

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

**Diagnóstico molecular de hemoparasitos de primatas
não humanos no estado do Rio de Janeiro**

Olivia Zen Gianfrancisco

2023



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS**

**Diagnóstico molecular de hemoparasitos de primatas
não humanos no estado do Rio de Janeiro**

OLIVIA ZEN GIANFRANCISCO

Sob a orientação do professor
Adivaldo Henrique da Fonseca

co-orientação dos professores
Matheus Dias Cordeiro
Bruna de Azevedo Baêta

Dissertação submetida como
requisito parcial para a obtenção do
grau de **Mestre** em Ciências no
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias

2023

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G433d Gianfrancisco, Olivia Zen, 1994-
Diagnóstico molecular de hemoparasitos de primatas não humanos no estado do Rio de Janeiro / Olivia Zen Gianfrancisco. - Campinas, 2023.
52 f.

Orientador: Adivaldo Henrique da Fonseca.
Coorientadora: Bruna de Azevedo Baêta.
Coorientador: Matheus Dias Cordeiro.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, 2023.

1. Trypanosoma. 2. Hemoparasitoses. 3. Primatas. 4. Saúde Pública. 5. Biologia Molecular. I. da Fonseca, Adivaldo Henrique, 1953-, orient. II. Baêta, Bruna de Azevedo, 1984-, coorient. III. Cordeiro, Matheus Dias, 1983-, coorient. IV. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias. V. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA Nº 4081/2023 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.065771/2023-70

Seropédica-RJ, 28 de setembro de 2023.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

OLIVIA ZEN GIANFRANCISCO

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre(a) em Ciências**, no Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 28/09/2023

(Assinado digitalmente em 28/09/2023 16:50)
ADIVALDO HENRIQUE DA FONSECA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DESP (12.28.01.00.00.00.52)
Matricula: ###58#7

(Assinado digitalmente em 28/09/2023 16:51)
PAULO CESAR MAGALHÃES MATOS
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.182-##

(Assinado digitalmente em 28/09/2023 17:25)
CATIA DEJUSTE DE PAULA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.458-##

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho para
minha mãe Giane e minha irmã de alma Letícia,
obrigada pelo amor, carinho e apoio de vocês.
Obrigada por acreditarem em mim.*

AGRADECIMENTOS

A parte de agradecimentos para mim, me remete a uma nostalgia, de olhar para trás e me ver revisitando momentos em que tive, de alguma forma, aquela faguha de apoio, ajuda, força ou carinho. Neste tempo que estive presente desenvolvendo meu projeto de mestrado, sinto que também estive me desenvolvendo como pessoa e, estar finalizando este ciclo acadêmico, refletiu nas diversas áreas da minha vida: profissional, social, amorosa e familiar. Significa muito além de um título, talvez seja uma marca eterna de uma experiência de vida, e eu espero sempre que ler esses agradecimentos, entrar em contato com essa energia maravilhosa da gratidão e das lembranças que vão aquecer meu coração e me fazer lembrar que com muitas ajudas eu pude viver essa incrível experiência profissional e pessoal.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer todos os primatas não-humanos que participaram desta pesquisa, todo meu respeito, carinho e gratidão a vocês, para mim foi uma honra trabalhar e aprender sobre essas espécies, espero contribuir ao máximo com todos os dados que coletamos.

Quero agradecer a minha mãe, Giane Cristina Zen, por ser meu porto seguro, minha luz no fim do túnel e minha fortaleza, por ter tido a sabedoria do que me falar e quando falar e, principalmente, por acreditar que eu iria conseguir, por acreditar na minha potência como mulher e me ensinar tanto dessa vida. Mãe, eu agradeço todos os dias da minha vida por você ser a minha mãe, eu te amo, e você é a maga mais incrível do universo!

Quero agradecer ao Professor Dr. Adivaldo Henrique da Fonseca, a Professora Dra. Bruna de Azevedo Baêta e Dr. Matheus Dias Cordeiro por me orientarem, se preparem comigo e pela confiança de que eu poderia desenvolver este projeto, jamais me esquecerei da oportunidade que vocês me deram e da parceria construída. Quero também agradecer ao Professor Dr. Argemiro Sanavria por ter feito a ponte de contato para que fosse possível esse mestrado e por ter me iniciado na pesquisa através da Iniciação Científica.

Gostaria de agradecer o Bioparque do Rio e o Centro de Primatologia do Rio de Janeiro por cederem as amostras dos Primatas. Também agradecer ao Centro de Triagem de Animais Silvestres de Seropédica, ao Biotério da Universidade Federal do Rio de Janeiro e o Zoológico de Volta Redonda pela parceria e contribuição para as coletas do material.

Quero agradecer meus amigos pessoais pela força de sempre, pelas longas conversas e por aguentarem minhas lamentações com tanta perfeição, dedicação, senso de humor e carinho, eu sei que esse ano eu preoquei muito vocês mas foi de suma importância toda minha experiência. Eu amo vocês: Letícia Gabriela da Silva, Emerson Mendes Filho, Juan Almeida, Deburah Alcaraz e Rafael Rosa.

Quero agradecer a equipe de amigos, parceiros e agregados do Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro que me aturam cantando, falando baboseira, chorando, brava, perdida e por ai vai...: Isadora Dias, Maiara Vasconcelos, Erica Gonçalves, Eduardo Sena, Ellen Meireles Brandão, Rodrigo Oliveira, Aline Furtado, Renata Silva, Gilliard Ferreira, Ana Clara, João Caetano, Wendel Benac e Davi Guimarães, essa equipe vai dar muitos frutos, e eu espero fazer do laboratório junto com vocês, uma experiência incrível. Pessoal sem brincadeira, vocês foram muito importantes para mim, cada um de vocês, acho que somos uma equipe saudável e solicita, eu agradeço por isso.

Quero ressaltar dois seres humanos que me acompanharam bem de pertinho nessa reta final e, juntamente comigo, se desesperaram, choraram, arrancaram os cabelos e no

fim vamos “rir na cara do perigo”, pois somos incríveis e juntos imbatíveis: Jonathan Chagas e Diogo Maia, obrigada por dividirem comigo a caminhada da dissertação.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, agradeço o financiamento desta pesquisa.

BIOGRAFIA

Olivia Zen Gianfrancisco, filha de Giane Cristina Zen e Eder Gianfrancisco, nasceu em 26 de fevereiro de 1994, em Campinas, São Paulo. Estudou o ensino fundamental nas escolas E.M.E.F. Oadil Pietrobon e E.M.E.F. Professor Domingos de Araújo, ambas situadas na cidade de Paulínia-SP. cursou ensino médio concomitante com técnico em informática na escola CEMEP - Centro Municipal de Ensino Profissionalizante Osmar Passarelli Silveira – Paulínia-SP, concluindo em 2011. Ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro no ano de 2012, no curso de Medicina Veterinária. Durante a graduação foi bolsista PIBIC-CNPq de Iniciação Científica em dois projetos, sob orientação do Professor Dr. Argemiro Sanavria, participou do Diretório Acadêmico de Medicina Veterinária como tesoureira, participou de organização de evento de semana acadêmica e projetos de extensão. Formou-se em Medicina Veterinária no ano de 2018, atuou com clínica médica e acupuntura em pequenos animais na cidade de Campinas-SP de 2018 a 2021, ingressou no curso de especialização em Acupuntura Veterinária em 2020. Em 2021 ingressou a nível de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV - UFRRJ) a nível de mestrado sob orientação do Professor Dr. Aivaldo Henrique da Fonseca e co-orientação da Professora Dra. Bruna Baêta e do Dr. Matheus Dias Cordeiro.

RESUMO

GIANFRANCISCO, Olivia Zen. **Diagnóstico molecular de hemoparasitos de primatas não humanos no estado do Rio de Janeiro**. 2023. 64p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

O Brasil é o país com o maior número de primatas não humanos conhecidos e estes animais, assim como toda fauna silvestre, tem potencial para serem hospedeiros de diversos hemoparasitos, incluindo os de caráter zoonótico. Temos relatos de primatas não humanos infectados por *Plasmodium* spp., *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp., hemoparasitos de relevância mundial para saúde pública, sendo que o Brasil alberga os vetores responsáveis pela transmissão desses agentes. O objetivo deste estudo foi detectar hemoparasitos através da análise molecular de amostras de sangue de diferentes espécies de primatas mantidos sob cuidados humanos, oriundos do estado do Rio de Janeiro, realizando um levantamento de dados e identificando a ocorrência desses agentes nesses animais. As origens das amostras foram o Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ), Centro de Triagem de Animais Silvestres - Ibama, Seropédica, biotério de animais silvestres do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro e Bioparque do Rio. Foi realizada a extração de DNA das amostras de sangue para posterior análise molecular, utilizando diferentes iniciadores responsáveis pela amplificação de genes específicos das famílias Trypanosomatidae e Anaplasmataceae, ordem Haemosporida e gêneros *Babesia* spp. e *Borrelia* spp. Sete amostras oriundas do CPRJ (7/178) amplificaram produtos para o gene 18S rRNA da família Trypanosomatidae e, após sequenciamento, foram alinhadas e submetidas a análise filogenética. A análise do sequenciamento resultou as sete amostras exibindo sequências com similaridade genética de 99% a 100% para *Trypanosoma minasense* em seis *Leontopithecus chrysomelas* (3,9%) e um *Alouatta puruensis* (0,56%), ambas espécies exóticas ao estado do Rio de Janeiro, sendo a área de distribuição natural na Bahia e na Amazônia respectivamente. Não houveram ampliações das amostras quando submetidas aos testes moleculares para a pesquisa de genes dos demais hemoparasitos deste estudo.

Palavras-chave: Hemoparasitoses, *Trypanosoma*, PNH, Mata Atlântica, Saúde Pública

ABSTRACT

GIANFRANCISCO, Olivia Zen. **Molecular diagnosis of hemoparasites in non-human primates in the state of Rio de Janeiro**. 2023. 64p. Dissertation (Master's Degree in Veterinary Sciences), Veterinary Institute, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

Brazil is the country with the largest number of known non-human primates and these animals, like all wild fauna, have the potential to be hosts for various hemoparasites, including those of a zoonotic nature. There have been reports of non-human primates infected with *Plasmodium* spp., *Leishmania* spp. and *Trypanosoma* spp., hemoparasites of global relevance to public health, and Brazil harbors the vectors responsible for transmitting these agents. The purpose of this study was to detect hemoparasites through molecular analysis of blood samples from different species of primates from the state of Rio de Janeiro kept under human care, carrying out a data survey and identifying the occurrence of such agents in these animals. The sources of the samples were the Primatology Center of Rio de Janeiro (CPRJ), the Wild Animal Screening Center - Ibama, Seropédica, the wild animal vivarium of the Carlos Chagas Filho Biophysics Institute of the Federal University of Rio de Janeiro and Rio Biopark. DNA was extracted from the blood samples for subsequent molecular analysis, using different primers responsible for amplifying specific genes from the Trypanosomatidae and Anaplasmatidae families, the Haemosporida order and the *Babesia* spp. and *Borrelia* spp. genera. Seven samples from the CPRJ (7/178) amplified products for the 18S rRNA gene from the Trypanosomatidae family and, after sequencing, were aligned and subjected to phylogenetic analysis. The sequencing analysis resulted in the seven samples showing sequences with 99% to 100% genetic similarity to *Trypanosoma minasense* in six *Leontopithecus chrysomelas* (3.9%) and one *Alouatta puruensis* (0.56%), both exotic species to the state of Rio de Janeiro, whose natural distribution area is in Bahia and the Amazon respectively. There was no amplification of the samples when they were submitted to molecular tests for the genes of the other hemoparasites in this study.

Keywords: Hemoparasitosis, Trypanosoma, PNH, Atlantic Forest, Public Health

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema de representação dos diferentes morfotipos encontrados nos diversos estágios da família Trypanosomatidae. Imagem reproduzida de d'Avila-Levy et al., 2015. 4
- Figura 2.** Primata do gênero *Callithrix* spp. advindo do CETAS-RJ, contido fisicamente para coleta de sangue. Fonte: arquivo pessoal..... 111
- Figura 3.** Representação dos produtos da PCR para o gene GAPDH (400pb – seta vermelha), aplicados em gel de agarose a 2% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®) corado com DSVIEW nucleic stain 20.000X (Sinapse Inc®) e separados por eletroforese (5V/cm), visualizados em transiluminador UV. Poço 1-27: amostras positivas. Poço 28-29: controles negativos. Poço 30: ladder. 1616
- Figura 4.** Representação dos produtos da PCR para o gene 18S (680pb – seta vermelha), aplicados em gel de agarose a 2% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®) corado com DSVIEW nucleic stain 20.000X (Sinapse Inc®) e separados por eletroforese (5V/cm), visualizados em transiluminador UV. Poço 1-7 e poço 9: amostras positivas. Poço 12: controle positivo (*Trypanosoma cruzi*). Poço 13 e 14: controles negativos. Poço 15: ladder. 18
- Figura 5.** Dendograma baseado nas sequências de *Trypanosoma* sp. a partir do gene 18SrRNA das amostras obtidas neste estudo e outras sequências de diferentes partes do mundo. O dendograma foi construído usando o método de *Maximum Likelihood* (PhyML). O suporte estatístico dos clados foi medido por meio de uma busca heurística com 1000 replicatas de bootstrap. 19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos iniciadores (primers) utilizados neste estudo..... 12

Tabela 2. Relação das espécies de primatas coletados, seus respectivos nomes populares e quantidade de indivíduos por espécie, de acordo com cada local de coleta. 17

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Primatas neotropicais no cenário brasileiro	2
2.2. Hemoparasitoses em primatas não humanos.....	3
2.2.1. Família Trypanosomatidae.....	3
2.2.2. Família Anaplasmataceae.....	5
2.2.3. Ordem Haemosporida.....	6
2.2.4. Gênero <i>Borrelia</i> spp.	8
2.2.5. Gênero <i>Babesia</i> spp.	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1. Aspectos éticos e legais da pesquisa científica.....	10
3.2. Delineamento do estudo	10
3.3. Metodologia de captura e contenção dos primatas não humanos.....	10
3.4. Armazenamento das amostras de sangue coletadas.....	11
3.5. Extração de DNA do sangue.....	11
3.6. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	11
3.6.1. Análise molecular para os gêneros <i>Borrelia</i> spp. e <i>Babesia</i> spp.	13
3.6.2. Análise molecular das famílias Anaplasmataceae e Trypanosomatidae	14
3.6.3. Análise molecular para a ordem Haemosporida	14
3.7. Eletroforese e análise dos resultados	15
3.8. Sequenciamento genético	15
3.9. Análise Filogenética.....	15
4. RESULTADOS.....	16
5. DISCUSSÃO	20
6. CONCLUSÃO	22
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
ANEXO I.....	35
ANEXO II.....	36
ANEXO III.....	37

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é conhecido mundialmente pela sua biodiversidade, possuindo cerca de 20% da biota mundial (EMBRAPA, 2016), tendo mais de 8 mil animais vertebrados e, dentre esses, 730 espécies de mamíferos distribuídas em 11 ordens, presentes nos biomas Mata Atlântica, Cerrado, Pantanal, Amazônia, Pampa e Caatinga (ICMBIO, 2023). O Brasil também é o país com o maior número de primatas não humanos (PNH) conhecidos, com 152 táxons (espécies e subespécies) distribuídos em 5 famílias e 19 gêneros (IUCN, 2023).

Apesar da considerável biodiversidade de fauna e flora, as atividades antrópicas crescentes têm levado a perda e a fragmentação dos ecossistemas naturais (MMA, 2003; Souza e Silva, 2009). Com o impacto da proximidade humana, invasão e destruição dos biomas naturais, temos o declínio considerável do tamanho das populações de diversos animais silvestres (Silva, 2022), afetando principalmente as condições necessárias para o acasalamento desses animais, levando a uma considerável redução do número de proles geradas a cada ano (Seoane, 2007). Outra consequência importante deste cenário, tem sido a disseminação de zoonoses, o estreito contato entre animais silvestres, animais domésticos e o ser humano pode favorecer a disseminação de patógenos e vetores (Macpherson, 2005; Rodrigues *et al.*, 2017). Além do impacto social e ecológico, as doenças zoonóticas requerem grande investimento econômico para controle e tratamento das populações afetadas (Cascio, 2011), destacando que, a maioria das zoonoses tem origem em animais silvestres (Jones *et al.*, 2008), sendo de grande relevância em temas que abordam saúde pública.

Dentre as zoonoses de importância temos as hemoparasitoses, causadas por bactérias e protozoários. Os hemoparasitos são organismos que possuem tropismo pelo tecido sanguíneo de seus hospedeiros e sua transmissão, de forma geral, se dá por meio de um vetor artrópode como moscas, mosquitos, pulgas e carrapatos (Colwell *et al.*, 2011; Fonseca, 2020). Os agentes causadores das hemoparasitoses tem distribuição cosmopolita e a ocorrência das infecções mudam constantemente devido a migração, transporte de vetores e hospedeiros, ações antrópicas e mudanças climáticas (Macpherson, 2005; Geiger *et al.*, 2015). Temos alguns relatos de hemoparasitos como *Trypanosoma* spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp. e *Plasmodium* spp. (Nakayima *et al.*, 2014; Aalvarenga, 2019; Guimarães *et al.*, 2022) encontrados em animais silvestres, incluindo primatas neotropicais, tanto de vida livre como os mantidos sob cuidados humanos. Devido à proximidade filogenética dos PNH com seres humanos, pode haver uma ponte de compartilhamento de possíveis hemoparasitos entre ambos (Fuentes e Hockings, 2010; Miniz *et al.*, 2021), sendo relevante o conhecimento dos patógenos, zoonóticos ou não, circulantes entre esses animais.

