

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

DISSERTAÇÃO

**INVESTIGAÇÃO DE HEMOPARASITOS EM INDIVÍDUOS DO
GÊNERO *Callithrix* (PRIMATES: CALLITRICHIDAE) DE VIDA
LIVRE E CATIVEIRO NA REGIÃO METROPOLITANA DO RIO
DE JANEIRO, BRASIL**

DIOGO PIGNATARA COIMBRA

2020



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**INVESTIGAÇÃO DE HEMOPARASITOS EM INDIVÍDUOS DO
GÊNERO *Callithrix* (PRIMATES: CALLITRICHIDAE) DE VIDA
LIVRE E CATIVEIRO NA REGIÃO METROPOLITANA DO RIO
DE JANEIRO, BRASIL**

DIOGO PIGNATARA COIMBRA

Sob a Orientação da Professora
Dra. Denise Monnerat Nogueira

Dissertação submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre
em Biologia Animal, no Programa de
Pós-Graduação em Biologia Animal, área
de concentração em Biodiversidade Animal.

Seropédica – 2020

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

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

C652i Coimbra, Diogo Pignatara, 1988-
INVESTIGAÇÃO DE HEMOPARASITOS EM INDIVÍDUOS DO
GÊNERO *Callithrix* (PRIMATES: CALLITRICHIDAE) DE VIDA
LIVRE E CATIVEIRO NA REGIÃO METROPOLITANA DO RIO DE
JANEIRO, BRASIL / Diogo Pignatara Coimbra. -
Seropédica, 2020.
90 f.: il.

Orientadora: Denise Monnerat Nogueira.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
Biologia Animal, 2020.

1. Parasitologia. 2. Microscopia. 3. Diagnóstico
molecular. 4. Primatas. 5. Saguís. I. Nogueira,
Denise Monnerat, 1961-, orient. II Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós
Graduação em Biologia Animal III. Título.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

DIOGO PIGNATARA COIMBRA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Biologia Animal**, no **Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal**, área de concentração em **Biodiversidade Animal**.

Dissertação aprovada em: 31/07/2020

Banca não presencial

Conforme deliberação nº001/2020 da PROPPG/UFRRJ, de 30/06/2020, as assinaturas dos membros da banca examinadora foram substituídas por assinaturas digitais, que constam no anexo.

Denise Monnerat Nogueira. Dra. UFRRJ
(Orientadora)

Carlos Eduardo da Silva Verona. Dr. RioZoo

Claudia Bezerra da Silva. Dra. UFRRJ

Jorge Luís Azevedo de Armada. Dr. UFRRJ.

Maristela Peckle Peixoto. Dra. UFRRJ

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a oportunidade dada pela minha orientadora Denise Monnerat, que me acolheu e me orientou durante toda essa caminhada, mesmo diante de tantas dificuldades e percalços que atravessamos. Sua imagem de uma profissional exemplar sempre será um exemplo ao qual irei me espelhar. Todos os seus conselhos serão levados para sempre comigo, e espero um dia ter a honra de lhe chamar de colega de profissão.

Agradeço também ao Diego Penedo, a quem considero um co-orientador devido à tudo que me ensinou durante estes dois anos. Sem a sua presença e ajuda, não seria possível chegar até aqui, a dupla sertaneja dos macacos indo para tudo que é campo, sofrendo com mosquitos, carrapatos, cansaço.

Agradecimento especial também a Monique, que não só me ensinou muito no início, como compartilhou seu material coletado comigo e possibilitou que este estudo tenha sido feito. Juntamente agradeço aos envolvidos nas coletas da Monique, o Dr. Carlos Eduardo Verona e a equipe fauna do JBRJ.

Não posso esquecer de todas as pessoas do laboratório de Genética e Diversidade Animal que me auxiliaram durante estes anos, principalmente nos afazeres diários: Bia, Francisco, Léo, Michele, Fernanda e demais. Não somente a ajuda no trabalho, mas todos os momentos e risadas com a nossa convivência tornaram muito mais leve essa caminhada.

Agradeço também as equipes do CETAS-RJ liderados pelo biólogo Daniel, sempre prestativo. Como também a equipe do CRAS-UNIVAP, que foram muito amigáveis e nos auxiliaram muito. Agradeço o Departamento de Parasitologia Animal, ao Laboratório de Sanidade Avícola (LASAVE - DESP) e o laboratório de Hemoparasitos e Vetores (LHV) do professor Massard, especialmente à prof. Claudia Bezerra que não só me ajudou, como me ensinou muito nestes anos. Também tenho a agradecer ao professor Carlos Mathias pelo auxílio quanto às coletas.

Agradeço à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, ao secretário Zé Antônio, por todo o auxílio durante o Mestrado.

Agradeço aos componentes da banca, por aceitarem o convite. As suas avaliações são imprescindíveis, e estou muito feliz por agregar conhecimento com as suas expertises.

Agradecimento especial a minha família, que me apoiou até aqui e a qual se orgulha da minha origem e de onde cheguei. Foram muitas batalhas vencidas juntas, com esse suporte incomparável. Agradeço a todo o incentivo, auxílio, tudo que aprendi até aqui e o que me moldou, muito obrigado. Vocês torceram por mim o tempo todo, espero ter correspondido.

Também agradeço aos meus amigos, os quais são muitos e seria uma injustiça nomear somente alguns. Saibam que todos vocês têm enorme importância nessa história e que caso não estivessem aqui, não acredito que teria conseguido chegar aonde cheguei. Vocês são o meu porto seguro, o meu abrigo. Como diz o ditado “família é aquela na qual você nasce, amigos são a família que você escolhe”.

RESUMO

COIMBRA, Diogo Pignataro. **Investigação de hemoparasitas de saguis do gênero *Callithrix* (Primates: Callithrichidae) de vida livre e cativo da Região Metropolitana do Rio de Janeiro, Brasil.** 2020. 90p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Primates são hospedeiros de diversos hemoparasitos. Os saguis do gênero *Callithrix* que habitam a Região Metropolitana do Rio de Janeiro, interagem com humanos podendo ser transmissores de zoonoses. Os objetivos deste estudo foram: identificar as espécies de hemoparasitos detectados em saguis da Região Metropolitana do Rio de Janeiro através da microscopia, morfometria, análise molecular e comparar os valores de prevalência e intensidade média parasitária entre as localidades de vida livre e cativo amostradas. Foram realizadas coletas em duas localidades de vida livre, Jardim Botânico do Rio de Janeiro (JBRJ) e Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), e duas de cativo, Biotério da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Biotério-UFRJ) e Centro de Triagem de Animais Silvestres do Rio de Janeiro (CETAS-RJ). Como localidade externa, foram analisadas amostras de cativo do Centro de Recuperação de Animais Silvestres da Universidade do Vale do Paraíba (CRAS-UNIVAP). Aproximadamente 1 ml de sangue foi coletado da veia femoral para confecção de esfregaços sanguíneos e análise genética. As lâminas foram analisadas por microscopia óptica com registro fotográfico e tomadas de medidas morfométricas. Foram analisadas a prevalência e a intensidade média parasitária. O DNA foi extraído a partir das amostras de sangue utilizando o método de fenol-clorofórmio. Foram utilizados *primers* para amplificação de um fragmento de 700 pares de bases (pb) do gene *18S rRNA* de *Trypanosoma* e aproximadamente 300 pb da sequência *ITS-1* para microfilária, ambos por PCR convencional. Amplicons do gene *18S rRNA* foram sequenciados, alinhados com a ferramenta BLAST[®] e submetidos à análise filogenética. Durante análise microscópica, foram encontrados nas amostras do JBRJ *Trypanosoma* sp., microfilárias e inclusões sugestivas de *Babesia* sp. As medidas das formas tripomastigotas detectadas nas amostras do JBRJ e UFRRJ foram TL 28,4 - 48, PK 6,8 - 15 e B 2 - 6 µm, dentro da margem descrita para *T. minasense* e o sequenciamento dos amplicons do gene *18S rRNA* revelaram similaridade genética acima de 97% com esta espécie, agrupando em um mesmo clado na análise filogenética. Os dados morfométricos sugerem que as microfilárias encontradas sejam *Mansonella marmosetae* e *Dipetalonema graciliformis*, sendo possível a presença de mais espécies. Através da microscopia, localidades de vida livre apresentaram prevalência de 25% para *Trypanosoma* sp., 11% para microfilárias e, possivelmente, de 3% para *Babesia* sp. Em cativo a prevalência foi de 2%, somente para *Trypanosoma* sp. Por PCR, a prevalência por *Trypanosoma* foi de 43% em vida livre contra 14% em cativo, enquanto para microfilárias foi de 21% e 44%, respectivamente. A análise por PCR foi mais eficaz na detecção de hemoparasitos. As diferenças nas taxas de infecção por microfilárias devem estar relacionadas à densidade de hospedeiros e a limitação dos movimentos dos indivíduos em cativo.

Palavras-chave: parasitologia, microscopia, genética molecular

ABSTRACT

COIMBRA, Diogo Pignataro. **Hemoparasite investigation of free-living and captivity *Callithrix* marmosets (Primates: Callithrichidae) from the Metropolitan Region of Rio de Janeiro, Brasil.** 2020. 90p. Dissertation (Master Science in Animal Biology). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Primates are hosts of various hemoparasites species. *Callithrix* marmosets inhabiting the Rio de Janeiro metropolitan region interact with humans representing potential transmitters of zoonoses. The objectives of this study were: to identify the hemoparasites species detected in marmosets of the Metropolitan Region of Rio de Janeiro through optical microscopy, morphometry, molecular analysis and compare the values of prevalence and parasite mean intensity between free-living and captivity locations. Captures were carried out in two free-living locations, Jardim Botânico do Rio de Janeiro (JBRJ) and Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), and two captivity locations, Biotério of the Universidade Federal do Rio de Janeiro (Biotério-UFRJ) and Wild Animals Triage Center of Rio de Janeiro (CETAS-RJ). Samples from the captivity location Wild Animals Recovery Center of the Universidade of Vale do Paraíba in São Paulo (CRAS-UNIVAP) were included as an external location for comparison. About 1 ml of blood was collected from the femoral vein for blood smears and genetic analysis. The slides were analyzed under an optical microscope with photographic register and morphometric measurements. Prevalence and mean parasite intensity were analyzed. DNA was extracted from blood samples by phenol-chloroform method. Primers were used to amplify a 700 base pairs (bp) fragment of the *18S rRNA* gene of *Trypanosoma* and approximately 300 bp of the *ITS-1* sequence of microfilaria by the conventional PCR. The *18S rRNA* gene amplicons were sequenced, aligned by BLAST[®] and submitted to phylogenetic analysis. Through microscope analysis, *Trypanosoma* sp., microfilaria and suggestive cell inclusions of *Babesia* sp. were found in the JBRJ samples. The morphometric measures of the trypomastigotes detected in JBRJ and UFRRJ were TL 28.4 and 48, PK 6.8 - 15 and B 2 - 6 μm , in the expected range for *T. minasense*, and the sequencing of amplicons of the *18S rRNA* gene revealed genetic similarity above 97% with this species clustering in the same clade in the phylogenetic analysis. The morphometric data suggest that the microfilariae found are *Mansonella marmosetae* and *Dipetalonema graciliformis*, being possible the presence of more species. Through microscopy, free-living localities presented prevalence of 25% for *Trypanosoma* sp., 11% for microfilariae and possibly 3% for *Babesia* sp. In captivity, the prevalence was 2% for *Trypanosoma* sp. only. By PCR, the *Trypanosoma* prevalence in free-living localities was 43% against 14% in captivity, on the other hand for microfilaria was 21% and 44%, respectively. PCR analysis was more effective in parasite detection. Differences regarding the microfilaria infection rates should be related to the hosts density and the limitation of their movements in captivity.

Key words: parasitology, microscopy, molecular genetics

LISTA DE ABREVIACES

μL – microlitro

μm – micrmetro

B – largura do corpo na altura do núcleo (*Trypanosoma*)

bp – *base pairs*

Biotério-UFRJ – Biotério do Instituto Carlos Chagas Filho na Universidade Federal do Rio de Janeiro

C – comprimento do corpo de microfilária

CDC – *Center of Disease Control*

CETAS-RJ – Centro de Triagem de Animais Silvestres do Rio de Janeiro.

cm – centímetros

CRAS-UNIVAP – Centro de Reabilitação de Animais Silvestres da Universidade do Vale do Paraíba, SP.

Csp – *Callithrix sp.*

DNA – *desoxyribonucleic acid*/ácido desoxirribonucleico

F – tamanho do flagelo livre de *Trypanosoma*

FLONA – Floresta Nacional

g – gramas

ha – hectares

HGP – *Human Genome Project*

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICMBIO – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

INEA – Instituto Estadual do Ambiente

IUCN – *International Union for Conservation of Nature*

JBRJ – Jardim Botânico do Rio de Janeiro

kg – kilogramas

KN – distância entre o cinetoplasto e o meio do núcleo de *Trypanosoma*

L – largura do corpo de microfilária

m² – metros quadrados

min – minuto

mg – miligramas

ml – mililitros

mm – milímetros

N – largura do núcleo de *Trypanosoma*

NA – distância do meio do núcleo à extremidade anterior de *Trypanosoma*

nM – nanomolar

ONU – Organização das Nações Unidas

pb – pares de bases

PCR – *Polymerase Chain Reaction*/Reação em Cadeia da Polimerase

PK – distância entre a extremidade posterior e o cinetoplasto de *Trypanosoma*

PN – distância da extremidade posterior ao meio do núcleo de *Trypanosoma*

PNT – Parque Nacional da Tijuca

SD – desvio padrão

seg – segundo

SOSMA – Fundação SOS Mata Atlântica

TL – tamanho total de *Trypanosoma*

U – unidade

V – volts

UFRRJ – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

WHO – *World Health Organization*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estimativa de casos de Doença de Chagas no mundo com dados de 2006-2010 editado da World Health Organization (WHO 2018).....	8
Figura 2: Casos confirmados de malária no mundo, dados de 2010, editado da World Health Organization (WHO 2018).	9
Figura 3: Espécies de sagui do Brasil: A - <i>Callithrix penicillata</i> ; B - <i>Callithrix aurita</i> ; C - <i>Callithrix flaviceps</i> ; D - <i>Callithrix geoffroyi</i> ; E - <i>Callithrix jacchus</i> ; F - <i>Callithrix kullii</i> . Retirado de Rylands <i>et al.</i> 2009.	11
Figura 4: Distribuição das espécies de <i>Callithrix</i> (Callithrichidae:Primates) em território brasileiro. Elaborado por Diogo P. Coimbra (editado de encurtador.com.br/cJUW9).....	12
Figura 5: Relação entre espécies de sagui do gênero <i>Callithrix</i> e os parasitos encontrados na literatura na revisão feita por Solórzano-Garcia & León (2018).....	13
Figura 6: Formas tripomastigotas do parasito <i>Trypanosoma cruzi</i> . Retirado de Maldalosso <i>et al.</i> 2004.	14
Figura 7: Vetores de algumas espécies de <i>Trypanosoma</i> sp. A - <i>Panstrongylus megistus</i> ; B - <i>Rhodnius prolixus</i> ; C - <i>Triatoma infestans</i> ; D - <i>Glossina</i> spp.; E - <i>Stomoxys cancitrans</i> . Retirado do Google® (Jurberg & Galvão, 2003; Guhl & Vallejo, 2009; Dorling Kindersley/Getty Images, Pavel Krok/Fir0002)	15
Figura 8: Ciclo de vida do parasito <i>Trypanosoma cruzi</i> , agente infeccioso da Doença de Chagas, e seus estágios no vetor triatomíneo e no hospedeiro humano. Modificado de “Center for Diseases Control and Prevention” - CDC https://bit.ly/2IPpn5J	16
Figura 9: Filogenia da família Onchocercidae com base na sequência dos genes <i>12S rRNA</i> , <i>COX1</i> , <i>RBP1</i> , <i>ST13</i> , <i>myoHC</i> , <i>18S rRNA</i> e <i>28S rRNA</i> , e os respectivos hospedeiros de cada espécie. Retirado de Lefoulon <i>et al.</i> 2015.....	17
Figura 10: Ciclo de vida e estágios de desenvolvimento da filária <i>Wuchereria bancrofti</i> , causadora da elefantíase em humanos. Alterado de Center of Disease Control - CDC https://bit.ly/2jNah65	18
Figura 11: Esfregaço sanguíneo corado com Giemsa, com eritrócitos infectados por <i>Babesia</i> sp. Retirado de https://bit.ly/2EdkPog	20
Figura 12: Face de saguis (<i>Callithrix</i> : Primates) amostrados, representando a variação fenotípica com diferentes padrões de cor e formato dos tufos auriculares. A - <i>Csp18</i> capturado no JBRJ, B - <i>Csp56</i> da UFRRJ, C - <i>Csp45</i> do CETAS-RJ e D - Uni3 do CRAS-UNIVAP.	21
Figura 13: Mapas destacando a área de estudo. A - América do Sul e Brasil; B - Rio de Janeiro; C - Região Metropolitana; I - Campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; II - Centro de Triagem de Animais Silvestres do Rio de Janeiro, CETAS-RJ; III - Jardim Botânico do Rio de Janeiro; IV - Biotério do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ (Imagem editada de encurtador.com.br/cJUW9, encurtador.com.br/mxCT8 e encurtador.com.br/amtMN). 23	
Figura 14: Mapa destacando a localidade de amostragem de cativo de <i>Callithrix</i> sp. no Centro de Reabilitação de Animais Silvestres da Universidade do Vale do Paraíba/CRAS-UNIVAP, SP. A - Brasil; B - Estado de São Paulo; C - município de São José dos Campos; * UNIVAP (Imagens editadas de encurtador.com.br/cJUW9, encurtador.com.br/yEIO1 e Guisard & Kuplich 2009).	24

Figura 15: Plataforma de bambu com três armadilhas modelo <i>Tomahawk</i> , com iscas de banana para a captura de saguis <i>Callithrix</i> sp. no Campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, município de Seropédica. Foto: Diogo P. Coimbra.....	26
Figura 16: Aplicador e microchip 12 mm x 2,1 mm e 0,06g para identificação de saguis, <i>Callithrix</i> sp. Imagem do fornecedor Microchip partners®	27
Figura 17: Medidas morfométricas analisadas no hematozoário flagelado, <i>Trypanosoma</i> sp., detectados em amostras de <i>Callithrix</i> sp. da Região Metropolitana do Rio de Janeiro. As siglas representam: PK – distância entre a extremidade posterior e o cinetoplasto, KN – distância entre o cinetoplasto e o meio do núcleo, PN – distância da extremidade posterior ao meio do núcleo, NA – distância do meio do núcleo à extremidade anterior, F – tamanho do flagelo livre, TL – tamanho total, N – largura do núcleo e B – largura do corpo na altura do núcleo. Esquema: Diogo P. Coimbra.	28
Figura 18: Medidas morfométricas analisadas em nematódeos, microfilárias detectadas em indivíduos de <i>Callithrix</i> na Região Metropolitana do Rio de Janeiro: C – comprimento do corpo, L – largura do corpo. Esquema: Diogo P. Coimbra.....	29
Figura 19: <i>Trypanosoma</i> encontrado nos esfregaços sanguíneos dos saguis <i>Callithrix</i> sp. amostrados no Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Fotografado com câmera digital em microscópio Olympus bx45® em aumento de 1000 x. As letras representam diferentes hospedeiros: A - <i>Csp10</i> , B - <i>Csp14</i> , C - <i>Csp19</i> , D - <i>Csp20</i> e E - <i>Csp41</i> . Foto: Diogo P. Coimbra.	32
Figura 20: Microfilárias encontradas em esfregaços sanguíneos de <i>Callithrix</i> sp. amostrados no Jardim Botânico do Rio de Janeiro utilizando microscópio Olympus bx45®. Imagens A, B e C com magnificação de 400 x e imagem D, com 1000 x. As letras representam diferentes hospedeiros: A - <i>Csp14</i> , B - <i>Csp19</i> , C e D - <i>Csp41</i> . Foto: Diogo P. Coimbra.	33
Figura 21: Esfregaço sanguíneo de um indivíduo de <i>Callithrix</i> sp. (<i>Csp19</i>) capturado no Jardim Botânico do Rio de Janeiro (JBRJ). As setas destacam merozoítos de <i>Babesia</i> sp., sua forma infectante intra-eritrocitária. Fotografado em microscópio Olympus bx45® em aumento de 1000 x. Foto: Diogo P. Coimbra.	33
Figura 22: <i>Trypanosoma</i> sp. encontrados em esfregaços sanguíneos de <i>Callithrix</i> sp. amostrados na UFRRJ (A e B) e na amostra do CETAS-RJ (C) em Seropédica, RJ. Imagens A, B e C com magnificação de 1000 x. As letras representam diferentes hospedeiros: A - <i>Csp49</i> , B - <i>Csp64</i> , C - <i>Csp53</i> . Foto: Diogo P. Coimbra.	34
Figura 23: Esquemas de microfilárias evidenciando tipos de cauda diferentes e um exemplar observado no material coletado. A - <i>Mansonella marmosetae</i> com cauda arredondada e nucleada, B - <i>Mansonella dumni</i> , com cauda afilada e anucleada. Retirados de Eberhard & Orihel 1984.	37
Figura 24: Representações da molécula do ácido desoxirribonucleico (DNA). A - fotografias de Rosalind Franklin (1953), B - modelo de Watson e Crick (1953). Retiradas de Klug 1968 e https://bit.ly/2uyOOml	47
Figura 25: Géis de agarose a 2% com fragmentos de DNA corados com brometo de etídeo, Ctr+ representando o controle positivo e os demais fragmentos gerados a partir da amplificação do gene <i>18S rRNA</i> por PCR para identificação da espécie de <i>Trypanosoma</i> sp. detectado em <i>Callithrix</i> sp. (<i>Csp</i> seguido pelo número de identificação do indivíduo) da Região Metropolitana do Rio de Janeiro.....	56
Figura 26: Géis de agarose a 2% com fragmentos de DNA corados com brometo de etídeo, gerados a partir da amplificação da sequência intrônica <i>ITS-1</i> por PCR para	

identificação de microfilárias detectadas em *Callithrix* sp. (Csp seguido pelo número de identificação do indivíduo) da Região Metropolitana do Rio de Janeiro. No primeiro gel acima, não houve amplificação em nenhuma amostra. Nos géis abaixo os fragmentos entre 200 e 300 pares de bases estão de acordo com o esperado (ZHU *et al.* 2000; SATO *et al.* 2006). N – controle negativo..... 57

