showed some values significantly lower (hemoglobin - Student's t-test, $p < 0.001$; hematocrit - Student's t-test, $p = 0.015$; monocytes – Mann-Whitney U test, $p = 0.045$; urea - Student's t-test, $p = 0.015$).

The infected howler monkeys presented higher mean lymphocyte values ($p = 0.010$, $r = 0.46$), and ALT ($p = 0.003$, $\eta^2 = 0.26$) and AST levels ($p = 0.037$, $r = 0.35$). Analyzing the samples by sex, females infected with *Plasmodium* spp. presented the higher mean lymphocyte values (Mann-Whitney U test, $p = 0.014$), and ALT levels (Student's t-test, $p = 0.003$) comparing to non-infected females. Infected males presented a lower mean albumin level (Student's t-test, $p = 0.049$), and higher levels of the ALT (Student's t-test, $p = 0.046$) compared to non-infected males.

There was no difference in any of the hematological values of howler monkeys among those who had only one *Plasmodium* species (*P. simium* or *P. brasilianum/P. malariae*) (n = 10) and those with mixed infection (n = 12). However, for the biochemical parameters, animals with mixed infection had lower values of total proteins (Student's t-test, $p = 0.023$), and higher levels of the enzyme ALT (Student's t-test, $p = 0.019$) than those with only one parasite species.

DISCUSSION

Plasmodium brasilianum has been described as able to infect NHPs in the Amazon and Atlantic Forest biomes, in Brazil.^(4,13-16,27) This species infects naturally a wide range of Neotropical primates, including species from all families of New World primates.^(4,27) This parasite is widely diffused from Central America to the South of Brazil, and has been described in Mexico, Panama, Costa Rica, Venezuela, Colombia, French Guiana, Peru, and Brazil.⁽²⁸⁻³³⁾

Plasmodium simium is restricted to the Atlantic Forest in southern and southeastern Brazil, where it has been reported in Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina and Rio Grande do Sul States.^(4,13-16) Thus far, *Alouatta caraya*, *Alouatta guariba*, *Brachyteles arachnoides*, *Cacajao melanocephalus*, *Callicebus nigrifrons*,

Cebus spp., *Sapajus robustus*, and *Sapajus xanthosternos* species were diagnosed with natural *P. simium* infection.^(4,13,15,25,34)

The prevalence of *Plasmodium* spp. infection in NHP observed in the present study was the greatest one found in the literature for species of New World primate. However, it should be considered that the methodologies used in the studies were different, since only in 2007 the molecular methods were introduced for the diagnosis of the infection by *Plasmodium* spp. in non-human primates.⁽³⁵⁾ Furthermore, we have also observed a high rate of mixed infection. In accordance with other studies in the Atlantic forest,^(14,16) we identified the prevalence of *P. simium* infection (22.5%) higher than by *P. brasilianum* (7.5%).

The rate of *Plasmodium* spp. infection in howler monkeys varies according to geographical region, and, as previously discussed, the diagnosis method. Deane in 1964 identified, by optical microscopy, 35% of infection in São Paulo State.⁽³⁶⁾ Duarte *et al.* identified an infection rate of 11.3% positive for *Plasmodium* spp. in the same state.⁽¹³⁾ In the metropolitan area of São Paulo, Yamasaki *et al.*, using PCR, found 18% positivity for *P. simium*/*P. vivax* in howler monkeys and 4% for *P. brasilianum*/*P. malariae*.⁽¹⁴⁾ In the state of Espírito Santo, Cerutti-Júnior found two positives for *Plasmodium* spp., in 5 howler monkeys (*Alouatta clamitans*), being one free-living, and one captive.⁽³⁵⁾ In the state of Rio Grande do Sul, it was observed 14.5% of natural infection by *Plasmodium* spp. in 55 howler monkeys.⁽³⁷⁾ In the same study, Deane and Neto described that the highest prevalence in the state was identified in the municipality of Guaíba (57.1%), through the thick and thin blood smear method. Additionally, two other animals presented malarial pigment in the spleen, suggestive of malaria.⁽³⁷⁾

The first record of primates infected with *Plasmodium* spp. in Santa Catarina indicated that 38.5% of the howler monkeys were infected in Joinville.⁽³⁸⁾ Deane in 1992 reported 46% of the primates were infected with malaria parasites in the neighborhood of Joinville.⁽⁴⁾ Costa *et al.*⁽¹⁶⁾ studied 65 howler monkeys (*Alouatta clamitans*) from the municipality of Indaial, also in Santa Catarina State, and the positivity rate for *P. simium* was of 35% (7/20) for free-living NHPs, and 4.4% for captive howler monkeys.⁽¹⁶⁾ In this study, *P. brasilianum* was not identified, which differs from the present study.

The high prevalence found in Joinville can be attributed to the forest formation of the region. The dense ombrophilous lowland forest is characterized by the presence of large numbers of bromeliads,⁽¹⁹⁾ plants that accumulate water and function as natural breeding grounds for anopheline species, which are responsible for the parasite transmission.⁽³⁹⁾

In the howler monkeys sampled at different times we observed three different patterns: (i) the diagnosed infection was with the same *Plasmodium* species in all samples (animals 1, 7, and 9); (ii) infection was negative at one time and positive at another (animals 10, and 17); and (iii) the infection was diagnosed with different species (animals 8, 12, and 20). In the first group, the samples with the same diagnosis of infection had intervals of 1 month (animal 1) and 2 years (animal 9), which may suggest a chronic infection, as suggested by Deane⁽³⁶⁾ and Erkenwick *et al.*⁽³³⁾ However, in order to confirm this hypothesis, it is necessary to show that the parasites are genetically identical at the different periods. In relation to the second group, one of the animals became infected between 2015 and 2017 (animal 17), the other animal became negative, which may be due to self-cure, already described for *P. simium*.⁽³⁶⁾ In the third group, the diagnosis varied from one sample to another, which might be an artifact of the diagnosis that sometimes does not detect the mixed infection, or temporary infections that are self-cured and the animals reinfect with another species of *Plasmodium*. The hypothesis that some infections are not diagnosed due to low parasitemias should be considered, because according to Snounou *et al.*, 10 parasites/ μ L of blood may be detected in a conservative manner.⁽²⁴⁾ Nevertheless, in the detection of *P. simium* through the technique described by Alvarenga *et al.*, the test is able to identify up to 3.12 parasites/ μ L in the sample.⁽²⁵⁾ There is also the possibility that, at the sampling time, the blood aliquot used for the test was not likely to seize the parasite in the circulation because of little number of parasites, as suggested by Hofmann *et al.*⁽⁴⁰⁾

Deane reported that infection in howler monkeys was more frequent in adults than in young animals that differed from our findings, in which the frequency was higher in juveniles, although differences were not statistically significant.⁽³⁸⁾ However, the number of juveniles sampled was low in comparison to that of adults, due to the preference for the capture of the adult animals, in order to avoid possible lesions in the howler monkeys with lower weight, and smaller size. The females presented the value of the body weight below the average found for the species; nonetheless, there was no correlation with the presence of the infection. Amidst the animals that presented splenomegaly upon abdominal palpation, one was negative for *Plasmodium* spp. infection and the other was infected with *P. simium*. Splenomegaly is a fairly common finding in patients with malaria. It has been described in *P. vivax*, *P. malariae* and *P. ovale* infections in humans.⁽⁴¹⁾

Regarding the morphometric measurements, no differences were observed between infected and uninfected males, and infected and uninfected females, which may suggest that the infection does not interfere with these animal's body features.