Contribuindo para o levantamento de dados dos possíveis hemoparasitos encontrados em PNH, de interesse tanto para a biodiversidade da fauna como para preservação da saúde humana, esta pesquisa objetivou realizar a detecção molecular de agentes das famílias Trypanosomatidae e Anaplasmataceae, da ordem Haemosporida e dos gêneros *Borrelia* spp. e *Babesia* spp., em sangue de PNH pertencentes ao estado do Rio de Janeiro e mantidos sob cuidados humanos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Primatas neotropicais no cenário brasileiro

O Brasil é o país com o maior número de primatas neotropicais conhecidos, com 152 espécies e subespécies já catalogadas das 723 existentes no mundo (ICMBio, 2022). Dos 152 táxons de PNH encontrados no Brasil, pouco mais de 50% são endêmicos (Brasil, 2005), sendo que a maior parte é encontrada habitando o bioma Amazônia, com 105 espécies, seguido pelo bioma Mata Atlântica, o qual está inserido todo o território do estado do Rio de Janeiro, com 24 espécies (Paglia *et al.*, 2012). Apesar da grande riqueza de primatas do Brasil, muitas dessas espécies se encontram em situação vulnerável, em perigo de extinção ou em estado crítico, segundo estudo realizado pelo Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Primatas Brasileiros em 2022.

Com a proximidade e as intervenções antrópicas, as interações entre humanos e PNH têm se tornado cada vez mais frequentes por toda área de distribuição dessas espécies (Fuentes, 2012; Van Doreen; Rose, 2012), tanto em ambiente rural como em ambiente urbano. Os PNH, comumente, interagem com humanos em busca de alimentos (Lousa, 2013; Batista *et al.*, 2017), e acabam, por vezes, sendo capturados e tomados como animais de estimação (Riley, 2006; Damasceno, 2022). Além disso, a fragmentação e a degradação do habitat natural, juntamente com a caça ilegal (Fuentes, 2006; Mendes, 2020), o comércio de animais silvestres e a introdução de espécies exóticas, constituem importantes desafios encontrados para a sobrevivência dessas espécies (Almeida, 2014; Silva *et al.*, 2022).

Outra consequência da antropização e da fragmentação florestal é o aumento do número de animais silvestres em cativeiros, incluindo diversas espécies de PNH, em parques, zoológicos e centro de triagem de animais silvestres (Nascimento *et al.*, 2017; Gonzalez *et al.*, 2017; Artigas *et al.*, 2019), muitas vezes devido à dificuldade ou impossibilidade da reabilitação desses animais nos centros e reintrodução na natureza. Sob outra perspectiva, atualmente, muitas espécies de PNH são utilizadas para estudos em ambientes laboratoriais e biotérios, devido a estreita relação filogenética entre os humanos e esses animais, o que os tornam um modelo experimental altamente relevante (Fuentes; Hockings, 2010; Muniz *et al.*, 2021).

No contexto de zoonoses compartilhadas entre PNH e humanos, esteve em foco no Brasil em 2016 e 2017 a febre amarela (Souza *et al.*, 2019), uma doença infecciosa transmitida por mosquitos dos gêneros *Aedes* na África, e *Haemagogus* e *Sabethes* na América, causada por um arbovírus da família flaviviridae e gênero *Flavivírus*. Atualmente, são reconhecidos o ciclo urbano, simples, do tipo humano-mosquito-humano e o ciclo silvático epizoonótico, mais complexo, no qual PNH atuam como amplificadores virais (Cavalcante *et al.*, 2016). Outra zoonose importante envolvendo os PNH, é a malária, considerada a protozoose de maior impacto do mundo, e em 2018, no Brasil, foram registrados mais de 190 mil casos e a grande maioria foi relatada na região amazônica (Vieira *et al.*, 2021). A malária é uma doença causada por agentes do gênero *Plasmodium* spp. e, atualmente, são consideradas 5 espécies capazes de infectar seres humanos: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e o mais recente *Plasmodium knowlesi*. A transmissão desse agente ocorre através da picada de um vetor fêmea de mosquitos do gênero *Anopheles*.

Além dessas zoonoses de grande relevância mundial, temos também diversas helmintoses e hemoparasitoses (Antonucci, *et al.*, 2019; Coimbra, 2020; Santos, 2022) que podem acometer humanos e os PNH, o que ressalta a relevância de um monitoramento e conhecimento das doenças circulantes entre estes animais.

2.2. Hemoparasitoses em primatas não humanos

2.2.1. Família Trypanosomatidae

A Família Trypanosomatidae é constituída por dezenas de espécies de protozoários de diversos gêneros, tendo significativa relevância tanto para a fauna silvestre como para saúde pública, uma vez que compreende espécies zoonóticas (Rodrigues *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2021). Esses organismos são capazes de infectar mais de 900 espécies de vertebrados e, também, infectam mais de 500 invertebrados que participam do ciclo biológico desses agentes, atuando como vetores e disseminadores (Podlipaev, 1990).

Esses protozoários estão inseridos no filo Euglenozoa e na classe Kinetoplastea, a qual possui como apomorfia o cinetoplasto, que são corpúsculos de DNA em formato circular, organizados e localizados na origem do corpo flagelar. Advindos da ordem Trypanosomatida, a qual possui uma única família: Trypanosomatidae e, seus representantes, possuem como característica um único flagelo (Vickerman, 1976; Lom, 1976; Kostygov *et al.*, 2020).

A família Trypanosomatidae é subdividida em dois grupos, em função dos hospedeiros envolvidos em seu ciclo de vida, sendo eles: monoxênico e heteroxênico. Os tripanosomatídeos do grupo monoxênico possuem apenas um hospedeiro durante todo o ciclo de vida, comumente um inseto e, não são zoonóticos, porém, possuem similaridade bioquímica com os demais membros patogênicos dessa família (d'Avila-Levy *et al.*, 2004). Os gêneros representantes deste grupo são: *Angonomas*, *Lafontella*, *Herpetomonas*, *Blastocrithidia*, *Novymonas*, *Rhynchoidomonas*, *Leptomonas*, *Zelonia*, *Wallacemonas*, *Sergeia*, *Kentomonas*, *Jaenimonas*, *Strigomonas*, *Lotmaria*, *Blechomonas*, *Paratrypanosoma* e *Crithidia* (Vickerman, 1976; Votýpka *et al.*, 2013; d'Avila-Levy *et al.*, 2015). Já os tripanosomatídeos heteroxênicos alternam o ciclo de vida entre hospedeiros invertebrados e vertebrados, sendo representados pelos gêneros *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Phytomonas* e *Endotrypanum* (Maslov *et al.*, 2013; Porcel *et al.*, 2014; Kaufer *et al.*, 2017). Os dois primeiros gêneros citados neste grupo, se destacam com sua importância para saúde pública, pois, ambos possuem o potencial de infectar humanos, animais domésticos e silvestres (Rodrigues *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2021).

Os representantes da família Trypanosomatidae apresentam diferentes morfologias durante o ciclo de vida, tanto na natureza como em cultivo no laboratório (d'Avila-Levy *et al.*, 2015), tendo, por definição, sete morfotipos principais (Figura 2), sendo eles com formas esféricas e arredondadas denominados amastigotas, esferomastigotas e coanomastigostas e, formatos mais alongados e fusiformes, chamados de promastigotas, epimastigotas, tripomastigotas e opistomastigotas (Hoare 1964; Hoare e Wallace, 1966).

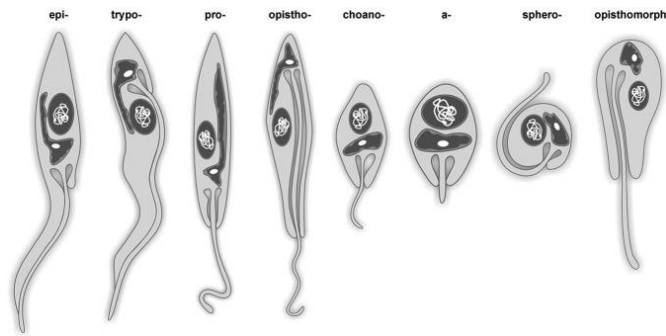


Figura 1. Esquema de representação dos diferentes morfotipos encontrados nos diversos estágios da família Trypanosomatidae. Imagem reproduzida de d’Avila-Levy et al., 2015.

Os tripanossomatídeos possuem diversos vetores invertebrados sugadores de sangue como sanguessugas, carrapatos e insetos (Zingales *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2022; Cecílio *et al.*, 2022), e são bem adaptados a várias espécies de vertebrados como hospedeiros, incluindo, espécies aquáticas (Virgilio *et al.*, 2021). Os vetores de maior impacto na literatura são os flebotomíneos e os triatomíneos, pois, transmitem *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi*, respectivamente, sendo estes agentes zoonóticos e em muitas regiões do Brasil, são endêmicos (Ribeiro *et al.*, 2019; Costa *et al.*, 2021; Pinto *et al.*, 2022). Os flebotomíneos são dípteros amplamente distribuídos pelo mundo, pertencentes a família Psychodidae e a subfamília Phlebotominae (Galati e Rodrigues, 2023), e a maior diversidade desses insetos se encontra em regiões neotropicais, sendo descritas mais de 530 espécies (Galati, 2018), são os únicos vetores para as leishmanioses. Já os vetores do gênero *Trypanosoma* spp., podem ser dividido em dois subgrupos: Salivaria e Stercoraria (Hoare, 1972). Salivaria estão incluídos os tripanosomas dos quais, parte do seu ciclo biológico, ocorre no interior de glândulas salivares dos insetos vetores, sobretudo dípteros, sendo transmitidos para animais vertebrados durante o repasto sanguíneo. Stercoraria é representado por protozoários que são transmitidos via conteúdo fecal ou urinário do inseto vetor, após o repasto sanguíneo (Stevens e Gibson, 1999), destacando, neste caso, os triatomíneos, insetos hematófagos da ordem Hemiptera, popularmente conhecidos como “barbeiros”, capazes de transmitir *T. cruzi*.

Diversas espécies de animais silvestres podem se infectar com os agentes da família Trypanosomatidae, atuando como potenciais reservatórios e contribuindo para a disseminação desses protozoários (Santiago *et al.*, 2007; Brandão, 2021). Os primatas, por sua vez, também são susceptíveis a essas infecções (Lisboa *et al.*, 2000; Nogueira, 2023). Barreto (1967) demonstrou que os PNH podem ser considerados reservatórios silvestres de *T. cruzi* e, posteriormente, Chagas (1909) utilizou um *Callithrix penicillata* (Sagui-de-Tufo-Preto) como exemplar para a execução de um dos primeiros experimentos realizados, no intuito de observar a infecção intencional desse agente a partir de triatomíneos, sendo verificado, transcorrido alguns dias, formas evolutivas de *T. cruzi* no sangue do animal. Além do *T. cruzi*, outras espécies desse gênero como *Trypanosoma minasense*, *Trypanosoma rangeli* (agente zoonótico) e *Trypanosoma devei*, já foram descritas infectando naturalmente os PNH, tanto os mantidos sob cuidados humanos como os de vida livre (Ziccardi *et al.*, 2000).

Em uma pesquisa realizada por Coimbra e colaboradores. (2020), foi utilizado amostras de sangue de quinze *Callithrix* spp. de vida livre, advindos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro e, foi observado em esfregaços sanguíneos dessas amostras, espécimes de *Trypanosoma* spp. em cinco lâminas (33,3%). Posteriormente, através de análises moleculares, foi possível detectar apenas três amostras (20%) que amplificaram para o

gene 18S rRNA, sendo então sequenciadas e analisadas, mostrando identidade com *T. minasense*. Guimarães e colaboradores. (2022), realizou uma pesquisa com 34 PNH, dos gêneros *Sapajus* spp. e *Callithrix* spp. do estado do Rio de Janeiro, encontrando uma ocorrência de *T. minasense*, de 30,8% e 12,5% para os respectivos gêneros mencionados, sendo semelhante ao relatado por Coimbra e colaboradores. (2019), demonstrando a circulação desse agente em PNH do estado do Rio de Janeiro. Esta espécie já foi relatada infectando primatas neotropicais de algumas regiões do Brasil e, devido a sua alta especificidade por PNH, sugere-se que seu potencial zoonótico seja baixo (Coimbra *et al.*, 2019). Ainda não se sabe informações aprofundadas sobre seu ciclo de vida ou possíveis hospedeiros e vetores, uma vez que, esta espécie não infecta triatomíneos (Ziccardi *et al.*, 1996).

Temos relatos ainda de PNH infectados por *Leishmania* spp. em diversas regiões do país. As leishmanioses são doenças consideradas um sério problema de saúde pública, principalmente por serem negligenciadas (Abraão *et al.*, 2020), são endêmicas em 102 países (PAHO, 2019) e a estimativa do número de novos casos por ano aproxima-se de 1 milhão, tendo em média 20 a 30 mil casos de óbito a cada ano, estando classificada em nono lugar dentre as doenças infecciosas de maior relevância em saúde pública (WHO, 2018).

Apesar dos poucos estudos envolvendo o monitoramento de PNH infectados por *Leishmania* spp., temos alguns trabalhos como o de Guirald (2020), que encontrou em PNH mantidos sob cuidados humanos advindos de 5 regiões do Brasil, 11 animais infectados naturalmente por *Leishmania infantum* e 5 positivos para *Leishmania braziliensis*. O trabalho de Paiz e colaboradores (2015) demonstrou evidência sorológica de animais silvestres naturalmente infectados por *L. Infantum*, dentre eles a espécie *Callithrix jacchus* (Sagui-de-Tufos-Brancos). Esses relatos destacam a importância do monitoramento das doenças circulantes em animais silvestres, incluindo os primatas não humanos.

2.2.2. Família Anaplasmataceae

A família Anaplasmataceae, que pertence a ordem Rickettsiales, é constituída por alfa-proteobactérias gram negativas, intracelulares obrigatórias, que se replicam dentro de vacúolos citoplasmáticos de células hospedeiras como: células fagocíticas, eritrócitos, células retículo-endoteliais, tecidos reprodutivos de helmintos e artrópodes. Possuem distribuição cosmopolita e são capazes de causar doenças nos animais e no ser humano, sendo transmitidas através de vetores invertebrados, principalmente carrapatos (Walker; Dumler, 1996; Dumler *et al.*, 2001).

Por um longo período, as espécies da família Anaplasmataceae, foram classificadas com base na célula parasitada, pela severidade do adoecimento do hospedeiro e distribuição geográfica (Smith *et al.*, 1976). No entanto, Dumler e colaboradores (2001) propuseram uma nova classificação, envolvendo além de informações biológicas e morfométricas como patogenicidade, especificidade pelo hospedeiro, local de parasitismo, formas de transmissão, período pré-patente e patente, os autores também classificaram as informações genéticas contidas em cada indivíduo dessa família, avaliando as diferenças nucleotídicas das sequências de genes bem específicos, como genes codificantes de proteínas estruturais e funcionais e, também, RNA ribossomal. Devido a esses estudos moleculares houve modificações nas posições de algumas bactérias pertencentes a ordem Rickettsiales, sendo incluídas nesta família espécies dos gêneros *Wolbachia*, *Erhlichia* e *Neorickettsia*, mantendo *Anaplasma* e *Aegyptianella*. Gofton e colaboradores (2016) propuseram um sexto gênero potencial:

Candidatus Neoehrlichia, caracterizado molecularmente a partir de carrapatos do gênero *Ixodes*.

Os gêneros *Anaplasma* spp. e *Ehrlichia* spp., se destacam nesta família, possuindo uma ampla diversidade de espécies que acometem humanos, animais domésticos e silvestres, incluindo aves e répteis (Almeida, 2011; Dolz, *et al.*, 2013; Calchi *et al.*, 2020; Magalhães, 2020; Bernardes, 2022). São bactérias pequenas e pleomórficas (cocóides a elipsoidais) que residem em vacúolos individualmente ou em inclusões compactas, firmemente envoltas por uma membrana, as chamadas mórulas (Mendonça *et al.*, 2005).

Temos relatos de primatas não humanos infectados por agentes do gênero *Ehrlichia* spp., como descreve Mafra e colaboradores (2015) em seu trabalho, no qual, através de análises moleculares, encontra o primeiro *Callithrix* sp. (Sagui) infectado por *Ehrlichia canis*, sendo este, um animal de vida livre capturado em um fragmento de Mata Atlântica no município de Viçosa, Minas Gerais. Os autores ressaltaram o grande potencial de transmissão ao ser humano, devido ao crescente contato dessa espécie com a população. Recentemente, Candido e colaboradores. (2023) realizaram a detecção molecular e caracterização filogenética de *Ehrlichia canis* e *Ehrlichia chaffeensis* infectando PNH das espécies *Sapajus apella* (Macaco-Prego-Castanho) e *Mico melanurus* (Sagui-do-Cerrado) respectivamente, no estado do Mato Grosso. Os autores ressaltaram que, estudos envolvendo a interação entre primatas neotropicais e os agentes desta família são escassos e, a realização de monitoramentos e pesquisas envolvendo este assunto, se fazem necessários. O gênero *Anaplasma* spp. foi detectado em alguns animais silvestres e em carrapatos coletados desses animais (Mazzotti *et al.*, 2018; Calchi *et al.*, 2020) porém, com a escassez de estudos sobre esses agentes em animais silvestres, ainda não temos relatos de primatas não humanos infectados por *Anaplasma* spp.

2.2.3. Ordem Haemosporida

Os hemosporídeos, parasitas pertencentes a ordem Haemosporida, fazem parte de um grupo filogeneticamente bem estabelecido, tendo distribuição cosmopolita, são protozoários heteróxeos obrigatórios, necessitando de mais de um hospedeiro para finalizar seu ciclo biológico, utilizando de insetos dípteros (classe Insecta e ordem Diptera) como vetores (Valkiunas, 2005). São agentes que apresentam zigoto móvel com conóide, microgametas flagelados produzidos por merogonia e oocisto com esporozoítos (Valkiunas, 2005; Perkins e Schaer, 2016). A distinção dos gêneros pertencentes a essa ordem, se dá com base na localização do desenvolvimento endógeno do parasito no hospedeiro vertebrado, na morfologia do estágio eritrocítico e no tipo de vetor invertebrado. Os vertebrados (anfíbios, répteis, aves e mamíferos) são considerados hospedeiros intermediários, uma vez que, nestes animais ocorre o estágio de merogonia, enquanto que, o estágio de esporogonia ocorre amplamente em dípteros hematófagos, sendo estes considerados os hospedeiros definitivos (Garnham, 1966; Martinsen; Perkins e Schall, 2008; Perkins e Schaer, 2016). Dentro da ordem Haemosporida encontram-se quatro famílias seguidas de seus hospedeiros vertebrados, sendo elas: Haemosporidae (aves e répteis), Plasmodiidae (répteis, aves e mamíferos), Leucocytozoidae (aves) e Garniidae (répteis).