Figura 27: Árvore filogenética construída com o método de *Maximum Likelihood* baseada no alinhamento das sequências do gene *18S rRNA* de *Trypanosoma* sp. encontrados em amostras de *Callithrix* sp. do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Sequências obtidas seguem a sigla *Csp*. Demais sequências representam outras espécies de *Trypanosoma*. Através do programa MEGA 7[®], foi utilizado Bootstrap com 1000 repetições, distâncias evolutivas foram computadas com o método Kimura 2-parameter (Kimura 1980 e 1981, Kumar *et al.* 2016). 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados referentes aos saguis, <i>Callithrix</i> sp., capturados nas localidades de vida livre e de cativeiro na Região Metropolitana do Rio de Janeiro e na localidade externa em São Paulo: identificação (ID), local de amostragem, data de captura, idade, sexo, peso, comprimento do corpo (ccorpo) e da cauda (ccauda).	30
Tabela 2: Dados morfométricos dos <i>Trypanosoma</i> sp. encontrados nos saguis <i>Callithrix</i> sp. do Jardim Botânico do Rio de Janeiro e da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Para cada medida são apresentados os valores mínimo e máximo obtidos para cada hemoparasito de cada indivíduo parasitado e, entre parênteses, o valor médio (μm) e desvio padrão (DP). R - identificação, N - número de parasitos encontrado, PK - distância entre a extremidade posterior ao cinetoplasto, KN - distância entre o cinetoplasto e o meio do núcleo, PN - distância entre a extremidade posterior ao meio do núcleo, NA - distância entre o meio do núcleo a extremidade anterior, FF - tamanho do flagelo livre, TL - tamanho total, NL - tamanho do núcleo, B - largura do corpo na altura do núcleo.	36
Tabela 3: Dados morfométricos das microfilárias encontradas nos saguis <i>Callithrix</i> sp. do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Para cada medida são apresentados os valores mínimo e máximo obtidos para cada parasito de cada indivíduo parasitado e, entre parênteses, o valor médio (μm) e desvio padrão (DP). ID – identificação; N - número de parasitos; L - comprimento do corpo; B - largura do corpo.	37
Tabela 4: Quantificação de DNA em gel de agarose a 0,8% e em Nanodrop® de DNA extraído a partir de amostras de sangue de saguis <i>Callithrix</i> sp. amostrados na cidade do Rio de Janeiro, no Jardim Botânico do Rio de Janeiro; em Seropédica, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e no Centro de Triagem de Animais Silvestres do Rio de Janeiro e no Centro de Reabilitação de Animais Silvestres da Universidade do Vale do Paraíba/Campinas, em São Paulo. – ausência de banda em gel.	53
Tabela 5: Relação dos indivíduos de <i>Callithrix</i> sp. amostrados em vida livre e cativeiro em localidades do Rio de Janeiro e uma localidade de cativeiro de São Paulo, com os respectivos hemoparasitos detectados em esfregaços sanguíneos e por reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras destes indivíduos: <i>Trypanosoma</i> sp. e microfilária. ID - identificação, <i>Csp Callitrix</i> sp. seguido da ordem de captura, (+) positivo para o parasito e (-) negativo para o parasito.....	58

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO I – ANÁLISES PARASITOLÓGICAS E EPIDEMIOLÓGICAS ATRAVÉS DE ESFREGAÇOS SANGUÍNEOS DE SAGUIS <i>CALLITHRIX SP.</i> DA REGIÃO METROPOLITANA DO RIO DE JANEIRO, BRASIL	3
1. INTRODUÇÃO.....	6
1.1 Parasitologia Animal	8
1.2 Primatas Neotropicais e o Gênero <i>Callithrix</i>	10
1.3 <i>Trypanosoma</i>	14
1.4 Microfilária.....	17
1.5 <i>Babesia</i>	19
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
2.1 Espécies Estudadas	21
2.2 Áreas de Estudo	22
2.3 Procedimentos de Captura, Identificação Individual, Registro e Coleta de Material Biológico	25
2.3.1 Procedimentos Pré-Captura	25
2.3.2 Procedimentos de Coleta de Amostras Biológicas	26
2.4 Análise Microscópicas.....	27
2.5 Análise Epidemiológica.....	27
2.6 Análise Morfométricas dos Parasitos	28
3. RESULTADOS	29
3.1 Análise dos Esfregaços Sanguíneos	32
3.1.1 Prevalência e Intensidade Média Parasitária	34
3.2 Análises Morfométricas.....	35
4. DISCUSSÃO	38
5. CONCLUSÃO.....	42
CAPÍTULO II – ANÁLISE GENÉTICA DE <i>TRYPANOSOMA SP.</i> E MICROFILÁRIAS DE AMOSTRAS DE <i>CALLITHIX SP.</i> DA REGIÃO METROPOLITANA DO RIO DE JANEIRO, BRASIL.....	43
1. INTRODUÇÃO.....	46
1.1 Genética Molecular na Parasitologia.....	48
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
2.1 Extração de DNA.....	51

2.2 Reação em Cadeia da Polimerase	51
2.3 Sequenciamento dos Fragmentos Amplificados por PCR.....	52
2.4 Análise Filogenética	52
3. RESULTADOS	53
3.1 Análise do DNA Extraído.....	53
3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	55
3.1.1 Para Diagnóstico de <i>Trypanosoma</i>	55
3.1.2 Para Diagnóstico de Microfilária.....	56
3.3 Análise de Sequenciamento do DNA	59
3.4 Análise Filogenética	59
4. DISCUSSÃO	61
5. CONCLUSÃO.....	63
CONCLUSÕES GERAIS	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ANEXOS	79

INTRODUÇÃO GERAL

Desde o século XIX estudos sobre a relação entre parasitos e hospedeiros têm ganhado cada vez mais destaque na ciência. Como exemplos, podemos citar o impacto das descobertas de Patrick Manson e Carlos Chagas que até hoje podem ser notados. A doença de Chagas, causada pelo hematozoário *Trypanosoma cruzi*, descoberta pelo cientista do qual a doença leva o nome, é considerada uma das oito doenças infecciosas do grupo de “doenças tropicais” mais preocupantes no mundo, devido às dificuldades de prevenção e controle. Dentre essas, sete possuem como agente etiológico um parasito, reforçando o impacto da parasitologia na saúde pública.

Não apenas humanos podem ser afligidos por parasitos; animais silvestres e domésticos também são alvos. Perdas tanto emocionais, no caso dos animais domésticos, quanto financeiras, no caso da produção animal, sempre estiveram em pauta na parasitologia. Nos últimos tempos há também a preocupação com a perda de biodiversidade em decorrência de patologias de origem parasitária.

Primatas neotropicais podem se infectar por diversos tipos de parasitos, sendo a proximidade genética com humanos uma ponte para o compartilhamento de possíveis parasitos entre ambos. Dentre os primatas neotropicais, os saguis das espécies *Callithrix jacchus* e *C. penicillata* são altamente adaptados a ambientes urbanos e à interação com humanos. Essa interação em grandes cidades como o Rio de Janeiro, pode favorecer a disseminação de zoonoses. Essas espécies são exóticas e invasoras no Sudeste e Sul do Brasil, inter cruzam, inclusive com a espécie nativa da região Sudeste, *C. aurita*, e geram híbridos provavelmente férteis, estando disseminados pela Região Metropolitana do Rio de Janeiro. Eles são encontrados desde a zona sul da cidade, por exemplo, no bairro do Jardim Botânico, até o subúrbio, na baixada fluminense, como na cidade de Seropédica. Devido à resgates referentes à acidentes, ao tráfico, remoções ou por doações voluntárias, saguis são comuns em centros de recuperação e triagem de animais silvestres, como o Centro de Triagem de Animais Silvestres do Rio de Janeiro, em Seropédica. Saguis também são utilizados frequentemente em pesquisas, sendo mantidos em biotérios, como no biotério do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho na UFRJ. Sendo assim, na Região Metropolitana no Rio de Janeiro se encontram saguis tanto em vida livre quanto em cativeiro.

Neste estudo foram coletadas amostras de sangue de saguis que habitam a Região Metropolitana do Rio de Janeiro, tanto em localidades de vida livre, como o JBRJ e o campus da UFRRJ, quanto em localidades de cativeiro, como o CETAS-RJ e o Biotério-UFRJ, a fim de investigar os possíveis hemoparasitos que infectam estes indivíduos e as diferenças epidemiológicas entre os dois tipos de localidades. Também foram analisados saguis do CRAS-UNIVAP como localidade de cativeiro externa ao Rio de Janeiro para comparação.

A microscopia óptica tem sido utilizada na parasitologia clássica como a principal metodologia para identificação e classificação de parasitos. Entretanto, a variação natural dos caracteres morfológicos dos parasitos, a ausência do parasito, por vezes, na porção de amostra analisada e características inerentes ao observador, são variáveis que podem influenciar no resultado das análises. Diante disto, a análise genética molecular através da reação em cadeia da polimerase (PCR), tem se mostrado uma alternativa eficaz para complementar as limitações das análises microscópicas. Por meio da PCR, a detecção do parasito mesmo a partir de uma única molécula de DNA

existente na amostra, teoricamente é possível, devido à amplificação exponencial ao fim dos ciclos de replicação. Além disso, pelo sequenciamento dos amplicons o grande número de sequências de bases nitrogenadas gerado, possibilita uma infinidade adicional de caracteres para uma classificação mais precisa do parasito detectado.

Esta dissertação está dividida em dois capítulos. O primeiro capítulo compreende as análises microscópicas dos esfregaços sanguíneos obtidos de saguis do gênero *Callithrix* amostrados em localidades de vida livre e cativeiro da Região Metropolitana do Rio de Janeiro. Pela dificuldade de classificação taxonômica em decorrência da hibridação, os indivíduos analisados foram aqui identificados como *Callithrix sp.* Para cada hemoparasito detectado foram avaliadas: a prevalência da infecção e a intensidade média parasitária comparando-as entre as localidades de vida livre e cativeiro. Para a identificação do parasito, foram tomadas medidas morfométricas e os dados obtidos foram comparados aos descritos na literatura. No segundo capítulo foi realizada a análise genética utilizando como marcadores moleculares o gene *18S rRNA* e a região intrônica *ITS-1* para a confirmação por PCR de alguns achados do Capítulo I por microscopia, no caso, *Trypanosoma* e microfilárias, respectivamente. Também foi realizada a PCR para investigar a ocorrência de hemoparasitos dentre as amostras negativas por microscopia. Por fim, foi realizado o sequenciamento dos amplicons obtidos neste estudo a partir do gene *18S rRNA*, o alinhamento e a análise filogenética para a identificação da espécie de *Trypanosoma* detectado.

CAPÍTULO I

ANÁLISES PARASITOLÓGICAS E EPIDEMIOLÓGICAS DE ESFREGAÇOS SANGUÍNEOS DE SAGUIS *Callithrix* sp. DA REGIÃO METROPOLITANA DO RIO DE JANEIRO, BRASIL

RESUMO

Animais domésticos e silvestres podem se infectar com uma grande variedade de parasitos que em alguns casos, representam zoonoses, ou seja, são transmitidos a humanos. A proximidade filogenética e geográfica entre primatas, como os saguis do gênero *Callithrix* e humanos, pode favorecer a infecção cruzada de parasitos. Três espécies de saguis: *Callithrix aurita*, *C. jacchus* e *C. penicillata*, habitam o estado do Rio de Janeiro, sendo somente a primeira nativa. As duas últimas, consideradas invasoras, ocorrem na Região Metropolitana do Rio de Janeiro. Os objetivos deste capítulo foram investigar através da microscopia óptica a ocorrência de parasitos em esfregaços sanguíneos de saguis de vida livre e de cativeiro, nas seguintes localidades de vida livre, Jardim Botânico do Rio de Janeiro (JBRJ) e Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ); e de cativeiro, Biotério da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Biotério-UFRJ) e Centro de Triagem de Animais Silvestres do Rio de Janeiro (CETAS-RJ). Também foram analisadas amostras de indivíduos do Centro de Recuperação de Animais Silvestres da Universidade do Vale do Paraíba, São Paulo, (CRAS-UNIVAP) como uma localidade de cativeiro externa ao Rio de Janeiro para comparação. A hipótese a ser testada é que nas localidades de vida livre deve haver maior diversidade de parasitos, prevalência e intensidade média parasitária, devido à diversidade do habitat e contato entre saguis e possíveis vetores. Os indivíduos foram capturados na natureza em armadilhas *Tomahawk*. Após sedação, foram coletadas amostras de sangue para confecção dos esfregaços, posteriormente analisados ao microscópio, com registro fotográfico e tomada de medidas morfométricas dos parasitos. Foram analisadas a prevalência e a intensidade média parasitária observando possíveis diferenças entre localidades de vida livre e cativeiro. Foram encontrados nas amostras do JBRJ *Trypanosoma* sp., microfilárias e possivelmente *Babesia* sp.; UFRRJ e CETAS-RJ, somente *Trypanosoma* sp.; e CRAS-UNIVAP nenhum parasito foi detectado. As medidas das formas tripomastigotas detectadas nas amostras do JBRJ e UFRRJ, TL 28,4 - 48, PK 6,8 - 15 e B 2 - 6 μm , estão dentro da margem descrita para *T. minasense* com polimorfismo de tamanho característico desta espécie. As microfilárias encontradas nas amostras do JBRJ são possivelmente *Mansonella (Tetrapetalonema) marmosetae*, L 299 - 330 μm e B 3 μm ; e *Dipetalonema graciliformis* L 255 - 330 μm e B 3,4 - 4 μm , com base nos valores morfométricos, sendo possível a presença de mais espécies. A intensidade média parasitária foi avaliada somente para *Trypanosoma* sp. (3,2) e microfilárias (4) do JBRJ por haver mais de um parasito por amostra. Nas amostras do JBRJ, a prevalência de *Trypanosoma* sp. foi 33%, de microfilárias 20% e, possivelmente, de *Babesia* sp. 6,6%. Na UFRRJ, a prevalência de *Trypanosoma* sp. foi 16%, enquanto no CETAS-RJ, 6,6%. Em conjunto, nas localidades de vida livre a prevalência foi de 25% para *Trypanosoma* sp., 11% para microfilárias e 3%, possivelmente, para *Babesia* sp. Em cativeiro, este valor foi de 2% somente para *Trypanosoma* sp. Foram observados maiores valores de prevalência, intensidade média parasitária e diversidade de parasitos nas localidades de vida livre.

Palavras-chave: hemoparasitos, microscopia, primatas

ABSTRACT

Domestic and wild animals can be infected with a wide variety of parasites, which can represent possible transmitters to humans, called zoonosis. The phylogenetic and geographic proximity between primates such as the marmosets of *Callithrix* genus and humans, could favour the parasite cross infection. Three marmoset species: *C. aurita*, *C. jacchus* and *C. penicillata* inhabit the state of Rio de Janeiro, only the first being native. The last two, classified as invasive, occur in the Metropolitan Region of Rio de Janeiro. The objectives of this chapter were to investigate through optical microscopy the occurrence of parasites in blood smears of free-living and captivity marmosets from the following two free-living localities: Jardim Botânico do Rio de Janeiro (JBRJ) and Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ); and captivity localities, the Bioterium of the Universidade Federal do Rio de Janeiro (Biotério-UFRJ) and the Center of Triage of Wild Animals of Rio de Janeiro (CETAS-RJ). Blood samples from marmosets from the Wild Animal Recovery Center of the Universidade do Vale do Paraíba in São Paulo (CRAS-UNIVAP) were also included in the analysis for comparison as an external captivity locality out of Rio de Janeiro state. The hypothesis to be tested is that in free-living localities should have higher parasite diversity, higher prevalence and parasite mean intensity, due to the habitat diversity and possible contact between marmosets and vectors. Free-living individuals were captured in Tomahawk traps. After sedation, blood was collected for smears, which were analyzed under a microscope with subsequent photographic register and morphometric measurements of the parasites. The prevalence and mean parasite intensity were analyzed, observing possible differences in these parameters between free-living and captivity localities. In JBRJ samples was found *Trypanosoma* sp., microfilariae and possibly *Babesia* sp.; UFRJ and CETAS-RJ was found only *Trypanosoma* sp.; CRAS-UNIVAP none parasite was detected. The morphometric values of the trypomastigote forms found in samples from JBRJ and UFRJ, TL 28.4 and 48, PK 6.8 - 15 and B 2-6 μm , were identified as *T. minasense* according to the similar measures described for this species, and also with size polymorphism. The microfilariae found in the JBRJ samples can represent *Mansonella (Tetrapetalonema) marmosetae* due to the morphometric values L 299 - 330 B 3 μm , and *Dipetalonema graciliformis* L 255 - 330 B 3,4 - 4 μm , being possible the presence of more species. The mean parasitic intensity was only evaluated to *Trypanosoma* sp. (3.2) and microfilariae (4) of the JBRJ samples which presented more than one parasite. In JBRJ samples, the prevalence of *Trypanosoma* sp. was 33%, of microfilariae 20% and possibly of *Babesia* sp. 6.6%. In UFRJ, the prevalence of *Trypanosoma* sp. was 16%, while in CETAS-RJ it was 6.6%. Free-living localities presented prevalence of 25% for *Trypanosoma* sp., 11% for microfilariae and 3% possibly for *Babesia* sp. In captivity, it was found 2% of prevalence for *Trypanosoma* sp. only. The prevalence, mean parasitic intensity and parasite diversity showed higher values in free-living localities.

Key words: hemoparasites, microscopy, primates

1. INTRODUÇÃO

A definição das regiões e biomas do mundo foi amplamente discutida, desde as teorias de Darwin ao avanço da biogeografia, até que em 1947, Pierre Gourou revisou a definição de região tropical (ARNOLD, 2000). Região tropical até então, não só era categorizada pela geografia, entre os trópicos de câncer e capricórnio, mas também pela visão europeia de uma área tórrida, paradisíaca, de terras abundantes, com vegetação exuberante, fauna exótica, temperaturas e umidade constantes ao longo do ano (OVIEDO, 1959; COHEN, 1988; ARNOLD, 2000). Esta região, também tem sido atrelada à imagens negativas como: habitada por primitivos, bestas ferozes, tempestades destruidoras e calor insuportável (OVIEDO, 1959). A vegetação em paralelo à latitude e fatores abióticos têm sido apontados como principais atributos da região tropical (ANDERSON, 1992). Dentro dela, destaca-se a região neotropical, que se refere às Américas, desde o México, até a parte inferior da Argentina e Chile (MORRONE, 2014). É composta por diversos biomas que vão além da ideia de um único bloco de floresta tropical (MORRONE, 2014).

As regiões tropicais também têm sido diretamente relacionadas à proliferação de doenças infecciosas, denominadas doenças tropicais (CAMARGO, 2008), devido às condições climáticas e sócio-demográficas que favorecem o desenvolvimento destas enfermidades (EVANS *et al.* 1993; CAMARGO, 2008; SILVA & LANGONI, 2008; SIQUEIRA-BATISTA *et al.* 2011). A pluviosidade e a temperatura, por exemplo, aumentam a abundância de mosquitos, conseqüentemente aumentando o número de interações entre vetores e hospedeiros e a possibilidade da perpetuação de doenças (ALTIZER *et al.* 2006, GALARDO *et al.* 2009).

Para a ocorrência de uma doença infecciosa, é necessária a tríade ou teia ecológica, na qual devem estar presentes o agente etiológico, o hospedeiro definitivo, caso necessário os intermediários e o meio ambiente favorável, onde devem estar presentes os vetores quando for o caso (NEVES *et al.* 2005; SIQUEIRA-BATISTA *et al.* 2011). Esse ambiente favorável é retratado na biodiversidade e riqueza da região neotropical, que tem como estandartes a Amazônia, berço da biodiversidade das Américas e o bioma com maior riqueza no mundo, e a Floresta Atlântica, um dos *hostspots* de endemismo do planeta (MYERS *et al.* 2000; HOORN *et al.* 2011; ANTONELLI *et al.* 2018).

A expansão humana associada à destruição biótica e ao desmatamento, também influenciam na proliferação e contato de vetores com humanos em ambientes urbanizados, desencadeando as doenças tropicais (TARTAROTTI, 2004; SIQUEIRA-BATISTA *et al.* 2011). A destruição das florestas aumenta a extensão de ambientes peri-urbanos, ocasionando variação nos mecanismos de invasões domiciliares por parte dos vetores (MASCARINI, 2003).

A Floresta Atlântica perdeu a maior parte de sua área com o passar do tempo (BERGALLO *et al.* 2000). Dentre as principais causas estão o extrativismo decorrente das plantações de café, cana-de-açúcar, eucalipto e pecuária, o uso industrial e as expansões dos grandes centros urbanos (AZEVEDO, 1997; BERGALLO *et al.* 2000; MITTERMEIER *et al.* 2005). A preservação dos fragmentos tem sido prejudicada pela ampliação de estradas e rodovias, que isolam ainda mais os retalhos de florestas,

criando ilhas de vegetação (BERGALLO *et al.* 2009). Estudos recentes, estimam que exista um percentual entre 12% e 17% de vegetação natural da Floresta Atlântica (SOSMA, 2019).

Dentre todas as enfermidades que afligem os trópicos, oito doenças tropicais se destacam de acordo com a “World Health Organization” (WHO): dengue, malária, leishmaniose, doença de Chagas, doença do sono, filariose, esquistossomose e oncocercíase, tendo todas em comum um parasito como agente etiológico, com exceção da dengue ocasionada por vírus (CAMARGO, 2008). Apenas a esquistossomose é transmitida por caramujos, um reservatório animal, sendo as demais transmitidas por insetos hematófagos como vetores (CAMARGO, 2008). Na região neotropical, ocorrem sete destas enfermidades, com exceção da doença do sono.

1.1 Parasitologia Animal

A parasitologia é o estudo de organismos que vivem em dependência de outros seres vivos, os hospedeiros, e teve início no século XIX (REY, 2010). No século XX, a parasitologia obteve significativos avanços tecnológicos, especialmente a microscopia óptica, com o desenvolvimento da microscopia eletrônica e progressos na imunologia, biologia molecular, e demais áreas (REY, 2010). A parasitologia estuda, de forma geral, a relação parasito-hospedeiro, o parasitismo e suas implicações.

O parasitismo é a relação ecológica entre indivíduos de espécies diferentes (REY, 2010). Esta relação pode apresentar diferentes graus de dependência metabólica (REY, 2010). A associação do parasito ao hospedeiro é sobretudo nutritiva, pois o parasito depende do hospedeiro do qual retira seu alimento (REY, 2010). É também uma associação unilateral, em que o parasito é beneficiado e o hospedeiro prejudicado (NEVES *et al.* 2005). A dependência metabólica pode incluir enzimas e demais proteínas, como em tripanosomatídeos que ao perderem a capacidade de síntese da porfirina, dependem das hemoglobinas do hospedeiro (REY, 2010). Em suma, parasito é o indivíduo que se estabelece em um ou mais hospedeiros do qual se beneficia e depende para viver e se desenvolver (NEVES *et al.* 2005; REY 2010). Parasitos podem viver dentro do corpo do hospedeiro, denominados endoparasitos, sendo estes intracelulares ou extracelulares; ou viver fora do corpo, denominados ectoparasitos (NEVES *et al.* 2005). Hospedeiros são organismos que abrigam os parasitos, de forma intermediária, apenas na fase larval ou assexuada, ou de forma definitiva, hospedando o parasito em fase sexual, na qual se prolifera (NEVES *et al.* 2005). Há também os hospedeiros paratênicos que são abrigos temporários aos parasitos, onde não há desenvolvimento ou maturação, e, deste modo, não são necessários para o ciclo do parasito (REY, 2010; NEVES *et al.* 2005).

Em 1877, Patrick Manson comprovou que o meio de transmissão de nematódeos causadores de filariose se daria através de insetos (FOSTER, 1965). A descoberta de Manson revolucionou a parasitologia e o entendimento dos meios de transmissão dos agentes etiológicos através dos vetores (MASCARINI, 2003). A atenção dos cientistas à importância do vetor na proliferação da doença, foi se intensificando com o tempo, e a partir de 1899, Ronald Ross tentou erradicar a malária através da erradicação do mosquito vetor do gênero *Anopheles*, método que passou a ser utilizado como

profilático (MASCARINI, 2003). Os vetores têm papel fundamental no ciclo parasitológico, e sem a sua presença, ou de um reservatório que supra o seu papel, não é possível a sustentação do ciclo na natureza (NEVES *et al.* 2005; SIQUEIRA-BATISTA *et al.* 2011). Como mencionado anteriormente, segundo a WHO, sete entre as oito doenças infecciosas mais impactantes à saúde pública no mundo, são transmitidas por insetos vetores (CAMARGO, 2008).