Our results indicate an increase in lymphocytes in the blood of howlers infected with *Plasmodium* spp. Lymphocyte augmentation has already been reported in splenectomized common marmosets (*Callithrix jacchus*) infected in laboratory with *P. brasilianum*.⁽⁴²⁾ In general, human patients infected with *P. vivax* tend to present a significantly lower number in lymphocyte counts.⁽⁴³⁾ However, our results agreed with other authors such as Lacerda *et al.*,⁽⁴⁴⁾ in which the mean lymphocyte count was elevated in 29.6% of patients with *P. vivax* infection from Brazilian endemic area.

The augmented levels of the hepatic enzymes ALT and AST showed by infected howler monkeys corroborate the unique report of an animal of the same species (*Alouatta g. clamitans*) with symptoms suggestive of malaria.⁽¹⁶⁾ Abnormalities in liver function have been reported in patients infected with *P. falciparum*.⁽⁴⁵⁾ Hepatic enzyme alterations have also been identified in infections by other *Plasmodium* species (*P. vivax*, *P. malariae* and *P. ovale*), however, generally without significant clinical complications.^(41,43) Alanine transaminase is considered the most important specific liver enzyme. In our present work, ALT was elevated in all analyzes, either comparing infected versus uninfected or in the subdivisions comparing only females or males and, it was also higher monkeys with mixed infections compared to infection with a single parasite species. These data suggest that *Plasmodium* spp. infection results in hepatic impairment in NWP. Despite the significant ALT findings in the different analyzes, their calculated effect size was low, which may be due to our reduced sample number. Further studies are necessary with probabilistic sampling to confirm the result. While the AST and lymphocyte parameters displayed a medium effect size, that is, in addition to the statistical difference in infected howler monkeys, both parameters had a more prominent effect on the population.

Among infected males, a low albumin levels was observed, which also corroborates the report by Costa *et al.*,⁽¹⁶⁾ where howler monkeys with symptoms suggestive of malaria presented hypoalbuminemia. This low levels may be a consequence of its uptake and degradation by the parasites during intraerythrocytic growth, and differentiation.⁽⁴⁶⁻⁴⁷⁾ It is also possible that the cause is the decrease in the synthesis of albumin by the liver, due to hepatic commitment because of the hepatocytes degradation caused by the presence of parasites.⁽⁴⁸⁾ The low total proteins values in animals with mixed infection, when compared to the animals with only one *Plasmodium* species infection, might reinforce the

suggestion that the infection might cause insufficiency in proteins synthesis due to possible hepatic damage. Furthermore, it suggested that the howler monkeys with mixed infection are under a greater challenge to maintain homeostasis because of the additive effect of the presence of the two species of parasites.

It is not yet known whether under natural conditions NHPs infected by *Plasmodium* spp. may develop malaria. The studies that characterize the clinical features of malaria in howler monkeys were all performed after experimental infection in splenectomized animals.⁽²⁾ One of the few descriptions of clinical signs and hematological changes resulting from *Plasmodium* natural infection in NHPs was performed by Costa *et al.*⁽¹⁶⁾ The infection by *P. simium* in neotropical primates is subpatent, chronic, and usually asymptomatic, probably due to an action of the immune system controlling the parasitemia, and consequently avoiding the changes resulting from the infection. This probable action would explain why naturally infected howler monkeys may show clinical signs of malaria when they are under stress conditions.⁽¹⁶⁾ In the animals that underwent the experimental splenectomy, it was observed that infection by *Plasmodium* spp. may cause weakness, fever, anemia, jaundice, and renal failure.⁽³⁶⁾ Natural infection by *P. simium* is characterized by low parasitemia, however, after splenectomy; parasitemia increases.⁽³⁶⁾ Most of the time, the infection is self-controlled after a few weeks, in some cases, the animals evolved to death due to the increase of the parasitemia. The symptoms observed in naturally infected howler monkeys were similar to those resulting from experimental infections.⁽³⁶⁾

The impact and the natural interaction between the parasite *Plasmodium* spp. and the host NHP are not yet fully known. With this study, it was possible to observe that, although the howler monkeys were asymptomatic, there were alterations in the hematological and biochemical parameters in the infected monkeys, which may have an impact on the health of the animals, mainly due to possible interactions that may generate some stress to these animals.⁽¹⁶⁾

It is also necessary to evaluate the risks in the translocation of primates for the diagnosis of the infection by *Plasmodium* spp., predicted by Normative Instruction number 179 of the Brazilian Institute of Environment and Natural Renewable Resources (IBAMA, www.icmbio.gov.br), because it may qualify as a threaten, by the introduction of a new pathogen, to the survival of species endangered with extinction,⁽⁴⁸⁾ for both translocated animals and local animals, as well as the risk for the human population in the region where anophelines are present.

The presence of high prevalence of *Plasmodium* spp. in NWP, in addition to the presence of large quantities of bromeliads in the forest region,⁽¹⁹⁾ plants that accumulate water and function as natural breeding grounds for vectors, constitute a worrying eco-epidemiological scenario of malaria in the region. The growth of contact between the human host and forest areas, mainly through ecotourism, increases the potential for autochthonous cases of human malaria in the municipality.⁽⁵⁰⁾ Therefore, it is required a more accurate epidemiological surveillance in the Atlantic Forest areas, with specific strategies for zoonotic malaria.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the team involved in the free-living howler monkeys capture and to Program for the Southern Brown Howler Monkey Conservation at Perini Business Park, Joinville/SC.

REFERENCES

1. WHO - World Health Organization. World malaria report 2018. Geneva: World Health Organization; 2018. p. 1-210.
2. Coatney GR, Collins WE, McWilson W, Contacos PG. CD-ROM. The Primate Malaria [original book published 1971]. Division of Parasitic Disease, producers. Version 1.0. Atlanta, GA: CDC; 2003. p. 1-366.
3. Arruda ME, Nardini EH, Nussenzweig RS, Cochrane AH. Sero-epidemiological studies of malaria in Indian tribes and monkeys of the Amazon basin of Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1989; 41(4): 379-85.
4. Deane LM. Simian malaria in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1992; 87(Suppl 3): 1-20.
5. Leclerc M, Hugot J, Durand P, Renaud F. Evolutionary relationships between 15 *Plasmodium* species from new and old world primates (including humans): an 18S rDNA cladistic analysis. *Parasitol.* 2004; 129: 677-84.
6. Tazi L, Ayala FJ. Unresolved direction of host transfer of *Plasmodium vivax* v. *P. simium* and *P. malariae* v. *P. brasilianum*. *Infect Genet Evol.* 2011; 11(1): 209-21.
7. Lalremruata A, Magris M, Vivas-Martínez S, Koehler M, Esen M, Kempaiah P, et al. Natural infection of *Plasmodium brasilianum* in humans: man and monkey share quartan malaria parasites in the Venezuelan Amazon. *EBioMedicine.* 2015; 2: 1186–92.
8. Brasil P, Zalis MG, Pina-Costa A, Siqueira AM, Bianco Júnior C, Silva S, et al. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. *Lancet Glob Health.* 2017; 5: 1038–46.
9. Boletim Região Extra-Amazonica [database on the Internet]. Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde (SVS/MS). 2019 - [cited 2019 Feb 4]. Available from: <https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/>.
10. Secretaria do Estado do Desenvolvimento Econômico Sustentável (SDS). Resolução CONSEMA nº 002, de 06 de dezembro de 2011. *Lex: Diário Oficial do Estado de Santa Catarina, Florianópolis;* 2011. p. 02-08.
11. Ministério do Meio Ambiente (MMA). Portaria nº 444, de 17 de dezembro de 2014. *Diário Oficial da União 18/12/14. Brasília, DF;* 2014. p. 121-126.