Dentro desta ordem, mais especificadamente na família Plasmodiidae e gênero *Plasmodium* spp., encontram-se os agentes responsáveis por causar a malária humana, são transmitidos por fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* spp., e conduz a uma doença aguda com risco de morte, sendo considerada uma notável ameaça à saúde global. De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2018, foram notificados cerca de 228 milhões de casos de malária e 405 mil mortes em todo o mundo, sendo a África o local com maior número, tanto de casos como de mortes (WHO, 2019).

Atualmente, temos 5 espécies deste gênero capazes de infectar humanos, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*, sendo o mais frequente o *P. vivax* e o *P. falciparum* o mais relevante por causar maior número de óbitos (Ollomo, 2009). *P. knowlesi*, um dos últimos descritos deste gênero, capaz de infectar seres humanos, tem como principais hospedeiros *Macaca fascicularis* (primata do velho mundo), *Macaca nemestrina* (Macaco-de-cauda-de-porco do-sul) e *Presbytis melalophos* (Langur-de-Sumatra-de-Crista-Negra), reconhecido atualmente após um surto de casos em seres humanos na Malásia (Amir, *et al.*, 2008; Naserrudin, 2022).

Primatas não humanos são os hospedeiros mais vulneráveis a infecção por *Plasmodium* spp., tanto primatas do Velho Mundo como do Novo Mundo (Coatney, 1971) e, atualmente, temos 65 espécies desses animais detectadas com infecção natural por *Plasmodium* spp. (Cormier, 2011). No cenário brasileiro, a região amazônica é a mais endêmica para esses agentes causadores da malária, registrando 99% de casos autóctones. Nas demais regiões do país cerca de 20% dos casos notificados são autóctones e, principalmente em áreas de Mata Atlântica (Rio de Janeiro, São Paulo, Espírito Santo e Minas Gerais), existem casos de transmissão residual de malária (MS, 2023). Em uma pesquisa realizada no estado de Rondônia, Araújo e colaboradores (2013) observaram que, de 184 primatas não humanos, 19 estavam infectados por *Plasmodium* spp., sendo mais frequente em animais de vida livre do que de cativeiro, neste trabalho a maioria dos agentes detectados eram *Plasmodium brasilianum* e, 3 casos eram *P. falsiparum*. Figueiredo e colaboradores (2017) detectaram parasitemia através da microscopia eletrônica, observando 5 animais positivos para *Plasmodium* spp. de 171 amostras de sangue, coletadas de animais silvestres da região da Amazônia maranhense, sendo um *Callithrix jacchus* (Sagui-de-Tufos-Branco), um desses animais positivos, confirmando posteriormente, através da análise molecular, uma prevalência das amostras positivas de 29,81% para *Plasmodium malariae* e 34,16% para *Plasmodium brasilianum*, demonstrando a provável circulação desses agentes em PNH da região.

Recentemente, Alvarenga (2019) coletou, aproximadamente, 360 amostras de PNH, oriundos de fragmentos de Mata Atlântica das cidades de Guapimirim/RJ, Joinville/SC, Indaial/SC, Porto Rico/PR e Taquarassu/MS, e, após análise molecular das mesmas, foi detectado infecção por *Plasmodium Simium* em *Cebus* (Macaco-de-Cauda-Longa) e *Sapajus* (Macaco-Prego), e *Plasmodium brasilianum* em Callitrichidae dos gêneros *Callithrix* (Sagui), *Leontopithecus* (Mico-Leão) e *Mico*, sendo o primeiro relato desses protozoários encontrados nesses animais. A autora ressalta que, apesar da importância destes parasitos em decorrência do seu potencial zoonótico, há um número limitado de estudos sobre a circulação de *Plasmodium* spp. em primatas brasileiros, bem como, a escassez de notificação de casos autóctones em regiões de Mata Atlântica.

Apesar dos diversos estudos envolvendo a malária humana no mundo e da relevância dessa zoonose, não existe uma vacina licenciada contra os agentes causadores dessa doença e, embora tenham mais de 30 antígenos identificados como candidatos vacinais, nenhum deles proporcionou uma perspectiva sólida da possibilidade de se ter uma significativa imunização nos próximos anos, dessa forma, diversos estudos são realizados a partir de exemplares recomendados dos gêneros *Saimiri* (Macacos-de-Cheiro) e *Aotus nigriceps* (Macaco-da-Noite), uma vez que, espécies destes gêneros, são capazes de se infectar por plasmódios humanos. No Brasil, uma parceria entre o Laboratório de Pesquisa em Malária e o Centro Nacional de Primatas (CENP) do Instituto Evandro Chagas, vem desenvolvendo estudos para elucidar e desenvolver uma possível vacina contra a malária humana (Pratt-Riccio *et al.*, 2021).

2.2.4. Gênero *Borrelia* spp.

O gênero *Borrelia* spp. pertence a ordem Spirochaetales e família Spirochaetaceae (Quinn, 1994), são bactérias espiroquetas que possuem formato helicoidal, protoplasma cilíndrico envolto pela membrana celular (da qual partem flagelos) e, possuem uma membrana externa que contém diversas proteínas de superfície. Sendo diferenciadas, morfologicamente, dos demais gêneros dessa família por possuírem maior número de flagelos periplasmáticos, por serem maiores e possuírem menor número de espiras (Babour e Hayes, 1986; Quinn *et al.*, 1994). Causadoras das chamadas borrelioses, são capazes de infectar diversas espécies de vertebrados através de carrapatos vetores (FARIAS *et al.*, 2023; SÁNCHEZ *et al.*, 2020). Estudos consideram que, carrapatos pertencentes ao gênero *Ixodes*, são os principais vetores responsáveis pela transmissão das borrelias (Soares *et al.*, 2000 e Kassab *et al.*, 2020). Esses carrapatos desempenham um papel significativo na disseminação dessas espiroquetas, tanto para animais silvestres, que são considerados potentes reservatórios e amplificadores desses agentes (Hasle, 2013 e Norte *et al.*, 2013), quanto para animais domésticos, que podem favorecer a transmissão para seres humanos. Além disso, outras espécies de carrapatos foram identificadas como potenciais transmissoras desse agente, incluindo *Amblyomma brasiliense* (Santos *et al.*, 2020), *Amblyomma americanum*, *Dermacentor variabilis* (Mather *et al.*, 1994) e argasídeos, que têm a capacidade de transmitir praticamente todas as espécies de *Borrelia* spp. (Hoogstraal *et al.*, 1985).

Atualmente, temos quatro grupos distintos de enfermidades causadas pelas borrelias, a Febre recorrente, primeira borreliose descrita, uma zoonose que tem como agentes borrelias do grupo *Borrelia recurrentis sensu lato (s.l.)*, composto por mais de 20 espécies, no qual os vetores são carrapatos do gênero *Ornithodoros* e piolhos do gênero *Pediculus* (Barbour e Hayes, 1986). Na sequência, foi descrita a borreliose aviária causada pela *Borrelia anserina*, cujos vetores são carrapatos argasídeos (Quinn *et al.*, 1994) e a espiroquetose bovina, causada pela *Borrelia theileri*, agente que, além de causar doença em bovinos, também são capazes de infectar equinos e ovinos, através de vetores carrapatos do gênero *Ixodes*, principalmente *Rhipicephalus microplus* (Matton e Melckebeke 1990; Quinn *et al.*, 1994). E, por fim, a borreliose de Lyme, acometendo animais domésticos, silvestres e o ser humano, uma doença multissistêmica e de ampla distribuição geográfica, tendo como agentes borrelias pertencentes ao grupo *Borrelia burgdorferi sensu lato (s.l.)*, com pelo menos dezoito genoespécies (Nascimento, 2012). A doença de Lyme tem grande relevância, principalmente, nos Estados Unidos da América (EUA), Europa e Ásia, representando um grave problema de saúde pública (Kugeler *et al.*, 2021; Marques *et al.*, 2021). Nos EUA predomina-se a *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, diferentemente da Europa onde três espécies do complexo *B. burgdorferi s.l.* são patogênicas para humanos (*B. burgdorferi stricto sensu*, *Borrelia garinii*, e *Borrelia afzelii*) e, na Ásia, foram identificadas sete espécies de borrelias, sendo duas patogênicas: *B. garinii*, e *B. afzelii* (Ataliba, 2006). No Brasil, Filgueirae colaboradores (1989) descreveram o que, possivelmente, seria o primeiro relato da doença de Lyme em pacientes com quadros dermatológicos e, posteriormente outros relatos foram descritos no Rio de Janeiro (Azulay *et al.*, 1991) e Manaus (Talhari *et al.*, 1992). Porém, até o momento, não foi possível realizar o isolamento do agente etiológico em território nacional (Soares *et al.*, 2000; Fonseca *et al.* 2005). Não se pode descartar a ocorrência desses patógenos do complexo *B. burgdorferi s.l.*, porém, estudos com detecção molecular e tentativa de isolamento e cultivo se fazem necessários para fundamentar a hipótese da existência desses agentes.

A detecção de bactérias do gênero *Borrelia* spp. já foi descrita em alguns animais silvestres como cervídeos, que, apesar de, na maioria dos casos, não expressarem

sintomatologia clínica, atuam como reservatórios, principalmente das borrelíias do grupo *B. burgdorferi s.l.* (Magnarelli *et al.*, 1995), roedores que, atualmente, são considerados os principais reservatórios e carreadores da *Borrelia recurrentis*, uma vez que, transportam esses agentes do ambiente silvestre para ambientes urbanos e, dificilmente adoecem (Barbour e Hayes, 1986) e aves migratórias que, atuam como potentes reservatórios e disseminadoras de *B. burgdorferi* (Oslen *et al.*, 1995), já que transportam carrapatos vetores infectados de uma região para outra (Hubalek *et al.*, 1996).

Em primatas, no Brasil, temos apenas um trabalho relatando a infecção natural por *Borrelia burgdorferi* em *Leontopithecus chrysomelas* (Mico-Leão-da-Cara-Dourada) de vida livre do estado do Rio de Janeiro, descrito por Santos (2018), no qual, através da análise molecular do gene 16SRNA e posterior sequenciamento, evidenciou 32 animais de um total de 200 animais (16%), positivos para esse agente, com similaridade de 98% a 99% com *B. burgdorferi* (CP005925) disponível no GenBank. Entretanto, a frequência de animais infectados por *B. burgdorferi* descrita nesta pesquisa, não está compatível com os achados pela literatura científica envolvendo este agente no Brasil, além disso, até o momento, não foi possível realizar o isolamento desta espécie no país (Soares *et al.*, 2000; Fonseca *et al.* 2005). Não se pode descartar a ocorrência desses patógenos do complexo *B. burgdorferi s.l.*, porém, a análise molecular deve ser feita de maneira criteriosa, detectando, de preferência, mais de um gene do agente encontrado, além de descartar possíveis contaminações das amostras com o controle positivo, que neste caso, foi utilizado a própria espécie *B. burgdorferi* como controle, utilizar borrelíias de outras espécies proporcionaria mais segurança ao detectar agentes deste complexo *B. burgdorferi s.l.* nas amostras analisadas.

2.2.5. Gênero *Babesia* spp.

O gênero *Babesia* spp., protozoários hemoparasitos pertencentes ao filo Apicomplexa, ordem Piroplasmida e família Babesiidae, são transmitidos por carrapatos da família Ixodidae, estes agentes necessitam deste vetor para completar seu ciclo biológico, uma vez que, todo desenvolvimento sexual ocorre dentro dos carrapatos e, a posterior transmissão ao hospedeiro vertebrado, ocorre através da saliva do vetor. Os gêneros de Ixodidae que atuam como principais vetores para *Babesia* spp. são *Rhipicephalus*, *Boophilus*, *Dermacentor*, *Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma* (Genchi, 2007; Pietrobelli *et al.* 2007). A fase assexuada destes agentes é completada com os merozoítos dentro do eritrócito de hospedeiros vertebrados que, após várias replicações do protozoário, se rompe, causando febre, anorexia, perda de peso, anemia hemolítica, hemoglobinúria, podendo levar ao óbito do hospedeiro (Telford, 1993; Genchi, 2007). Os hospedeiros do gênero *Babesia* spp. são animais silvestres e domésticos como: canídeos, felídeos, equinos, bovídeos, ovinos, suínos, roedores, além de ter um potencial zoonótico, podendo infectar seres humanos (Pietrobelli *et al.* 2007).

Em primatas, até o momento, temos relatos de agentes do gênero *Babesia* spp., infectando naturalmente, apenas primatas do Velho Mundo (Wel *et al.* 2008; Maamun *et al.* 2011), tanto animais mantidos sob cuidados humanos como de vida livre e, experimentalmente, foi demonstrada a infecção por esse agente em *Saimiri sciureus* (macaco-de-cheiro-comum) e *Cebus apella* (Macaco-prego-das-guianas).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos e legais da pesquisa científica

Todas as amostras utilizadas nessa pesquisa obtiveram aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fundação Universidade de Passo Fundo, sob o número de protocolo nº 006/2022 (Anexo 1). Além disso, a captura dos primatas, a coleta e transporte de todas as amostras foram autorizadas previamente pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) sob o nº 82109-1 (Anexo 2).

3.2. Delineamento do estudo

Parte das amostras de sangue de primatas não humanos utilizadas neste estudo, foram coletadas pela equipe de pesquisa do Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em parceria com a Fundação Universidade de Passo Fundo, sendo, 11 amostras oriundas do Zoológico Municipal de Volta Redonda (ZooVR), Volta Redonda, RJ, 33 do Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) – Ibama, Seropédica, RJ e 12 amostras coletadas no biotério de animais silvestres do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ. As demais amostras foram cedidas ao LDP pelo BioParque do Rio, localizado no Rio de Janeiro, RJ e Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ), localizado em Guapimirim, RJ, que contribuíram para esse estudo com 69 e 53 amostras, respectivamente. As amostras oriundas do Bioparque do Rio foram mantidas em tubos a vácuo contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e as amostras oriundas do CPRJ em tubos secos contendo coágulos cardíacos, uma vez que a coleta desse material foi realizada posterior a morte natural dos animais através de necropsia.

3.3. Metodologia de captura e contenção dos primatas não humanos

Os animais das espécies *Sapajus apela* (macaco-prego) e *Callithrix spp.* (sagui) foram capturados em seus recintos com puçá feito de cordão de algodão trançado e, em seguida, contidos fisicamente (figura 2), brevemente e sempre respeitando o bem-estar de cada indivíduo, com auxílio de luvas de raspa de punho longo, e então identificados por meio da leitura de microship individual, nome e recinto. Em seguida realizado o exame físico de todos os animais e, por fim, a coleta de 1 mL do sangue através da veia femoral, que foi colocado em tubos contendo EDTA. Ao final, os animais foram devolvidos para seus respectivos recintos e ficaram sob observação de um médico veterinário responsável.

Para a coleta de sangue dos animais das espécies *Papio anubis* (babuíno) e *Alouatta guariba clamitans* (bugio ruivo) foi necessária a realização de contenção química, com os fármacos cloridrato de cetamina 10 % na dose 10-20 mg/kg associado ao midazolam na dose 1 mg/kg. Esses animais foram acompanhados pelo médico veterinário responsável durante todo o procedimento e devolvidos ao seu recinto e grupo somente após plena recuperação anestésica.

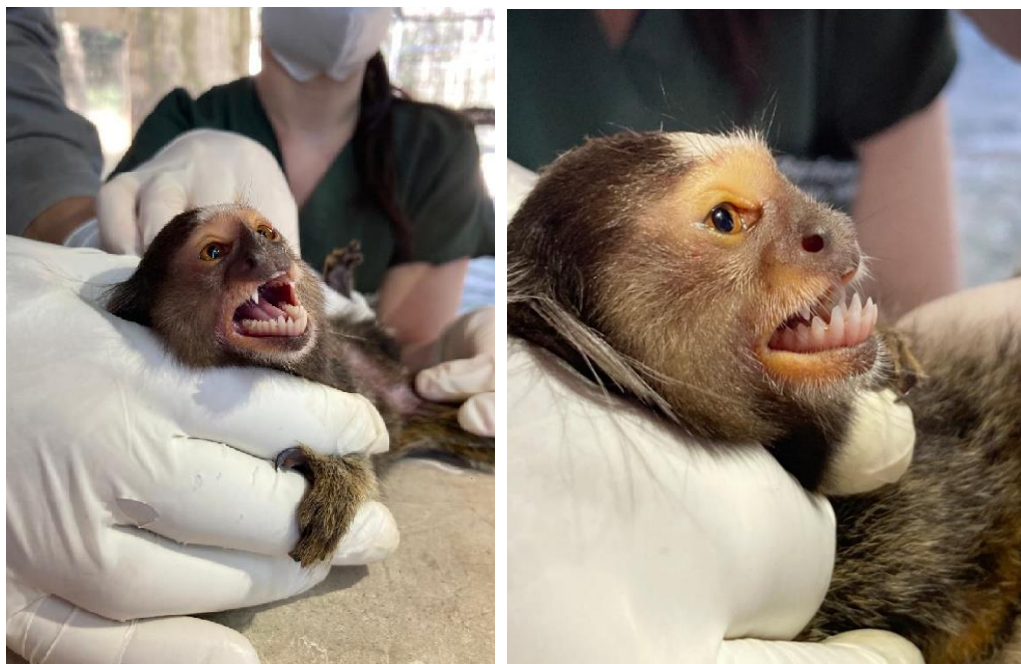


Figura 2. Primata do gênero *Callithrix* spp. advindo do CETAS-RJ, contido fisicamente para coleta de sangue. Fonte: arquivo pessoal.