A relação do homem e seu conhecimento dos parasitos é antiga, anterior ao século XIV como mencionado nos estudos de Manson (FOSTER, 1965). No antigo Egito já eram conhecidos os helmintos que afligiam os humanos (ÁVILA-PIRES, 1989). A estátua do faraó Mentuhotep II, datada a 2000 A.C. apresentava membros inferiores inchados, possivelmente decorrente de sintoma da filariose (CHANDY *et al.* 2011). As relações com insetos como intermediários de patologias também eram citadas desde a antiguidade, e além destes, a associação de animais à certas enfermidades, denominadas zoonoses, também faziam parte do conhecimento humano (ÁVILA-PIRES, 1989). Zoonoses são doenças ou infecções transmitidas naturalmente de animais vertebrados para humanos (WHO, 2018). Historicamente parasitos têm causado danos consistentes à saúde humana e animal, com diversas doenças assolando o mundo e se tornando principais objetivos de combate pela saúde pública (ÁVILA-PIRES, 1989; COX, 2002; MASCARINI, 2003). Atualmente o foco da comunidade médica e científica está nas doenças tropicais, a doença de Chagas causada por *Trypanosoma cruzi* e a malária causada por *Plasmodium vivax* e *P. falciparum* (MORRONE, 2004, WHO 2018). A doença de Chagas, causada por *T. cruzi* afeta atualmente cerca de 8 milhões de pessoas ao redor do mundo, sendo 5.7 milhões de habitantes da América Latina, onde é endêmica, e destes 1.56 milhão somente no Brasil (Figura 1) (WHO, 2015). No ano de 2017, foram estimados 219 milhões de casos de malária (Figura 2) (WHO, 2018). Nas Américas foram registrados 773 mil casos, sendo 236 mil no Brasil (WHO, 2018). Países africanos são os que apresentam maior incidência, um total de 92% de todos os casos diagnosticados de malária no mundo em 2017 (WHO, 2018).

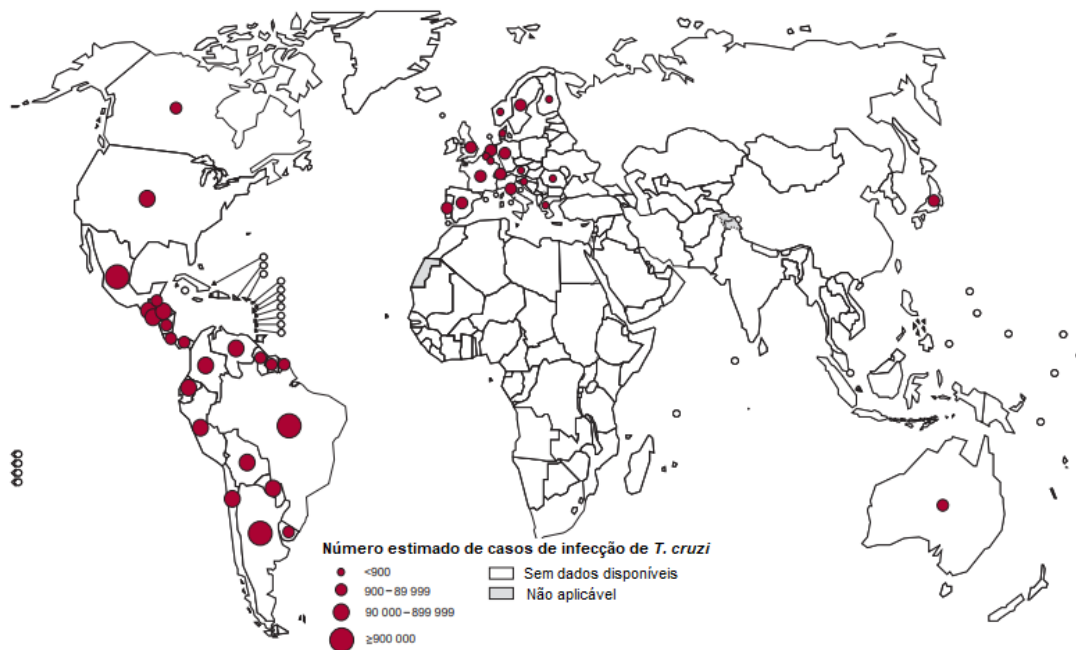


Figura 1: Estimativa de casos de Doença de Chagas no mundo com dados de 2006-2010, editado da “World Health Organization” (WHO 2018).

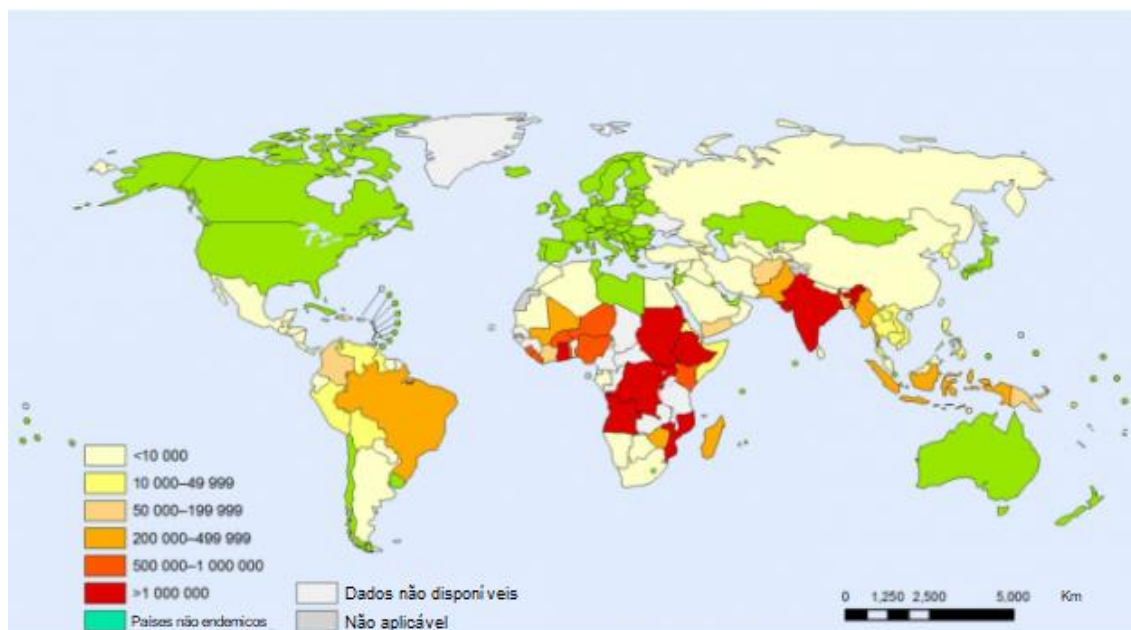


Figura 2: Casos confirmados de malária no mundo, dados de 2010, editado da “World Health Organization” (WHO 2018).

Estima-se que aproximadamente 61% de todos os organismos infectantes de humanos advém de outro animal (TAYLOR *et al.* 2001). Sendo assim, as zoonoses representam o meio mais impactante de transmissão de doenças ao ser humano (MORSE, 1995).

Recentemente, zoonoses que acometem animais silvestres, domésticos e o homem estiveram em foco no Brasil e no mundo. A esporotricose, uma micose subcutânea causada pelo fungo *Sporothrix schenckii*, que aflige felinos domésticos e selvagens, tem se mostrado difícil de erradicar e continua afetando humanos ao longo do país e, mesmo com os danos, continua sendo negligenciada pela medicina humana e veterinária (LACAZ *et al.* 1991; XAVIER *et al.* 2004; SILVA *et al.* 2012). Em 2009, o mundo se assustou com uma pandemia causada pelo vírus H1N1, que é um subtipo decorrente de mutação do vírus da Influenza A, o tipo de gripe mais comum em humanos. Foi denominada como “gripe suína” devido aos primeiros casos terem ocorrido no México a partir de uma variante da influenza A (H1N1) de origem suína (MACHADO, 2009). A gripe suína foi reportada em mais de 74 países durante o surto de 2009 (ZAROCOSTAS, 2009). No Brasil, atingiu 23 estados e o Distrito Federal, tendo em sua maioria casos alóctones, mas também apresentando casos autóctones (GRECO *et al.* 2009; MACHADO, 2009). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) e o “Center for Diseases Control” (CDC), o centro de controle de doenças nos Estados Unidos, não há risco de transmissão do vírus através da ingestão de carne de porco, porque ele será eliminado durante o cozimento em temperatura elevada (71 °C).

Outro surto de zoonose que esteve em foco no Brasil em 2016 e 2017 foi o da febre amarela, uma doença infecciosa causada por um vírus do gênero *Flavivirus* e transmitida por mosquitos dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* os principais vetores no ciclo silvático e *Aedes aegypti* no ciclo urbano (BARRET & MONATH, 2003; VACONSELOS *et al.* 2003; GOLDANI, 2017). O ciclo natural desta doença, ciclo silvático epizoonótico, envolve primatas não-humanos, conseqüentemente a importância

do monitoramento destes é de interesse tanto para a conservação da biodiversidade quanto para a preservação da saúde humana (VASCONSELOS, 2003; ALMEIDA *et al.* 2012, 2014).

No final do ano de 2019, 27 casos de pneumonia com origem desconhecida apareciam na província de Wuhan na China. A maioria dos casos teve em comum a presença dos infectados no mercado atacadista de frutos do mar de Wuhan, onde também são comercializados, além de peixes, porcos, morcegos e cobras (LU *et al.* 2020). O agente patogênico foi identificado como sendo um vírus da família Coronaviridae, ou coronavírus, posteriormente denominado SARS-CoV-2, e a doença como COVID-19 (LU *et al.* 2020; WHO, 2020). Em 30 de janeiro de 2020 a *World Health Organization* declarava emergência pública internacional, considerando uma pandemia (SOHRABI *et al.* 2020) que persiste, decorridos dez meses até este momento. De acordo com estudos filogenéticos, o SARS-CoV-2 tem como origem e possível reservatório animal o morcego, visto que a similaridade genética com o coronavírus detectado nestes animais é de 96,2% (FOSTER *et al.* 2020; SHEREEN *et al.* 2020). A relação intrínseca entre outros animais, sejam estes domésticos ou silvestres, só ressaltam a importância do monitoramento das interações humanas com estes animais com a finalidade de entender o ciclo das zoonoses e os possíveis impactos decorrentes da interação humana com os mesmos (DASZAK *et al.* 2000; BONILLA-ALDANA *et al.* 2020).

1.2 Primatas Neotropicais e o Gênero *Callithrix*

Os primatas neotropicais são representantes da infraordem Platyrrhini, também conhecidos como primatas do Novo Mundo, que vivem exclusivamente na América do Sul e Central (REIS *et al.* 2011). São um grupo diverso, com 152 espécies e 52 sub-espécies (RYLANDS & MITTERMEIER, 2012), sendo 118 espécies encontradas no território brasileiro, classificando assim o Brasil como o país com maior número de espécies de primatas neotropicais (PAGLIA *et al.* 2012). De acordo com o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBIO, 2014), 35 espécies são consideradas ameaçadas de extinção.

Dentre os diversos gêneros de primatas neotropicais, o gênero *Callithrix* (Mammalia, Primates) é composto por seis espécies: *C. kuhlli*, *C. flaviceps*, *C. geoffroyi*, *C. aurita*, *C. jacchus* e *C. penicillata* (Figura 3) (RYLANDS & MITTERMEIER, 2009). O sagui-de-wied *C. kuhlli*, tem distribuição limitada à Floresta Atlântica costeira no sul da Bahia e nordeste de Minas Gerais (Figura 4) (RYLANDS *et al.* 1988). É listada como “quase ameaçada” pelo ICMBio e “vulnerável” pela IUCN (RYLANDS & KIERULLF, 2008; PEREIRA, 2015; NEVES *et al.* 2019). O sagui-da-serra-claro *C. flaviceps*, que por muitos é considerada sub-espécie de *C. aurita* (COIMBRA-FILHO, 1986a, 1986b, 1990; RYLANDS *et al.* 2009), ocorre no sudeste de Minas Gerais e sul do Espírito Santo, principalmente na Serra da Mantiqueira (Figura 4) (RYLANDS *et al.* 2009). Atualmente é a espécie do gênero com o *status* de conservação mais preocupante, listada como “em perigo” pelo ICMBio e IUCN (RYLANDS & FERRARI & MENDES, 2008; HILÁRIO *et al.* 2015). O sagui-da-cara-branca *C. geoffroyi* ocorre no nordeste de Minas Gerais, norte do Espírito Santo e sul da Bahia (Figura 4) (RYLANDS *et al.* 1988). Seu *status* de conservação é considerado como “pouco preocupante” pelo ICMBio e IUCN (PEREIRA, 2015; RYLANDS &

MENDES, 2018). Três espécies de saguis são encontradas no estado do Rio de Janeiro: *C. aurita*, *C. jacchus* e *C. penicillata* (CUNHA & VIEIRA, 2004).

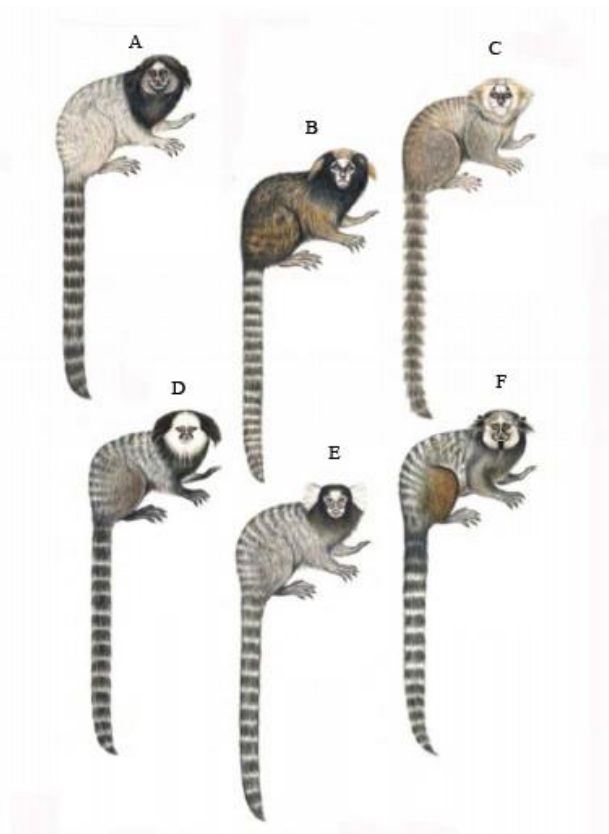


Figura 3: Espécies de saguis do Brasil: A – *Callithrix penicillata*; B – *C. aurita*; C – *C. flaviceps*; D – *C. geoffroyi*; E – *C. jacchus*; F – *C. kulii*. Retirado de Rylands *et al.* 2009.

Única dentre as espécies citadas, *C. aurita* ou sagui-da-serra-escuro, é nativa da região Sudeste do Brasil nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais (Figura 4) (RYLANDS *et al.* 1993). Atualmente esta espécie tem uma distribuição e abundância reduzidas se comparada às espécies invasoras no estado do Rio de Janeiro (CUNHA & VIEIRA, 2004), *C. jacchus* e *C. penicillata*, tendo 50% de sua população reduzida em um intervalo de 18 anos, sendo considerada como “vulnerável” quanto ao *status* de conservação pelo ICMBio e “em perigo” pela IUCN (RYLANDS *et al.* 2008; MELO *et al.* 2015; MELO *et al.* 2020). Ao contrário das espécies invasoras, *C. aurita* ocorre apenas em áreas montanhosas no estado (RYLANDS *et al.* 1993) com pelo menos 500 m de altitude (RYLANDS & FARIA, 1993). Segundo Norris (2011), a altitude ideal para a ocorrência desta espécie se encontra entre 608 – 1023 m. A perda de hábitat devido à influência antrópica é considerada a principal ameaça para a conservação da espécie (COIMBRA-FILHO, 1986b; BRANDÃO & DEVELEY, 1998).

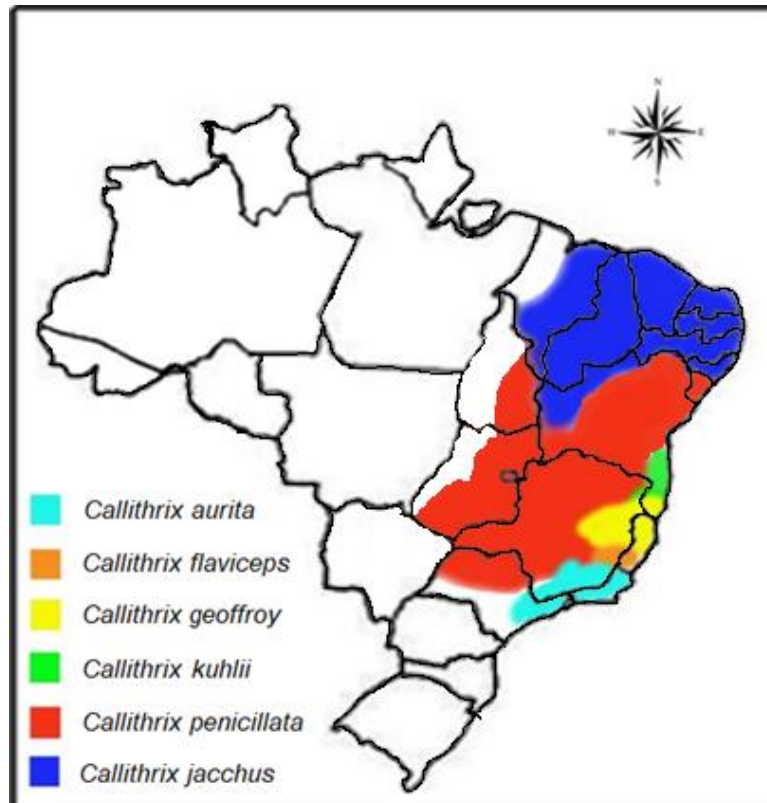


Figura 4: Distribuição das espécies de *Callithrix* (Callithrichidae:Primates) em território brasileiro. Elaborado por Diogo P. Coimbra (editado de encurtador.com.br/cJUW9).

O sagui *C. jacchus* ou sagui-de-tufos-brancos, ocorre naturalmente na região nordeste tanto nas áreas de Caatinga e de Mata Atlântica, nativo dos estados de Alagoas, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí e Rio Grande do Norte (Figura 4). Assim como *C. penicillata*, foi introduzido no Rio de Janeiro através do tráfico de animais e ambos se estabeleceram no estado (RYLANDS *et al.* 1993; RUIZ-MIRANDA *et al.* 2000). Atualmente é considerado com o *status* “pouco preocupante” pelo ICMBio e IUCN (VALENÇA-MONTENEGRO *et al.* 2012; BEZERRA *et al.* 2018)

O sagui-de-tufos-pretos *C. penicillata*, é nativo da área central do Brasil, principalmente das áreas de cerrado, com distribuição ao longo de Goiás, Tocantins, São Paulo, Minas Gerais e Bahia (Figura 4) (RYLANDS *et al.* 1993). Seu *status* de conservação é também considerado “pouco preocupante” pelo ICMBio e IUCN (RÍMOLE *et al.* 2015; BICCA-MARQUES *et al.* 2018).

Espécies invasoras são aquelas que não são nativas da área geográfica onde habitam, ou seja, foram introduzidas fora de sua região de origem, causando desequilíbrio ecológico e podendo ameaçar diferentes habitats (LOWIE, 2010). Um levantamento da ONU aponta que um milhão de espécies de animais e plantas estão ameaçados de extinção, e cinco são as principais causas: perda de habitat, exploração de recursos naturais, mudanças climáticas, poluição e espécies invasoras (ONU, 2019). Com relação aos saguis, alguns fatores propiciaram a invasão dessas duas espécies na região sudeste, por exemplo: a intervenção humana, principalmente, devido ao tráfico de animais; o acompanhamento da degradação da Floresta Atlântica e a adaptação aos

centros urbanos (COIMBRA-FILHO, 1983; COIMBRA-FILHO & CÂMARA, 1996; BICCA-MARQUES, 2016). Outra característica importante para a adaptação de *C. jacchus* e *C. penicillata* à diferentes habitats é que ambas são onívoras generalistas, utilizando uma ampla variedade de itens alimentares (STEVENSON & RYLANDS, 1988; MIRANDA & FARIA, 2001; VILELA & FARIA, 2002). A interação de *C. aurita* com as espécies invasoras, é considerada um dos motivos do seu *status* como vulnerável, entre outros fatores, devido à hibridação (RYLANDS *et al.* 1993, 2008; RUIZ-MIRANDA *et al.* 2000; CARVALHO *et al.* 2013; MELO *et al.* 2015; DETOGNE *et al.* 2017).

Em recente revisão de literatura feita por Solórzano-Garcia & León (2018) foram contabilizadas 36 espécies diferentes de parasitos que podem infectar primatas do gênero *Callithrix* (Figura 5). Com relação à *C. aurita*, somente um parasito, o nematoda *Primasubulura jacchi*, foi detectado.

<i>Callithrix</i>		
<i>Callithrix aurita</i>	Nematoda	<i>Primasubulura jacchi</i>
<i>Callithrix geoffroyi</i>	Protozoa	<i>Plasmodium brasilianum</i> , <i>Trypanosoma cruzi</i>
	Acanthocephala	<i>Oncicola juxtatesticularis</i> , <i>Pachysentis lenti</i>
	Nematoda	<i>Rictularia nycticebi</i> *
	Acariformes	<i>Fonsecalges johnjadini</i>
<i>Callithrix jacchus</i>	Protozoa	<i>Sarcocystis</i> sp., <i>Giardia</i> sp., <i>Giardia intestinalis</i> , <i>Leishmania chagasi</i> , <i>Plasmodium malariae</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Trypanosoma cruzi</i> , <i>T. minasense</i>
	Trematoda	<i>Athesmia foxi</i> , <i>Leiptertrema foxi</i> , <i>Platynosomum amazonensis</i> , <i>Schistosoma mansoni</i>
	Acanthocephala	<i>Acanthocephalus</i> fam. Gen. sp., <i>Oncicola sigmoides</i> , <i>Prosthenorchis elegans</i> , <i>P. spirula</i>
	Nematoda	<i>Dipetalonema gracile</i> , <i>D. marmosetae</i> , <i>Filariopsis barretoii</i> , <i>Molineus verxillarius</i> , <i>Necator americana</i> , <i>Primasubulura distans</i> , <i>P. jacchi</i> , <i>Subulura</i> sp., <i>Trichospirura leptostoma</i> , <i>Trypanoxyuris callithricis</i>
	Pentastomida	<i>Amillifer</i> sp.
	Acanthocephala	<i>Prosthenorchis elegans</i>
	Protozoa	<i>Cryptosporidium</i> sp., <i>Isospora arctopitheci</i> , <i>Leishmania</i> sp.*, <i>L. braziliensis</i> *, <i>L. amazonensis</i> *, <i>Trypanosoma cruzi</i> , <i>T. minasense</i> *
<i>Callithrix kuhlii</i>	Trematoda	<i>Fasciola hepática</i> *, <i>Platynosomum illiciens</i>
	Acanthocephala	<i>Acanthocephalus</i> fam., gen. sp.
	Nematoda	<i>Physaloptera dilatata</i> , <i>Primasubulura jacchi</i> , <i>Strongyloides stercoralis</i> *, <i>S. venezuelensis</i> *, <i>Trichospirura leptostoma</i>
	Acariformes	<i>Fonsecalges</i> sp., <i>Listrocarpus hepalei</i>
	Cestoda	Dilepididae gen. sp.
<i>Callithrix</i> sp.	Nematoda	Ancylostomatidae gen. sp.