12. de Almeida MAB, Dos Santos E, Cardoso JDC, da Silva LG, Rabelo RM, Bicca-Marques JC. Predicting Yellow Fever Through Species Distribution Modeling of Virus, Vector, and Monkeys. *Ecohealth*. 2018; 16(1): 95-108.
13. Duarte AM, Malafronte R dos S, Cerutti-Jr C, Curado I, de Paiva BR, Maeda AY, et al. Natural *Plasmodium* infections in Brazilian wild monkeys: reservoirs for human infections? *Acta Trop*. 2008; 107(2): 179-85.
14. Yamasaki T, Duarte AM, Curado I, Summa ME, Neves DV, Wunderlich G, et al. Detection of etiological agents of malaria in howler monkeys from Atlantic Forest, rescued in regions of São Paulo city, Brazil. *J Med Primatol*. 2011; 40(6): 392-400.
15. Bueno MG, Rohe F, Kirchgatter K, Di Santi SM, Guimarães LO, Witte CL, et al. Survey of *Plasmodium* spp. in free-ranging neotropical primates from the Brazilian Amazon region impacted by anthropogenic actions. *Ecohealth*. 2013; 10(1): 48-53.
16. Costa DC, da Cunha VP, de Assis GM, Souza Junior JC, Hirano ZM, de Arruda ME, et al. *Plasmodium simium/Plasmodium vivax* infections in southern brown howler monkeys from the Atlantic Forest. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014; 109: 641–53.
17. Klein, R.M. Mapa fitogeográfico do estado de Santa Catarina. In: Reitz, R. (ed.). *Flora Ilustrada Catarinense*. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, 1978. p. 1-24.
18. Nunes AJD, Durão KK, Woyakewicz LPL, Souza Jr JC, Hirano ZMB. Parâmetros Populacionais de Bugios-Ruivos (*Alouatta clamitans*) Cabrera, 1940 (Primates: Atelidae) em Fragmento de Floresta Ombrófila Densa de Terras Baixas, Joinville, Santa Catarina. In: Encontro Sul Brasileiro de Primatologia 2, Blumenau, SC, FURB, 2016.
19. Gasper AL, Lichtenfelz FA e Leitempergher L. Levantamento Florístico e Fitosociológico da vegetação do Condomínio Perini Business Park, Joinville, Santa Catarina. Relatório Técnico. Blumenau, SC, 2015.
20. Glander K, Fedigan L, Fedigan L, Chapman C. Field methods for capture and measurement of three monkey species in Costa Rica. *Folia primatologica*. 1991; 57(2): 70-82.
21. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio. Protocolo para coleta de dados sobre primatas em Unidades de Conservação da Amazônia., Brasília: Marcelo Derzi Vidal, 2012; p. 1-38.
22. Carpenter CR. Primates behavior. The howlers of Barro Colorado Island. De Voere (ed). New York: Holt, Rinehart e Winston, 1965; p. 250-291.

23. Kocher TD, Meyer TA, Edwards SV, Paabo S, Villablanca X, Wilson AC. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 86: 6196-200.
24. Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol*. 1993; 58(2): 283-92.
25. Alvarenga DAM, Culleton R, de Pina-Costa A, Rodrigues DF, Bianco C Jr, Silva S, et al. An assay for the identification of *Plasmodium simium* infection for diagnosis of zoonotic malaria in the Brazilian Atlantic Forest. *Sci Rep*. 2018; 8: 86.
26. Souza Jr JC de. Perfil sanitário de bugios ruivos, *Alouatta guariba clamitans* (Cabrera, 1940) (Primates: Atelidae): um estudo com animais recepcionados e mantidos em perímetro urbano no município de Indaial, Santa Catarina – Brasil. [masters dissertation] - Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública. Florianópolis; 2007. p. 111.
27. Alvarenga DA, Pina-Costa A, Bianco C Jr, Moreira SB, Brasil P, Pissinatti A, et al. New potential *Plasmodium brasilianum* hosts: tamarin and marmoset monkeys (family Callitrichidae). *Malar J*. 2017; 16(1): 71.
28. Seidelin H. Notes on Some Blood-Parasites in Man and Mammals. *Annals of Trop Med Parasitol*. 1912; 4: 501-508.
29. Renjifo S, Sanmartin C, De Zulueta J. A survey of the blood parasites of vertebrates in Eastern Colombia. *Acta Tropica*. 1952; 9: 151-69.
30. Porter JA, Jr. Johnson CM, De Sousa L. Prevalence of malaria in Panamanian primates. *J. Parasit*. 1966; 52: 669-70.
31. Fandeur T, Volney B, Peneau C, de Thoisy B. Monkeys of the rainforest in French Guiana are natural reservoirs for *P. brasilianum*/*P. malariae* malaria. *Parasitology*. 2000; 120(Pt 1): 11-21.
32. Fuentes-Ramirez A, Jimenez-Soto M, Castro R, Romero-Zuniga JJ, Dolz G. Molecular detection of *Plasmodium malariae*/*Plasmodium brasilianum* in non-human primates in captivity in Costa Rica. *PLoS ONE*. 2017; 12(1): e0170704.
33. Erkenswick GA, Watsa M, Pacheco MA, Escalante AA, Parker PG. Chronic *Plasmodium brasilianum* infections in wild Peruvian tamarins. *PLoS ONE*. 2017; 12(9): e0184504.

34. de Alvarenga DA, de Pina-Costa A, de Sousa TN, Pissinatti A, Zalis MG, Suárez-Mutis MC, et al. Simian malaria in the Brazilian Atlantic forest: first description of natural infection of capuchin monkeys (Cebinae subfamily) by *Plasmodium simium*. *Malar J*. 2015; 14: 81.
35. Cerutti-Júnior C. Caracterização epidemiológica da malária autóctone do Espírito Santo. [PhD Thesis]. Universidade de São Paulo; 2007.
36. Deane LM. Studies on Simian Malaria in Brazil. *Bull World Health Organ*. 1964; 31: 752-3.
37. Deane LM, Neto JAF. Malária em macacos do estado do Rio Grande do Sul. Observações preliminares. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1969; 11(5): 299-305.
38. Deane LM. Monkey malaria in Brasil. A summary of studies performed in 1964-1966. *Rev Brasil Biol*. 1967; 27(3): 213-28.
39. Marelli L, Stigliano R, Triantos C, Senzolo M, Cholongitas E, Davies N, et al. Transarterial therapy for hepatocellular carcinoma: Which technique is more effective? A systematic review of cohort and randomized studies. *Cardiovasc Interv Radiol*. 2007; 30: 6-25.
40. Hofmann NE, Gruenberg M, Nate E, Ura A, Rodriguez-Rodriguez D, Salib M, et al. Assessment of ultra-sensitive malaria diagnosis versus standard molecular diagnostics for malaria elimination: an in-depth molecular community cross-sectional study. *Lancet Infect Dis*. 2018; 18(10): 1108-16.
41. Tangpukdee N, Thanachartwet V, Krudsood S, Luplertlop N, Pornpininworakij K, Chalermrut K, et al. Minor liver profile dysfunctions in *Plasmodium vivax*, *P. malariae* and *P. ovale* patients and normalization after treatment. *Korean J Parasitol*. 2006; 44(4): 295-302.
42. Wedderburn N, Mitchell GH, Davies DR. *Plasmodium brasilianum* in the common marmoset *Callithrix jacchus*. *Parasitol*. 1985; 90(3): 573-8.
43. Da Costa AG, Tarrago AM. Influência da infecção por *Plasmodium vivax* nos marcadores hematológicos e hepáticos em pacientes de um município da Região Amazônica brasileira. *Rev Pan-Amaz Saude*. 2017; 8(2): 11-9.
44. Lacerda MV, Mourão MP, Coelho HC, Santos JB. Thrombocytopenia in malaria: who cares? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011; 106(Suppl 1): 52-63.
45. Miller LH, Good MF, Milon G. Malaria pathogenesis. *Science*. 1994; 264: 1878-83.