3.4. Armazenamento das amostras de sangue coletadas

As amostras foram identificadas e mantidas em sob refrigeração a uma temperatura de aproximadamente 4°C. Para o transporte das amostras até o Laboratório de Doenças Parasitárias, foi utilizado caixa isotérmica e placas de gelo reciclável, de modo que, as amostras permaneceram entre o gelo, o que garantiu a refrigeração durante todo o transporte, com acompanhamento de um termômetro digital, sem haver quaisquer prejuízos para as amostras.

3.5. Extração de DNA do sangue

Para a extração do DNA das amostras de sangue total, foi utilizado o *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega®, USA), seguindo as recomendações do fabricante, a partir de 300 µL de sangue das amostras já homogeneizadas. Para a extração das amostras dos coágulos, foi utilizado o *Biospin vírus DNA/RNA extraction kit* (BioFlux®), seguindo as recomendações do fabricante.

3.6. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para avaliar a viabilidade das amostras extraídas para testes biomoleculares, todas as amostras foram submetidas a uma triagem realizada através da amplificação parcial do gene endógeno GAPDH, que detecta a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH ou G3PD), presente em células de animais mamíferos, répteis, aves, crustáceos e alguns coleópteros (Sarri *et al.*, 2014; Cassia-Pires *et al.*, 2017). Para realizar a PCR convencional do gene GAPDH foi obtido um produto, em microtubos de 200 µL, com volume final de 25 µL, contendo 2 µL do DNA extraído acrescidos de 23 µL do *Master Mix* [0,2 µL de Taq polimerase a 1U (GoTaq DNA Polymerase, Promega®), 2 µL de

cada iniciador a 10 μ M (GAPDH-F e GAPDH-R), 2 μ L de dNTP a 2,5 mM, 1,5 μ L de MgCl₂ a 25 mM (Promega® MgCl₂ Solution), 5 μ L de tampão 5X (Colorless GoTaq®, Promega®) e 10,3 μ L de água ultrapura livre de DNases]. As reações no termociclador foram realizadas com seguinte protocolo: 95°C por 2 minutos e 30 segundos (ativação da Taq polimerase), seguidos de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos (desnaturação), 55° por 30 segundos (anelamento) e 72° por 25 segundos (extensão) e, por fim, um ciclo de 72° por 5 minutos (extensão final).

Posteriormente à amplificação de todas as amostras para o gene GAPDH, foram então realizadas PCR buscando agentes do gênero *Borrelia* spp. e *Babesia* spp., das famílias Anaplasmataceae e Trypanosomatidae, e da ordem Haemosporida (Tabela 1).

Tabela 1. Sequência dos iniciadores (primers) utilizados neste estudo.

Especificidade/ Gene/Primer	Sequência dos oligonucleotídeos	PB	Referência
Anaplasmataceae			
23S			
Ana23S-212f	ATAAGCTGCGGGGAATTGTC	515pb	Dahmani <i>et al.</i> , 2015
Ana23S-723r	TGCAAAAGGTACGCTGTAC		
Trypanosomatidae			
18S			
TRY927F	GAAACAAGAAACACGGGAG	680pb	Smith <i>et al.</i> , 2008
TRYP927R	CTACTGGGCAGCTTGGA		
SSU561F	TGGGATAACAAAGGAGCA		
SSU561R	CTGAGACTGTAACCTCAAAGC		
Haemosporida			
CytB			
CytBF	GAGAATTATGGAGTGGATGGTG	815pb	Harrison <i>et al.</i> , 2013
CytBR	TGGTAATTGACATCCAATCC		
<i>Borrelia</i> spp			
FlaB			
FlaLL	ACATATTCAGATGCAGACAGAGGT	665pb	Stromdahl <i>et al.</i> , 2003
FlaRL	GCAATCATAGCCATTGCAGATTGT	354pb	
FlaLS	AACAGCTGAAGAGCTTGGAAT		
FlaRS	CTTTGATCACTTATCATTCTAATAGC		
<i>Babesia</i> spp			
18S			
BTF1	GGCTCATTACAACAGTTATAG	±800pb	Jefferies <i>et al.</i> , 2007
BTR1	CCCAAAGACTTTGATTTCTCTC		
BTF2	CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATAC		
BTR2	GGACTACGACGGTATCTGATCG		
Chordata			
GAPDH			
GAPDHF	ACCACAGTCCATGCCATCAC	200pb	Cassia-Pires <i>et al.</i> , 2017
GAPDHR	GTCAGGTCCACCACTGACAC		

3.6.1. Análise molecular para os gêneros *Borrelia* spp. e *Babesia* spp.

Para a detecção dos agentes do gênero *Borrelia* spp foi utilizado nested-PCR para amplificação do gene flaB (flagelina), como demonstrado por Stromdahl e colaboradores (2003). Para realizar a primeira reação da nested-PCR foi adicionado em microtubo de 200 µL um produto com volume final de 25 µL contendo 3 µL do DNA extraído acrescido de 22 µL do *Master Mix* [0,2 µL de Taq polimerase a 1U (GoTaq DNA Polymerase, Promega®), 2 µL de cada iniciador a 10 µM (FLARL e FLALL), 2 µL de dNTP a 2,5 mM, 1,5 µL de MgCl₂ a 25 mM (Promega® MgCl₂ Solution), 5 µL de tampão 5X (Colorless GoTaq®, Promega®) e 9,3 µL de água ultrapura livre de DNases]. No termociclador a primeira reação ocorreu seguindo o protocolo de 95°C por 2 minutos e 30 segundos (ativação da Taq polimerase), seguidos de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos (desnaturação), 55° por 30 segundos (anelamento) e 72° por 35 segundos (extensão) e, por fim, um ciclo de 72° por 5 minutos (extensão final). Já para a segunda reação da nested-PCR para *Borrelia* spp. foi adicionado a um tubo de 200 µL 2 µL do amplicon gerado na primeira reação acrescido de 23 µL do *Master Mix* [0,2 µL de Taq polimerase a 1U (GoTaq DNA Polymerase, Promega®), 2 µL de cada iniciador a 10 µM (FLARS e FLALS), 2 µL de dNTP a 2,5 mM, 1,5 µL de MgCl₂ a 25 mM (Promega® MgCl₂ Solution), 5 µL de tampão 5X (Colorless GoTaq®, Promega®) e 10,3 µL de água ultrapura livre de DNases]. Para a segunda reação, utilizou-se o protocolo de 95°C por 2 minutos e 30 segundos (ativação da Taq polimerase), seguidos de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos (desnaturação), 55° por 30 segundos (anelamento) e 72° por 30 segundos (extensão) e, por fim, um ciclo de 72° por 5 minutos (extensão final). Como controles positivos foram utilizadas amostras previamente analisadas e sequenciadas, positivas para *Borrelia anserina*.

Para detecção dos agentes do gênero *Babesia* spp. foi realizado nested-PCR para amplificação do gene 18S, como demonstrado por Jefferies e colaboradores (2007). Para a primeira reação da nested-PCR foi adicionado em microtubo de 200 µL um produto com volume final de 25 µL contendo 3 µL do DNA extraído acrescido de 22 µL do *Master Mix* [0,2 µL de Taq polimerase a 1U (GoTaq DNA Polymerase, Promega®), 2 µL de cada iniciador a 10 µM (BTF1 e BTR1), 2 µL de dNTP a 2,5 mM, 1,5 µL de MgCl₂ a 25 mM (Promega® MgCl₂ Solution), 5 µL de tampão 5X (Colorless GoTaq®, Promega®) e 9,3 µL de água ultrapura livre de DNases]. No termociclador a primeira reação ocorreu seguindo o protocolo de 95°C por 2 minutos e 30 segundos (ativação da Taq polimerase), seguidos de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 58° por 20 segundos (anelamento) e 72° por 30 segundos (extensão) e, por fim, um ciclo de 72° por 5 minutos (final). Já para a segunda reação da nested-PCR para *Babesia* spp. foi adicionado a um tubo de 200 µL 2 µL do amplicon resultado da primeira reação acrescidos de 23 µL do *Master Mix* [0,2 µL de Taq polimerase a 1U (GoTaq DNA Polymerase, Promega®), 2 µL de cada iniciador a 10 µM (BTF2 e BTR2), 2 µL de dNTP a 2,5 mM, 1,5 µL de MgCl₂ a 25 mM (Promega® MgCl₂ Solution), 5 µL de tampão 5X (Colorless GoTaq®, Promega®) e 10,3 µL de água ultrapura livre de DNases]. Para o termociclador, na segunda reação, utilizou-se o protocolo de 95°C por 2 minutos e 30 segundos (ativação da Taq polimerase), seguidos de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 62° por 20 segundos (anelamento) e 72° por 30 segundos (extensão) e, por fim, um ciclo de 72° por 5 minutos (extensão final).

Como controles positivos foram utilizadas amostras previamente analisadas e sequenciadas, positivas para *Babesia canis*. Tanto para *Babesia* spp. como para *Borrelia* spp para o controle negativo foi utilizado água ultrapura livre de DNases aplicadas dentro e fora do fluxo laminar de preparação do *Master Mix*.

3.6.2. Análise molecular das famílias Anaplasmataceae e Trypanosomatidae

Para a detecção dos agentes da família Anaplasmataceae foi utilizado PCR convencional para amplificação do gene 23-S rRNA como demonstrado por Dahmani e colaboradores (2015). Para a reação de PCR convencional foram utilizados tubos de 200 µL, aos quais foram adicionados um produto com volume final de 25 µL, contendo 3 µL do DNA extraído acrescidos de 22 µL do *Master Mix* [0,2 µL de Taq polimerase a 1U (GoTaq DNA Polymerase, Promega®), 2 µL de cada iniciador a 10 µM (Ana23S-212f e Ana23S-723r), 2 µL de dNTP a 2,5 mM, 1,5 µL de MgCl₂ a 25 mM (Promega® MgCl₂ Solution), 5 µL de tampão 5X (Colorless GoTaq®, Promega®) e 9,3 µL de água ultrapura livre de DNases]. O protocolo utilizado na etapa do termociclador foi de 95°C por 2 minutos e 20 segundos (ativação da Taq polimerase), seguidos de 40 ciclos de 94°C por 40 segundos (desnaturação), 55° por 40 segundos (anelamento) e 72° por 48 segundos (extensão) e, por fim, um ciclo de 72° por 5 minutos (extensão final). Como controles positivos foram utilizadas amostras previamente analisadas e sequenciadas, positivas para *Anaplasma marginale*.

Já para a detecção dos agentes da família Trypanosomatidae foi utilizado nested-PCR para amplificação do gene 18-S rRNA, como demonstrado por Smith e colaboradores (2008). Para a primeira reação da nested-PCR foi adicionado em microtubo de 200 µL um produto com volume final de 25 µL, contendo 3 µL do DNA extraído acrescido de 22 µL do *Master Mix* [0,2 µL de Taq polimerase a 1U (GoTaq DNA Polymerase, Promega®), 2 µL de cada iniciador a 10 µM (TRY927F e TRYP927R), 2 µL de dNTP a 2,5 mM, 1,5 µL de MgCl₂ a 25 mM (Promega® MgCl₂ Solution), 5 µL de tampão 5X (Colorless GoTaq®, Promega®) e 9,3 µL de água ultrapura livre de DNases]. No termociclador a primeira reação ocorreu seguindo o protocolo de 94°C por 2 minutos (ativação da Taq polimerase), seguidos de 35 ciclos de 94°C por 15 segundos (desnaturação), 55° por 30 segundos (anelamento) e 72° por 60 segundos (extensão) e, por fim, um ciclo de 72° por 5 minutos (extensão final). Já para a segunda reação da nested-PCR para a família trypanosomatidae foi adicionado a um tubo de 200 µL 2 µL do amplicon resultado da primeira reação acrescido de 23 µL do *Master Mix* [0,2 µL de Taq polimerase a 1U (GoTaq DNA Polymerase, Promega®), 2 µL de cada iniciador a 10 µM (SSUF e SSUR), 2 µL de dNTP a 2,5 mM, 1,5 µL de MgCl₂ a 25 mM (Promega® MgCl₂ Solution), 5 µL de tampão 5X (Colorless GoTaq®, Promega®) e 10,3 µL de água ultrapura livre de DNases]. Para o termociclador, na segunda reação, utilizou-se o protocolo de 94°C por 2 minutos (ativação da Taq polimerase), seguidos de 35 ciclos de 94°C por 15 segundos (desnaturação), 55° por 30 segundos (anelamento) e 72° por 60 segundos (extensão) e, por fim, um ciclo de 72° por 5 minutos (extensão final). Como controles positivos foram utilizadas amostras previamente analisadas e sequenciadas, positivas para *Trypanosoma cruzi*.

Como controle negativo para as reações citadas, foi utilizado água ultrapura livre de DNases aplicadas dentro e fora do fluxo laminar de preparação do *Master Mix*.

3.6.3. Análise molecular para a ordem Haemosporida

Para a detecção de agentes da ordem Haemosporidae, foi utilizado PCR convencional para amplificação do gene CytB, como demonstrado por Harrison e colaboradores, (2013). Para realizar a PCR convencional foi obtido um produto, em microtubos de 200 µL, com volume final de 25 µL, contendo 3 µL do DNA extraído acrescido de 22 µL do *Master Mix* [0,2 µL de Taq polimerase a 1U (GoTaq DNA Polymerase, Promega®), 2 µL de cada iniciador a 10 µM (CytBR e CytBF), 2 µL de dNTP a 2,5 mM, 1,58 µL de MgCl₂ a 25 mM (Promega® MgCl₂ Solution), 5 µL de

tampão 5X (Colorless GoTaq®, Promega®) e 9,232 µL de água ultrapura livre de DNases]. As reações no termociclador foram realizadas com seguinte protocolo: 95°C por 2 minutos e 30 segundos (ativação da Taq polimerase), seguidos de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 62° por 30 segundos (anelamento) e 72° por 50 segundos (extensão) e, por fim, um ciclo de 72° por 5 minutos (extensão final).

Para controle positivo foram utilizadas amostras previamente analisadas e sequenciadas, positivas para *Plasmodium justanucleare*. Como controle negativo foi utilizado água ultrapura livre de DNases aplicadas dentro e fora do fluxo laminar de preparação do *Master Mix*. Todas as reações realizadas nesta dissertação foram utilizados termocicladores da Bio-rad®, modelo T100.

3.7. Eletroforese e análise dos resultados

Um volume de 10 µL dos produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose a 1,5% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®), separados por eletroforese (5V/cm), corado com DSVIEW nucleic stain 20.000X e visualizados em transiluminador de luz UV (L-PIX Sti, Loccus). Para se estimar o tamanho dos fragmentos amplificados, os mesmos foram comparados com um padrão de peso molecular de 100pb (100bp Ladder Plus, Ready To Use - Sinapse Inc - M1071).

3.8. Sequenciamento genético

Do produto de PCR das amostras que amplificaram no gel de agarose, 5µL foram separados e purificados, sendo tratados com Exo-Sap-IT (GE Healthcare®), seguindo o protocolo e recomendações do fabricante. Os fragmentos do DNA foram então sequenciados em ambas as direções por um analisador genético automatizado (ABI 3730 DNA Analyser, Thermo Fisher Scientific®) na Plataforma de Sequenciamento de DNA – RPT01A PDTIS/FIOCRUZ. Os resultados das sequências obtidas foram alinhados através do programa DNA Baser® e então submetidas a pesquisa de homologia com outras sequências depositadas no GenBank, utilizando a ferramenta BLASTn.

3.9. Análise Filogenética

O alinhamento de múltiplas sequências foi realizado com as sequências obtidas neste estudo e sequências do GenBank utilizando o programa MAFFT, implementado no software Jalview v.2.11 (Kato et al., 2013, Waterhouse et al., 2009). O modelo evolutivo mais adequado foi determinado usando o MEGA versão 11, utilizando o critério bayesiano (Tamura et al., 2021). As relações filogenéticas foram estimadas usando a inferência filogenética por Máxima Verossimilhança (ML) com o programa PhyML, que está implementado no SeaView v.5 (Gouy et al., 2021). O suporte estatístico dos cladogramas foi medido por meio de uma busca heurística com 1000 replicatas de bootstrap.

4. RESULTADOS

Todas as amostras deste estudo foram coletadas ao longo do ano de 2022 (tabela 2). Na análise molecular, a qualidade da extração foi confirmada com a amplificação do gene endógeno GAPDH em todas as amostras utilizadas para o estudo (figura 3).

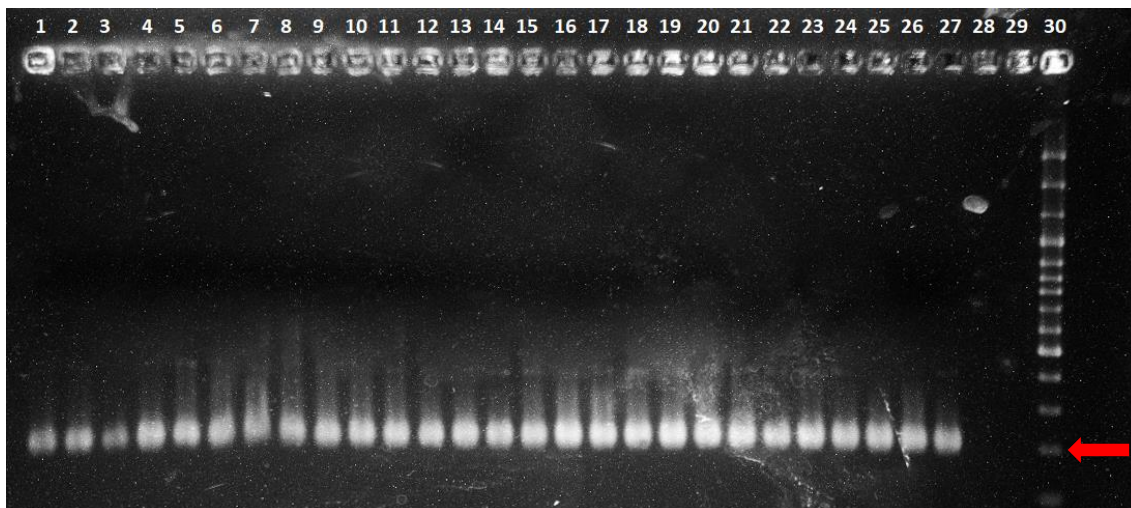


Figura 3. Representação dos produtos da PCR para o gene GAPDH (200pb – seta vermelha), aplicados em gel de agarose a 2% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®) corado com DSview nucleic stain 20.000X (Sinapse Inc®) e separados por eletroforese (5V/cm), visualizados em transiluminador UV. Poço 1-27: amostras positivas. Poço 28-29: controles negativos. Poço 30: ladder.