Figura 5: Relação das espécies de sagui do gênero *Callithrix* e os parasitos encontrados na revisão de literatura feita por Solórzano-Garcia & León (2018).

Verona (2008), detectou 88 possíveis agentes etiológicos em *C. jacchus*, dentre bactérias, fungos, protozoários e helmintos, no Parque Nacional da Tijuca (PNT) na cidade do Rio de Janeiro. Com relação aos hematozoários foram registradas infecções por *Trypanosoma minasense*, *T. devei* e microfíliarias.

Análises epidemiológicas e parasitológicas em animais silvestres são essenciais para a conservação da biodiversidade, devido ao fato de que as doenças desempenham um papel importante na redução de biodiversidade (DASZAK *et al.* 2000; PEDERSEN *et al.* 2007).

1.3 *Trypanosoma*

Tripanosomatídeos são protozoários parasitas com um só flagelo e uma organela chamada cinetoplasto (REY, 2010). Em sua maioria, possuem um ciclo de vida semelhante, com transmissão através de um inseto vetor hematófago da família Reduviidae, como nos casos de *Trypanosoma cruzi* (Figura 6), *T. devesi* e *T. rangeli* (HOARE, 1972; BURLEIGH & ANDREWS, 1995; HAAG *et al.* 1998).

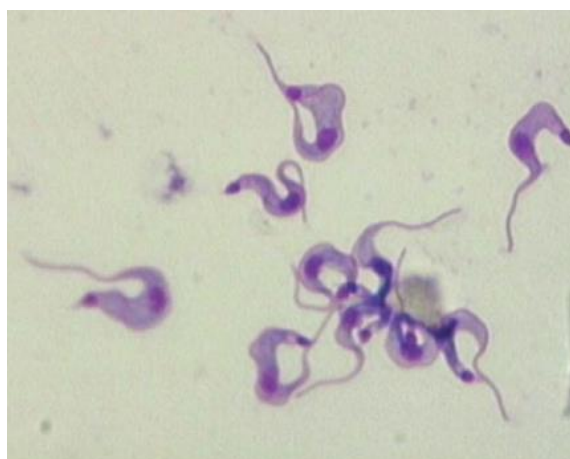


Figura 6: Formas tripomastigotas do parasito *Trypanosoma cruzi*. Retirado de Maldalosso *et al.* 2004.

Algumas espécies de vetores se destacam, como: *Triatoma infestans*, *Rhodonius prolixus* e *Panstrongylus megistus* vetores de *Trypanosoma cruzi* e *T. rangeli*, as moscas tsé-tsé *Glossina* sp. vetores de *T. brucei* e *T. vivax* no continente africano, e as moscas *Stomoxys calcitrans* e *Stomoxys nigrans* vetores de *T. vivax* (Figura 7) (PAIVA *et al.* 2000; GUHL & VALLEJO 2003; LISBOA *et al.* 2004; REY, 2010; SANGENIS *et al.* 2015; ZINGALES, 2017).

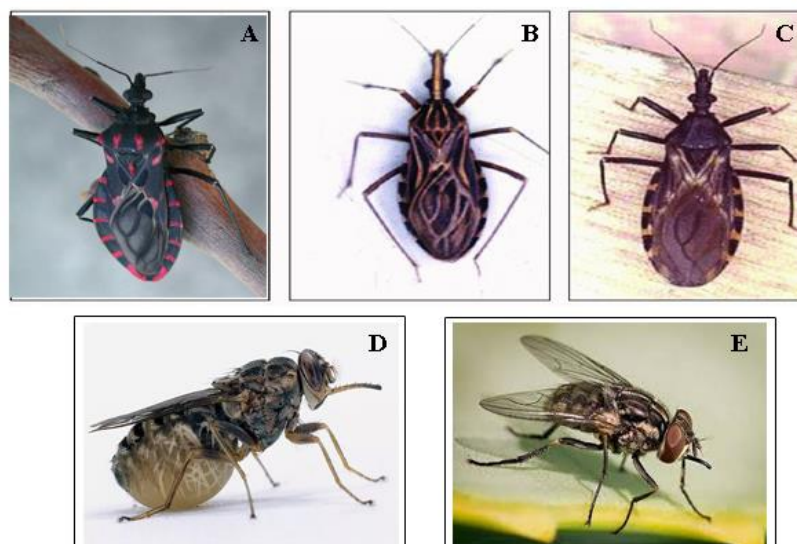


Figura 7: Vetores de algumas espécies de *Trypanosoma* sp. A - *Panstrongylus megistus*; B - *Rhodnius prolixus*; C - *Triatoma infestans*; D - *Glossina* spp.; E - *Stomoxys calcitrans*. Retirado do Google® (JURBERG & GALVÃO, 2003; GUHL & VALLEJO, 2009; Dorling Kindersley/Getty Images, Pavel Krok/Fir0002).

A infecção por *Trypanosoma* acontece quando o vetor se alimenta de sangue do hospedeiro e libera os parasitos no estágio tripomastigota metacíclico ao defecar. Estes adentram o hospedeiro através da ferida da picada ou pela mucosa, invadindo uma célula nucleada para continuar o seu desenvolvimento (Figura 8) (BURLEIGH & ANDREWS, 1995). Em seguida, os tripomastigotas, realizam o processo de fagocitose induzida, onde os microtúbulos do citoesqueleto da célula hospedeira direcionam lisossomos para o local onde está o parasito na célula hospedeira, fundindo-se com a membrana, criando assim um vacúolo por onde o parasito adentra a célula (TYLER & ENGMAN, 2001; REY, 2010). A acidificação resultante da fusão do lisossomo com a membrana estimula a produção da proteína Tc-Tox que facilita a saída do parasito do vacúolo ganhando assim o citoplasma da célula, onde se diferencia para amastigota, multiplicando-se e formando um pseudocisto (DVORAK, 1976; ANDREWS, 1993; TYLER & ENGMAN, 2001). Quando o pseudocisto é formado, gradualmente as formas amastigotas se diferenciam novamente em tripomastigotas, ganhando a corrente sanguínea e continuando o ciclo no hospedeiro ou sendo ingeridas pelo vetor (Figura 8) (TYLER & ENGMAN, 2001).

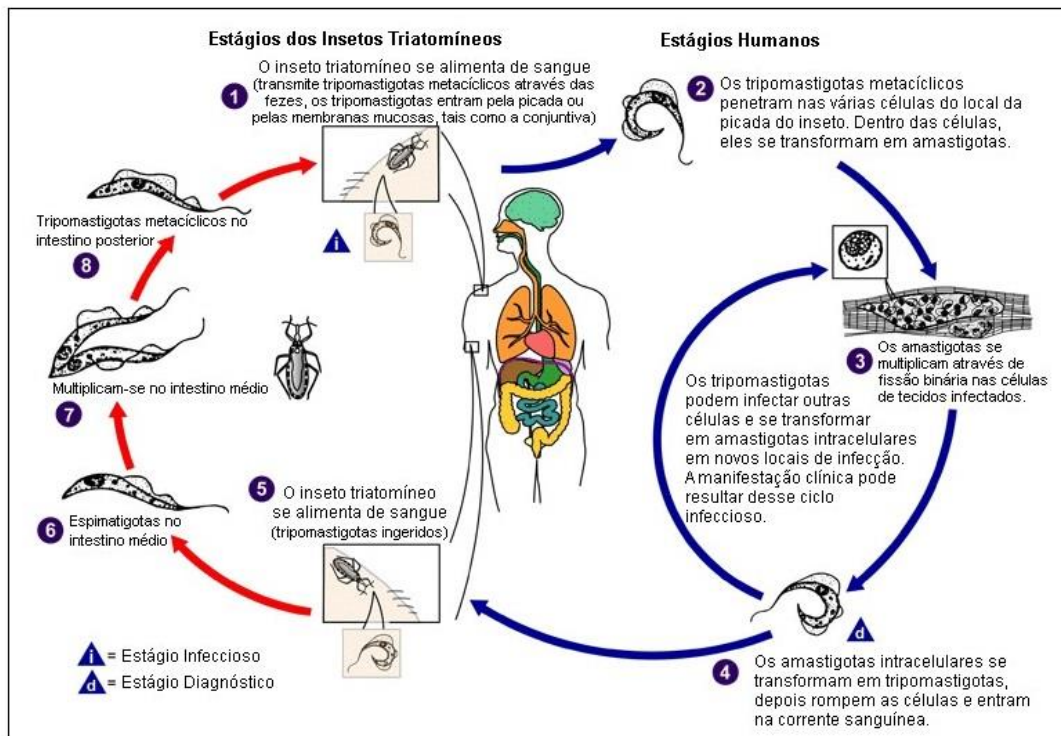


Figura 8: Ciclo de vida do parasito *Trypanosoma cruzi*, agente infeccioso da doença de Chagas, e seus estágios no vetor triatomíneo e no hospedeiro humano. Modificado do “Center for Diseases Control and Prevention” - CDC <https://bit.ly/2IPpn5J>.

Tripomastigotas carregados pela corrente sanguínea, infectam diversos tipos de células: hemácias, macrófagos, tecidos musculares lisos, como no caso sistema digestório, e tecidos musculares esqueléticos, como no caso do miocárdio (TYLER & ENGMAN, 2001; BURLEIGH & ANDREWS, 1995; REY, 2010). Tripanosomatídeos possuem uma variedade de hospedeiros além dos humanos, todos mamíferos, dentre eles: gambás, tatus, morcegos, preás e os primatas neotropicais, por exemplo, calitriquídeos e cebídeos (ZICCARDI & LOURENÇO-DE-CARVALHO, 1998, 2000; MADALOSSO *et al.* 2004; MAIA DA SILVA *et al.* 2008; SATO *et al.* 2008; REY 2010).

Dentre os tripanosomatídeos há espécies com características únicas dentro do grupo, como a relação da parasitemia com o ciclo circadiano, em *T. minasense* (DEANE *et al.* 1974). Parasitos desta espécie apresentam diferentes níveis de parasitemia ao longo do dia, com pico a partir das 16h (DEANE *et al.* 1974). Outra característica do grupo dos tripanosomatídeos é o polimorfismo de tamanho observado em *T. cruzi* e *T. minasense* (BRENER, 1969; ZICCARDI & LOURENÇO-DE-CARVALHO, 1999).

1.4 Microfilária

As filárias são nematóides, vermes redondos e filiformes de pequeno tamanho, da ordem Spirurida e família Onchocercidae (Figura 9) (REY, 2010). Em sua maioria são transmitidas por insetos hematófagos dípteros, comumente conhecidos como moscas e mosquitos, mas também podem ser transmitidos por carrapatos e piolhos (ANDERSON, 2000; REY, 2010). Os principais gêneros de dípteros vetores de filárias são *Aedes* spp., *Culex* spp. e *Anopheles* spp. (EVANS *et al.* 1993; LARDEUX *et al.* 2002; SILVA & LANGONI, 2008; STOOPS *et al.* 2010). A denominação microfilária se refere às larvas filarióides com desenvolvimento no sangue, linfa, tecido subcutâneo, intermuscular e adiposo do hospedeiro (ANDERSON, 2000; REY 2010). Os mosquitos se infectam ao se alimentar do sangue do hospedeiro contendo microfilária (Figura 10). Estas, após serem ingeridas perfuram a parede do estômago através de interações hidrofóbicas e migram para a hemocele, se alojando posteriormente em tecidos específicos de acordo com a espécie. Por exemplo, os túbulos de Malpighi em *Dirofilaria* sp. e os músculos torácicos no caso de *Wuchereria* sp., onde se desenvolvem para o estágio infeccioso (Figura 10) (ANDERSON, 2000; TYLER & ENGMAN, 2001; FOX & KING, 2013). Posteriormente, as larvas saem dos tecidos em que se desenvolveram e migram através da hemocele para os lábios ou probóscide, de onde podem ser inoculadas no hospedeiro (Figura 10) (NAYAR & KNIGHT, 1999; REY, 2010; FOX & KING, 2013).

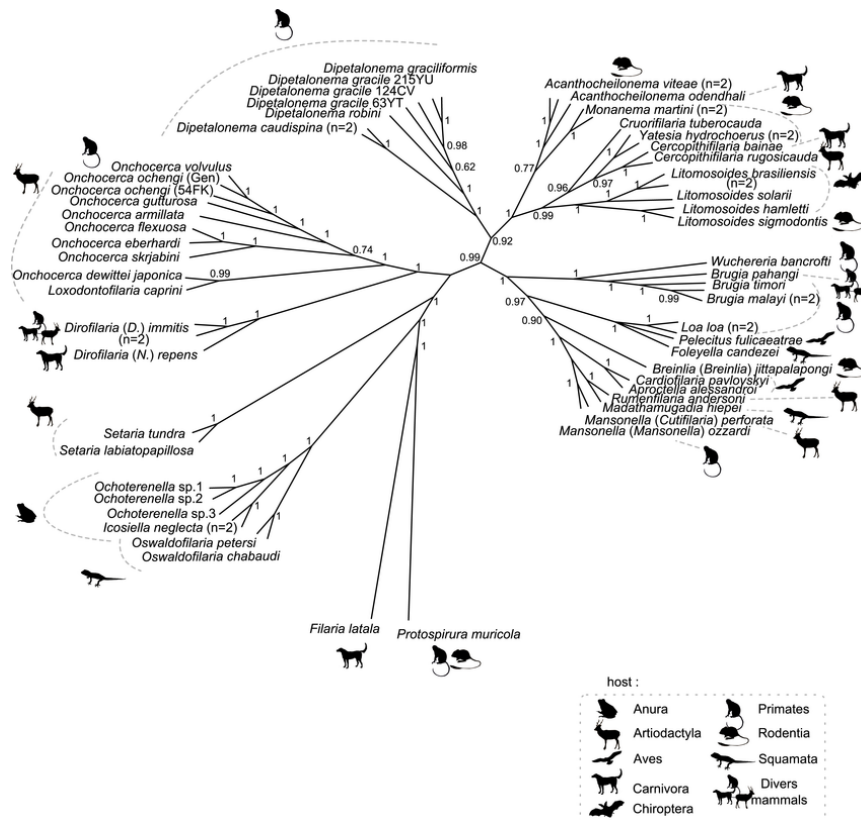


Figura 9: Filogenia da família Onchocercidae com base na sequência dos genes *12S rRNA*, *COX1*, *RBPI*, *ST13*, *myoHC*, *18S rRNA* e *28S rRNA*, e os respectivos hospedeiros de cada espécie. Retirado de Lefoulon *et al.* 2015.

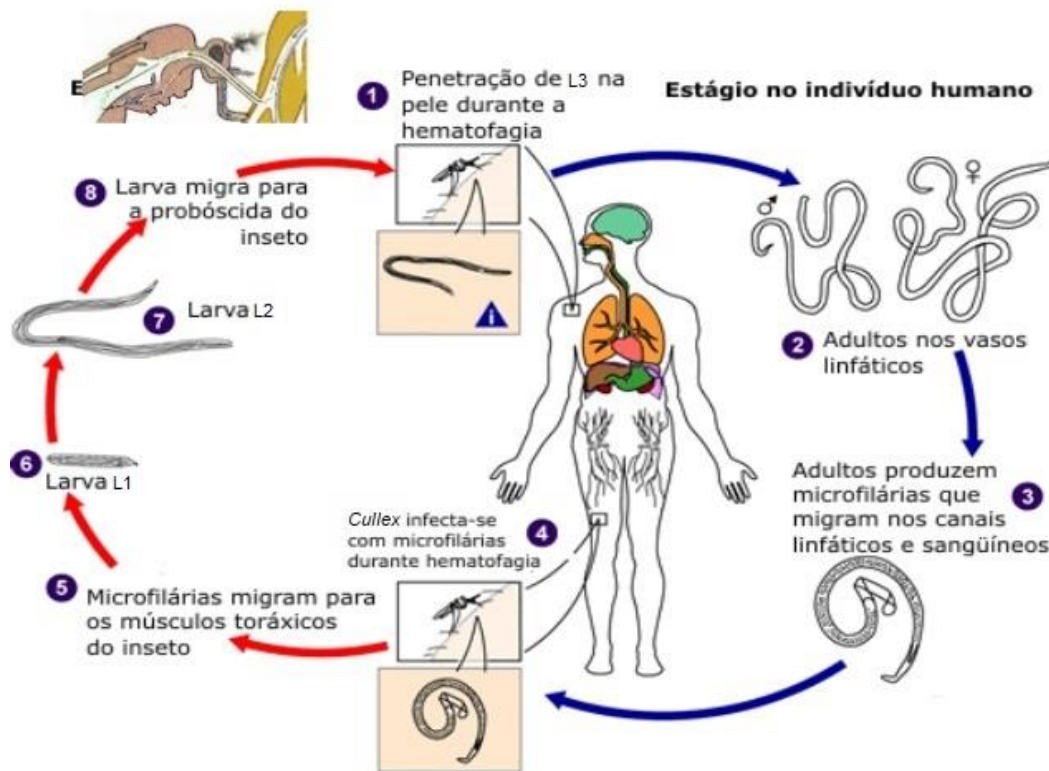


Figura 10: Ciclo de vida e estágios de desenvolvimento da filária *Wuchereria bancrofti*, causadora da elefantíase em humanos. Alterado de “Center of Disease Control” - CDC <https://bit.ly/2jNah65>.

Dentre as espécies de filárias *Wuchereria bancrofti* e *Dirofilaria immitis* se destacam pela sua importância na medicina humana e veterinária. A primeira espécie é a causadora da elefantíase em humanos, filariose do sistema linfático que pode causar diversas inflamações e conseqüentemente o aumento exagerado dos membros (REY, 2010). A filariose linfática é considerada, uma doença tropical negligenciada, com aproximadamente 856 milhões de pessoas infectadas com *W. bancrofti* em 52 países diferentes, sendo 40 milhões desfiguradas ou incapacitadas devido aos sintomas (WHO, 2018). A segunda espécie, *D. immitis*, conhecida também como *heartworm* ou parasito do coração, possui diversos hospedeiros, causando inflamações e obstruções nas artérias, ou lesões no pulmão ou coração (ETTINGER & FELDMAN, 1995). Os principais hospedeiros são os cães domésticos e demais canídeos, mas podem também parasitar lontras, ursos, gatos domésticos e selvagens, cavalos, castores e humanos (ORIHIEL & EBERHARD, 1998; SILVA & LANGONI, 2008). Tem distribuição ampla ao redor do mundo, em países como Brasil, Portugal e Japão (SILVA & LANGONI, 2008; OI *et al.* 2014; VIEIRA *et al.* 2014). Os vetores são mosquitos dos gêneros *Culex* spp., *Aedes* spp. e *Anopheles* spp. (SILVA & LANGONI, 2008). Considerando os vetores, a ocorrência do parasito está diretamente associada às condições climáticas, principalmente ao índice pluviométrico (SILVA & LANGONI, 2008). Outros fatores devem ser considerados, como o tamanho da população de cães, densidade de mosquitos e frequência de interação de hospedeiros com vetores (GARCEZ *et al.* 2006). Primatas neotropicais podem se infectar por diversas espécies de microfilárias, e em

relação aos saguis já foram detectadas infecções por *Dipetalonema marmosetae*, *D. gracile*, *Mansonella mariae* e *M. ozzardi* (SOLÓRZANO-GARCIA & LÉON, 2008; SATO *et al.* 2008).

O método convencional de diagnóstico e identificação de filárias é a microscopia óptica com observação de esfregaços sanguíneos corados com Giemsa (SINGH *et al.* 2013).

1.5 Babesia

Babesiose é uma doença infecciosa causada por protozoários hemoparasitos do filo Apicomplexa, ordem Piroplasmida e família Babesiidae, na qual podem ser destacados três gêneros de importância médica e veterinária: *Babesia*, *Theileria* e *Cytauxzoon* (Figura 11) (GENCHI, 2007; PIETROBELLI *et al.* 2007). Piroplasmídeos da família Babesiidae necessitam de um carrapato da família Ixodidae como vetor para completar seu ciclo (PIETROBELLI *et al.* 2007). Todo o desenvolvimento sexual ocorre dentro dos carrapatos, sendo feita a transmissão ao hospedeiro através da saliva do vetor (GENCHI, 2007). Dentre os diferentes gêneros de Ixodidae, os principais vetores destes piroplasmídeos são *Boophilus*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Ixodes* e *Rhipicephalus* (PIETROBELLI *et al.* 2007). Para *Babesia*, a fase assexuada é completada com os merozoítos dentro do eritrócito do hospedeiro vertebrado que após várias replicações dos parasitos se rompe, causando anemia hemolítica, febre, hemoglobinúria, anorexia, perda de peso, podendo levar a morte (TELFORD, 1993; GENCHI, 2007). Diferentes espécies de *Babesia* podem infectar diferentes animais silvestres e domésticos, tais como: gado, ovelhas, equinos, suínos, canídeos, felinos, roedores, além de infectar também o homem (PIETROBELLI *et al.* 2007). No Rio de Janeiro, a babesiose é uma patologia recorrente em animais domésticos nos arredores do PNT e do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (JBRJ) (HELIODORO *et al.* 2020). A babesiose provoca prejuízos significativos na pecuária em áreas tropicais e subtropicais, onde é mais frequente (ALTAY *et al.* 2007). No entanto, estes piroplasmídeos estão presentes ao redor do mundo e são constantemente o foco de pesquisadores devido à sua importância na saúde humana e animal (PIETROBELLI *et al.* 2007).

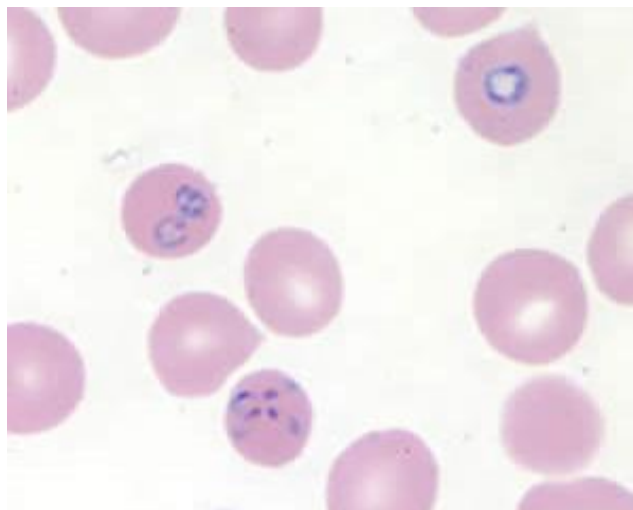


Figura 11: Esfregaço sanguíneo corado com Giemsa, com eritrócitos infectados por *Babesia* sp. Retirado de <https://bit.ly/2EdkPog>.