46. Mitamura T, Hanada K, Ko-Mitamura EP, Nishijima M, Horii T. Serum factors governing intraerythrocytic development and cell cycle progression of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Int.* 2000; 49: 219–29.
47. El Tahir A, Malhotra P, Chauhan VS. Uptake of proteins and degradation of human serum albumin by *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes. *Malar J.* 2003; 2: 11.
48. Schreiber G, Lesch R, Weinszen U, Zähringer J. The distribution of albumin synthesis throughout the liver lobule. *The Journal of cell biology.* 1970; 47(1): 285.
49. Kock RA, Woodford MH, Rossiter PB. Disease risks associated with the translocation of wildlife. *Rev Sci Tech.* 2010; 29: 329–50.
50. Marques GR, Condino ML, Serpa LL, Cursino TV. Aspectos epidemiológicos de malária autóctone na mata atlântica, litoral norte, Estado de São Paulo, 1985 – 2006. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008; 41(4): 386-9.

TABLE 1

Infection by *Plasmodium* spp. in captured Southern brown howler monkeys (*Alouatta g. clamitans*) from Joinville, SC

| Molecular diagnosis of <i>Plasmodium</i> infection ^a | Sex | | | | Age Group | | | | Total | |
|---|--------|-------|------|-------|-----------|-------|------------|-------|-------|-------|
| | Female | | Male | | Adults | | Non-adults | | n | % |
| | n | % | n | % | n | % | n | % | | |
| <i>P. simium</i> | 5 | 23.81 | 4 | 21.05 | 8 | 23.53 | 1 | 16.67 | 9 | 22.50 |
| <i>P. brasilianum</i> / <i>P. malariae</i> | 1 | 4.76 | 2 | 10.53 | 1 | 2.94 | 2 | 33.33 | 3 | 7.50 |
| Mixed infection ^b | 8 | 38.10 | 8 | 42.11 | 14 | 41.18 | 2 | 33.33 | 16 | 40.00 |
| Negative | 7 | 33.33 | 5 | 26.32 | 11 | 32.35 | 1 | 16.67 | 12 | 30.00 |
| Total of positives | 14 | 66.67 | 14 | 73.68 | 23 | 67.65 | 5 | 83.33 | 28 | 70.00 |
| Total | 21 | | 19 | | 34 | | 6 | | 40 | |

^a Results of combined diagnosis by *Nested*-PCR for ribosomal and mitochondrial target; ^bInfection by *P. simium* and *P. brasilianum/P. malariae*.

TABLE 2

Infection by *Plasmodium* spp. in re-captured free-living Southern brown howler monkeys (*Alouatta g. clamitans*) in Joinville/SC

| Group ^a | Animal | Sex ^b | Age ^c | Sample | Date ^d | Infection ^e | Sample | Date ^d | Infection ^e | Sample | Date ^d | Infection ^e |
|--------------------|--------|------------------|------------------|--------|-------------------|------------------------|--------|-------------------|------------------------|--------|-------------------|------------------------|
| (i) | 1 | F | A | 1 | 07/07/2015 | Mixed | 7 | 15/08/2015 | Mixed | | | |
| (i) | 7 | F | A | 8 | 15/08/2015 | Neg | 47 | 07/12/2017 | Neg | | | |
| (i) | 9 | M | A | 10 | 17/08/2015 | Pb/Pm | 38 | 05/08/2017 | Pb/Pm | | | |
| (ii) | 10 | F | S | 11 | 18/09/2015 | Ps | 40 | 01/09/2017 | Neg | | | |
| (ii) | 17 | M | A | 18 | 17/10/2015 | Neg | 34 | 12/07/2017 | Ps | | | |
| (iii) | 12 | M | A | 13 | 19/09/2015 | Pb/Pm | 48 | 08/12/2017 | Ps | | | |
| (iii) | 17 | M | A | 18 | 17/10/2015 | Neg | 34 | 12/07/2017 | Ps | | | |
| (iii) | 20 | M | J | 21 | 27/11/2015 | Pb/Pm | 44 | 11/11/2017 | Ps | | | |
| (iii) | 8 | M | A | 9 | 16/08/2015 | Ps | 39 | 06/08/2017 | Mixed | 42 | 06/10/2017 | Ps |

^a(i) The diagnosed infection was with the same *Plasmodium* species in all samples; (ii) infection was negative at one time and positive at another; and (iii) the infection was diagnosed with different species at different times of blood collection. ^bF = female; M = male; ^cAge estimated according to Carpenter, 1965: A = adult; S = subadult; J = juvenile; ^dSample collection date; ^eMixed = mixed infection (*P. simium* + *P. brasilianum*/*P. malariae*); Pb/Pm = *P. brasilianum*/*P. malariae*; Ps = *P. simium*; Neg = negative.

TABLE 3

Hematological parameters of the free-living Southern brown howler monkeys (*Alouatta g. clamitans*), infected and uninfected by *Plasmodium* spp.

| Hematological parameters | Infected | | | Uninfected | | | p ^a |
|--|----------|-------|-------|------------|-------|-------|----------------|
| | n | Mean | SD | n | Mean | SD | |
| Erythrocytes (x10 ⁶ /μL) | 22 | 4.74 | 0.67 | 12 | 4.56 | 0.65 | 0.464 |
| Hemoglobin (g/μL) | 22 | 9.93 | 1.51 | 12 | 9.92 | 1.23 | 0.975 |
| Hematocrit (%) | 22 | 33.35 | 4.22 | 12 | 32.96 | 3.86 | 0.787 |
| Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (g/μL) | 22 | 29.70 | 1.77 | 12 | 30.11 | 1.78 | 0.533 |
| Mean Corpuscular Volume (fL) | 22 | 70.59 | 4.16 | 12 | 72.72 | 6.36 | 0.312 |
| Mean Corpuscular Hemoglobin (pg) | 22 | 20.98 | 1.90 | 12 | 21.97 | 3.13 | 0.331 |
| Platelets (x10 ³ /μL) | 22 | 57.86 | 34.39 | 12 | 76.33 | 50.53 | 0.274 |
| Leucocytes (x10 ³ /μL) | 22 | 6.43 | 2.66 | 12 | 6.02 | 2.36 | 0.647 |
| Neutrophils (x10 ³ /μL) | 22 | 3.23 | 0.46 | 12 | 3.44 | 0.40 | 0.270 |
| Band Cells (x10 ³ /μL) | 22 | 0.19 | 0.06 | 12 | 0.23 | 0.06 | 0.320 |
| Eosinophils (x10 ³ /μL) | 22 | 0.14 | 0.04 | 12 | 0.16 | 0.05 | 0.557 |
| Lymphocytes (x10 ³ /μL) ^b | 22 | 2.80 | 0.48 | 12 | 1.76 | 0.29 | 0.010 |
| Monocytes (x10 ³ /μL) | 22 | 0.12 | 0.03 | 12 | 0.10 | 0.03 | 0.423 |

^aMann-Whitney U Test, comparing infected and uninfected animals, p ≤ 0.05 (significants in bold); ^bSignificantly higher in infected females compared to infected males (p=0.014). In this analysis, we only included adults and subadults. SD= standard deviation.