Tabela 2. Relação das espécies de primatas coletados, seus respectivos nomes populares e quantidade de indivíduos por espécie, de acordo com cada local de coleta.

Origem das Amostras	Espécie	Nome Popular	N
CETAS	<i>Sapajus apella</i>	Macaco-Prego	13
	<i>Callithrix spp.</i>	Sagui	20
Zoológico De Volta Redonda	<i>Papio anubis</i>	Babuíno	3
	<i>Sapajus apella</i>	Macaco-Prego	7
	<i>Alouatta guariba</i>	Bugiu-Ruivo	1
Biotério - UFRJ	<i>Sapajus apella</i>	Macaco-Prego	12
Bioparque Do Rio	<i>Sapajus xanthosternos</i>	Macaco-Prego	27
	<i>Aotus nigriceps</i>	Macaco-da-Noite	1
	<i>Sapajus apella</i>	Macaco-Prego	12
	<i>Aotus azarae</i>	Macaco-da-Noite	2
	<i>Cebus albifrons</i>	Cairara-de-Frente-Branca	2
	<i>Alouatta caraya</i>	Bugio-Preto	1
	<i>Sapajus flavius</i>	Macaco-Prego	7
	<i>Ateles paniscus</i>	Macaco-Aranha	7
	<i>Ateles marginatus</i>	Macaco-Aranha	1
	<i>Ateles chamek</i>	Macaco-Aranha	2
	<i>Pithecia irrorata</i>	Parauaçu	2
	<i>Sapajus robustos</i>	Macaco-Prego	1
	<i>Macaca fascicularis</i>	Macaco-Cinimolgo	1
	<i>Alouatta seniculus</i>	Bugiu	2
<i>Mandrillus sphinx</i>	Mandril	1	
CPRJ	<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	Mico-Leão-de-Cara-Dourada	49
	<i>Saguinus midas</i>	Sagui-de-Mãos-Amarelas	1
	<i>Cebuella pygmaea</i>	Sagui-Pigmeu	2
	<i>Alouatta puruensis</i>	Bugiu-Vermelho-do-Rio-Purus	1
Total de Amostras			178

N = Quantidade de espécimes coletados.

De todas as 178 amostras de sangue de PNH analisadas pelos testes moleculares, 7 amostras (3,9%) advindas do CPRJ amplificaram para o gene 18S rRNA de Trypanosomatidae (figura 5), sendo que, 6 dessas amostras correspondem a primatas da espécie *Leontopithecus chrysomelas* (3,37 %, 6/178) e 1 corresponde a espécie *Alouatta puruensis* (0,56%, 1/178), popularmente conhecidos como Mico-Leão-de-Cara-Dourada e Bugio-Vermelho-do-Rio-Purus, respectivamente. Todas as amostras foram purificadas e sequenciadas. Posterior a análise das sequências obtidas, foi possível identificar que as 7 amostras exibiram sequências de *Trypanosoma* spp., agrupados dentro do mesmo clado onde se encontra *Trypanosoma minasense* na árvore filogenética (figura 5) e, quando analisadas pelo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), obtiveram 99% a 100% de identidade entre as sequências e a espécie de *Trypanosoma minasense* depositada (GenBank AB362411.1).

Todas as amostras foram submetidas a análise molecular para a pesquisa dos agentes da ordem Haemosporidae, família Anaplasmataceae e gêneros *Borrelia* spp. e *Babesia* spp. porém, nenhuma amostra amplificou para os genes testados destes agentes.

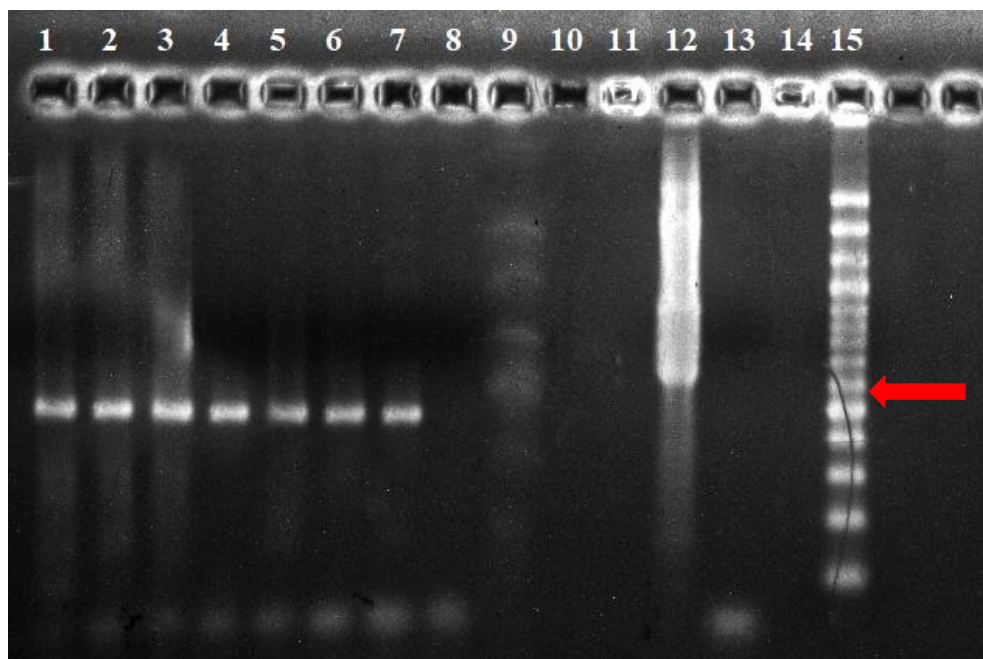


Figura 4. Representação dos produtos da PCR para o gene 18S (680pb – seta vermelha), aplicados em gel de agarose a 2% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®) corado com DSview nucleic stain 20.000X (Sinapse Inc®) e separados por eletroforese (5V/cm), visualizados em transiluminador UV. Poço 1-7: amostras positivas. Poço 12: controle positivo (*Trypanosoma cruzi*). Poço 13: controle negativo. Poço 15: ladder.

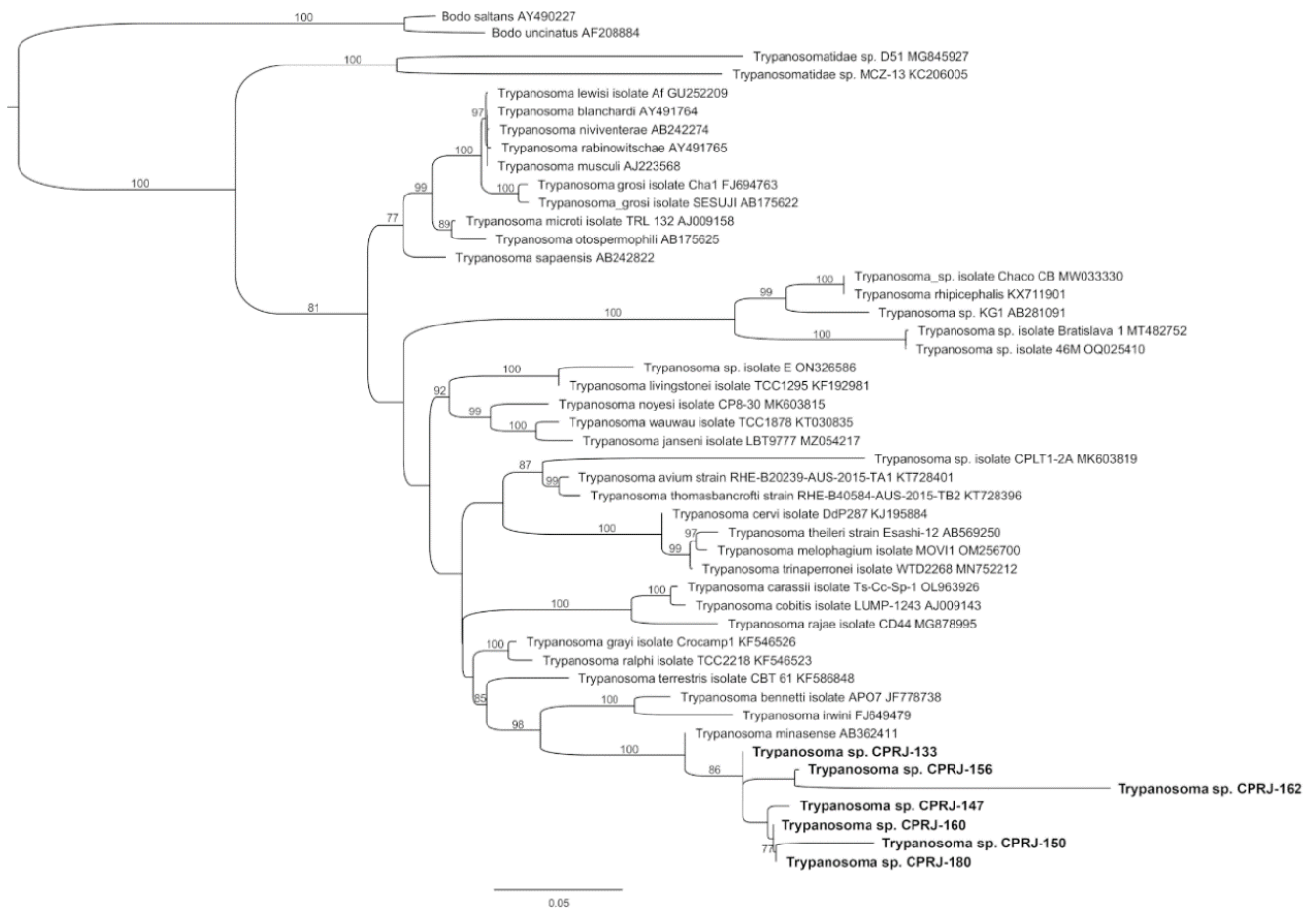


Figura 5. Árvore filogenética baseada nas sequências a partir do gene 18S rRNA das amostras obtidas neste estudo e outras sequências de diferentes partes do mundo (os números de acesso do GenBank são indicados após o nome da espécie). Essa árvore filogenética foi construída usando o método de *Maximum Likelihood* (PhyML). O suporte estatístico dos clados foi medido por meio de uma busca heurística com 1000 replicatas de bootstrap.

5. DISCUSSÃO

Esta pesquisa realizou o diagnóstico molecular para diversos hemoparasitos, de importância tanto para a biodiversidade da fauna como para saúde pública, a partir de amostras de sangue de PNH mantidos sob cuidados humanos advindos do estado do Rio de Janeiro. O número amostral e a diversidade de espécies de primatas utilizadas neste trabalho é bem expressivo quando comparado com os achados na literatura científica. Além disso, este é o primeiro trabalho relatando a detecção de *Trypanosoma minasense* na espécie *Alouatta puruensis*. Há relatos deste agente infectando outras espécies de primatas brasileiros, de vida livre ou não, de forma natural e experimental (Deane e Damasceno, 1961; Dunn *et al.*, 1963; Deane 1979; Resende *et al.*, 1994; Ziccardi *et al.*, 2000; Coimbra *et al.*, 2020; Guimarães *et al.*, 2022).

O primeiro isolamento de *Trypanosoma minasense* ocorreu a partir de amostras de um *Callithrix penicillata* naturalmente infectado do Brasil (Ziccardi *et al.*, 1996). Este agente não é capaz de infectar triatomíneos e nada se sabe sobre seus vetores, além disso, ainda não está claro se causa doença em PNH, devido à escassez de estudos envolvendo a interação de *T. minasense* com seus hospedeiros (Ziccardi *et al.*, 1996; Ziccardi e Oliveira, 1999; Sato *et al.*, 2008).

A alta especificidade deste protozoário por hospedeiros primatas neotropicais, sugere um agente não zoonótico (Coimbra *et al.*, 2020), no entanto, os relatos de *Trypanosoma minasense* infectando diferentes famílias de primatas neotropicais (Deane e Damasceno, 1961) somado com a proximidade filogenética dos PNH em relação ao ser humano, podem sugerir uma possibilidade de infecção zoonótica futura. Estudos envolvendo a biologia e patogenia deste protozoário podem contribuir com a elucidação das diversas lacunas existentes atualmente na literatura e, ainda, se houver similaridade bioquímica, complementar dados a respeito de outras espécies mais patogênicas desse gênero (d'Avila-Levy *et al.*, 2004).

Neste estudo foi encontrado uma baixa ocorrência de *Trypanosoma minasense* em PNH do estado do Rio de Janeiro (3,9%), quando comparado com trabalhos anteriores e recentes, desenvolvidos com PNH da mesma região, dos quais a ocorrência deste patógeno se encontra entre 12% e 30% em animais dos gêneros *Callithrix* spp. e *Sapajus* spp, tanto de vida livre como os que estão mantidos sob cuidados humanos (Coimbra *et al.*, 2020; Guimarães *et al.*, 2022). A baixa ocorrência observada neste estudo, pode estar associada à baixa parasitemia dos indivíduos no momento da coleta, já que a grande maioria das coletas foram realizadas pela manhã e a espécie de *Trypanosoma minasense* tem uma relação da parasitemia com ciclo cicardiano, expressando diferentes níveis ao longo do dia, tendo seu pico parasitêmico as 16h e, mantendo, após isso, uma parasitemia baixa e constante (Deane *et al.* 1974; Sato *et al.* 2008).

Estudos envolvendo primatas não humanos e hemoparasitos se concentram em torno dos locais que desenvolvem este tipo de pesquisa, limitando o entendimento da epidemiologia desses agentes, mostrando-se necessário mais pesquisas em regiões pouco ou nunca estudadas, complementando o conhecimento ecológico do agente estudado e realizando o levantamento epidemiológico das diversas regiões (Guimarães *et al.*, 2022).

Além da pesquisa de agentes da família Trypanosomatidae, as amostras foram submetidas a análises moleculares para a detecção de agentes da ordem Haemosporida, família Anaplasmataceae e gêneros *Borrelia* spp. e *Babesia* spp. Não houve amplificação das amostras para esses genes testados, sugerindo pouca ou nenhuma circulação desses hemoparasitos nos locais de origem desses animais utilizados no presente estudo. No entanto, a constante mudança da ocorrência das infecções devido a migração e transporte

de vetores e patógenos, somado com mudanças climáticas e a sazonalidade, requerem monitoramentos constantes para a obtenção de dados epidemiológicos mais atualizados (Macpherson, 2005; Geiger *et al.*, 2015).

Ainda que, nas amostras analisadas por este estudo, não houve a detecção molecular dos demais hemoparasitos além de *Trypanosoma minasense*, PNH são hospedeiros e podem se infectar e albergar diversos hemoparasitos de importância para saúde pública sendo, inclusive, os hospedeiros mais vulneráveis as infecções por *Plasmodium* spp. (Coatney, 1971), agentes responsáveis por causar a malária humana, doença com ocorrência de milhões de casos e milhares de mortes ao redor do mundo a cada ano (OMS, 2018). Outro agente causador de doença zoonótica negligenciada e de grande relevância mundial, a *Leishmania* spp. (Abraão *et al.*, 2020), também é capaz de infectar PNH, tendo relatos tanto da detecção molecular como de análises sorológicas positivas desse agente nesses animais (Guiraldi, 2020; Paiz *et al.*, 2015). No município de Viçosa-MG foi descrito o primeiro *Callithrix* spp. infectado por *Ehrlichia canis* (Mafra *et al.*, 2015), e, recentemente (Candido *et al.*, 2023), no estado do Mato Grosso, um *Sapajus apella* e um *Mico melanurus* foram detectados com *Ehrlichia canis* e *Ehrlichia chaffeensis*, respectivamente. Os gêneros *Anaplasma* spp., *Babesia* spp. e *Borrelia* spp., em função do reduzido número de estudos realizando o monitoramento desses agentes em PNH, ainda não se tem relatos fundamentados descrevendo a ocorrência desses hemoparasitos nesses animais.

Com a antropização atingindo regiões de mata e promovendo a fragmentação dos biomas, tornam-se mais frequentes as interações entre animais silvestres, domésticos e o ser humano (Fuentes, 2012; Van Doreen e Rose, 2012; Lousa, 2013; Batista *et al.*, 2017). Primatas também estão cada vez mais susceptíveis a esse estreito contato com a população, sendo comum, em algumas regiões do país, estes animais serem capturados e tomados como animais de estimação (Riley, 2006; Damasceno, 2022). Com esse cenário acontecendo, realizar pesquisas envolvendo levantamento de dados epidemiológicos, monitoramento de vetores e agentes infecciosos circulantes nas diversas regiões do país, podem servir como bioindicadores de qualidade do ambiente (Farias *et al.*, 2023), principalmente para regiões de matas antropizadas, possibilitando mapear os locais de risco, proporcionar medidas preventivas e alertar a população dos cuidados profiláticos para cada caso, tendo a possibilidade de reduzir o investimento econômico para controle e tratamento das populações afetadas por surtos (Cascio, 2011).