A descoberta da babesiose foi feita no final do século XIX, em 1888, quando Babes associou o parasito à hemoglobinúria ou “febre da água vermelha” (BABES, 1888; GENCHI, 2007). Em 1893, Smith e Kilbourne observaram e nomearam *Pyrosoma bigeminum* um parasito similar em esfregaços sanguíneos de gado, o qual se suspeitava ser o agente etiológico da febre do gado do Texas nos Estados Unidos, sendo transmitido por carrapatos (SMITH & KILBOURNE, 1893; GENCHI, 2007). A primeira suspeita de infecção por *Babesia* em humanos foi descrita por Wilson e Chowning em 1904, através de observações de um parasito com formato de piroplasmídeo dentro de um eritrócito em esfregaços sanguíneos de pacientes com a “Rocky Mountain Fever”, frequente no oeste dos Estados Unidos (GENCHI, 2007). Entretanto, a primeira infecção confirmada foi em 1957 em um fazendeiro de gado iugoslavo que faleceu após oito dias de febre e hemoglobinúria (SKRABALO & DEANOVIC, 1957; GENCHI, 2007). O gado de sua fazenda apresentou infecção por *Babesia bovis* uma semana antes de sua doença (SKRABALO & DEANOVIC, 1957).

Até o momento, só são relatados casos de babesiose em primatas do velho mundo, tanto de vida livre como em cativeiro (WEL *et al.* 2008; MAAMUN *et al.* 2011). Entretanto, experimentalmente foi constatada a infecção por *Babesia* sp. em *Saimiri sciureus* e *Cebus apella* (MOORE & KUNTZ, 1981).

Os objetivos deste capítulo foram: investigar a carga parasitária de hemoparasitos de saguis *Callithrix* sp. da Região Metropolitana do Rio de Janeiro através da microscopia óptica; identificar os parasitos através de análises morfométricas; analisar a prevalência e intensidade média dos parasitos encontrados e comparar os resultados entre as localidades de vida livre e cativeiro.

Algumas hipóteses são levantadas: não há diferença na carga parasitária e diversidade de hemoparasitos nas amostras de animais de localidades de vida livre e cativeiro; a hipótese a ser testada é de que as localidades de vida livre possuem maior probabilidade de apresentar infecções devido à diversidade e disponibilidade de nichos,

contato com outros espécimes e a um número menor de fatores de impedimento físico entre os vetores e hospedeiros.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Espécies estudadas

Os animais-modelo deste estudo foram os saguis do gênero *Callithrix*. Em torno de 85% dos indivíduos estudados foi observado um padrão de pelagem intermediário entre *C. jacchus* e *C. penicillata* (SILVA, 2018) que pode ser decorrente de adaptação ou hibridação, o que pode sugerir a presença de indivíduos puros e híbridos dentre os amostrados (RYLANDS *et al.* 1993; MALUKIEWICZ, 2018). Por este motivo, os indivíduos amostrados foram identificados neste estudo como *Csp* (*Callithrix* sp.) seguidos da numeração referente à ordem de captura. Os saguis-de-tufos-brancos, *Callithrix jacchus*, e os saguis-de-tufos-pretos, *C. penicillata*, (Figura 12) possuem um padrão de pelagem característico, com tufos pré-auriculares pretos em *C. penicillata* e circum-auriculares brancos em *C. jacchus* (STEVENSON & RYLANDS, 1988; VIVO, 1991).

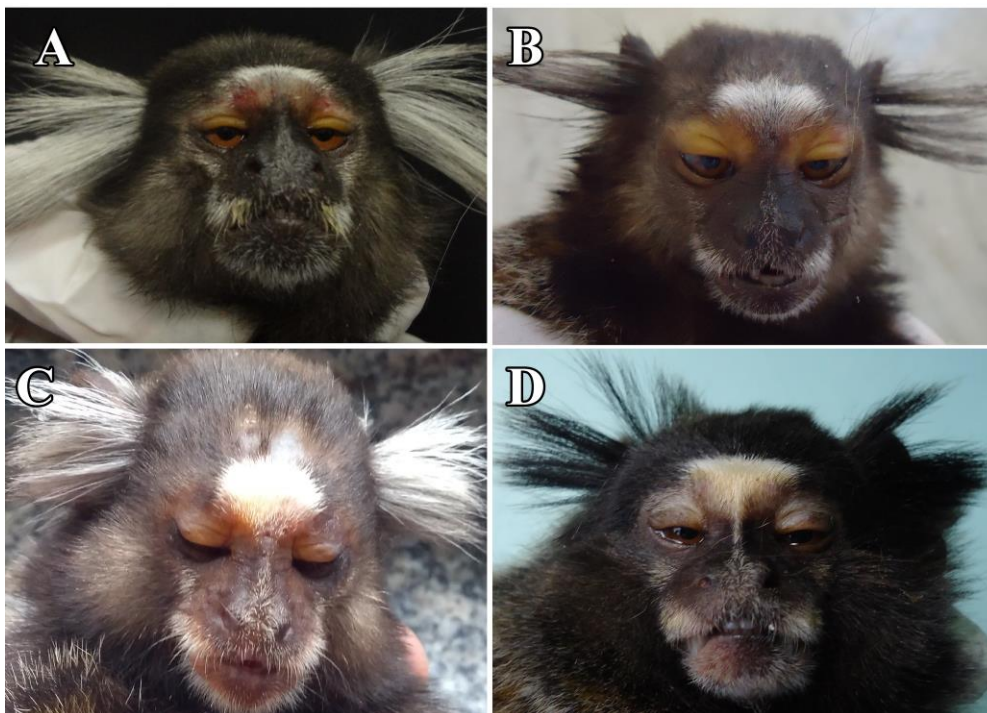


Figura 12: Face de saguis (*Callithrix*: Primates) amostrados, representando a variação fenotípica com diferentes padrões de cor e formato dos tufos auriculares. A - *Csp*18 capturado no JBRJ, B - *Csp*56 da UFRRJ, C - *Csp*45 do CETAS-RJ e D - Uni3 do CRAS-UNIVAP.

São macacos de pequeno porte, com os adultos pesando entre 300 a 450 g, medindo 25 cm em média da cabeça ao final do corpo e 28 cm de cauda (REIS *et al.* 2011). São arborícolas (STEVENSON & RYLANDS, 1988) e onívoros generalistas, se alimentando de frutos, insetos, néctar, exsudatos, flores, sementes, moluscos, ovos e pequenos vertebrados (STEVENSON & RYLANDS, 1988; MIRANDA & FARIA, 2001; VILELA & FARIA, 2002).

2.2 Áreas de Estudo

As localidades de vida livre onde foram capturados os saguis estudados estão incluídas na Região Metropolitana Rio de Janeiro, RJ, BR. A Região Metropolitana é composta pelas cidades do Rio de Janeiro, Niterói, Guapimirim, Magé, São Gonçalo, e cidades da baixada fluminense como Nova Iguaçu, Duque de Caxias e Seropédica, totalizando 21 municípios. Nela, se encontra 74% da população do estado com amplo contato entre urbanização e o Meio Ambiente (CEPERJ/RJ, 2017). Esta região, detém 21 Unidades de Conservação (INEA, 2017) com aproximadamente 19.5% de cobertura vegetal, de acordo com dados da Fundação SOS Mata Atlântica/SOSMA (2019) e do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais/INPE (2017). A cidade do Rio de Janeiro é considerada a quarta capital do país com maior porcentagem de cobertura vegetal, atrás do Recife, Florianópolis, e em primeiro lugar está Porto Alegre (SOSMA, 2019). Há uma estreita convivência entre seres humanos e outras diversas espécies animais, na Região Metropolitana do Rio de Janeiro, dentre as quais destacamos os saguis do gênero *Callithrix* Erxleben, 1777 (STEVENSON & RYLANDS, 1988).

Os locais de amostragem dos saguis de vida livre foram: o campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (22°45'47''S, 43°41'18''O), no município de Seropédica e o Jardim Botânico do Rio de Janeiro (22°58'7"S, 43°13'30"W) na cidade do Rio de Janeiro (Figura 13).

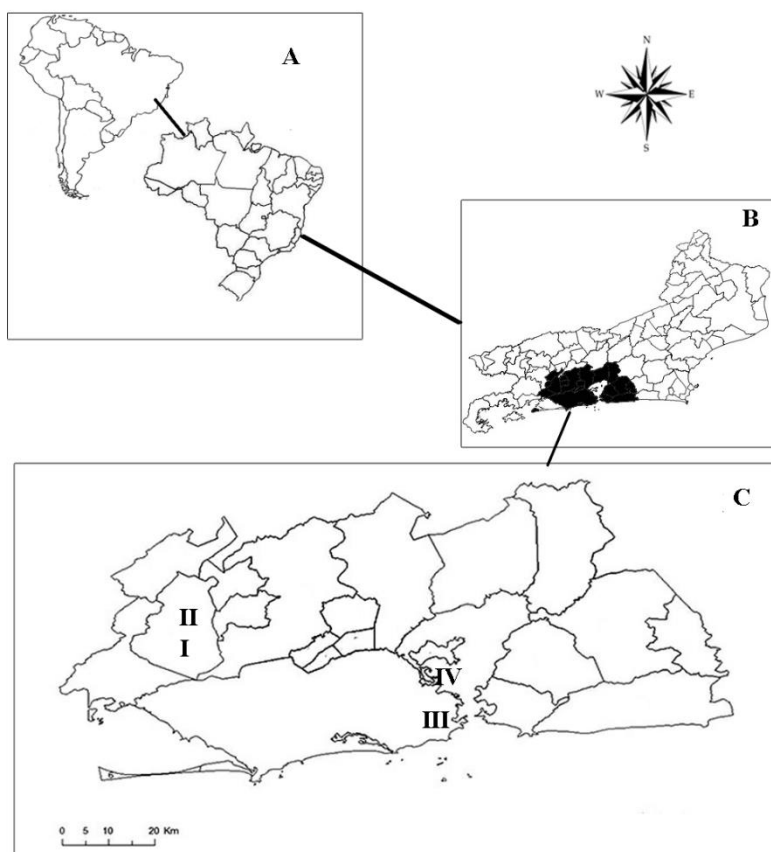


Figura 13: Mapas destacando a área de estudo. A - América do Sul e Brasil; B - Rio de Janeiro; C - Região Metropolitana; I - Campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; II - Centro de Triagem de Animais Silvestres do Rio de Janeiro, CETAS-RJ; III - Jardim Botânico do Rio de Janeiro; IV - Biotério do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ (Imagem editada de encurtador.com.br/cJUW9, encurtador.com.br/mxCT8 e encurtador.com.br/amtMN).

O município de Seropédica se encontra a 50 km da capital do Rio de Janeiro. Possui uma área de 283.794 m² e uma população 84.416 habitantes (IBGE, 2008). Nele, está localizada a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/UFRRJ (Figura 13 C-I) contendo 3.024 hectares (ha) com fragmentos de vegetação natural ou manejada. No campus da UFRRJ as capturas foram realizadas no período de 01/2018 a 11/2018.

O Jardim Botânico do Rio de Janeiro (JBRJ) está situado na região sul da cidade do Rio de Janeiro (Figura 13 C-III), ocupando 137 ha de área florestada, dos quais 54 ha correspondem ao arboreto e 83 ha a um fragmento de Mata Atlântica (RANGEL *et al.* 2011). Há uma conexão natural do fragmento de Mata Atlântica ao Parque Nacional da Tijuca (PNT) possibilitando a circulação da fauna autóctone (RANGEL *et al.* 2011). O JBRJ é também um importante ponto turístico da cidade localizado em uma área com alta densidade demográfica. Possui uma média anual de 600 mil visitantes que juntamente aos moradores e funcionários, interagem com saguis oferecendo diversos tipos de alimentos (RANGEL, 2010). Nesta localidade as capturas foram realizadas no período de 04/2016 a 09/2016.

Os locais de amostragem de cativo foram: o Centro de Triagem de Animais Silvestres do Rio de Janeiro (CETAS-RJ), que se encontra dentro da Floresta Nacional (FLONA) Mario Xavier, localizada na BR 465 Km 05 ($22^{\circ} 44' 38''\text{S}$, $43^{\circ} 42' 28''\text{W}$) (Figura 13 C-II), o Biotério do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ (Biotério-UFRJ), Avenida Carlos Chagas Filho, 373, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro - RJ ($22^{\circ}50'39''\text{S}$, $43^{\circ}14'15''\text{O}$) (Figura 13 C-IV) e no Centro de Reabilitação de Animais Silvestres na Universidade do Vale do Paraíba (CRAS-UNIVAP) Av. Shishima Hifumi, 2911 - Urbanova, São José dos Campos - SP, 12244-000 ($23^{\circ} 12' 51'' \text{ S}$, $45^{\circ} 56' 59'' \text{ W}$) (Figura 14).

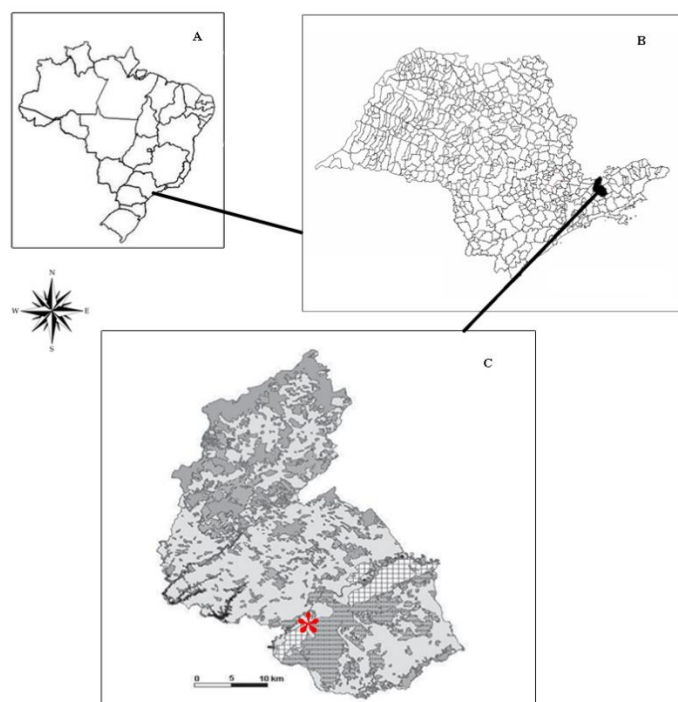


Figura 14: Mapa destacando a localidade de amostragem de cativo de *Callithrix* sp. no Centro de Reabilitação de Animais Silvestres da Universidade do Vale do Paraíba/CRAS-UNIVAP, SP. A - Brasil; B - Estado de São Paulo; C - município de São José dos Campos; * UNIVAP (Imagens editadas de encurtador.com.br/cJUW9, encurtador.com.br/yEIO1 e Guisard & Kuplich 2009).

O CETAS-RJ recebe animais silvestres provenientes de entrega voluntária, resgate, fiscalização e apreensão. Os animais são reabilitados e destinados à soltura, quando aptos. Os animais amostrados no CETAS-RJ não tinham procedência conhecida. As amostras foram coletadas no período de 12/2017 a 07/2018, com o auxílio do Biólogo Chefe Daniel Marchesi Neves.

O Biotério-UFRJ é um centro de pesquisas acadêmicas, físicas e biológicas, com aplicações em modelos animais. Os animais do Biotério-UFRJ se encontravam em cativeiro há mais de 6 meses, vindos do município de Campos dos Goytacazes, norte fluminense. As amostras dos indivíduos de *Callithrix* spp. do Biotério-UFRJ foram coletadas em julho de 2016.

O CRAS-UNIVAP é um criadouro conservacionista e mantenedor da fauna silvestre, registrado no IBAMA (1223856). Dentre os animais amostrados, cinco (Uni1-Uni5) nasceram dentro das instalações do CRAS-UNIVAP, os demais não têm procedência conhecida e foram recebidos por entrega voluntária. As amostras foram coletadas no dia 30/11/2018, com o auxílio da equipe da instituição, composta por biólogos, médicos veterinários e tratadores, liderada pela Médica Veterinária Hanna Sibuya Kokobun. Toda a instalação do CRAS-UNIVAP era coberta por telas anti mosquito, isolando os animais e com o objetivo de impossibilitar a circulação de vetores. Devido às condições destas instalações e pelo fato de estar localizado fora do Rio de Janeiro este centro de recuperação foi incluído como localidade externa para fins de comparação.

Todos os procedimentos de captura e manipulação dos animais estudados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (número 004/2018) e autorizados pelo Sisbio/ICMBio/MMA (licenças 20435-2 e 59088-1).

2.3 Procedimentos de Captura, Identificação Individual, Registro e Coleta de Material Biológico

2.3.1 Procedimentos Pré-Captura

O número amostral pré-estabelecido foi de 15 indivíduos por localidade. Esse número representa um meio-termo entre a baixa precisão de números amostrais pequenos e a baixa variação no desvio padrão de números amostrais maiores (JOVANI & TELLA, 2006).

Para as coletas de amostras de saguis de vida livre, foram realizadas incursões para avistamento dos indivíduos e determinação dos melhores locais para captura. Também foram coletadas informações com residentes e trabalhadores locais sobre a ocorrência dos saguis. Após a escolha do local para captura, foi iniciado o processo de habituação dos animais ao local e armadilha (VERONA, 2018). Primeiro, foi utilizada uma fruteira confeccionada com bambu, onde foram colocadas bananas, para atrair os saguis e acondicioná-los ao local. As fruteiras foram reabastecidas duas vezes ao dia, geralmente por três dias. Ao ser verificado que os saguis estavam habituados às fruteiras, estas foram substituídas por três armadilhas modelo *Tomahawk* (18 x 18 x 60 cm) (Figura 15) abertas e travadas, presas sobre uma plataforma de bambu e erguidas com uma corda. As iscas eram repostas duas vezes ao dia e a ceva durou em média, quatro dias.



Figura 15: Plataforma de bambu com três armadilhas modelo *Tomahawk*, com iscas de banana para a captura de saguis *Callithrix* sp. no Campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, município de Seropédica. Foto: Diogo P. Coimbra.

Nas localidades de cativeiro, os animais foram transferidos dos recintos para gaiolas onde foram contidos e sedados pelos médicos veterinários e tratadores das respectivas instituições.

2.3.2 Procedimentos de Coleta de Amostras Biológicas

Para minimizar o estresse, logo após a captura, as armadilhas foram cobertas com pano preto e levadas para o local adequado para os procedimentos de coleta de amostras e demais dados. Os animais capturados foram imobilizados contra a grade do fundo da gaiola, com auxílio de uma luva de raspas de couro. Posteriormente, foram pesados e sedados com Cloridrato de Cetamina (10mg/kg) e relaxante muscular (Midazolam 0,05 mg/kg) via intramuscular na coxa direita após assepsia do local com álcool 70%.

Após a sedação, foram coletados aproximadamente 1 ml de sangue, por punção da veia femoral no plexo inguinal (agulhas 24 g; 0,55x20 mm), armazenado em tubos *vacutainer* de 5 ml com EDTA. Dois a três esfregaços sanguíneos foram preparados a partir das amostras de sangue extraídas de cada indivíduo. Os esfregaços sanguíneos realizados em campo, foram transportados ao laboratório onde foram fixados por imersão em cubas de vidro contendo metanol por 10 min e, posteriormente, corados pelo método de Giemsa a 10% por 30 min (GIEMSA, 1904).

A marcação dos saguis foi feita com a aplicação de *microchip* (*Microchip-partners*[®]) com as dimensões 12 mm x 2,1 mm e peso estimado de 0,06 g (Figura 16), inseridos na região dorsal inter-escapular do animal, para identificar recapturas (SETCHELL & CURTIS, 2011).

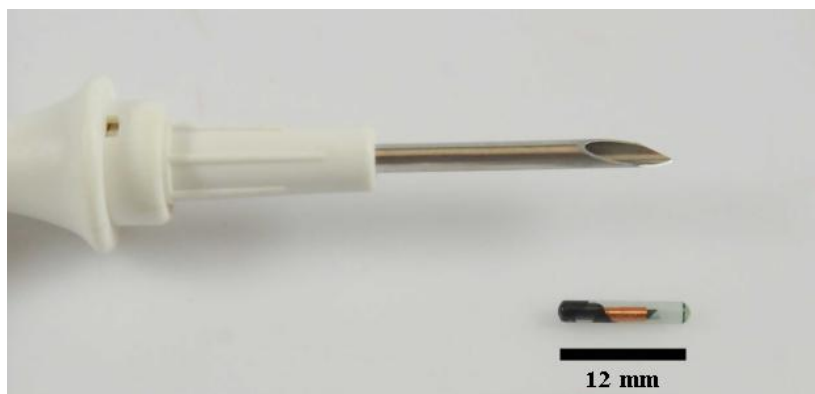


Figura 16: Aplicador e *microchip* 12 mm x 2,1 mm e 0,06g para identificação de saguis, *Callithrix sp.* Imagem do fornecedor *Microchip partners*®.

Após os procedimentos de coleta de material biológico, os animais foram transferidos para as armadilhas e observados até o retorno completo dos reflexos. Após estarem aptos, os animais de vida livre, foram soltos no mesmo local da captura.

2.4 Análise Microscópica

Os esfregaços sanguíneos foram analisados em microscópio óptico EVEN® em aumento de 400x e caso avistada alguma alteração, alternava-se para o aumento de 1000x. Na fase de triagem, os parasitos foram fotografados com *software FutureWinJoe*® lente ocular digital para microscópios *BIOFOCUS*®.

2.5 Análise Epidemiológica

Para avaliar a distribuição da hemoparasitose na população, quando observada, foram analisados os parâmetros de prevalência parasitária e intensidade média parasitária.

Análises de prevalência estimam o percentual de indivíduos infectados por determinado parasito em uma população. A prevalência parasitária (p) é estimada dividindo o número de indivíduos infectados (i) pelo número amostral (n), ou seja, o total de indivíduos analisados em cada localidade. Sendo assim, $(p=i/n^*)100$ (BUSH *et al.* 1997).

As análises de intensidade média parasitária permitem estimar a quantidade média de parasitos que infectam os hospedeiros em uma população de infectados, sendo intensidade o número de parasitos de determinada espécie infectando um único hospedeiro e intensidade média parasitária (m), o total de parasitos encontrados em todas as amostras (p) dividido pelo número de total de indivíduos infectados ($i \pm o$

desvio padrão (*sd*), sendo assim $(m=p/i) \pm sd$ (BUSH *et al.* 1997). Estes valores permitem avaliar o grau de parasitemia.

2.6 Análise Morfométrica dos Parasitos

A morfometria consiste na medição de valores físicos dos parasitos. Estas foram realizadas ao microscópio *Olympus bx45*[®] em aumento de 1000x, do Departamento de Parasitologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, utilizando o “software” *D’Cell*[®], em escala micrométrica (μm). A mensuração através do “software” considerou a curvatura do corpo do parasito evitando o erro métrico de mensurações retilíneas.

Para a análise morfométrica das formas tripomastigotas de *Trypanosoma* encontradas, foram consideradas as seguintes medidas de acordo com a metodologia descrita por Hoare (1972): tamanho total do parasito (TL), distância entre a extremidade posterior e o cinetoplasto (PK), distância entre o cinetoplasto e o meio do núcleo (KN), distância da extremidade posterior ao meio do núcleo (PN), distância do meio do núcleo à extremidade anterior (NA), tamanho do flagelo livre (F), tamanho do núcleo (N) e largura do corpo na altura do núcleo (B) (Figura 17).