TABLE 4

Biochemical parameters of free-living Southern brown howler monkeys (*Alouatta g. clamitans*), infected and uninfected by *Plasmodium* spp.

| Biochemical Parameters | Infected | | | Uninfected | | | p ^a |
|------------------------------------|----------|--------|--------|------------|--------|--------|----------------|
| | n | Mean | SD | n | Mean | SD | |
| Glucose (mg/dL) | 22 | 75.04 | 26.97 | 12 | 67.62 | 20.51 | 0.345 |
| Cholesterol (mg/dL) | 22 | 80.91 | 29.88 | 12 | 101.55 | 46.80 | 0.110 |
| Triglycerides (mg/dL) | 22 | 122.04 | 51.26 | 12 | 126.28 | 77.56 | 0.631 |
| Total Proteins (g/dL) ^b | 22 | 7.25 | 1.31 | 12 | 7.77 | 0.75 | 0.216 |
| Albumin (g/dL) ^c | 22 | 3.62 | 0.96 | 12 | 4.14 | 0.87 | 0.125 |
| Urea (mg/dL) | 22 | 36.48 | 21.90 | 12 | 29.24 | 15.24 | 0.268 |
| ALT (UI/L) ^d | 22 | 26.28 | 13.00 | 12 | 12.57 | 7.55 | 0.003 |
| GGT (UI/L) | 22 | 50.75 | 17.76 | 12 | 44.26 | 20.80 | 0.372 |
| CK (UI/L) | 22 | 556.02 | 388.03 | 12 | 575.16 | 225.75 | 0.877 |
| Creatinine (mg/dL) | 22 | 0.99 | 0.45 | 12 | 0.80 | 0.27 | 0.444 |
| AST (UI/L) | 22 | 112.24 | 66.89 | 12 | 86.47 | 56.79 | 0.037 |
| FA (UI/L) | 22 | 163.25 | 52.35 | 12 | 150.87 | 42.28 | 0.461 |
| LDH (UI/L) | 17 | 644.20 | 424.95 | 7 | 491.07 | 286.71 | 0.318 |
| Iron (mmol/L) | 12 | 57.25 | 47.25 | 7 | 48.03 | 63.14 | 0.650 |
| Albumin/globulin ratio | 22 | 1.05 | 0.35 | 12 | 1.22 | 0.53 | 0.562 |

^aStudent's T-test and Mann-Whitney U test, comparing infected and uninfected animals, $p \leq 0.05$ (significants are in bold); ^bSignificantly lower in animals with mixed infection (*P. simium* and *P. brasilianum/P. malariae*) compared to those infected with only one species of *Plasmodium* ($p=0.023$); ^cSignificantly lower in infected males than in infected females ($p=0.049$); ^dSignificantly higher in infected females compared to infected males ($p=0.003$) and in animals with mixed infection (*P. simium* and *P. brasilianum/P. malariae*) compared to those infected with only one species of *Plasmodium* ($p=0.019$). In this analysis, only adults and subadults were included. SD=standard deviation.

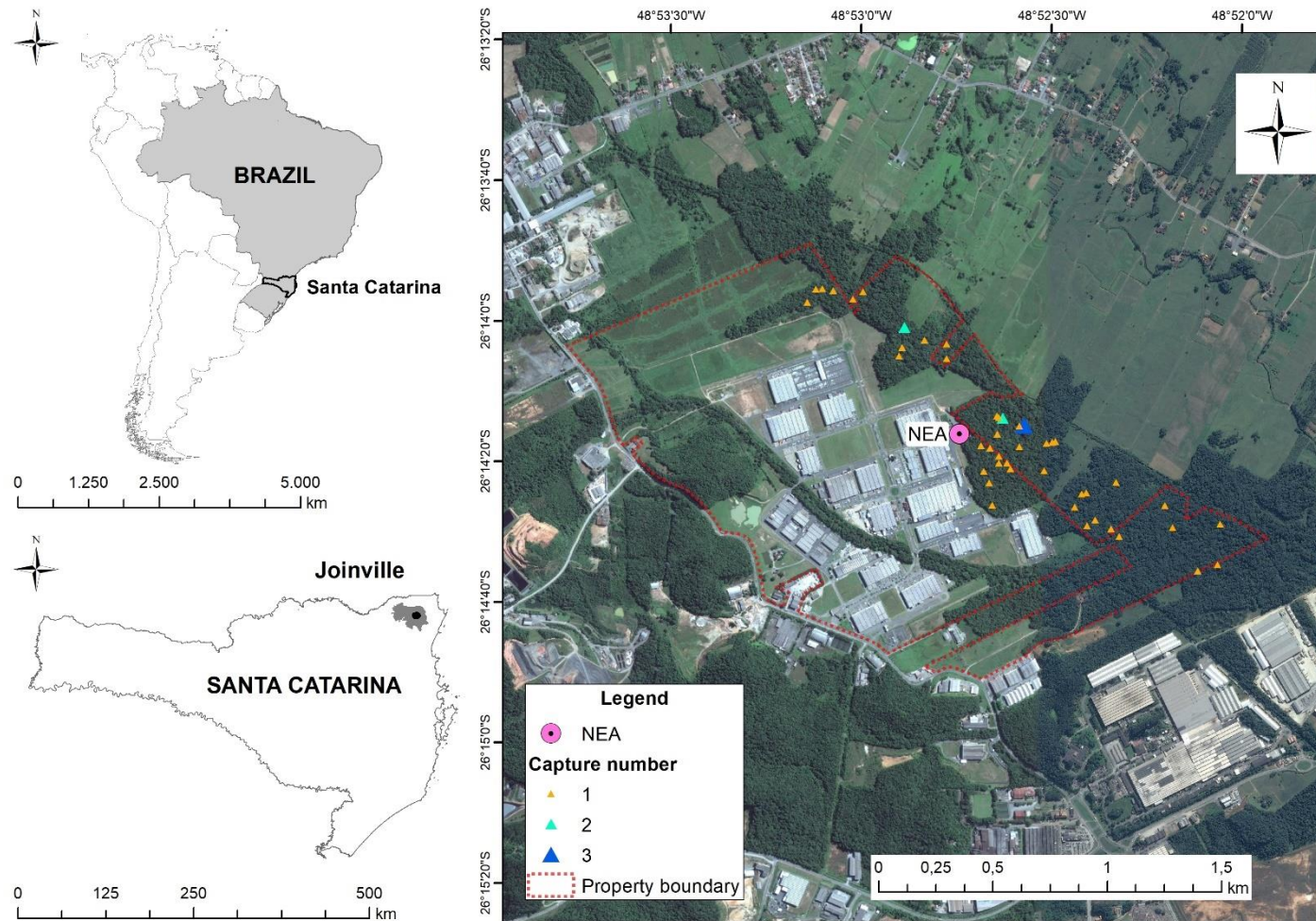


Figure 1: Location of the fragment of Ombrophilous Dense Lowland Forest and the captured free-living Southern brown howler monkey, in the city of Joinville, Santa Catarina, Brazil. NEA: laboratory.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