6. CONCLUSÃO

O presente estudo relatou a detecção molecular de *Trypanosoma minasense* nas espécies *Leontopithecus chrysomelas* e *Alouatta puruensis* advindos do CPRJ, sendo a primeira detecção desse agente na espécie *Alouatta puruensis*. Mais estudos são necessários para elucidar as lacunas do ciclo biológico de *T. minasense* e avaliar o papel dos PNH na ecologia do agente.

Os demais hemoparasitos avaliados neste trabalho, dos quais não houveram ampliações do produto da PCR, podem ocorrer em outro momento. O monitoramento constante dos vetores e dos animais silvestres pode contribuir para a elaboração de um panorama mais realista sobre o cenário das hemoparasitoses ao longo do tempo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAÃO, L. S. D. O., JOSÉ, B. M. P. A., GOMES, C. B. D. S., NUNES, P. C., SANTOS, D. R. D., VARELA, A. P. A. D. S., LIMA, C. D. S. Perfil epidemiológico dos casos de leishmaniose tegumentar americana no estado do Pará, Brasil, entre 2008 e 2017. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 11, 2020.

ALVARENGA, D. A. M. Malária como zoonose na Mata Atlântica: detecção molecular da infecção por PLASMODIUM em primatas neotropicais e desenvolvimento de um diagnóstico diferencial. 2019. 124 f. Tese (**Doutorado em Ciências da Saúde**) - Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2019.

ALMEIDA, A. P. Pesquisa de *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Babesia*, *Hepatozoon* e *Leishmania* em Cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) de vida livre do Estado do Espírito Santo. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo. 2011.

ALMEIDA, M.A.B., CARDOSO, G.C.; SANTOS, E. Surveillance for yellow fever virus in non-human primates in southern Brazil, 2001-2011: A tool for prioritizing human populations for vaccination. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.8, n.3. 2014.

ALVARENGA, D. A. M. Malária como zoonose na Mata Atlântica: detecção molecular da infecção por PLASMODIUM em primatas neotropicais e desenvolvimento de um diagnóstico diferencial. 2019. 124 f. Tese (**Doutorado em Ciências da Saúde**) - Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2019.

AMIR, A., CHEONG, F. W., SILVA, J. R., LIEW, J. W. K., LAU, Y. L. Plasmodium knowlesi malaria: Current research perspectives. **Infectious Drug Resistance**, v. 11, p. 1145, 2018.

ANTONUCCI, A. M. ROSSATO, M. R., SERRA, E. G. Primeira ocorrência de nemátodas da família strogylidae e gênero *Physaloptera* sp. em primatas na cidade de Maringá, PR. **Interfaces Científicas-Saúde e Ambiente**, v. 8, n. 1, p. 61-68, 2019.

ARTIGAS, N. A. S., FISCHER, M. L. Limitações no cativeiro quanto a promoção de bem-estar em primatas na percepção do visitante do Zoológico de Curitiba. **Revista Brasileira de Educação Ambiental (RevBEA)**, v. 14, n. 1, p. 49-68, 2019.

ATALIBA, A. C. "Estudo de *Borrelia* spp. no Brasil". **Dissertação**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2006.

AZULAY R.D., ABULAFIA L., SODRE C.S., AZULAY R.A., AZULAY M.M. Lyme disease in Rio de Janeiro, Brazil. **Int. J. Dermatol**, v. 30, p. 569-571. 1991.

BARRETO, M. P. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXII. Modificações dos focos naturais da triponossomose americana e suas consequências. **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 1, n. 167, p. 74. 1967.

BATISTA, W. P., NETO, E. M. C., SPAGNOLETTI, N. Relação entre humanos e primatas (*Sapajus* sp) às margens do Rio São Francisco, nordeste, Brasil. **Ethnoscintia-Brazilian Journal of Ethnobiology and Ethnoecology**. v. 2, n. 1, 2017.

BERNARDES, L. P. Coinfecção por *Anaplasma platys* e *Ehrlichia canis* em cão diagnosticado através da Sorologia: relato de caso. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 16, n. 2, p. 1-11, 2022.

BRANDÃO, É. M. V. Interações entre canídeos silvestres, domésticos e pequenos mamíferos não-voadores na rede de transmissão de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp. em uma área do cerrado brasileiro. **Tese de Doutorado**. 2021.

BRASIL. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção 1**. ed. Brasília, DF: MMA; Belo Horizonte, MG: Fundação Biodiversitas, 2008.

BRASIL. **Tratado de Educação Ambiental para sociedades sustentáveis e responsabilidade global**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente e Ministério da Educação, 2005.

CALCHI, A. C., VULTÃO, J. G., ALVES, M. H., YOGUI, D. R., DESBIEZ, A. L. J., DE SANTI, M., ANDRÉ, M. R. *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma* spp. in *Xenarthra* mammals from Brazil, with evidence of novel 'Candidatus *Anaplasma* spp.'. **Scientific RepoRtS**, v. 10, n. 1, p. 12615, 2020.

CÂNDIDO, S. L., DE ASSIS PEREIRA, N., FONSECA, M. J. D. O. R., CAMPOS PACHECO, R., MORGADO, T. O., COLODEL, E. M., AGUIAR, D. M. Molecular detection and genetic characterization of *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia* sp. in neotropical primates from Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 14, n. 4, p. 102179, 2023.

CASCIO, A. et al. The socio-ecology of zoonotic infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n.3, p. 336-342, 2011.

CASSIA-PIRES, R., MELO, M. D. F. A. D., BARBOSA, R. D. H., ROQUE, A. L. R. Multiplex PCR as a tool for the diagnosis of *Leishmania* spp. kDNA and the gapdh housekeeping gene of mammal hosts. **PLoS One**, v. 12, n. 3, p. e0173922, 2017.

CARINI, A. Über *Trypanosoma minasense*. **Arch f Schiffs Tropenhyg**, v. 13, p. 447-448. 1909.

CAVALCANTE, K. R. L. J., TAUIL, P. L. Características epidemiológicas da febre amarela no Brasil, 2000-2012. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 11-20, 2016.

CECÍLIO, P., SILVA, A. C., OLIVEIRA, F. Sand flies: Basic information on the vectors of leishmaniasis and their interactions with *Leishmania* Parasites. **Communications biology**, v. 5, n. 1, p. 305, 2022.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 1 p. 159-208. 1909.

COATNEY, G. R. The simian malarías: zoonoses, anthroponoses, or both? **Am J Trop Med Hyg**. v. 20, n. 6, p. 795-80. 1971.

COIMBRA, D. P. Investigação de hemoparasitas de saguis do gênero *Callithrix* (Primates: Callithrichidae) de vida livre e cativeiro da Região Metropolitana do Rio de Janeiro, Brasil. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, **Dissertação**, Programa de Pós Graduação em Biologia Animal, 2020.

COLWELL, D.D.; DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Vector-borne parasitic zoonoses: Emerging scenarios and new perspectives. **Vet. Parasitol**, v.182, n.1, p. 14-21, 2011.

CORMIER, L.A. 2011. The Ten-thousand year fever: Rethinking human and wild-primate malaria. **Walnut Creek**, California, 2011.

COSTA, A. C. D., ROCHA, E. A., SILVA FILHO, J. D. D., FIDALGO, A. S. O. D. B. V., NUNES, F. M. M., VIANA, C. E. M., OLIVEIRA, M. D. F. Prevalência da Infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em Doadores de Sangue. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 115, p. 1082-1091, 2021.

DAHMANI, M., LOUDAHI, A., MEDIANNIKOV, O., FENOLLAR, F., RAOULT, D. DAVOUST, B. Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from Kabylie, Algeria. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, n. 2, p. 198-203, 2015/03/01/ 2015.

DAMASCENO, Talita Maria Macedo. Primatas não-humanos recebidos em centros de triagem no Nordeste entre 2019 e 2022. **Trabalho de Conclusão de Curso**. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2022.

D'AVILA-LEVY, C. M.; BOUCINHA, C.; KOSTYGOV, A.; SANTOS, H. L.; MORELLI, K. A.; GRYBCHUK-IEREMENKO, A.; DUVAL, L.; VOTÝPKA, J.; YURCHENKO, V.; GRELLIER, P.; LUKEŠ, J. Exploring the environmental diversity of kinetoplastid flagellates in the high-throughput DNA sequencing era. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, p. 956–965, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26602872/>> Acesso em: 20 ago. 2023.

D'AVILA-LEVY, CM, ARAÚJO, FM, VERMELHO, AB, BRANQUINHA, MH, ALVIANO, CS, SOARES, RM, dos SANTOS, AL. Differential lectin recognition of glycoproteins in choanomastigote-shaped trypanosomatids: taxonomic implications. **FEMS Microbiology Letters**, v. 231, p. 171-176. 2004.

D'AVILA-LEVY CM, BOUCINHA C, KOSTYGOV A, SANTOS HL, MORELLI KA, GRYBCHUK-IEREMENKO A, DUVAL L, VOTÝPKA J, YURCHENKO V, GRELLIER P, LUKEŠ J. Exploring the environmental diversity of kinetoplastid flagellates in the high-throughput DNA sequencing era. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v.110, n.8, p. 956-965. 2015.

DEANE, L. M., DAMASCENO, R. G. Tripanosomídeos de mamíferos da região amazônica II. Tripanosomas de macacos da Zona do Salgado, Estado do Pará. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 3, p. 61-70. 1961.

DEANE, L.M.; DA SILVA, J.E.; LOURES FILHO, L. Nycthemeral variation in the parasitaemia of *Trypanosoma minasense* in naturally infected marmosets of the genus *Callithrix* (Primates: Callithricidae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 16: 1-6. 1974.

DEANE, L. M. *Trypanosoma cruzi* and other trypanosomes in brazilian primates, p. D9. Anais do Congresso Internacional sobre Doença de Chagas, Rio de Janeiro. 1979.

DOLZ, G., ÁBREGO, L., ROMERO, L. E., CAMPOS-CALDERÓN, L., BOUZAMORA, L., & JIMÉNEZ-ROCHA, A. E. Ehrlichiosis y anaplasmosis en Costa Rica. **Acta Médica Costarricense**, v. 55, p. 34-40, 2013.

DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P.J.; DASCH, G.A.; PALMER, G.H.; STUART, C.R.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F.R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with

Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE 52 agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. [s. l.], v.51, n. 6, p. 2145-2165, 2001.

DUNN, F. L., LAMBRECHT, F. L., DU PLESSIS, R. 1963. Trypanosomes of South American monkeys and marmosets. **Am J Trop Med Hyg**, v. 12, p. 524-534. 1963.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Agroindústria, Biodiversidade, Mercado de Cultivares e Sementes, 2016. Disponível em <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/16533355/brasil-possui-20-da-biodiversidade-mundial-mas-consome-alimentos-de-outros-paises#:~:text=Brasil%20possui%2020%25%20da%20biodiversidade,de%20outros%20pa%C3%ADses%202D%20Portal%20Embrapa>> Acesso em 31 mar. 2024.

FARIAS, I. F., MOURA, L., SÁ, J. C. B. D., SOUZA, D. S., TORRES-SANTOS, P. T., OLIVEIRA, J. B., HORTA, M. C. Avaliação de infecção por *Borrelia* sp. em mamíferos domésticos, selvagens e carrapatos do Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 43, p. e07203, 2023.

FIESTAS, M. L. P. **Biosíntesis de tripanotión en *trypanosoma cruzi*: validación biológica de su potencial como blanco terapéutico contra la enfermedad de chagas**. 2014. 250f. Chagas (Dissertação de mestrado em ciências biológicas) - Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay. 2019.

FILGUEIRA A.L., TROPPE B. M., GONTIJO Filho P.P. Doença de Lyme. **Rio Dermatológico**, v. 2, n. 1. 1989.

FONSECA, A. H.; SALLES, R. S.; SALLES, S. A. N.; MADUREIRA, R. C.; YOSHINARI, N. H. Borreliose de Lyme simile: uma doença emergente e relevante para a dermatologia no Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 2, p.171-178, 2005.

FONSECA, G. A. Fisiopatologia e diagnóstico das principais hemoparasitoses causadoras de infecção em humanos. 2020.

FUENTES, G. A; HOCKINGS, K. J. The ethnoprimateological approach in primatology. **American Journal of Primatology**, v. 72, n. 10, p. 841-847, 2010.

FUENTES, A. Ethnoprimateology and the anthropology of the human-primate interface. **Annual Review of Anthropology**, v. 41, p. 101-117, 2012.

GALATI, E. A. B., RODRIGUES, B. L. A review of historical Phlebotominae taxonomy (Diptera: Psychodidae). **Neotropical Entomology**, p. 1-21, 2023.

GALATI, E.A.B. Phlebotominae (Diptera, Psychodidae): Classification, Morphology and Terminology of Adults and Identification of American Taxa. In: RANGEL EF e SHAW JJ. **Brazilian Sand Flies: Biology, Taxonomy, Medical Importance and Control**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, p. 9-212. 2018.

GARNHAM, P. C. C. Malaria parasites and other haemosporidia. Oxford: Blackwell Scientific, 1966)

GEIGER, A. et al. Adult blood-feeding tsetse flies, trypanosomes, microbiota and the fluctuating environment in sub-Saharan Africa. **Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology**, v. 9, p. 1496–1507, 2015.

- GENCHI, C. Human babesiosis, an emerging zoonosis. **Parassitologia**, v. 49, n. 1, p. 29-31. 2007.
- GOFTON, A.W.; DOGGETT, S.; RATCHFORD, A.; RYAN, U.; IRWIN, P. IRWIN. Phylogenetic characterisation of two novel Anaplasmataceae from Australian Ixodes holocyclus ticks: “*Candidatus Neoehrlichia australis*” and “*Candidatus Neoehrlichia arcana*” **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, [s. l.], v.66, p. 1-6, 2016.
- GONZALEZ, I.H.L., LABRUNA, M.B., CHAGAS, C.R.F., SALGADO, P.A.B., MONTICELLI, C., MORAIS, L.H., ANTUNE, T.C., RAMOS, P.L., MARTINS, T.F. Ticks infesting captive and free-roaming wild animal species at the São Paulo Zoo, São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, 26 (4): 496-499, 2017.
- GOUY, M., TANNIER, E., COMTE, N., PARSONS, D. P. Seaview Version 5: A Multiplatform Software for Multiple Sequence Alignment, Molecular Phylogenetic Analyses, and Tree Reconciliation. **Methods Mol Biol.** v. 2231, p. 241-260. 2021.
- GUIMARÃES, A; SANTOS, H. A.; BALTHAZAR, D. A.; KIERULFF, M. C. M.; BAPTISTA, M. N. M.; OLIVEIRA, A. F. X.; STOCCO, N. V.; MUREB, E. N.; COSTA, A. C.; RAIMUNDO, J. M.; BALDANI, C.D. Molecular detection and phylogenetic analysis of *Trypanosoma* spp. in Neotropical primates from Rio de Janeiro State, Brazil. **Pesq. Vet. Bras**, v. 42, 2022.
- GUIRALDI, L. M. Pesquisa de *Leishmania* spp. em primatas de cativeiro de cinco regiões brasileiras por diferentes técnicas de diagnóstico. (**Tese Doutorado**). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. 2020.
- HARRISON, G. F.; FOLEY, D. H.; RUEDA, L. M.; MELANSON, V. R.; WILKERSON, R. C.; LONG, L. S.; RICHARDSON, J. H.; KLEIN, T. A.; KIM, H. C.; LEE, W. J. Plasmodium-specific molecular assays produce uninterpretable results and non-*Plasmodium* spp. sequences in field-collected *Anopheles* vectors. **Am J Trop Med Hyg**, v. 89, n. 6, p. 1117-1121, dez. 2013.
- HASLE, Gunnar. Transport of ixodid ticks and tick-borne pathogens by migratory birds. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 3, p. 48, 2013.
- HOARE, CA. Morphological and taxonomic studies on Mammalian Trypanosomes. Revision of the systematics. **J. Protozool**, v.11, p.200-7. 1964.
- HOARE CA, WALLACE FG. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. **Nature**, v. 212, p.1385-1386. 1966.
- HOARE CA. The trypanosomes of mammals: a zoological monograph. **Blackwell Scientific Publications Oxford**, United Kingdom; 1972.
- HOOGSTRAAL H. Argasid and nuttalliellid ticks as parasites and vectors. **Adv. Parasitol.** v. 24, p. 135-238. 1985.
- HUBALEK Z., ANDERSON J.F., HALOUZKA J. & HAJEK V. Borreliæ in immature Ixodides ricinus (Acari: Ixodidae) ticks parasitizing birds in the Czech Republic. **J. Med. Entomol**, v. 33, n. 5, p. 766-771. 1996.
- ICMBIO – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. **Unidades de conservação**, 2023. Disponível em <Unidades nos Biomas — Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (www.gov.br)> Acesso em 26 jun. 2023.

IUCN - *International Union for Conservation of Nature*. **Primate Specialist Group**, 2023. Disponível em <http://www.primate-sg.org/primata_diversity_by_region/> Acesso em 6 de abril de 2024.

JEFFERIES, R.; RYAN, U. M.; & IRWIN, P. J. PCR-RFLP for the detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies. **Veterinary parasitology**, v. 144, n. 1-2, p. 20–27, 2007.

JONES, K. E. et al. Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, v. 451, 2008.

KASSAB, S., DANKAR, E., PEREIRA, J., FERREIRA, L. A., MONTOZO, M. F. Borreliose canina. **Encicloédia Bioesfera**, v. 17 n. 32, p. 160–178. 2020.

KATOH, K., STANDLEY, D. M., MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 4, p. 772-780, abril de 2013.

KAUFER, A. et al. The evolution of trypanosomatid taxonomy. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 287, p. 1-17, 2017.

KOSTYGOV, A. Y., FROLOV, A. O., MALYSHEVA, M. N., GANYUKOVA, A. I., CHISTYAKOVA, L. V., TASHYREVA, D., YURCHENKO, V. *Vickermania* gen. nov., trypanosomatids that use two joined flagella to resist midgut peristaltic flow within the fly host. **BMC biology**, v. 18, n. 1, p. 1-16, 2020.