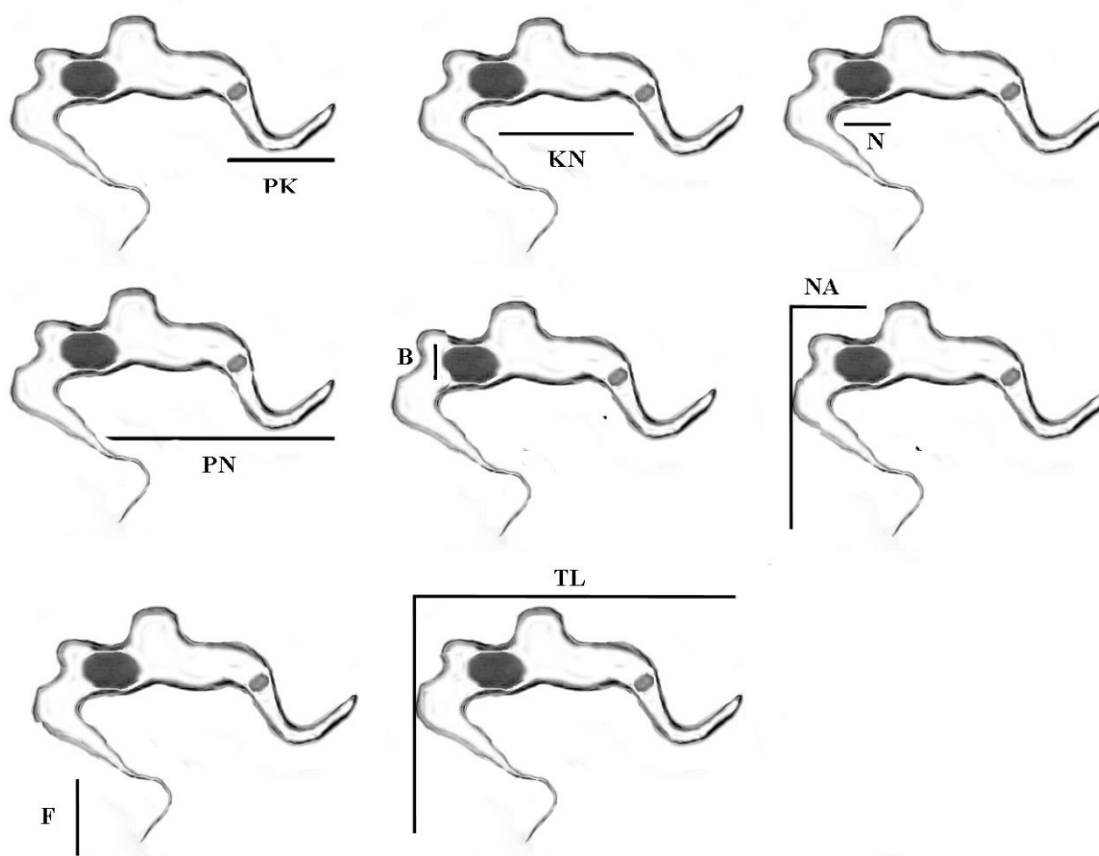


Figura 17: Medidas morfométricas analisadas no hematozoário flagelado, *Trypanosoma* sp., detectados em amostras de *Callithrix* sp. da Região Metropolitana do Rio de

Janeiro. As siglas representam: PK – distância entre a extremidade posterior e o cinetoplasto, KN – distância entre o cinetoplasto e o meio do núcleo, PN – distância da extremidade posterior ao meio do núcleo, NA – distância do meio do núcleo à extremidade anterior, F – tamanho do flagelo livre, TL – tamanho total, N – largura do núcleo e B – largura do corpo na altura do núcleo. Esquema: Diogo P. Coimbra.

Foram medidos os seguintes caracteres nas microfilárias: comprimento do corpo (C) e largura do corpo (L) (Figura 18).

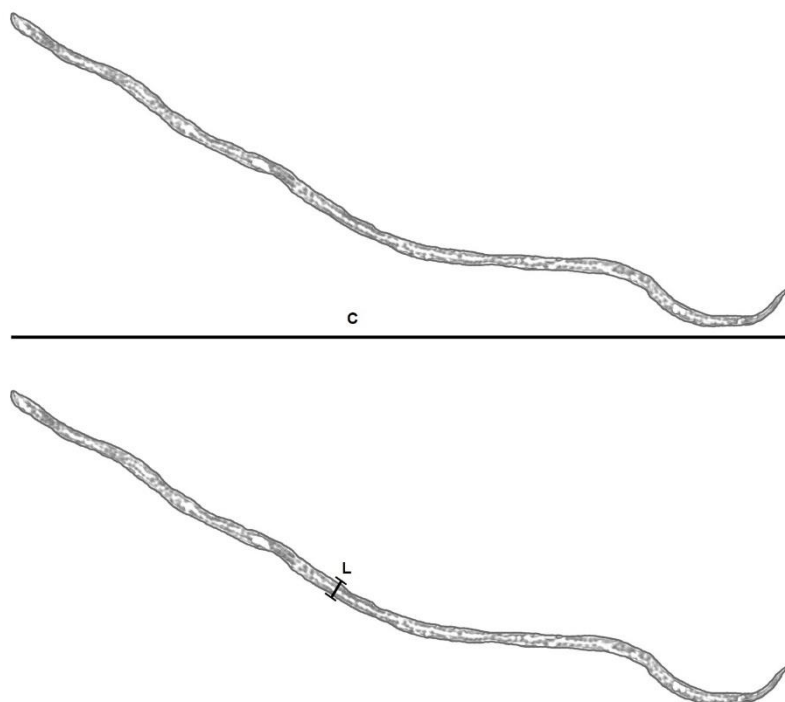


Figura 18: Medidas morfométricas analisadas em nematódeos, microfilárias detectadas em indivíduos de *Callithrix* na Região Metropolitana do Rio de Janeiro: C – comprimento do corpo, L – largura do corpo. Esquema: Diogo P. Coimbra.

3. RESULTADOS

Foram capturados 27 saguis nas localidades de vida livre, somando 15 saguis do JBRJ e 12 da UFRRJ, composto por 19 machos e 8 fêmeas. A estimativa da idade foi feita a partir do peso, sendo considerado juvenil entre 164 g - 244 g e adulto entre 261 g - 450 g (HEARN, 1983; VERONA & PISSINATTI, 2007)

No JBRJ, dentre os saguis adultos, o peso variou entre 275 g a 430 g, o único juvenil pesava 175 g. Nos saguis da UFRRJ, o peso variou de 250 g a 430 g nos adultos e de 190 g a 240 g entre os juvenis.

Foram coletadas amostras de 35 saguis de cativeiro, sendo 13 saguis do Biotério-UFRJ, 15 do CETAS-RJ e 7 do CRAS-UNIVAP/SP, totalizando 17 machos e 18 fêmeas.

Dentre os saguis do Biotério-UFRJ o peso dos adultos variou de 300 g a 340 g, o único juvenil pesava 240 g, sendo que cinco indivíduos não foram pesados por não haver tempo hábil. O peso dos saguis adultos do CETAS-RJ variou de 270 g a 341 g e dos juvenis de 166 g a 220 g. O peso dos saguis do CRAS-UNIVAP/SP variou de 326 g a 411 g (Tabela 1).

Tabela 1: Dados referentes aos saguis, *Callithrix* sp. (*Csp*), capturados nas localidades de vida livre e cativeiro na Região Metropolitana do Rio de Janeiro e na localidade externa em São Paulo: identificação (ID), local de amostragem, data de captura, idade, sexo, peso, comprimento do corpo (ccorpo) e da cauda (ccauda).

ID	Local	Data	Idade	Sexo	Peso (g)	Ccorpo (cm)	Ccauda (cm)
Csp10	JBRJ	28/04/2016	Adulto	M	275	18	29
Csp11	JBRJ	28/04/2016	Adulto	M	285	19	30
Csp12	JBRJ	28/04/2016	Adulto	M	295	18	14
Csp13	JBRJ	28/04/2016	Adulto	M	300	18	28
Csp14	JBRJ	28/04/2016	Adulto	F	370	19	30
Csp15	JBRJ	31/05/2016	Adulto	F	430	22	33
Csp16	JBRJ	31/05/2016	Adulto	M	365	20	30
Csp17	JBRJ	31/05/2016	Adulto	F	445	22	35
Csp18	JBRJ	31/05/2016	Adulto	M	345	19	29
Csp19	JBRJ	27/06/2016	Adulto	M	380	22	33
Csp20	JBRJ	27/06/2016	Adulto	F	327	20	31
Csp21	JBRJ	27/06/2016	Juvenil	M	175	17	28
Csp22	JBRJ	27/06/2016	Adulto	M	310	X	cc
Csp40	JBRJ	20/09/2016	Adulto	M	320	20	31
Csp41	JBRJ	20/09/2016	Adulto	M	350	19	34
Csp26	Biotério-UFRJ	05/07/2016	Adulto	M	X	17	30
Csp27	Biotério-UFRJ	05/07/2016	Adulto	F	X	21	32
Csp28	Biotério-UFRJ	06/07/2016	Adulto	M	X	X	X
Csp29	Biotério-UFRJ	06/07/2016	Adulto	F	X	19	28
Csp31	Biotério-UFRJ	06/07/2016	Adulto	M	X	19	30
Csp32	Biotério-UFRJ	12/07/2016	Adulto	F	321	20	27
Csp33	Biotério-UFRJ	12/07/2016	Adulto	M	320	19	24
Csp34	Biotério-UFRJ	12/07/2016	Adulto	F	320	19	29
Csp35	Biotério-UFRJ	12/07/2016	Juvenil	M	240	18	25
Csp36	Biotério-UFRJ	12/07/2016	Adulto	F	340	19	34
Csp37	Biotério-UFRJ	12/07/2016	Adulto	F	340	21	30
Csp38	Biotério-UFRJ	12/07/2016	Adulto	F	320	22	31
Csp39	Biotério-UFRJ	12/07/2016	Adulto	M	300	18	24
Csp42	CETAS-RJ	15/12/2017	Jovem	M	X	X	X

Tabela 1 continuação

<i>Csp43</i>	CETAS-RJ	15/12/2017	Adulto	F	310	16	5,14
<i>Csp44</i>	CETAS-RJ	15/12/2017	Adulto	M	330	19	30
<i>Csp45</i>	CETAS-RJ	15/12/2017	Adulto	F	281	19	32
<i>Csp46</i>	CETAS-RJ	15/12/2017	Juvenil	F	220	16,5	22
<i>Csp47</i>	CETAS-RJ	15/12/2017	Juvenil	M	195	15	27
<i>Csp48</i>	CETAS-RJ	15/12/2017	Adulto	F	330	18	30
<i>Csp53</i>	CETAS-RJ	22/02/2018	Adulto	M	346	16	35
<i>Csp54</i>	CETAS-RJ	22/02/2018	Juvenil	M	203	15	27
<i>Csp55</i>	CETAS-RJ	22/02/2018	Juvenil	M	166	14	26
<i>Csp58</i>	CETAS-RJ	18/07/2018	Adulto	F	285	17	32,5
<i>Csp59</i>	CETAS-RJ	18/07/2018	Adulto	F	330	18	32
<i>Csp60</i>	CETAS-RJ	18/07/2018	Adulto	M	324	19	33
<i>Csp61</i>	CETAS-RJ	18/07/2018	Adulto	F	341	17	28
<i>Csp62</i>	CETAS-RJ	18/07/2018	Adulto	M	270	18	Cc
<i>Csp49</i>	UFRRJ	31/01/2018	Juvenil	M	240	13,5	29
<i>Csp50</i>	UFRRJ	31/01/2018	Adulto	M	320	16	32
<i>Csp51</i>	UFRRJ	01/02/2018	Adulto	M	320	16	28
<i>Csp52</i>	UFRRJ	01/02/2018	Adulto	F	360	17	30
<i>Csp56</i>	UFRRJ	13/04/2018	Adulto	M	420	16	31
<i>Csp57</i>	UFRRJ	13/04/2018	Adulto	F	430	19	31
<i>Csp63</i>	UFRRJ	16/08/2018	Juvenil	F	200	12,5	28,5
<i>Csp64</i>	UFRRJ	16/08/2018	Adulto	M	360	16,5	23
<i>Csp65</i>	UFRRJ	16/08/2018	Juvenil	M	190	13	27
<i>Csp66</i>	UFRRJ	30/11/2018	Juvenil	M	200	14	26
<i>Csp67</i>	UFRRJ	30/11/2018	Adulto	F	320	16,8	28,5
<i>Csp68</i>	UFRRJ	30/11/2018	Adulto	M	250	15,5	Cc
Uni 1	CRAS-UNIVAP	13/12/2018	Adulto	F	400	X	X
Uni 2	CRAS-UNIVAP	13/12/2018	Adulto	M	343	X	X
Uni 3	CRAS-UNIVAP	13/12/2018	Adulto	M	326	X	X
Uni 4	CRAS-UNIVAP	13/12/2018	Adulto	F	331	X	X
Uni 5	CRAS-UNIVAP	13/12/2018	Adulto	M	370	X	X
Uni 6	CRAS-UNIVAP	13/12/2018	Adulto	F	411	X	X
Uni 7	CRAS-UNIVAP	13/12/2018	Adulto	F	350	X	X

X - não mensurado; cc - cauda cortada; JBRJ - Jardim Botânico do Rio de Janeiro; Biotério-UFRJ - Biotério do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro; CETAS-RJ - Centro de Triagem de Animais Silvestres do Rio de Janeiro; UFRRJ - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; CRAS-UNIVAP - Centro de Reabilitação de Animais Silvestres na Universidade do Vale do Paraíba.

3.1 Análise dos Esfregaços Sanguíneos

Pela análise microscópica, foram encontrados 3 tipos de parasitos dentre as amostras de sangue de *Callithrix* sp. do JBRJ, identificados como *Trypanosoma* sp., microfilárias e inclusões sugestivas de *Babesia* sp. (Figuras 19, 20 e 21).

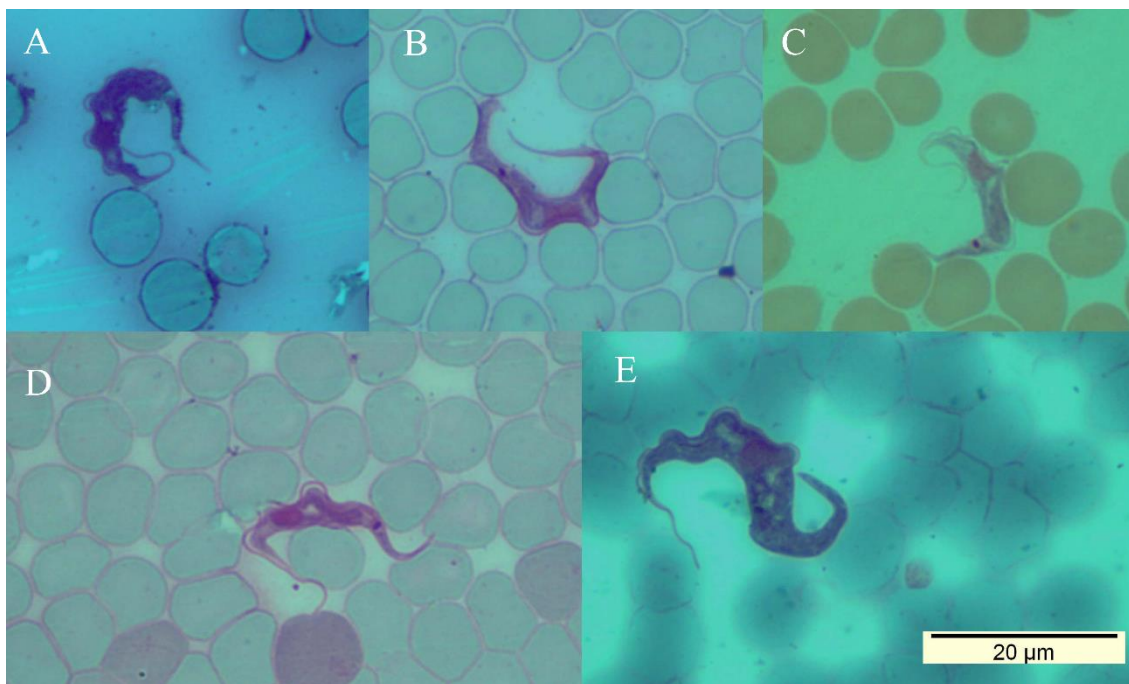


Figura 19: *Trypanosoma* encontrado nos esfregaços sanguíneos dos saguis *Callithrix* sp. amostrados no Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Fotografado com câmera digital em microscópio *Olympus bx45*[®] em aumento de 1000 x. As letras representam diferentes hospedeiros: A - *Csp10*, B - *Csp14*, C - *Csp19*, D - *Csp20* e E - *Csp41*. Foto: Diogo P. Coimbra.

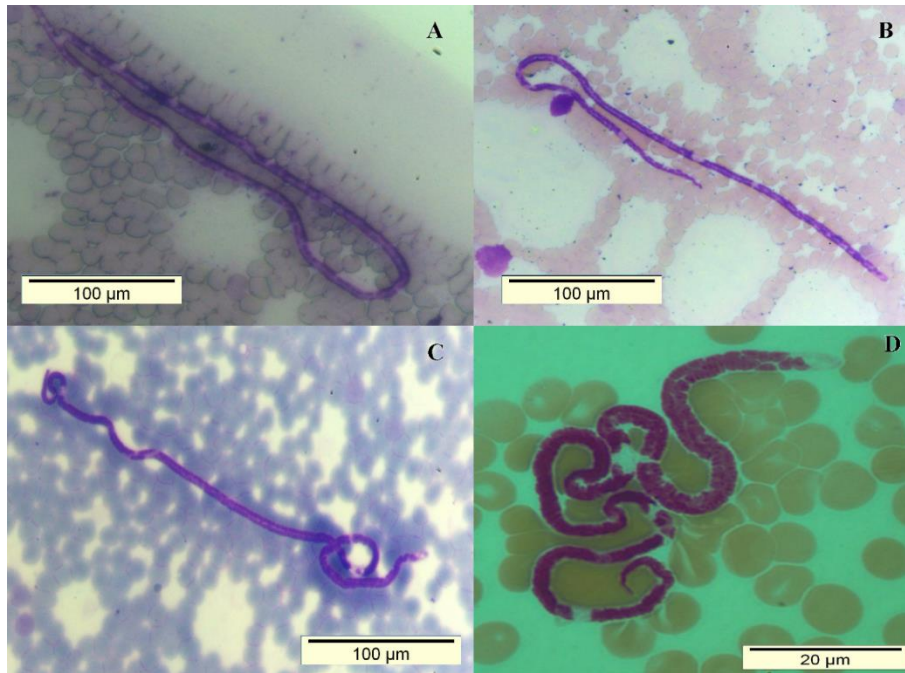


Figura 20: Microfilárias encontradas em esfregaços sanguíneos de *Callithrix* sp. amostrados no Jardim Botânico do Rio de Janeiro utilizando microscópio *Olympus* bx45[®]. Imagens A, B e C com magnificação de 400 x e imagem D, com 1000 x. As letras representam diferentes hospedeiros: A - *Csp14*, B - *Csp19*, C e D - *Csp41*. Foto: Diogo P. Coimbra.

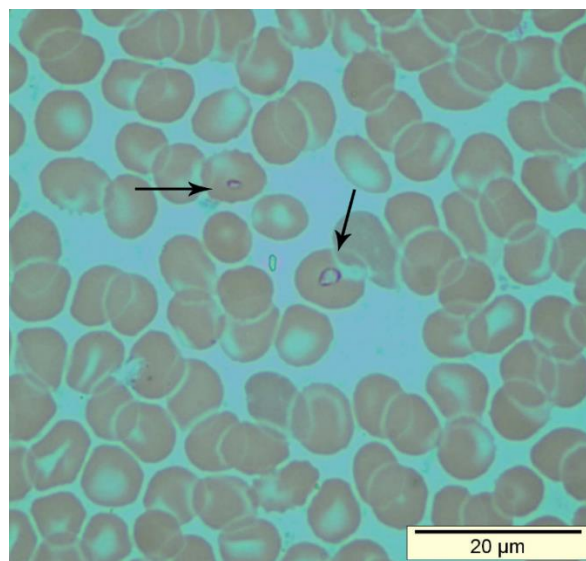


Figura 21: Esfregaço sanguíneo de um indivíduo de *Callithrix* sp. (*Csp19*) capturado no Jardim Botânico do Rio de Janeiro (JBRJ). As setas destacam inclusões sugestivas de merozoítos de *Babesia* sp., sua forma infectante intra-eritrocitária. Fotografado em microscópio *Olympus* bx45[®] em aumento de 1000 x. Foto: Diogo P. Coimbra.

Também foram encontrados *Trypanosoma* sp. nas amostras da UFRRJ (*Csp49* e *Csp64*) e do CETAS-RJ (*Csp53*), sendo encontrado um parasito em cada um dos saguis (Figura 22) analisados em ambas as localidades.

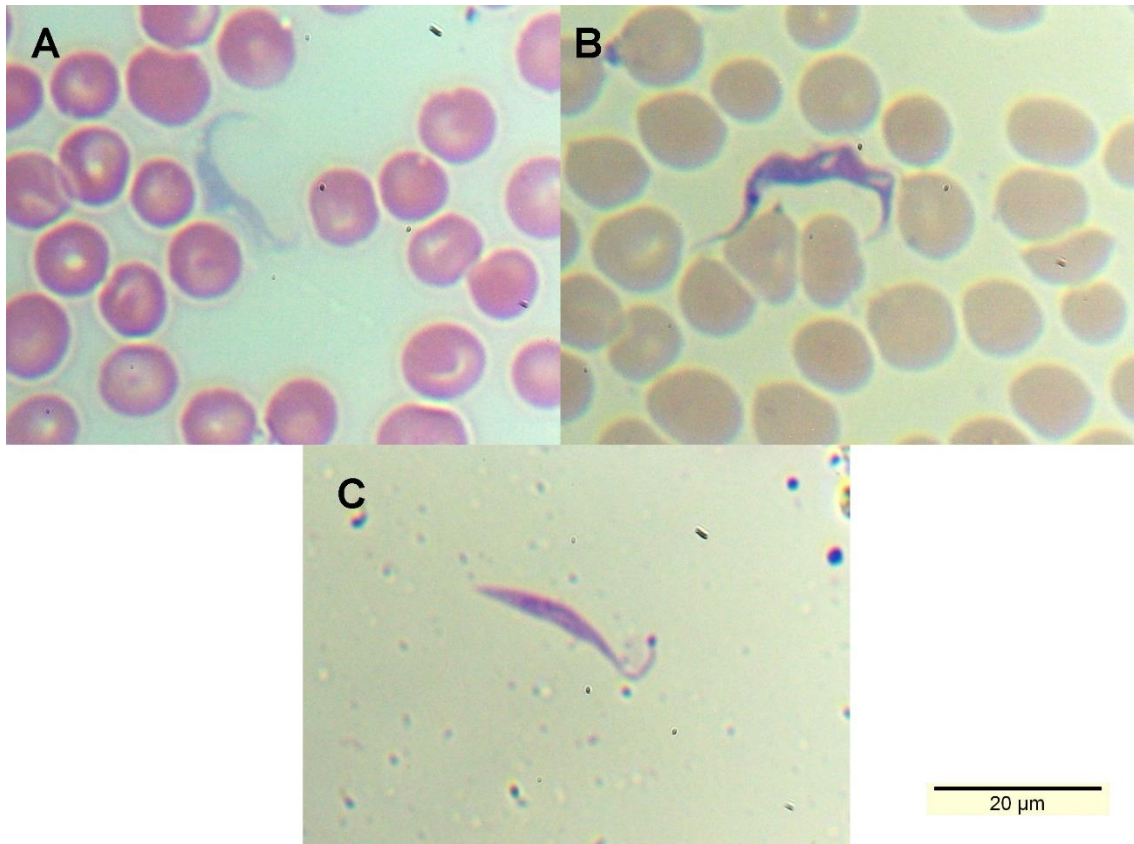


Figura 22: *Trypanosoma* sp. encontrados em esfregaços sanguíneos de *Callithrix* sp. amostrados na UFRRJ (A e B) e na amostra do CETAS-RJ (C) em Seropédica, RJ. Imagens A, B e C com magnificação de 1000 x. As letras representam diferentes hospedeiros: A - *Csp49*, B - *Csp64*, C - *Csp53*. Foto: Diogo P. Coimbra.