TABLE S1

Results from the distinct diagnostics of infection by *Plasmodium* spp. of the captured free-living Southern brown howler monkeys (*Alouatta g. clamitans*), by the year of capture

| Animal number | Year | Sample | Diagnosis 1 ^a | Diagnosis 2 ^b | Final combined Result ^c |
|---------------|------|--------|--------------------------|--------------------------|------------------------------------|
| 1 | 2015 | 1 | Pm | Ps, NPs | mixed |
| 2 | | 2 | Pv, Pm | Ps | mixed |
| 3 | | 3 | Pv, Pm | Ps, NPs | mixed |
| 4 | | 4 | Pm | Ps, NPs | mixed |
| 5 | | 5 | Pv, Pm | Ps | mixed |
| 6 | | 6 | Neg | Neg | Neg |
| 1 | | 7 | Pv, Pm | Ps | mixed |
| 7 | | 8 | Neg | Neg | Neg |
| 8 | | 9 | Pv | Ps | Ps |
| 9 | | 10 | Pm | Neg | Pb/Pm |
| 10 | | 11 | Pv | Ps | Ps |
| 11 | | 12 | Neg | Neg | Neg |
| 12 | | 13 | Pm | Neg | Pb/Pm |
| 13 | | 14 | Pv, Pm | Ps | mixed |
| 14 | | 15 | Pv | Ps | Ps |
| 15 | | 16 | Neg | Neg | Neg |
| 16 | | 17 | Pv, Pm | NA ^d | mixed |
| 17 | | 18 | Neg | Neg | Neg |
| 18 | | 19 | Neg | Neg | Neg |
| 19 | | 20 | Pv | Ps | Ps |
| 20 | | 21 | Pm | NA ^d | Pb/Pm |
| 21 | | 22 | Pv | Ps | Ps |
| 22 | | 23 | Neg | Neg | Neg |
| 23 | | 24 | Pm | NA ^d | Pb/Pm |
| 24 | | 25 | Pv | Ps | Ps |
| 25 | | 26 | Pv, Pm | Ps | mixed |
| 26 | | 27 | Pv, Pm | Ps | mixed |
| 27 | | 28 | Pv, Pm | Neg | mixed |
| 28 | | 29 | Pv, Pm | Ps | mixed |
| 29 | | 30 | Pm | NPs | Pb/Pm |
| 30 | 2017 | 31 | Neg | Ps | Ps |
| 31 | | 32 | Neg | Ps | Ps |
| 32 | | 33 | Neg | Ps | Ps |
| 17 | | 34 | Pv | Ps | Ps |
| 33 | | 35 | Neg | Neg | Neg |
| 34 | | 36 | Neg | Neg | Neg |

| | | | | |
|----|----|--------|-----------------|-------|
| 35 | 37 | Neg | Neg | Neg |
| 9 | 38 | Neg | NPs | Pb/Pm |
| 8 | 39 | Neg | Ps, NPs | mixed |
| 10 | 40 | Neg | NA ^d | Neg |
| 36 | 41 | Neg | NA ^d | Neg |
| 8 | 42 | Pv | Ps | Ps |
| 37 | 43 | Pv, Pm | Ps | mixed |
| 20 | 44 | Neg | Ps | Ps |
| 38 | 45 | Neg | Neg | Neg |
| 39 | 46 | Neg | Neg | Neg |
| 7 | 47 | Neg | NA ^d | Neg |
| 12 | 48 | Pv | Ps | Ps |
| 40 | 49 | Pm | Ps, NPs | mixed |

^aPositive diagnostic by *Nested*-PCR based on the 18S SSU rRNA (Snounou *et al.*, 1993) using primers for *Plasmodium vivax* (Pv) or *P. malariae* (Pm) or negative (Neg); ^bDifferential diagnostics between *P. simium* (Ps) and other *Plasmodium* species (NPs) based on the amplification by *Nested*-PCR of the *coxI* gene and digestion with *Hpy*CH4III (Alvarenga *et al.*, 2018), Neg – negative in the amplification; ^cThe final result was based on the combination of the results from both diagnostic methodologies and also for samples of the same animals. Animals 8, 12 and 20 were considered as presenting mixed infections and animals 10 e 17 were considered infected by *P. simium*. Mixed = *Plasmodium simium* + *P. brasilianum*/*P. malariae*; Pb/Pm = *Plasmodium brasilianum*/*P. malariae*; Ps = *Plasmodium simium*; Neg = negative. NA – Not amplified by PCR.

TABLE S2

Morphometric parameters of free-living Southern brown howler monkeys (*Alouatta g. clamitans*), according to sex and infection by *Plasmodium* spp.

| Morphometric parameter | n | Female | | | | | | Male | | | | | | |
|----------------------------|----|------------------|------|---|--------------------|------|-------|------------------|-------|------|--------------------|-------|------|-------|
| | | Infected Mean | SD | n | Uninfected Mean | SD | p | Infected Mean | SD | n | Uninfected Mean | SD | p | |
| 1 - Head-tail length | 11 | 46.00 | 3.61 | 7 | 47.43 | 3.64 | 0.430 | 11 | 52.91 | 4.11 | 5 | 52.80 | 2.59 | 0.950 |
| 2 - Tail | 11 | 51.00 | 2.37 | 7 | 52.57 | 4.79 | 0.364 | 11 | 55.36 | 4.18 | 5 | 54.70 | 1.98 | 0.673 |
| 3 - Head width | 11 | 5.74 | 0.34 | 7 | 5.97 | 0.43 | 0.263 | 11 | 6.55 | 0.50 | 5 | 6.66 | 0.31 | 0.587 |
| 4 - Face | 11 | 5.73 | 0.42 | 7 | 5.57 | 0.28 | 0.35 | 11 | 6.73 | 0.51 | 5 | 6.82 | 0.51 | 0.745 |
| 10a - Ear width | 11 | 2.29 | 0.51 | 7 | 2.14 | 0.48 | 0.375 | 11 | 2.45 | 0.58 | 5 | 2.22 | 0.16 | 1.000 |
| 10b - Ear length | 11 | 2.94 | 0.39 | 7 | 2.94 | 0.39 | 0.973 | 11 | 2.85 | 0.60 | 5 | 3.20 | 0.07 | 0.441 |
| 12 - Forearm length | 11 | 14.15 | 0.81 | 7 | 14.86 | 0.90 | 0.115 | 11 | 16.00 | 0.89 | 5 | 16.30 | 0.84 | 0.583 |
| 13 - Arm | 11 | 14.54 | 0.78 | 7 | 14.57 | 1.40 | 0.791 | 11 | 16.14 | 0.84 | 5 | 16.70 | 1.30 | 0.412 |
| 15 - Arm circumference | 11 | 11.09 | 1.11 | 7 | 11.21 | 0.91 | 0.724 | 11 | 13.23 | 1.60 | 5 | 14.20 | 2.28 | 0.422 |
| 14 - Hand | 11 | 9.67 | 2.92 | 7 | 10.79 | 0.95 | 0.536 | 11 | 11.64 | 0.50 | 5 | 11.60 | 0.42 | 0.827 |
| 16 - Thigh | 11 | 14.83 | 0.72 | 7 | 15.43 | 0.77 | 0.479 | 11 | 16.70 | 1.30 | 5 | 16.32 | 1.10 | 0.588 |
| 19 - Thigh circumference | 11 | 14.36 | 1.21 | 7 | 15.14 | 1.07 | 0.179 | 11 | 16.77 | 1.84 | 5 | 16.80 | 1.30 | 0.827 |
| 17 - Leg from knee to heel | 11 | 14.60 | 0.77 | 7 | 15.07 | 1.17 | 0.479 | 11 | 16.23 | 0.93 | 5 | 16.40 | 0.89 | 0.827 |
| 18 - Foot | 11 | 12.86 | 0.50 | 7 | 13.07 | 0.79 | 0.659 | 11 | 14.09 | 0.49 | 5 | 14.20 | 0.57 | 0.743 |
| A - Scrotum Length | 11 | 2.66 | 0.49 | 7 | 2.46 | 0.46 | 0.384 | 11 | 3.00 | 0.55 | 5 | 2.56 | 0.59 | 0.201 |
| B - Scrotum Width | 11 | 2.26 | 0.47 | 7 | 2.21 | 0.27 | 0.781 | 11 | 2.38 | 0.48 | 5 | 2.70 | 0.75 | 0.421 |
| 11 - Thorax circumference | 11 | 31.59 | 3.74 | 7 | 32.57 | 3.05 | 0.552 | 11 | 36.13 | 3.19 | 5 | 36.60 | 0.55 | 0.756 |

n=absolute number. we included only adults and subadults. SD= standard deviation.