KUGELER, K. J., SCHWARTZ, A. M., DELOREY, M. J., MEAD, P. S., HINCKLEY, A. F. Estimating the frequency of Lyme disease diagnoses, United States, 2010– 2018. **Emerging Infectious Diseases**, v. 27, n. 2, p. 616, 2021.

LEWINSOHN, T. M., PRADO P. I. **Biodiversidade brasileira: síntese do estado atual do conhecimento**. Contexto. São Paulo, 2002.

LISBOA, C.V., DIETZ, J., BAKER, A. J., RUSSEL, N. N., JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi* infection in *Leontopithecus rosalia* at Reserva Biológica de Poço das Antas, Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 95, p. 445- 452. 2000.

LOM, J. Biology of the trypanosomes and trypanoplasms of fish. In WHR Lumsden, DA Evans (eds), *Biology of the Kinetoplastida*, **Academic Press**, London/NewYork/San Francisco, p. 269-337. 1976.

LOPES, A. H., SOUTO-PADRON, T., DIAS, F. A., GOMES, M. T., RODRIGUES, G. C., ZIMMERMANN, L. T., ALVES, SILVA, T. L., VERMELHO, A. B. X. Trypanosomatids: odd organisms, devastating diseases. **Open Parasitol. J.**, v. 4, p. 30– 59. 2010.

LOUSA, T. C. Influências dos alimentos antrópicos no comportamento e ecologia de macacos-prego. **Dissertação** (Programa de Pós-Graduação em Ciências do Comportamento). Universidade de Brasília, Departamento de Processos Psicológicos Básicos, Instituto de Psicologia, Brasília, 2013.

LUKEŠ, J., SKALICKÝ, T., TYC, J.; VOTÝPKA, J., YURCHENKO, V. Evolução do parasitismo em flagelados cinetoplastídeos. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 195, p. 115-122, 2014.

MACPHERSON, C. N. L. Human behaviour and the epidemiology of parasitic zoonoses. **International journal for parasitology**, v. 35, n. 11-12, p. 1319-1331, 2005.

MAFRA, C., BARCELOS, R. M., MANTOVANI, C., CARRIZO, J., SOARES, A. C., MOREIRA, H. N. S. A., SILVA, I. D. O. Occurrence of *Ehrlichia canis* in free-living primates of the genus *Callithrix*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, p. 78-81, 2015.

MAGALHAES, R. B. Pesquisa de agentes da família Anaplasmataceae em carrapatos de animais silvestres do estado de Mato Grosso. **Dissertação** (Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal). Universidade de Cuiabá. 2020.

MAGNARELLI L.A., DUMLER J.S., ANDERSON J.F., JOHNSON R.C. & FIKRIG E. Coexistence of antibodies to tick-borne pathogens of babesiosis, ehrlichiosis, and Lyme borreliosis in human sera. **J. Clin.Microbiol**, v. 33, n. 11, p. 3054-3057. 1995.

MARTINSEN, E., PAPERNA, I., SCHALL, J. Morphological versus molecular identification of avian Haemosporidia: An exploration of three species concepts. **Parasitology**, v. 133, n. 3, p. 279-288. 2006.

MARQUES, A. R., STRLE, F., WORMSER, G. P. Comparison of Lyme disease in the United States and Europe. **Emerging infectious diseases**, v. 27, n. 8, p. 2017, 2021.

MARTINSEN, L. S., PERKINS, S. L., SCHALL, J. J. A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): Evolution of life-history traits and host switches. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 47, n. 1, p. 261-273, 2008.

MASLOV, D. A., VOTÝPKA, J., YURCHENKO, V., LUKEŠ, J. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed. **Trends Parasitology**, v. 29, n. 1, p. 43-52, 2013.

MATHER, T. N.; FISH, D.; COUGHLIN, R. T. Competence of dogs as reservoirs for Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*). **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 205, n. 2, p. 186-188, 1994

MATTON P. & MELCKEBEKE H.V. Bovine borreliosis: comparasion on simple methods for detection of the spirochaete in the blood. **Trop. Anim. Hlth Prod.** v. 22, p. 147-152. 1990.

MAZZOTTI, G. A., SILVA, W. A., CARNEIRO, F. T., SCALON, M. C., LIMA, M. A., TEIXEIRA, M. A., PALUDO, G. R. Investigação molecular de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum* e *Rickettsia* spp. em felídeos selvagens cativos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 528-535, 2018.

MENDES, F. L. S. Comercialização ilegal de carne de animais silvestres em feiras livres de algumas cidades do Estado do Amazonas (Brasil). **Revista colombiana de ciencia animal recia**, v. 12, n. 2, p. 22-32, 2020.

MENDONÇA, C. L., MUNDIM, A. V., COSTA, M. M. Ehrlichiose canina: epidemiologia, clínica e controle. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 2, p. 213-220. 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR), 2023. Malária: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção. Disponível em: <<https://saude.gov.br/saude-de-a-z/malaria>> . Acesso em: 06 de set. de 2023

MMA - Ministério do meio Ambiente; Fragmentação de Ecossistemas: **Causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas** / Denise Marçal

- Rambaldi, Daniela América Suárez de Oliveira (orgs.) Brasília: MMA/SBF, 510 p. 2003.
- MONTENEGRO, M. M. V. 2011. Ecologia de *Cebus flavius* (Schreber, 1774) em remanescentes de Mata Atlântica no estado da Paraíba, 131 f. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, 2011.
- MOREIRA, D.; LÓPEZ, P. G.; VICKERMAN, K. Um visão atualizada da filogenia dos cinetoplastídeos usando sequências ambientais e um grupo externo mais próximo: proposta para uma nova classificação da classe Kinetoplastea. **Internacional J. Sist. E vol. Microbiol.**, v. 54, p. 1861–1875. 2004.
- MUNIZ, J. A. C. P., LEAL, L. C. P., BAHIA, C. P., & KREJCOVÁ, L. V. *Sapajus apella* as a model for the development of novel therapeutic approaches for Parkinson's disease. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 12, n. esp, p. 11-11, 2021.
- NAKAYIMA, Jesca et al. Detection and characterization of zoonotic pathogens of free-ranging non-human primates from Zambia. **Parasites & vectors**, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2014.
- NASCIMENTO, D.A.G. Prevalência de anticorpos anti-borrelia spp. Em humanos, cães e equinos de assentamento rural da região norte do Paraná. **Curso de Pós Graduação em Ciência Animal**, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Londrina, PR, 35p, 2012.
- NASCIMENTO, K.K.G, VERÍSSIMO, S.M.M., RAIA, V.A., GUIMARÃES R.C.S., SEADE G.C.C., AZEVEDO A.C.P, MATOS S.P., OLIVEIRA J.M, BEZERRA, I.A, MARTINS, T.F. Tick fauna of wild animals received and attended at the Santarém Zoological Park, western Pará State, Brazil. **Ciencia Rural**, 47 (10), 2017.
- NASERRUDIN, N. A., HOD, R., JEFFREE, M. S., AHMED, K., HASSAN, M. R. The emerging threat of *Plasmodium knowlesi* malaria infection: a concept paper on the vulnerable factors in human. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 7, p. 4419, 2022.
- NOGUEIRA, P. P. O. Identificação de Uakari-careca (*Cacajao calvus* ssp.) e levantamento de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* de espécimes em semiliberdade, Iquitos, Peru. **Dissertação de Mestrado**. 2023.
- NORTE, A. C. et al. Birds as reservoirs for *Borrelia burgdorferi* sl in Western Europe: circulation of *B. turdi* and other genospecies in bird–tick cycles in Portugal. **Environmental microbiology**, v. 15, n. 2, p. 386-397, 2013.
- OLLOMO, B et al. A New Malaria Agent in African Hominids. **PLoS Pathogens**, Vol. 5, may, 2009.
- OSLEN B., DUFFY D.C., JAENSON T.G.T., GYLFE A., BONNEDAHL J. & BERGSTROM S. Transhemispheric exchange of Lyme disease spirochetes by seabirds. **J. Clin. Microbiol**, v. 33, n. 12, p. 3270-3274. 1995.
- PAGLIA, Adriano P. et al. Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil 2ª Edição/Annotated Checklist of Brazilian Mammals. **Occasional papers in conservation biology**, v. 6, n. 6, 2012.
- PAIZ LM, FORNAZARI F, MENOZZI BD, OLIVEIRA GC, COIRO CJ, TEIXEIRA CR, DA SILVA VMC, DONALISIO MR, LANGONI H. Serological evidence of

infection by *Leishmania* (*Leishmania infantum*) (Synonym: *Leishmania* (*Leishmania chagasi*) in free-ranging 201 wild mammals in a nonendemic region of the state of São Paulo, Brazil. *Vector-Borne-Zoonot.* v. 15, n. 11, p. 667-673. 2015.

Pan-American Health Organization (PAHO, 2019). Manual de procedimentos para a vigilância y control de las Leishmaniasis em las Américas. Acesso em: 30 de agosto de 2023. Disponível em: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50524/9789275320631_spa.pdf.

PEREIRA, P. M. Caracterização e dinâmica espacial da caça de primatas em comunidades ribeirinhas da Amazônia Central. 2015.

PERKINS, S.L., SCHAER, J., 2016. A Modern Menagerie of Mammalian Malaria. **Trends in Parasitology.** v. 32, n. 10, p. 772–782. 2016.

PIETROBELLI, M.; CANCRINI, G.; MORETTI, A.; TAMPIERI, M.P. Animal babesiosis: an emerging zoonosis also in Italy? **Parassitologia,** v. 49, n. 1, p. 33-38. 2007.

PINTO, C. S., ALVES, V. R., SANTOS, W. S., GARCEZ, L. M. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) vetores de *Leishmania* spp., em área endêmica para a leishmaniose tegumentar no nordeste do Pará, Brasil. **Revista Eletrônica Acervo Saúde,** v. 15, n. 10, p. e11038-e11038, 2022.

PODLIPAEV, S. A. Catalogue of world fauna trypanosomatidae (Protozoa). **Proceedings of the zoological Institute of the Russian Academy of Sciences.** Leningrad. v. 217, p 1-177. 1990.

PORCEL, B. M. et al. The streamlined genome of *Phytomonas* spp. relative to human pathogenic kinetoplastids reveals a parasite tailored for plants. **Plos Genetics,** v. 10, n. 2, p. e1004007, 2014. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1004007>. Acesso em 20 ago. 2023.

PRATT-RICCIO, L. R., PRATT RICCIO, E. K., BIANCO JUNIOR, C., ALVES, F. A., BAPTISTA, B. D. O., TOTINO, P. R. R., DANIEL-RIBEIRO, C. T. Uso de Modelos de Primatas Neotropicais Para Pesquisa Em Malária: Um Histórico Dos 25 Anos de Colaboração Entre o Laboratório de Pesquisa Em Malária (IOC, Fiocruz) e o Centro Nacional de Primatas (IEC, SVS). **Rev. Panamazonica Saúde.** 2021.

QUINN P.J.; CARTER, M.E., MARKEY, B.K. & CARTER G.R. Clinical Veterinary Microbiology. First Edition. **Wolfe Publishing,** London, p.292-303. 1994.

BARBOUR A.G., HAYES S.F. Biology of *Borrelia* species. **Microbiol. Rev.** v. 50, p. 4, p. 381- 400. 1986.

RESENDE, D.M., PEREIRA, L. H., LÔBO, A. Long-term patency of blood parasitism by *Trypanosoma minasense* and *Microfilariae* in *Callithrix penicillata* marmosets (Primates, Callitrichidae), caught in wild and maintained in captivity. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** v. 89, p. 127-128, 1994.

RIBEIRO, C. R.; GONÇALVES, C. A.; CRUZ, L. M.; GALERA, P. D. Prevalência da leishmaniose visceral canina e coinfeções em região periurbana no Distrito Federal–Brasil. **Ciência animal brasileira,** v. 20, 2019.

RILEY, E. P. Ethnoprimateology: toward reconciliation of biology and cultural anthropology. **Ecological and Environmental Anthropology,** v. 2, n. 2, p. 75-86, 2006.

- RODRIGUES, C. F. M., RODRIGUES, V. S., NERES, J. C. I., GUIMARÃES, A. P. M., NERES, L. L. F. G., CARVALHO, A. V. Desafios da saúde pública no Brasil: relação entre zoonoses e saneamento. **Scire Salutis**, v. 7, n. 1, p. 27-37, 2017.
- RODRIGUES, G. M., QUEIROZ, E. P., ALEXANDRE, K. V., RABELO, L. M. Agravos causados pela Doença de Chagas no ser humano: Revisão sobre as características do *Trypanosoma cruzi*. **Revista Liberum Accessum**, v. 1, n. 2, p. 1-14, 2020.
- SÁNCHEZ, R. S. T., SANTODOMINGO, A. M. S., MUÑOZ-LEAL, S., SILVA-DE LA FUENTE, M. C., LLANOS-SOTO, S., SALAS, L. M., & GONZÁLEZ-ACUÑA, D. Rodents as potential reservoirs for *Borrelia* spp. in northern Chile. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, 2020.
- SANTIAGO M.E., VASCONCELOS R.O., FATTORI K.R., MUNARI D.P., ADE F.M., LIMA V.M. An investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis* spp. from urban and peri-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil). **Vet Parasitol.** v.150, n. 238, p. 90. 2007.
- SANTOS, C. A. DOS, SUZIN, A., VOGLIOTTI, A., NUNES, P. H., BARBIERI, A.R. M., LABRUNA, M. B., SZABÓB, M.P.J, YOKOSAWA, J. Molecular Detection of a *Borrelia* sp. in Nymphs of *Amblyomma brasiliense* Ticks (Acari: Ixodidae) from Iguazu National Park, Brazil, Genetically Related to *Borrelia* from Ethiopia and Côte D'Ivoire. **Ticks and Tick-borne Diseases**. 2020.
- SANTOS, K. B., MARTINS, M. B., CARVALHO, A. V. Levantamento dos casos de Leishmaniose Visceral (calazar) em cães e humanos no município de Guaraí, Tocantins entre 2015-2020. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 16, p. e311101624204-e311101624204, 2021.
- SANTOS, A. V. P. D. Detecção molecular de Bartonella spp., Mycoplasma spp. e Borrelia spp. em *Leontopithecus chrysomelas* (Kuhl, 1820) de vida livre e alterações hematológicas associadas a infecção. 71 f. Tese (**Doutorado em Clínica e Reprodução Animal**), Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2018.
- SARRI, C., STAMATIS, C., SARAFIDOU, T., GALARA, I., GODOSOPOULOS, V., KOLOVOS, M., LIAKOU, C., TASTSOGLU, S., & MAMURIS, Z. A new set of 16S rRNA universal primers for identification of animal species. **Food Control**, v. 43, p. 35-41, 2014.
- SATO, H., LEO, N., KATAKAI, Y., TAKANO, J. I., AKARI, H., NAKAMURA, S. I., & UNE, Y. Prevalence and molecular phylogenetic characterization of *Trypanosoma* (Megatrypanum) *minasense* in the peripheral blood of small neotropical primates after a quarantine period. **Journal of Parasitology**, v. 94, n. 5, p. 1128-1138, 2008.
- SILVA, L. F., BATAZZA, A., SOUZA, N. F., SOUZA, N. F. D., ROCHA, N. S. Impactos das ações antrópicas aos Biomas do Brasil: Artigo de revisão. **Meio Ambiente (Brasil)**, v. 4, n. 1, 2022.
- SMITH, R.D. et al. Development of *Ehrlichia canis*, Causative Agent of Canine Ehrlichiosis, in the Tick *Rhipicephalus sanguineus* and Its Differentiation from a Symbiotic Rickettsia. **American Journal of Veterinary Research**, v.37, n.02, p.119-126, 1976.

- SMITH, A.; CLARK, P.; AVERIS, S.; LYMBERY, A.J.; WAYNE, A.F.; MORRIS, K.D.; THOMPSON, R.C. Trypanosomes in a declining species of threatened Australian marsupial, the brush-tailed bettong *Bettongia penicillata* (Marsupialia: Potoroidae). **Parasitology**, v. 135, p. 1329, 2008.
- SOARES, C. O., ISHIKAWA, M. M., FONSECA, A. H., & YOSHINARI, N.H. Borrelioses, agentes e vetores. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n 1, p. 01– 19. 2000.
- SOUZA, T. S, COELHO, E. G. A., OLIVEIRA, T. R. S., SILVA, J. C., BARROS, P. B. F. Ocorrência de febre amarela no Brasil: uma revisão integrativa da literatura (2014-2018). **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, n. 28, p. e896-e896, 2019.
- SOUZA, C. P., ALVES, V. R., SANTOS, W. S., GARCEZ, L. M. PINTO, S. C. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) vetores de *Leishmania* spp., em área endêmica para a leishmaniose tegumentar no nordeste do Pará, Brasil. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 15, n. 10, p. e11038-e11038, 2022.
- STEVENS, J., GIBSON, W. The evolution of salivarian trypanosomes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 94, 2, 225-228, 1999.
- STOCCO, N. V. Estudo hematológico e molecular da infecção por hemosporídeos e agentes da família anaplasmataceae em arara-canindé (*Ara ararauna*) e papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) Mantidos no Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS-RJ). 67 páginas (**Dissertação**). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2021.
- STROMDAHL, E. WILLIAMSON, P.C., KOLLARS, T.M., EVANS, S.R., BARRY, R., VINCE, M.A., DOBBS, N. Evidence of *Borrelia lonestari* DNA in *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) removed from humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 12, p. 5557-5562, 2003.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022-3027, julho de 2021.
- TALHARI S., TALHARI A.C., FERREIRA L.C.L. Eritema chronicum migrans, eritema migratório, doença de Lyme ou borreliose de Lyme. **Anais Bras. Dermatol**, v. 67, p. 205-209. 1992.
- TAYLOR, L. H., LATHAM, S. M., WOOLHOUSE, M. E. J. Risk factors for human disease emergence. **Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Sciences**, v. 356, n. 1411, p. 983-989, 2001.
- TELFORD III S.R.; GORENFLOT, A.; BRASSEUR, P.; SPIELMAN, A. Babesial infections in humans and wildlife. In: Creier JP (Ed), **Parasitic Protozoa**, Vol 5. Academic Press, San Diego, CA, pág. 1-47. 1993.
- VALKIŪNAS, G. 2005. **Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia**. CRC Press, Boca Raton, FL. 946p.
- VAN DOOREN, T., ROSE, D. B. Storied-places in a multispecies city. **Humanimalia**, v. 3, n. 2, p. 1-27, 2012.
- VICKERMAN, K. The diversity of the kinetoplastid flagellates. In: Lumsden, WHR. & Evans, D. A. (ed.), *Biology of the Kinetoplastida*. Academic Press, London. p.1–34. 1976.