Não foram observados hemoparasitos nos esfregaços sanguíneos dos saguis do Biotério-UFRJ e do CRAS-UNIVAP. As imagens de todos os parasitos detectados neste estudo estão incluídas em Anexo.

3.1.1 Prevalência e Intensidade Média Parasitária

Os parâmetros epidemiológicos foram analisados para os indivíduos de *Callithrix* sp. de cada localidade separadamente e por caráter de vida livre e cativo.

Com relação à infecção por *Trypanosoma* sp. no JBRJ a prevalência foi de 33% (0,3) de infectados nessa população. Para microfilárias, a prevalência foi de 20% (0,2) de infectados e a possível infecção por *Babesia* sp. em 6,6% (0,06) dos saguis capturados. Dentre os saguis capturados na UFRRJ, a prevalência de *Trypanosoma* sp.

foi de 16% (0,16). A prevalência de *Trypanosoma* sp. dentre os saguis do CETAS-RJ foi de 6,6% (0,06).

Nas localidades de vida livre conjuntamente a a prevalência foi de 25% por *Trypanosoma* sp., de 11% por microfilárias e de 3%, possivelmente por *Babesia* sp.

Nos saguis de cativeiro analisados conjuntamente, a prevalência parasitária foi de 2% somente para *Trypanosoma* sp.

A intensidade média parasitária de *Trypanosoma* sp. dentre os indivíduos infectados provenientes do JBRJ foi de $3,2 \pm 2,3$ SD. No caso das microfilárias no JBRJ, $4 \pm 2,64$ SD. Quanto ao *Trypanosoma* sp. em amostras de saguis da UFRRJ e CETAS-RJ este parâmetro não foi calculado por ter sido encontrado apenas um parasito por lâmina em cada um dos três saguis infectados.

3.2 Análises Morfométricas

As análises morfométricas visando a classificação taxonômica da espécie de hemoparasito, foram efetuadas para os tripanosomatídeos e microfilárias encontrados através da análise dos esfregaços sanguíneos ao microscópio óptico (Tabela 2).

Os *Trypanosoma* sp. medidos a partir de lâminas de esfregaços sanguíneos de saguis do JBRJ (*Csp14*, *Csp19*, *Csp20* e *Csp41*) e UFRRJ (*Csp49* e *Csp64*), apresentaram valores similares (Tabela 2).

Tabela 2: Dados morfométricos dos *Trypanosoma* sp. encontrados nos saguis *Callithrix* sp. (*Csp*) do Jardim Botânico do Rio de Janeiro e da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Para cada medida são apresentados os valores mínimo e máximo obtidos para cada hemoparasito de cada indivíduo parasitado e, entre parênteses, o valor médio (μm) e desvio padrão (DP). R - identificação, N - número de parasitos encontrado, PK - distância entre a extremidade posterior ao cinetoplasto, KN - distância entre o cinetoplasto e o meio do núcleo, PN - distância entre a extremidade posterior ao meio do núcleo, NA - distância entre o meio do núcleo a extremidade anterior, FF - tamanho do flagelo livre, TL - tamanho total, NL - tamanho do núcleo, B - largura do corpo na altura do núcleo.

ID	N	PK	KN	PN	NA	FF	TL	N	B
<i>Csp10</i>	2	8,6 -10,17 (9,38 \pm 1,11)	11,11 – 12,73 (11,92 \pm 1,14)	21,28 – 21,33 (21,3 \pm 0,03)	7,66 – 8,4 (8,03 \pm 0,52)	4,86 – 9,94 (7,4 \pm 3,59)	36,31 – 39,34 (38,07 \pm 1,78)	1,78 -2,12 (1,98 \pm 0,28)	3,18 – 4,56 (3,87 \pm 0,97)
<i>Csp14</i>	1	10,46	8,65	19,11	12,69	6,59	39,12	1,45	2,84
<i>Csp19</i>	4	6,82 – 7,51 (7,17 \pm 0,28)	6,02 – 11,29 (9,38 \pm 2,34)	13,53 – 18,45 (16,55 \pm 2,12)	5,24 – 8,49 (6,31 \pm 1,5)	3,65 – 11,74 (7,78 \pm 3,3)	24,14 - 35,62 (31,64 \pm 5,16)	1,21 – 1,78 (1,59 \pm 0,26)	2,19 – 2,84 (2,48 \pm 0,27)
<i>Csp20</i>	7	7,72 – 10,17 (8,71 \pm 0,91)	10,31 – 11,6 (10,98 \pm 0,45)	19,28 – 21,38 (19,7 \pm 0,91)	7,71 – 10,28 (8,96 \pm 1,02)	7,84 – 9,67 (8,8 \pm 0,77)	36,08 – 38,68 (37,27 \pm 1,37)	1,75 – 2,67 (2,12 \pm 0,5)	2,56 – 4,29 (3,44 \pm 0,63)
<i>Csp41</i>	2	11,28 -18,53 (14,9 \pm 5,12)	6,08 – 9,1 (7,59 \pm 2,13)	20,38 – 24,61 (22,49 \pm 2,99)	16,4 – 17,35 (16,87 \pm 0,67)	10 – 10,43 (10,21 \pm 0,3)	48,34 – 52,11 (50,22 \pm 2,66)	2,23 – 3,8 (3,01 \pm 1,11)	3,66 – 5,74 (4,7 \pm 1,47)
<i>Csp49</i>	1	8,44	9,31	17,75	7,17	8,28	33,11	3,13	1,86
<i>Csp64</i>	1	9,42	11,4	20,82	7,31	13,36	41,74	3,13	1,86

Três saguis do JBRJ apresentaram infecção por microfilárias através da microscopia (Tabela 3). Todas as filárias apresentaram caudas nucleadas (Figura 23).

Tabela 3: Dados morfométricos das microfilárias encontradas nos saguis *Callithrix* sp. (*Csp*) do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Para cada medida são apresentados os valores mínimo e máximo obtidos para cada parasito de cada indivíduo parasitado e, entre parênteses, o valor médio (μm) e desvio padrão (DP). ID – identificação; N - número de parasitos; L - comprimento do corpo; B - largura do corpo.

ID	N	L	B
<i>Csp</i> 14	1	316,99	3,63
<i>Csp</i> 22	4	297,79 – 347,09 (314,44 \pm 23,65)	3,29 – 3,84 (3,49 \pm 0,25)
<i>Csp</i> 41	8	249,31 – 326,31 (274,54 \pm 41,8)	2,75 – 3,73 (3,15 \pm 0,31)
Total	13		

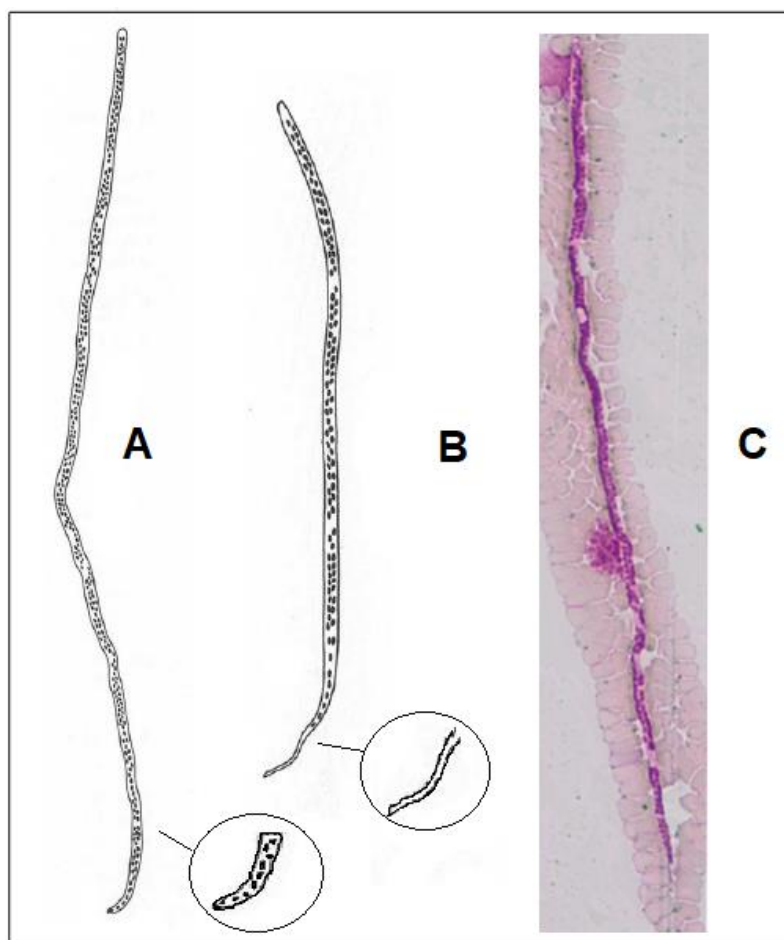


Figura 23: Esquemas de microfilárias evidenciando tipos de cauda diferentes e um exemplar observado no material coletado. A - *Mansonella marmosetae* com cauda arredondada e nucleada, B - *Mansonella dunni*, com cauda afilada e anucleada. Retirados de Eberhard & Orihel 1984, C - microfilária encontrada em esfregaço sanguíneo de *Callithrix* código *Csp*22 do JBRJ.

4. DISCUSSÃO

A preocupação quanto às patologias em animais e sua relação com os humanos é refletida na estimativa de que 61% de todas as infecções que acometem humanos são de origem animal ou zoonoses, sendo assim o meio de transmissão mais impactante ao homem (MORSE, 1995; TAYLOR *et al.* 2001). Considerando a biodiversidade brasileira, principalmente a da Floresta Amazônica e Atlântica, esta segunda um *hotspot* mundial da biodiversidade, as possibilidades de estabilização e transmissão de parasitos é considerável (ARNOLD, 2000; MYERS *et al.* 2000; CAMARGO, 2008; HOORN *et al.* 2011; ANTONELLI *et al.* 2018).

Primates neotropicais, especialmente os de pequeno porte como saguis, possuem contato próximo a humanos, inclusive sendo utilizados como animais de estimação e fonte alimento (MICHAUD *et al.* 2003; ROCHA, 2014). Essa proximidade, principalmente o contato prolongado, facilita a transmissão de agentes etiológicos e patógenos, o que os coloca como alvo de pesquisas relacionadas à saúde humana e animal (GILLESPIE, 2006; ROCHA, 2014). Além da proximidade física e geográfica, primatas-não-humanos, como por exemplo os saguis, são evolutivamente, geneticamente, fisiologicamente e comportamentalmente próximos aos humanos (BONTROP, 2001; DAVIES & PEDERSEN, 2008). Devido à esta proximidade filogenética, são considerados ótimos modelos para o entendimento de doenças e, compartilhando o mesmo espaço geográfico, aumentam consideravelmente a possibilidade de transmissão de patógenos (DAVIES & PEDERSEN, 2008).

Saguis podem ser hospedeiros de 36 espécies diferentes de parasitos (SOLÓRZANO-GARCIA & LÉON, 2018). Considerando a espécie nativa do sudeste brasileiro e vulnerável *C. aurita*, somente é relatada a infecção por *Primasubulura jacchi* (SOLÓRZANO-GARCIA & LÉON, 2018), um nematódeo que se aloja principalmente no intestino grosso com alta intensidade de infecção, podendo causar lesões ulcerosas e diarreia (MELO, 2004; TAVELA *et al.* 2013). Este parasito também infecta *C. jacchus*, *C. penicillata* e híbridos, tanto em vida livre quanto em cativeiro, com prevalência superior a 80% (MELO, 2004; TAVELA *et al.* 2013). É um parasito de infecção natural e espontânea em uma grande variedade de primatas neotropicais (RESENDE *et al.* 1994). Portanto, sendo o único parasito com registro de infecção em *C. aurita*, é de interesse para a conservação desta espécie o conhecimento da carga parasitária dos saguis invasores, *C. jacchus* e *C. penicillata*.

Nas análises por microscopia, no presente trabalho, foram encontrados dois tipos diferentes de parasitos: *Trypanosoma* sp. e microfilária nas localidades JBRJ, UFRRJ, CETAS-RJ, além de uma inclusão sugestiva de *Babesia* sp. em uma amostra do JBRJ. A prevalência de indivíduos infectados nas localidades de vida livre foi maior do que em cativeiro, sendo oito indivíduos infectados contra apenas um nas localidades de cativeiro. O único parasito encontrado em esfregaços oriundos de localidades de cativeiro foi *Trypanosoma* sp. do indivíduo *Csp53* do CETAS-RJ. Portanto, nas localidades de vida livre, além da maior prevalência, também foi observada uma maior diversidade de parasitos. Estes resultados já eram esperados devido às localidades de vida livre hipoteticamente permitirem maior possibilidade de circulação de vetores e agentes etiológicos, além de possibilitarem maior diversidade e abundância de ambos.

Os saguis do JBRJ foram os que apresentaram maior diversidade de parasitos (possivelmente 3 diferentes parasitos), intensidade média parasitária (3,2 para *Trypanosoma* e 4 para microfilárias) e prevalência de parasitos (33% para *Trypanosoma*, 20% para microfilárias e 6,6%, possivelmente, para *Babesia*), seguidos pela UFRRJ (16% de prevalência para *Trypanosoma*). Ambas as localidades de vida livre possuem extensas áreas de vegetação, proximidade com centros urbanos, alta concentração de humanos e distintas espécies de animais domésticos e silvestres. A presença de humanos nas áreas de vida dos saguis pode influenciar positivamente a infecção por nematódeos nos primatas não-humanos (TAVELA *et al.* 2013). O JBRJ possui uma grande diversidade de plantas nativas e exóticas, mais de 8.000 espécies, além de estar conectado ao Parque Nacional da Tijuca (PNT), o que possibilitaria a transição de vetores e agentes etiológicos (RANGEL, 2011) e por este motivo, já era esperado que fossem encontrados os parasitos descritos no presente estudo. Os hemoparasitos *Trypanosoma minasense* e *T. devei* já haviam sido descritos em calitriquídeos do PNT (VERONA, 2008).

As análises morfométricas dos *Trypanosoma sp.* detectados nos saguis do JBRJ e UFRRJ sugerem que pertençam à *T. minasense*. As medidas encontradas estão na margem das esperadas (Tabela 2), principalmente nos atributos-chave para esta espécie: TL 28.4 e 48, PK 6.8 - 15 e B 2 - 6 μm (HOARE, 1966). É esperado o polimorfismo de tamanho, já relatado para esta espécie como também para *T. cruzi* (BRENER, 1969; ZICCARDI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1998, 1999). Destacam-se os parasitos dos indivíduos *Csp19* e *Csp41*, com alguns valores que fogem ao esperado para a espécie. Os parasitos do *Csp19* foram em média os menores e mais delgados, entretanto um destes parasitos apresentou o menor valor de TL (24,14 μm) já descrito para a espécie. Até então o menor valor de tamanho descrito para *T. minasense* foi de 26 μm (HOARE, 1966). Um parasito do indivíduo *Csp41* apresentou o maior valor de TL (52,11 μm) em comparação com o maior tamanho de 48 μm já descrito (ZICCARDI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1999). Apesar deste polimorfismo, as demais medidas morfométricas se encontram dentro da margem de variação esperada para *T. minasense* e em conjunto com as medidas dos diferentes caracteres, divergem das observadas nas demais espécies de tripanosomatídeos. A presença de *T. minasense* aqui identificado segundo os caracteres morfométricos, representa o primeiro relato de infecção de saguis por este parasito nas localidades do JBRJ e da UFRRJ. Este achado será investigado pela análise genética molecular no Capítulo II.

Existem diversas hipóteses para explicar o polimorfismo de *T. minasense* e *T. cruzi*, dentre elas as mais mencionadas são a maturação do parasito, a diferenciação sexual do parasito, a resposta imune do hospedeiro e a espécie do hospedeiro (BRENER, 1965, 1969; URDANETA-MORALES, 1983; ZICCARDI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1999). Todas estas são relevantes e possíveis para os parasitos encontrados neste estudo, porém, podemos destacar a variação que pode ser atribuída ao parasitismo em diferentes espécies hospedeiras. Os saguis analisados no presente estudo apresentam variação fenotípica de pelagem dorsal, na face e nos tufos. As características de pelagem, sendo cor, tamanho e formato dos tufos, são fundamentais para a diferenciação das espécies de *Callithrix* (COIMBRA-FILHO, 1973). Diante da diversidade encontrada é possível que haja, indivíduos puros de *C. jacchus*, *C. penicillata* e híbridos, dentre as amostras analisadas neste estudo, visto que estas espécies podem gerar híbridos viáveis naturalmente (MALUKIEWICZ, 2014). Em análise recente no JBRJ, suspeita-se com base no fenótipo, que 80% dos saguis

encontrados nesta localidade sejam híbridos entre as duas espécies invasoras (SILVA, 2018).

O parasito detectado no indivíduo *Csp53* (CETAS-RJ) não pôde ser medido não sendo possível analisar por meio da morfometria a espécie a qual pertence. Entretanto, sua forma difere dos demais parasitos encontrados sendo bastante semelhante a *T. cruzi*. Análises posteriores poderão esclarecer a espécie em questão.

A intensidade média dos *Trypanosoma* encontrados através da microscopia óptica foi baixa, sendo em alguns indivíduos, de apenas um parasito (*Csp14* do JBRJ, *Csp49* e *Csp64* da UFRRJ), em dois indivíduos foram encontrados dois parasitos (*Csp10* e *Csp41* do JBRJ), em um indivíduo foram encontrados quatro (*Csp19* JBRJ) e em outro, sete (*Csp20* JBRJ). Essa baixa intensidade média é esperada pela baixa, porém constante parasitemia descrita para infecções por *T. minasense* (DEANE, 1974; ZICCARDI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1999; SATO *et al.* 2008). Outro fator que pode ter influenciado este resultado é o horário de coleta de sangue, visto que *T. minasense* apresenta variação de intensidade média relacionada ao ciclo circadiano, com pico de parasitemia a partir das 16h (DEANE, 1974). Todas as coletas foram realizadas na parte da manhã com pico às 12h devido à rotina de captura no JBRJ e do CETAS-RJ. Estes fatores também podem ter influenciado o índice de resultados falso negativos nas análises microscópicas.

A hipótese da rainha vermelha de Leigh Van Halen (1973) onde se menciona a frase “o indivíduo tem que correr o mais rápido possível para permanecer no mesmo lugar”, referindo-se a constante evolução da relação entre espécies competidoras, também pode ser aplicável à relação parasito-hospedeiro. Parasito e hospedeiro estão em constante adaptação, o que com o tempo resulta em um equilíbrio entre ambos (PESSÔA & MATINS, 1982; RIDLEY, 1993). O hemoprotozoário *T. minasense* é considerado uma das espécies mais primitivas do subgênero *Megatrypanum* (HOARE, 1977). Este grupo possui alta especificidade aos hospedeiros, característica utilizada inclusive na identificação das espécies de parasitos, e são caracterizados por serem grandes quanto ao tamanho, largos e pela posição do cinetoplasto próximo ao núcleo e distante da extremidade posterior (HOARE, 1966, 1972; WEL *et al.* 2008). A ausência de patologias detectada até o momento e a baixa e constante parasitemia de *T. minasense* podem ser um reflexo de uma relação antiga entre parasito-hospedeiro.

O estudo de microfilárias é limitado por alguns fatores relacionados ao próprio ciclo de vida do parasito, sendo eles a proporção de larvas infectantes, a rota de migração (BAIN & BABAYAN, 2003). Também são limitadas as formas tradicionais de diagnose e identificação das filárias (SINGH *et al.* 2013). A dificuldade de se identificar as microfilárias está relacionada com a dificuldade de se analisar todas as características morfológicas e de encontrar referências com as quais seja possível comparar os dados. A taxonomia dos gêneros *Dipetalonema* e *Mansonella* por exemplo, ainda é muito confusa e carece de mais estudos (MELO, 2004). Alguns estudos tratam exatamente do esclarecimento e discriminação da morfologia entre diferentes espécies de microfilária, apontando que é necessário usar outras medidas além do comprimento do corpo, o que a maioria dos estudos utiliza (POST *et al.* 2003). A diversidade morfológica das filárias é reflexo dos diferentes estágios, comportamentos e nichos acessíveis, incluindo o vetor (BAIN & BABAYAN, 2003). Sendo assim, diversos fatores podem influenciar a variação morfológica das microfilárias que pode representar mais de uma espécie ou apenas variações. Neste estudo foram observados tamanhos variando de 249,31 a 347,09 de comprimento, e 2,75 a 3,83 de largura, possivelmente

decorrentes de duas ou mais espécies de microfilárias. Apesar de diferenças entre as médias das filárias de *Csp14* (316,99 C e 3,63 L), *Csp22* (314,44 ± 23,65 C e 3,49 ± 0,25 L) e *Csp41* (274,54 ± 41,8 C e 3,15 ± 0,31 L), há variação suficiente entre os parasitos encontrados em *Csp22* (menor valor C 297,79 - maior valor de C 347,09, L 3,29 - 3,84) e *Csp41* (C 274,54 - 326,31, L 2,75 - 3,73) para se supor que alguns indivíduos pertençam à distintas espécies. Os dados morfométricos sugerem que as filárias pertençam ao gênero *Mansonella* e *Dipetalonema*. Dentre as possíveis espécies, *Mansonella (Tetrapetalonema) marmosetae* (L 299 - 330 B 3 µm) e *Dipetalonema graciliformis* (L 255 - 330 B 3,4 - 4 µm) podem ser consideradas as mais prováveis neste caso, pelo tamanho, formato e presença de núcleos na cauda (Figura 23) (LOWRIE *et al.* 1978; WEBBER, 1995; NOTARNICOLA *et al.* 2008). Entretanto, como já destacado anteriormente, é possível que haja mais de uma espécie e análises adicionais são necessárias para o esclarecimento.