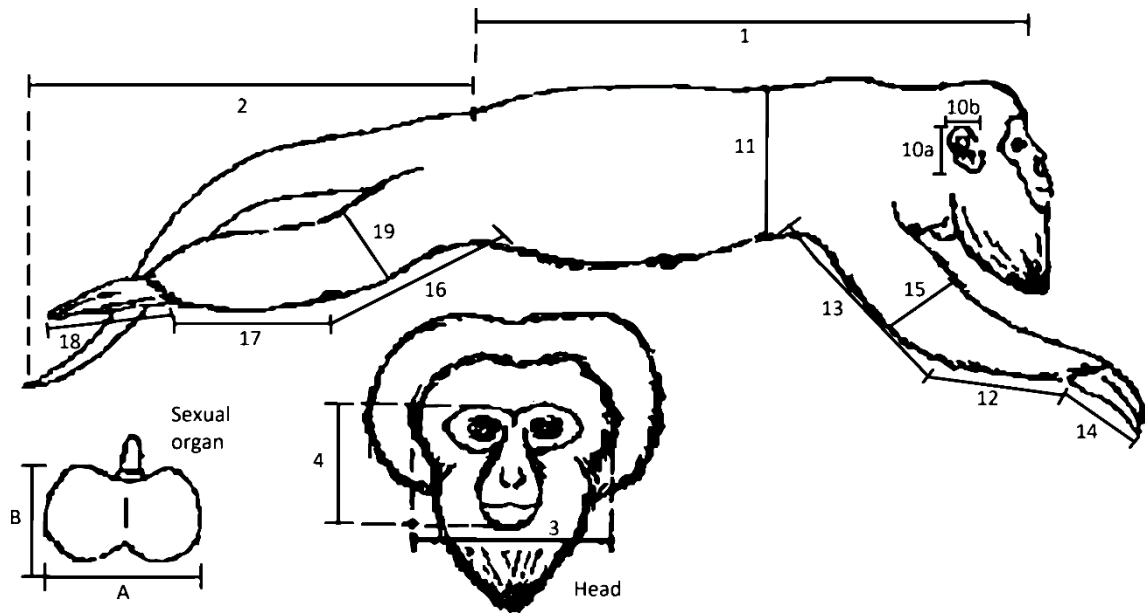


Figure S1: Schematic drawing of NHP morphometric parameters. Font: Bugio Project.

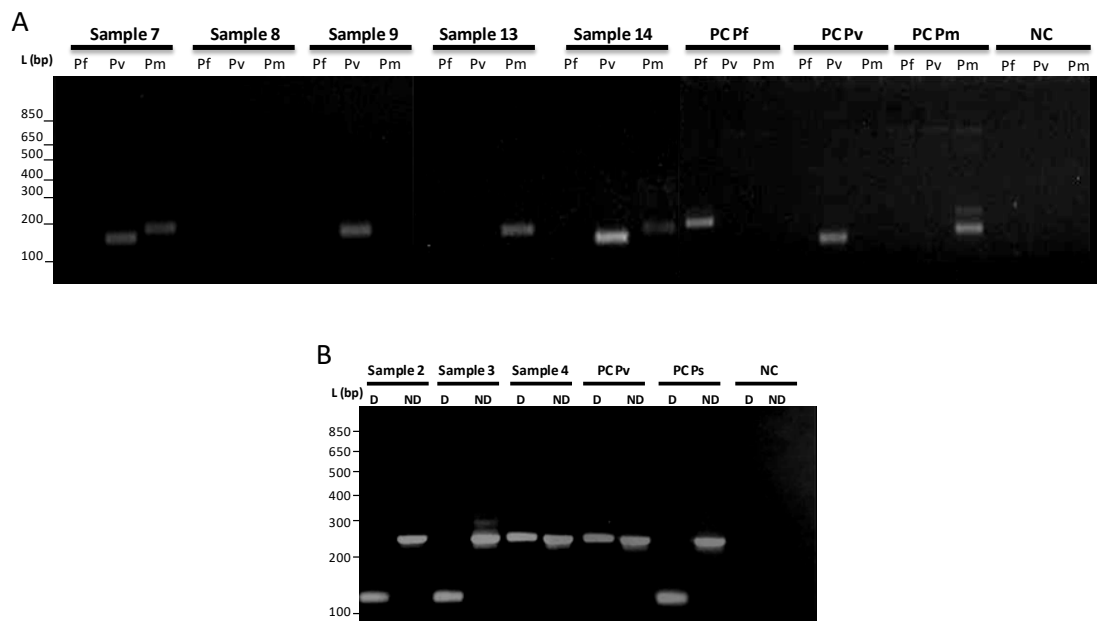


Figure S2: Representative diagnostic of *Plasmodium* species infection of some of the non-human free-living primates captured in Joinville. (A) Diagnostic by *Nested*-PCR (18S SSU rRNA) according to Snounou *et al.* 1993 of five samples: sample 7 (animal 1), sample 8 (animal 7), sample 9 (animal 8), sample 13 (animal 12) and sample 14 (animal 13). (B) *Nested*-PCR RFLP diagnostic of three samples: sample 2 (animal 2), sample 3 (animal 3) and sample 4 (animal 4). PC Pf - Positive control for *P. falciparum*. PC Pv - Positive control for *P. vivax*. PC Pm -- Positive control for *P. malariae*. PC Ps - Positive control for *P. simian*. NC - negative control. D - after digestion with the *Hpy*CH4III enzyme. ND - non digested amplified product.

ANEXOS

Anexo 01 - Atestado de aceitação do protocolo sob número 012/15 pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA da FURB.



ATESTADO

Atestamos, para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa, intitulado, "Estudo da ecologia, comportamento e saúde de bugio-ruivo (*Alouatta clamitans* Cabrera, 1940) em Joinville, Santa Catarina - Brasil", tendo como Pesquisadora, Prof. Zelinda Maria Braga Hirano, foi protocolado nesta Comissão sob nº 012/15 e aprovado na reunião de 11/03/15.

Blumenau, 11 de março de 2015.

Prof. Dr. Luis Olímpio Menta Giasson
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Anexo 02 - Autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO
nº 43375-6.