VIEIRA, A. C., DUARTE, A. M. R. C. Malária símia: detecção de plasmodium em fezes de primatas não humanos. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Especialização em Vigilância e Controle de Vetores e Hospedeiros Intermediários) - Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP; SUCEN. p. 41-41. 2021.

VIRGILIO, L., TEIXEIRA, G., ALMEIDA, L., MELO, H., PROLO, S., MENEGUETTI, D., TAKEMOTO, R. Trypanosomatids of four Loricariidae fish species in western Amazon rivers. **Conjecturas**, v. 21, n. 1, p. 30-43, 2021.

VOTÝPKA, J., SUKOVÁ, E., KRAEVA, N., ISHEMGULOVA, A., DUŽÍ, I., LUKEŠ, J., YURCHENKO, V. Diversity of trypanosomatids (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) parasitizing fleas (Insecta: Siphonaptera) and description of a new genus *Blechomonas* gen. n. **Protist**, v. 164, n. 6, p. 763-81, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24113136/>> Acesso em 20 ago. 2023.

WALKER, D.H.; DUMLER, J.S. Emergence of the ehrlichioses as human health problems. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.2, p.18-29, 1996.

WATERHOUSE, A. M.; PROCTER, J. B.; MARTIN, D. M. A.; CLAMP, M.; BARTON, G. J. Jalview Version 2 - a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1189-1191, 2009.

WEL, V.A.; KOCKEN, C.H.; ZEEMAN, A.M.; THOMAS, A.W. Detection of new *Babesia* microti-like parasites in a rhesus monkey (*Macaca mulatta*) with a suppressed *Plasmodium cynomolgi* infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, p. 643-645. 2008.

World Health Organization (WHO, 2018). Leishmaniasis. Acesso em: 30 de agosto de 2023. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>

World Health Organization (WHO, 2019). World malaria report. Geneva: World Health Organization; 2019. Acesso em: 9 de setembro de 2023. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/world-malaria-report-2019>.


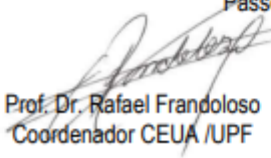
ZICCARDI, M., LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R., NOGUEIRA, R. A hemocultura de *Trypanosoma minasense* Chagas, 1908. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 4, p. 501-505. 1996.

ZICCARDI, M.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Polymorphism in trypomastigotes of *Trypanosoma* (Megatrypanum) *minasense* in the blood of experimentally infected squirrel monkey and marmosets. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 649-653, 1999.

ZICCARDI, M., LOURENÇO, R. O., LAINSON, R., BRÍGIDO, M. C. O., MUNIZ J. A. P. C. Trypanosomes of non-human primates from the National Centre of Primates, Ananindeua, State of Pará, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 95, p. 157-9. 2000.

ANEXO I

- Protocolo de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), para execução do trabalho.

	UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO VICE-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA
CERTIFICADO	
<p>Certificamos que a proposta intitulada “Caracterização genética, fatores de risco e epidemiologia de Toxoplasma gondii e Neospora caninum em primatas neotropicais: Pesquisa multidisciplinar no CPRJ , RJ, Brasil”, registrada com o nº 006/2022 sob a responsabilidade de Maria Isabel Botelho Vieira e que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos) para fins de Pesquisa, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO (CEUA-UPF).</p>	
<i>Finalidade:</i> Pesquisa	
<i>Espécie/linhagem/raça:</i> Primatas neotropicais	
<i>Peso/idade:</i> -- <i>Nº de animais:</i> 400	
<i>Sexo:</i> Machos e Fêmeas	
<i>Origem:</i> Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ).	
<hr/>	
<p>Resumo do procedimento: Avaliação dos animais: Iniciará a anamnese direcionada à queixa principal (objetivo da consulta) e perguntas complementares acerca dos fatores de risco analisadas neste trabalho. Será realizado um questionário com informações sobre idade, raça, sexo, número de animais da moradia, tipo de alimentação, ingestão de água, local de defecação, presença de roedores, acesso a rua, local de defecação e presença de animais contactantes com ratos ou outros animais, sobre o estilo de vida do animal, local que vive, entre outras perguntas, para que seja preenchido a ficha de Questionário de Avaliação Clínica. Haverá uma ficha para cada animal do estudo. Para cada animal utilizado no estudo terá uma ficha correspondente com dados de identificação, informações relevantes da anamnese e exame físico, além de espaço para anotação de resultados da sorologia e diagnóstico molecular. Metodologia de Captura e Contenção Química: Os animais serão capturados em seus recintos com puçã feito de cordão de algodão trançado, identificados por meio da leitura de microchip individual e em seguida contidos quimicamente com injeção intramuscular de cloridrato de cetamina 10 % na dose 10-20 mg/kg associado a Midazolam na dose 1 mg/kg conforme Carpenter (2017). Após a contenção química, os animais têm o seu peso registrado, é aferida a temperatura retal, realizada ausculta pulmonar e cardíaca, registro de frequência cardíaca e respiratória e realizado exame físico geral em busca de anormalidades, sendo avaliados com atenção: pele e pelagem; cavidade oral, mucosas e dentição; orifícios nasal, auricular, urogenital e anal; olhos; abdome e sistema musculoesquelético por palpação. Uma vez que não forem detectadas anormalidades o sangue será coletado do plexo arteriovenoso femoral em volume não superior a 1% do peso corporal do animal (em gramas) e depositado em tubos de coleta sem anticoagulante, que serão centrifugados para obtenção do soro. Os animais serão acompanhados em todos os procedimentos por médico veterinário durante e serão devolvidos ao seu viveiro e grupo após plena recuperação anestésica. A coleta de sangue é um procedimento de total responsabilidade do médico veterinário responsável pela colônia.</p>	
Passo Fundo, 14 de fevereiro de 2022.	
 Prof. Dr. Rafael Frandoso Coordenador CEUA /UPF	

ANEXO II

- Protocolo de aprovação do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) por meio do Sistema de Autorização e informação em Biodiversidade (Sisbio)



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 82109-1	Data da Emissão: 15/06/2023 11:44:48	Data da Revalidação*: 15/06/2024
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: Natalie Renata Zorzi	CPF: 023.380.600-83
Título do Projeto: Levantamento epidemiológico de doenças infecciosas e parasitárias em primatas do Estado do Rio de Janeiro	
Nome da Instituição: Fundação Universidade de Passo Fundo	CNPJ: 92.034.321/0001-25

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Defesa Tese Doutorado	06/2024	06/2024
2	Avaliação dos resultados	11/2023	12/2023
3	Análises laboratoriais	08/2023	11/2023
4	Encaminhamento do material para laboratório	08/2023	08/2023
5	Coleta de material biológico	06/2023	06/2023

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Maria Isabel Botelho Vieira	Orientadora de Doutorado	404.123.000-44	Brasileira
2	Sílvia Bahadian Moreira	Médica Veterinária	081.794.907-00	Brasileira
3	ERALDO LOURENÇO ZANELLA	Pesquisador	427.644.240-00	Brasileira
4	ALCIDES PISSINATTI	Chefe do CPRJ	208.501.317-15	Brasileira
5	ANDRESSA FERREIRA DA SILVA SPYRIDES	Co-orientadora e Pesquisadora	002.118.370-83	Brasileira
6	MARCIO MACHADO COSTA	Pesquisador	003.425.890-67	Brasileira
7	DANIEL GUIMARAES UBIALI	Pesquisador	329.592.088-54	Brasileira
8	Daniel de Almeida Balthazar	Pesquisador	072.247.147-55	Brasileira
9	OLIVIA ZEN GIANFRANCISCO	Médica Veterinária - coleta de sangue	423.668.618-00	Brasileira

Observações e ressalvas

1	Deve-se observar as as recomendações de prevenção contra a COVID-19 das autoridades sanitárias locais e das Unidades de Conservação a serem acessadas.
2	Esta autorização NÃO libera o uso da substância com potencial agrotóxico e/ou inseticida e NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de atender às exigências e obter as autorizações previstas em outros instrumentos legais relativos ao registro de agrotóxicos (Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, entre outros).
3	Esta autorização NÃO libera o uso da substância com potencial agrotóxico e/ou inseticida e NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de atender às exigências e obter as autorizações previstas em outros instrumentos legais relativos ao registro de agrotóxicos (Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, entre outros).
4	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.
5	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº Portaria ICMBio nº 748/2022. 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: 0821090120230615

Página 1/4

ANEXO III

- Sequências do gene 18S rRNA para identificação da família Trypanosomatidae, obtidos a partir das amostras de sangue de primatas não humanos, que ainda não foram depositadas no Genebank.

TrypanosomaSP.CPRJ133

TCTGAGACTGTAACCTCAAAGCTTTCGCGTGAAGAAGTCAGATAACGTGCT
GAGGATATTCCCGTTAAAGGCCCCCTTGCGAGGACCGTAAAGAATATGCAC
GTAAATTGATATCCATTGGCGAGACGAGGAGCGAGATGAACCCGACCCCGC
CTACGACCAAAAACCTCCCCAATTCATGGGTGTCATCGTTTGCAGTGTGGACT
ACAATGGTCTCTAATCATCTTCGATCCCCACACTTTGGTTCTTGATTGAGGA
AGGTATCCTTGAAGAATGCCTTCGCTGTAGTTCGTCTTGGTGCGGTCTAAGA
ATTCACCTCTGACGCACCAGTACGTTCTCCCCGAACTACCCTCCTTCATTC
CTGGAAGCCGCGAGTTGAGGGAAGACGCCAAGCTAACGAACCGAAGCACG
CAGCAAGGACGCGGATTTCCACAAAGGCGACGGATGCAACCCGAAGGAA
GACACCCAGTCACTTGTCGCACAGCCCCATAATCTCCAATGGACTTTTAAAA
CCAACAAAAGCCGAAACGGTGGCCCATAGGCTGCTCCTTTGTTATCCCAA

TrypanosomaSP.CPRJ147

AACCTCAAAGCTTTCGCGTGAAGAAGTCAGATAACGTGCTGAGGATATTCC
CGTTAAAGGCCCCCTTGCGAGGACCGTAAAGAATATGCACGTAAATTGATA
TCCATTGGCGAGACGAGGAGCGAGATGAACCCGACCCCGCCTACGACCAAA
AACTCCCCAATTCATGGGTGTCATCGTTTGCAGTGTGGACTACAATGGTCTC
TAATCATCTTCGATCCCCACACTTTGGTTCTTGATTGAGGAAGGTATCCTTG
AAGAATGCCTTCGCTGTAGTTCGTCTTGGTGCGGTCTAAGAATTTACCTCT
GACGCACCAGTACGTTCTCCCCGAACTACCCTCCTTCATTCTGGAAGCCG
CGAGTTGAGGGAAGACGCCAAGCTAACGAACCGAAGCACGCAGCAAGGAC
GCGGATTTCCACAAAGGCGACGGATGCAACCCGAAGGAAGACACCCAGTC
ACTTGTCGCACAGCCCCATAATCTCCAATGGACTTTTAAAACCAACAAAAG
CCGAAACGGTGGCCCATAGGCTGCTCCTTTGTTATCCCA

TrypanosomaSP.CPRJ150

CCTCAAAGCTTTCGCGTGAAGAAGTCAGATAACGTGCTGAGGATATTCCCG
TTAAAGGCCCCCTTGCGAGGACCGTAAAGAATATGCACGTAAATTGATATC
CATTGGCGAGACGAGGAGCGAGATGAACCCGACCCCGCCTACGACCAAAA
ACTCCCCAATTCATGGGTGTCATCGTTTGCAGTGTGGACTACAATGGTCTCT
AATCATCTTCGATCCCCACACTTTGGTTCTTGATTGAGGAAGGTATCCTTGA
AGAATGCCTTCGCTGTAGTTCGTCTTGGTGCGGTCTAAGAATTTACCTCTG
ACGCACCAGTACGTTCTCCCCGAACTACCCTCCTTCATTCTGGAAGCCGC
GAGTTGAGGGAAGACGCCAAGCTAACGAACCGAAGCACGCAGCAAGGACG
CGGATTTCCACAAAGGCGACGGATGCAACCCGAAGGAAGACACCCAGTCA
CTTGTCGCACAGCCCCATAATCTCCAATGGACTTTTAAAACCAACAAAAGCC
GAAACGGTGGCCCATAGGCTGCTCCTTTGTTATCCCA

TrypanosomaSP.CPRJ156

GGAACCTCAAAGCTTTCGCGTGAAGAAGTCAGATAACGTGCTGAGGATATT
CCCGTTAAAGGCCCCCTTGCAGGACCGTAAAGAATATGCACGTAAATTGA
TATCCATTGGCGAGACGAGGAGCGAGATGAACCCGACCCCGCCTACGACCA
AAAACCTCCCAATTCATGGGTGTCATCGTTTGCAGTGTGGACTACAATGGTC
TCTAATCATCTTCGATCCCCACACTTTGGTTCTTGATTGAGGAAGGTATCCTT
GAAGAATGCCTTCGCTGTAGTTCGTCTTGGTGCGGTCTAAGAATTTACCTC
TGACGCACCAGTACGTTCTCCCCGAACCTACCCTCCTTCATTCTGGAAGCC
GCGAGTTGAGGGAAGACGCCAAGCTAACGAACCGAAGCACGCAGCAAGGA
CGCGGATTTCCACAAAGGCGACGGATGCAACCCGAAGGAAGACACCCAGT
CACTTGTGCGACAGCCCCATAATCTCCAATGGACTTTTAAAACCAACAAA
GCCGAAACGGTGGCCCATAGGCTGCTCCTTTGTTATCCCAA

TrypanosomaSP.CPRJ160

TTTGTTGGTTTTaAAAGTCCATTGGAGATTATGGGGCTGTGCGACAAGTGAC
TGGGTGTCTTCCTTCGGGTTGCATCCGTCGCCTTTGTGGGAAATCCGCGTCC
TTGCTGCGTGCTTCGGTTCGTTAGCTTGGCGTCTTCCCTCAACTCGCGGCTTC
CAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCGGGGGAGAACGTACTGGTGCGTGAGAGG
TGAAATTCTTAGACCGCACCAAGACGAACTACAGCGAAGGCATTCTTCAAG
GATACCTTCCTCAATCAAGAACCAAAGTGTGGGGATCGAAGATGATTAGAG
ACCATTGTAGTCCACACTGCAAACGATGACACCCATGAATTGGGGAGTTTTT
GGTCGTAGGCGGGGTCGGGTTTCATCTCGCTCCTCGTCTCGCCAATGGATATC
AATTTACGTGCATATTCTTTACGGTCTTCGCAAGGGGGCCTTTAACGGGAAT
ATCCTCAGCACGTTATCTGACTTCTTCACGCGAAAGCTTTGAGGTTAC

TrypanosomaSP.CPRJ162

TTTCCACTTCCTTGCGGAACGTACTTCCATTTTGGGGCTTCTCAAAGCTTTC
GCGTGAAGAAGTCAGATAACGTGCTGAGGATATTCCCGTTAAAGGCCCCCT
TGCGAGGACCGTAAAGAATATGCACGTAAATTGATATCCATTGGCGAGACG
AGGAGCGAGATGAACCCGACCCCGCCTACGACCAAAAACCTCCCAATTCAT
GGGTGTCATCGTTTGCAGTGTGGACTACAATGGTCTCTAATCATCTTCGATC
CCCACACTTTGGTTCTTGATTGAGGAAGGTATCCTTGAAGAATGCCTTCGCT
GTAGTTCGTCTTGGTGCGGTCTAAGAATTTACCTCTGACGCACCAGTACGT
TCTCCCCCGAACTACCCTCCTTCATTCTGGAAGCCGCGAGTTGAGGGAAGA
CGCCAAGCTAACGAACCGAAGCACGCAGCAAGGACGCGGATTTCCACAA
AGGCGACGGATGCAACCCGAAGGAAGACACCCAGTCACTTGTGCGACAGCC
CCATAATCTCCAATGGACTTTTAAAACCAACAAAAGCCGAAACGGTGGCCC
ATAGGCTGCTCCTT

TrypanosomaSP.CPRJ180

CTGAGACTGTAACCTCAAAGCTTTCGCGTGAAGAAGTCAGATAACGTGCTG
AGGATATTCCCGTTAAAGGCCCCCTTGCAGGACCGTAAAGAATATGCACG
TAAATTGATATCCATTGGCGAGACGAGGAGCGAGATGAACCCGACCCCGCC
TACGACCAAAAACCTCCCAATTCATGGGTGTCATCGTTTGCAGTGTGGACTA
CAATGGTCTCTAATCATCTTCGATCCCCACACTTTGGTTCTTGATTGAGGAA
GGTATCCTTGAAGAATGCCTTCGCTGTAGTTCGTCTTGGTGCGGTCTAAGAA
TTTCACCTCTGACGCACCAGTACGTTCTCCCCCGAACTACCCTCCTTCATTCC

TGGAAGCCGCGAGTTGAGGGAAGACGCCAAGCTAACGAACCGAAGCACGC
AGCAAGGACGCGGATTTCCCACAAAGGCGACGGATGCAACCCGAAGGAAG
ACACCCAGTCACTTGTCGCACAGCCCCATAATCTCCAATGGACTTTTAAAC
CAACAAAAGCCGAAACGGTGGCCCATAGGCTGCTCCTTTGTTTATCCCA