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

Autorização para atividades com finalidade científica

| | | |
|--|-----------------------------------|------------------------------------|
| Número: 43375-6 | Data da Emissão: 22/09/2017 17:42 | Data para Revalidação*: 22/10/2018 |
| * De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão. | | |

Dados do titular

| | |
|--|--------------------------|
| Nome: Ana Júlia Dutra Nunes | CPF: 020.154.080-02 |
| Título do Projeto: Estudo da ecologia, comportamento e saúde de bugio-rulvo (<i>Alouatta clamitans</i> Cabrera, 1940) em Joinville, Santa Catarina, Brasil. | |
| Nome da Instituição: CONDOMÍNIO PERINI BUSINESS PARK | CNPJ: 05.600.443/0001-37 |

Cronograma de atividades

| # | Descrição da atividade | Início (mês/ano) | Fim (mês/ano) |
|---|--|------------------|---------------|
| 1 | Censo e densidade de animais | 10/2014 | 03/2015 |
| 2 | Avaliar a qualidade do fragmento | 01/2015 | 05/2015 |
| 3 | Coleta de material e análise genética | 01/2015 | 12/2016 |
| 4 | Coleta de material e pesquisa de zoonoses | 01/2015 | 12/2018 |
| 5 | Captura, marcação e coleta de material biológico | 04/2015 | 09/2017 |
| 6 | Coleta de dados de ecologia e comportamento | 10/2015 | 12/2018 |
| 7 | Análise de todos os dados | 01/2019 | 04/2019 |
| 8 | Análise de todos os dados | 01/2019 | 04/2019 |

Observações e ressalvas

| | |
|---|---|
| 1 | As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia. |
| 2 | Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso. |
| 3 | Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior. |
| 4 | A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). |
| 5 | O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ. |
| 6 | O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor. |
| 7 | Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/gen . |
| 8 | Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade. |

Equipe

| # | Nome | Função | CPF | Doc. Identidade | Nacionalidade |
|---|-------------------------------------|----------------------------------|----------------|----------------------|---------------|
| 1 | Thales Renato Ochotorena de Freitas | Pesquisador | 238.934.600-63 | 7016633021 SSP-RS-RS | Brasileira |
| 2 | JULIO CESAR DE SOUZA JUNIOR | Coordenador | 004.957.679-80 | 20280900 SSP-SC | Brasileira |
| 3 | Katiuscia Kaline Durão | Pesquisadora | 069.425.369-38 | 3861198 SSP-SC | Brasileira |
| 4 | Amanda Rezende Peruchi | técnica do projeto bugio da FURB | 079.508.426-95 | 12765967 ssp-MG | Brasileira |
| 5 | Cristiana Ferreira Alves de Brito | Pesquisadora | 682.133.796-91 | M-3.989.353 SSP-MG | Brasileira |
| 6 | ZELINDA MARIA BRAGA HIRANO | Coordenadora | 048.975.078-80 | 138942547 SSP-SP | Brasileira |
| 7 | Leticia Panaro Lunardi | Pesquisadora | 062.637.539-86 | 3670191 SSP-SC | Brasileira |

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 64873166



Página 1/3



Autorização para atividades com finalidade científica

| | | |
|--|-----------------------------------|------------------------------------|
| Número: 43375-6 | Data da Emissão: 22/09/2017 17:42 | Data para Revalidação*: 22/10/2018 |
| * De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão. | | |

Dados do titular

| | |
|--|--------------------------|
| Nome: Ana Júlia Dutra Nunes | CPF: 020.154.080-02 |
| Título do Projeto: Estudo da ecologia, comportamento e saúde de bugio-nulvo (<i>Alouatta clamitans</i> Cabrera, 1940) em Joinville, Santa Catarina, Brasil. | |
| Nome da Instituição: CONDOMÍNIO PERINI BUSINESS PARK | CNPJ: 05.600.443/0001-37 |

| | | | | | |
|----|-------------------------------------|--|----------------|-------------------|-----------|
| 8 | André Luis de Gasper | Botânico | 041.941.279-43 | 4606333 SSP-SC-SC | Brasilera |
| 9 | Aline Rimoldi Ribeiro | Pesquisadora | 222.461.988-01 | 30972756X SSP-SP | Brasilera |
| 10 | Adilson Luiz Nicoletti | Engenheiro Florestal | 004.371.599-06 | 3.742.629 SSP-SC | Brasilera |
| 11 | DENISE ANETE MADUREIRA DE ALVARENGA | Pesquisadora | 099.806.806-36 | 7000050 SSPMG-MG | Brasilera |
| 12 | João Artsteu da Rosa | Pesquisador | 665.155.488-34 | 4473812 SSP-SP | Brasilera |
| 13 | Jeferson Costa Carneiro | Pesquisador | 802.752.492-04 | 4357867 Segup-PA | Brasilera |
| 14 | Horacio Schneider | Pesquisador | 070.011.182-49 | 4005990637 SSP-RS | Brasilera |
| 15 | Denicris Evelton da Rosa | Auxiliar de campo | 082.404.789-30 | 5763434 SSP-SC | Brasilera |
| 16 | Gustavo Henrique Pereira Gonçalves | Técnico laboratório bioquímica da FURB | 055.286.269-00 | 4538549-1 SSP-SC | Brasilera |

Locais onde as atividades de campo serão executadas

| # | Município | UF | Descrição do local | Tipo |
|---|-----------|----|---------------------------------|--------------------|
| 1 | JOINVILLE | SC | Condominio Perini Business Park | Fora de UC Federal |

Atividades X Táxons

| # | Atividade | Táxons |
|---|--|------------------|
| 1 | Captura de animais silvestres in situ | Alouatta guariba |
| 2 | Coleta/transporte de amostras biológicas in situ | Alouatta guariba |
| 3 | Marcação de animais silvestres in situ | Alouatta guariba |

Material e métodos

| | | |
|---|-------------------------------------|---|
| 1 | Amostras biológicas (Primates) | Fezes, Urina, Sangue, Animal encontrado morto ou partes (carcaça/osso/pele, Fôlo, Ectoparasita) |
| 2 | Método de captura/coleta (Primates) | Outros métodos de captura/coleta (Rife Anestésico dist-inject 70) |
| 3 | Método de marcação (Primates) | Microchip, Tatuagem (tinta) |

Destino do material biológico coletado

| # | Nome local destino | Tipo Destino |
|---|--|--------------|
| 1 | Universidade de Blumenau - FURB | |
| 2 | CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU-FIOCRUZ | |
| 3 | UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ | |
| 4 | Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho-UNESP | |
| 5 | UFRGS - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL | |

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 64873166



Página 2/3



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

Autorização para atividades com finalidade científica

| | | |
|--|-----------------------------------|------------------------------------|
| Número: 43375-6 | Data da Emissão: 22/09/2017 17:42 | Data para Revalidação*: 22/10/2018 |
| * De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão. | | |

Dados do titular

| | |
|--|--------------------------|
| Nome: Ana Júlia Dutra Nunes | CPF: 020.154.080-02 |
| Título do Projeto: Estudo da ecologia, comportamento e saúde de bugio-rulvo (<i>Alouatta clamitans</i> Cabrera, 1940) em Joinville, Santa Catarina, Brasil. | |
| Nome da Instituição : CONDOMÍNIO PERINI BUSINESS PARK | CNPJ: 05.600.443/0001-37 |

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

| Taxon* | Qtde. | Tipo de amostra | Qtde. | Data |
|--------|-------|-----------------|-------|------|
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 64873166



Página 3/3

AUTORIZAÇÃO

Nome do autor: ANA JÚLIA DUTRA NUNES

RG: 6144233

Título da Dissertação: PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO POR *Plasmodium* spp. E SUA ASSOCIAÇÃO COM OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS DE *Atouatta guariba clamitans* (CABRERA, 1940) (PRIMATES: ATELIDAE) DE VIDA LIVRE.

Autorizo a Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, através da Biblioteca Universitária, disponibilizar cópias da dissertação de minha autoria.

Joinville, 22 de Maio de 2019.