O diagnóstico de *Babesia* sp. através da microscopia óptica ainda é um desafio para cientistas devido à dificuldade de identificação relativa às variações morfológicas entre as espécies (PERSING *et al.* 1995). O parasito detectado no sagui *Csp19* do JBRJ morfológicamente se assemelha a um piroplasmídeo do gênero *Babesia*, devido ao formato anelar com citoplasma mais claro e coloração próxima ao azul quando corado com Giemsa (HOMER *et al.* 2000; VANNIER *et al.* 2008). Apesar de não aparecer o núcleo do parasito, não se descarta esta possibilidade visto que esta estrutura celular é mais visível em estágios mais avançados de desenvolvimento deste hematozoário (HEALY *et al.* 1980), aqui identificado como sendo um merozoíto. Não há relatos de infecções por *Babesia* sp. em saguis até o momento, entretanto, há relatos de infecção assistida em laboratório por *B. microti* nos primatas neotropicais *Saimiri sciureus* e *Cebus apella* (MOORE & KUNTZ, 1981). Isto, sugere que a infecção natural por estes parasitos em primatas neotropicais é possível. Há poucos casos relatados, porém, são mais frequentes em primatas do velho mundo (WEL *et al.* 2008; MAAMUN *et al.* 2011). Um fator que pode contribuir para a dificultar a infecção dos primatas por este hemoparasito é o ato de catação. Este comportamento se refere ao hábito dos primatas de afagar os pelos e catar os ectoparasitos em si mesmo ou em outros membros do mesmo grupo social (HUTCHINS & BARASH, 1976). Estes hemoparasitos necessitam exclusivamente de um carrapato para completar seu ciclo de vida, ocorrendo dentro do vetor o desenvolvimento sexual do parasito (PIETROBELLI *et al.* 2007). Primatas não-humanos podem se infestar regularmente com carrapatos, entretanto o hábito de catação impede que estes se mantenham sobre o hospedeiro (HUTCHINS & BARASH, 1976; FREELAND, 1981). Portanto, mesmo sendo rara, é possível que ocorra a infecção por *Babesia* sp. em primatas.

Também vale ressaltar que as localidades do PNT e do JBRJ, apresentam como principais patógenos circulantes entre animais domésticos a babesiose (HELIODORO *et al.* 2020). Também foi constatado em animais silvestres do JBRJ, em um levantamento de ectoparasitos, a infestação por *Rhipicephalus sanguineus*, um dos vetores da *Babesia* sp. (HELIODORO *et al.* 2020). Portanto, tanto o patógeno circulante quanto o vetor estão presentes na localidade onde foi observada as inclusões sugestivas de *Babesia* sp. Entretanto, análises adicionais são necessárias para averiguar se o parasito observado neste estudo em um sagui do JBRJ é realmente *Babesia*, assim como identificar a espécie a qual pertence.

Os saguis do Biotério-UFRJ não apresentaram infecção por nenhum hemoparasito através das análises de microscopia óptica, assim como na localidade externa CRAS-UNIVAP. Ambas são localidades de cativeiro com ambiente telado o

que dificulta ou impede a circulação dos vetores no caso dos parasitos aqui detectados. A ausência de parasitos pelas análises microscópicas, corrobora a hipótese levantada de que localidades de vida livre possibilitam maior taxa de infecção, diversidade e intensidade de parasitos. Além das condições sanitárias das instalações, os animais são monitorados e medicados para controle de diversos tipos de infecção tanto para a preservação da sua saúde em cativeiro, como para controle dos experimentos aos quais são submetidos, como no caso do Biotério-UFRJ.

5. CONCLUSÕES

Os saguis da Região Metropolitana do Rio de Janeiro, das localidades de vida livre JBRJ e UFRRJ, assim como do CETAS-RJ, localidade de cativeiro, apresentaram infecção por *Trypanosoma*, microfilárias e possivelmente por *Babesia* sp.

Foi observada maior diversidade de parasitos em localidades de vida livre do que em cativeiro.

Pela análise morfométrica os *Trypanosoma* encontrados nos saguis do JBRJ e da UFRRJ, pertencem à *Trypanosoma minasense*, sendo o primeiro achado deste parasito nestas localidades. Também foi observado polimorfismo de tamanho, já descrito para a espécie.

Estudos prévios sobre *Trypanosoma minasense* indicam que não representam uma ameaça para a saúde pública, visto que é específico de primatas não-humanos, nem para a biodiversidade local, pois é descrito como não-patogênico em primatas não-humanos em geral.

Estudos adicionais são necessários para identificar as espécies de microfilárias, a espécie de *Trypanosoma* detectado no indivíduo Csp53 e confirmar a infecção por *Babesia* sp., aqui observados.

CAPÍTULO II

ANÁLISE GENÉTICA DE *Trypanosoma* sp. E MICROFILÁRIAS DE AMOSTRAS DE *Callithrix* sp. DA REGIÃO METROPOLITANA DO RIO DE JANEIRO, BRASIL.

RESUMO

A parasitologia é uma área da ciência que depende de um diagnóstico preciso para a identificação dos parasitos, o que historicamente tem sido feito, principalmente, por análise morfométrica através da microscopia óptica. Entretanto, devido à variabilidade dos parasitos, esta metodologia nem sempre é precisa. A genética molecular representa uma alternativa para identificação precisa de parasitos. O objetivo deste capítulo é identificar através da genética molecular a espécie de *Trypanosoma* sp. detectado em esfregaços sanguíneos de saguis do gênero *Callithrix* que habitam a Região Metropolitana do Rio de Janeiro, verificar a ocorrência nestas amostras de falsos negativos por microscopia para *Trypanosoma* e microfilária e comparar a prevalência parasitária entre localidades amostradas de vida livre e cativeiro. A hipótese levantada é que sendo a reação em cadeia da polimerase (PCR) uma técnica que permite, teoricamente, a detecção do parasito mesmo a partir de uma única molécula de DNA existente na amostra, espera-se obter um maior número de resultados positivos do que na análise por microscopia óptica. Além disso, por meio do sequenciamento dos amplicons espera-se obter uma alta similaridade genética com *T. minasense* confirmando os achados das análises morfométricas. Foi extraído DNA a partir das amostras de sangue coletadas de 51 indivíduos de *Callithrix* sp., por fenol-clorofórmio. Foram amplificadas por PCR uma região do gene *18S rRNA* para *Trypanosoma* e a região intrônica *ITS-1* para microfilária, incluindo um controle negativo em ambos e controle positivo para *Trypanosoma*. Os fragmentos amplificados para *Trypanosoma* apresentaram 700 pares de bases (pb) conforme o observado para o controle positivo. Os fragmentos amplificados para microfilária apresentaram entre 200 e 300 pb conforme publicado na literatura. Posteriormente, os amplicons gerados a partir das amostras dos indivíduos infectados por *Trypanosoma* sp. foram sequenciados pelo método de Sanger, alinhados com a ferramenta BLAST® e submetidos à análise filogenética com o método de *Maximum Likelihood*. A análise genética molecular foi mais eficaz do que a microscopia tanto para a detecção de *Trypanosoma* (com 14 resultados positivos em comparação a oito na microscopia), quanto para microfilária (17 resultados positivos em comparação a três por microscopia). Entretanto, dentre as amostras do JBRJ houve maior número de resultados positivos para ambos os parasitos pela microscopia. Falsos negativos por PCR, neste caso, foram considerados resultantes da baixa parasitemia e qualidade da amostra de sangue devido ao longo tempo transcorrido desde a coleta. Saguis amostrados em vida livre apresentaram maior prevalência por *Trypanosoma*. Entretanto, nas amostras de cativeiro a prevalência foi maior para microfilárias. As sequências do gene *18S rRNA* obtidas a partir das amostras positivas para *Trypanosoma* alinharam com similaridade mínima de 97% com *T. minasense* e na análise filogenética agruparam em um mesmo clado com sustentação de 73% com esta mesma espécie, permitindo a identificação do parasito.

Palavras-chave: genética molecular, *Trypanosoma*, microfilária

ABSTRACT

The parasitology is an area of science that rely on a precise diagnosis of the parasite identification, which historically has been done mainly by morphometric analysis, through optical microscopy. However, due to parasite variability, this methodology is not always accurate. Molecular genetics represents an alternative for a precise parasite identification. The objectives of this chapter is to identify through molecular genetics the species of *Trypanosoma* sp. detected in blood smears from *Callithrix* marmosets which inhabit the Metropolitan Region of Rio de Janeiro, verify the occurrence among these samples of false negatives for *Trypanosoma* and microfilariae by microscopy, and compare the parasitary prevalence between sampled free-living and captivity localities. The hypothesis to be tested is that since the polymerase chain reaction (PCR) is a technique that theoretically allows the detection of the parasite even from a single DNA molecule in the sample, it is expected to obtain a greater number of positive results than in optical microscopy analysis. Besides that, by sequencing of the amplicons it is expected to obtain a high genetic similarity with *T. minasense* confirming the morphometric analisys findings. DNA was extracted from blood samples collected from 51 individuals of *Callithrix* sp. by the phenol-chloroform method. A fragment of the *18S rRNA* gene for *Trypanosoma* and an intronic region *ITS-1* for microfilaria were amplified by PCR including a negative control for both and a positive control for *Trypanosoma*. The amplified fragments for *Trypanosoma* presented 700 base pairs (bp) as observed for the positive control. The amplified fragments for microfilariae presented between 200 and 300 bp as published by the literature. Later, the amplicons generated from the samples of the individuals infected by *Trypanosoma* sp. were sequenced using the Sanger method, aligned with the BLAST[®] tool and submitted to phylogenetic analysis with the Maximum Likelihood method. Molecular genetic analysis was more effective than microscopy for the detection of *Trypanosoma* (with 14 positive results compared to eight in microscopy) and for microfilariae (with three positive results in microscopy and 17 by PCR). However, samples of the JBRJ showed a higher number of positive results for both parasites in the microscopy. False negatives by PCR, in this case, were considered resulting from the low parasitemia and sample quality due to the long time elapsed since collection. Sampled marmosets from free-living localities had a higher prevalence for *Trypanosoma*. However, in captivity localities the prevalence was higher for microfilariae. The sequences of the *18S rRNA* gene obtained from positive samples for *Trypanosoma* aligned with similarity above 97% with *T. minasense*, and in the phylogenetic analysis, the sequences obtained clustered in the same clade with 73% with these species, allowing the identification of the parasite.

Key words: molecular genetics, *Trypanosoma*, microfilarie

1. INTRODUÇÃO

A genética surgiu há pouco mais de 100 anos, e desde então tem revolucionado os alicerces da ciência e a nossa compreensão sobre a vida e os seres vivos (GRIFFTHS *et al.* 2016). Entre 1856 a 1863 Gregor Mendel já investigava os modos de herança de determinados caracteres fenotípicos elucidando os mecanismos da hereditariedade por meio de cruzamentos controlados entre variedades de ervilhas-de-jardim, *Pisum sativum* (GRIFFTHS *et al.* 2016). A genética é o estudo dos genes e da hereditariedade, consequentemente de todas as características biológicas derivadas do código genético (ROBINSON, 2005). Apesar de impactantes, os experimentos de Mendel não tiveram o reconhecimento imediato, tendo tido grande repercussão somente 16 anos após sua morte, com seus modelos e métodos aplicados a outros organismos com grande sucesso, sendo considerado o pai da genética (SNUSTAD & SIMMONS, 2013).

Diferentemente da genética mendeliana ou genética clássica, a genética molecular é o estudo do material genético a nível molecular (MCMANUS & BOWLES, 1996; GERALD, 2008). Através da genética molecular conhecemos a estrutura e funcionamento dos genes que representam a porção codificante do DNA, o ácido desoxirribonucleico (SNUSTAD & SIMMONS, 2013; GRIFFTHS *et al.* 2016). A estrutura da molécula de DNA como uma dupla-hélice formando uma estrutura espiral foi proposta em 1953 por Watson e Crick e seu modelo tridimensional, tendo como uma das referências as imagens de difrações de raios X de Rosalind Fanklin em colaboração com Maurice Wilkins (Figura 24) (KLUG, 1968; SNUSTAD & SIMMONS, 2013). O ácido desoxirribonucleico é composto por sequências de nucleotídeos, sendo estes formados por uma molécula de açúcar, uma molécula de fosfato e uma base nitrogenada (SNUSTAD & SIMMONS, 2013; GRIFFTHS *et al.* 2016). Os nucleotídeos, devido às suas conformações, estão ligados por ligações fosfodiéster, unindo-se em pares complementares por ligações de hidrogênio, entre as fitas de DNA (SNUSTAD & SIMMONS, 2013).

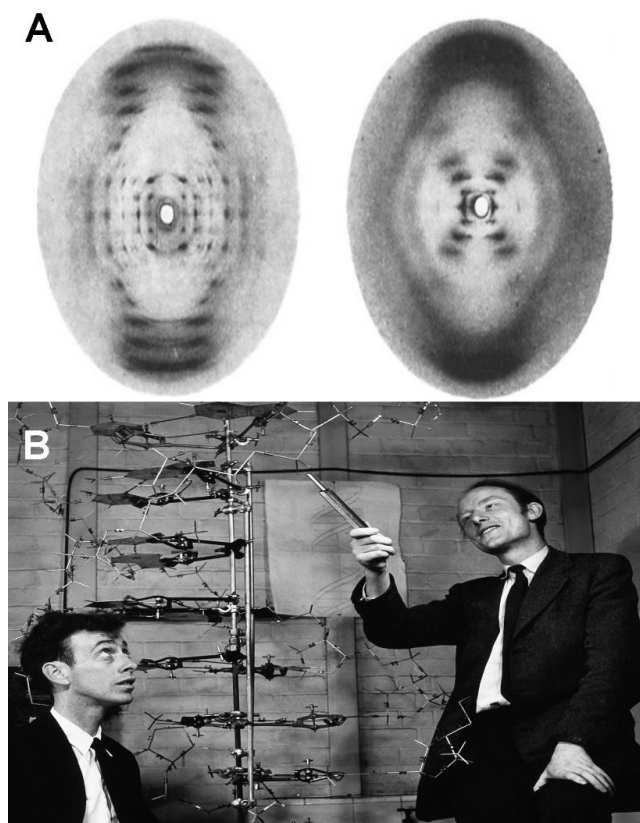


Figura 24: Representações da molécula do ácido desoxirribonucleico (DNA). A – difração de raio-x do DNA feitas por Rosalind Franklin (1953), B - modelo de Watson e Crick (1953). Retiradas de Klug 1968 e <https://bit.ly/2uyOOml>.

A partir da metade do século XX, o principal objetivo dos geneticistas moleculares foi sequenciar o genoma humano (SNUSTAD & SIMMONS, 2013). O primeiro passo se deu com Sanger (1977) desenvolvendo um método capaz de ordenar a sequência de nucleotídeos, denominado de sequenciamento do DNA. Isso possibilitou o próximo grande passo para a humanidade que foi desenvolvimento do Projeto Genoma Humano ou *Human Genome Project* (HGP) (VENTER *et al.* 2001). Com o empenho de cientistas de 17 países, este projeto sequenciou 3,2 bilhões de pares de bases (pb) do genoma humano publicado dois anos antes do prazo inicial de 15 anos (VENTER *et al.* 2001; COLLINS *et al.* 2003).

O HGP mostrou que era possível sequenciar um genoma, e abriu as portas para a possibilidade do sequenciamento de outras espécies, liderando a era genômica (COLLINS *et al.* 2003). A escolha do genoma a ser sequenciado, como no caso do *Plasmodium falciparum* foi devido à sua importância médica, sendo este o agente etiológico da malária que na época apresentava 40% da população mundial vivendo em risco de tal enfermidade (GARDNER *et al.* 2002). Visto que as doenças nas quais possuem como agente etiológico um parasito tal como a malária, a parasitologia é essencial para tanto a conservação da biodiversidade quanto para a saúde pública (DASZAK *et al.* 2000; CAMARGO, 2008). Com grande demanda de estudos devido a sua importância médica, o sequenciamento do genoma do *Trypanosoma cruzi*, agente causador da Doença de Chagas trouxe mais um importante acréscimo à genética molecular e à parasitologia (EL-SAYED *et al.* 2005).

1.1 Genética Molecular na Parasitologia

A parasitologia, como uma área científica e médica, sempre lidou com a necessidade de um diagnóstico efetivo, ou seja, de uma identificação acurada do parasito (MCMANUS & BOWLES, 1996). Desde o início da parasitologia, a identificação e classificação dos parasitos eram feitas através da avaliação óptica, seja esta ao olho nu ou através do microscópio (COX, 2002; MASCARINI, 2003). Como ferramenta de auxílio, é utilizada a análise morfométrica dos parasitos, como visto em tripanosomatídeos (HOARE, 1966). Entretanto, alguns parasitos carecem de uma identificação mais refinada, principalmente devido à problemas de caracterização do grupo (MCMANUS & BOWLES, 1996). O principal motivo da dificuldade de alguns grupos é a variação natural dos caracteres morfológicos (MCMANUS & BOWLES, 1996). Podemos citar como exemplo, o polimorfismo de tamanho em *Trypanosoma minasense* e *T. cruzi* (BRENER, 1969; ZICCARDI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1998, 1999). Diante destas variações, a genética molecular representa uma alternativa para complementar as limitações das análises microscópicas (GEYSEN *et al.* 2003) e tem sido utilizada como uma ferramenta mais precisa na identificação de parasitos (MCMANUS & BOWLES, 1996).

A escolha pela utilização do DNA se deve ao fato dele ser mais estável do que as proteínas e o RNA (MCMANUS & BOWLES, 1996; SNUSTAD & SIMMONS, 2013). A estabilidade do DNA permite uma melhor manipulação e um melhor armazenamento (MCMANUS & BOWLES, 1996).

Para se utilizar o DNA é necessário fazer a extração do mesmo (TAN & YAP, 2009). A primeira extração de DNA foi feita por Friedrich Miescher em 1869, tentando descobrir a composição química das células, e achando se tratar de proteínas, pois seriam os principais componentes no citoplasma. Nos testes executados ele observou um precipitado na solução quando um ácido era adicionado, e que este precipitado se dissolvia quando uma solução alcalina era adicionada (DAHM, 2004; TAN & YAP, 2009). Miescher inferiu que era necessário um protocolo para separar as proteínas do material precipitado e enzimas (DAHM, 2004). O primeiro método de rotina laboratorial para extração de DNA foi desenvolvido por Meselson e Stahl, no qual usavam o gradiente de densidade para separar as moléculas através de uma série de centrifugações (BUCKINGHAM & FLAWS, 2007). Nos métodos atuais são separados por solução tampão (TAN & YAP, 2009). Em geral os métodos envolvem a separação do DNA do resto do material celular e a purificação do produto final (TAN & YAP, 2009). Para isso é feito a lise das membranas, a inativação das nucleases e a separação das impurezas com o solvente orgânico e os processos de centrifugação (DOYLE, 1996; BUCKINGHAM & FLAWS, 2007; TAN & YAP, 2009).

A sequência de DNA de interesse, é obtida por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), que sintetiza milhões de cópias da sequência específica de forma rápida e automatizada a partir do DNA molde (MULLIS *et al.* 1986; ERLICH 1989). Esta técnica foi desenvolvida por Kary Mullis em 1983 quando ele trabalhava para a empresa *Cetus Corporation*, descoberta que lhe concedeu um prêmio Nobel (BARTLETT & STIRLING, 2003).

O processo de amplificação ocorre quando se prepara uma solução contendo o DNA de interesse, os *primers* que constituem sequências curtas que flanqueiam a região

alvo a ser amplificada e os desoxiribonucleotídeos trifosfados ou dNTPs que serão os blocos fundamentais para a construção das novas fitas (SAMBROOK, 1989). Também é adicionada uma solução tampão com um cátion bivalente (Mg), cátions monovalentes (K) que otimizam o processo químico (SAMBROOK, 1989; PAVLOV, 2004). Por último é acrescentada a enzima DNA polimerase termoestável, sendo regularmente utilizada a *Taq* DNA polimerase, proveniente da bactéria *Thermus aquaticus* (Sambrook 1989). Esta enzima, devido ao *status* termofílico da bactéria, suporta as altas temperaturas essenciais ao processo da PCR, para desnaturação do DNA (ERLICH 1989; SAMBROOK, 1989; BARTLETT & STIRLING, 2003).

O processo de amplificação por PCR requer mudanças de temperaturas e por este motivo, é utilizado um aparelho denominado termociclador (ERLICH, 1989; SAMBROOK, 1989; BARTLETT & STIRLING, 2003). Dentro do aparelho, a solução passa por diversas repetições de 3 estágios: desnaturação, anelamento e extensão (ERLICH, 1989). Na desnaturação a temperatura é elevada em torno de 95°C onde as ligações de hidrogênio da dupla-hélice de DNA são rompidas, resultando assim em duas fitas moldes de DNA (ERLICH, 1989; SAMBROOK, 1989; BARTLETT & STIRLING, 2003). No anelamento, em temperaturas mais baixas entre 50-65°C, os *primers*, oligonucleotídeos sintéticos, com aproximadamente 20 pb, iniciadores da polimerização das novas fitas, se ligam por complementaridade, em regiões específicas em cada uma das fitas de DNA (ERLICH, 1989; SAMBROOK, 1989; BARTLETT & STIRLING, 2003). Na extensão, geralmente na temperatura de 72 °C, ideal para a atividade da *Taq* DNA polimerase, uma nova fita de DNA é sintetizada a partir das regiões onde os *primers* anelaram, utilizando os dNTPs livres na solução, sendo estas etapas repetidas por pelo menos 30 ciclos (ERLICH, 1989; SAMBROOK, 1989; BARTLETT & STIRLING, 2003).

A análise de DNA voltada para investigação das relações filogenéticas entre organismos, requer que o gene escolhido seja comum a todo o grupo estudado (MCMANUS & BOWLES, 1996). Por este motivo, genes conservados são os mais utilizados em estudos filogenéticos de parasitos (SOUTO & ZINGALES, 1993; MEYER *et al.* 2010; GEYSEN, 2013). Sequências conservadas são as que permanecem idênticas ou são similares no DNA, RNA ou proteínas entre diferentes espécies (SNUSTAD & SIMMONS, 2013; GRIFFITHS *et al.* 2016). Estas sequências permanecem inalteradas ou pouco alteradas devido à menores taxas de mutação (KIMURA & OHTA, 1974). Sequências conservadas podem ser analisadas filogeneticamente através de análises de homologia e alinhamento, como utilizadas pelo *Basic local Aligment Search Tool* ou BLAST® (MORGULIS *et al.* 2008). A primeira descrição de estruturas conservadas foi em 1966 com as análises de Margaret Dayhoff comparando as sequências da ferredoxina entre diferentes espécies, sendo inferido que a seleção natural conservou a sequência a fim de otimizar e manter o código de uma proteína essencial para a vida (ECK & DAYHOFF, 1966).

Os genes mitocondriais são bastante utilizados nas análises filogenéticas, também na parasitologia, principalmente por serem de herança materna sem ocorrência de recombinação genética (MCMANUS & BOWLES, 1996). Esta característica possibilita reconstruir a história evolutiva dos parasitos, como no caso dos protozoários kinetoplastídeos, grupo de *Trypanosoma* e *Leishmania* (LAKE *et al.* 1988). Um dos genes mitocondriais que é bastante utilizado na identificação e filogenia de diferentes grupos de parasitos é o Citocromo B (*cyt b*) (BENSCH *et al.* 2000; VALKIŪNAS *et al.* 2006; SILVEIRA *et al.* 2013). Este gene codifica a proteína homóloga que tem papel fundamental no metabolismo energético (SNUSTAD & SIMMONS, 2013).

Os genes ribossomais também têm sido utilizados na parasitologia devido ao *status* conservado da sequência da região inter-gênica e da possibilidade de comparação por serem amplamente utilizados pela comunidade científica (MCMANUS & BOWLES, 1996; GEYSEN *et al.* 2003). Dentre a gama de genes ribossomais, destacam-se o *18S rRNA* e *24S rRNA* (SOUTO & ZINGALES, 1993; GEYSEN *et al.* 2003). Estes genes codificam RNA ribossomal, relacionado à síntese proteica, derivando nas subunidades ribossomais menor e maior em eucariotos (HERNÁNDEZ & CASTAÑEDA, 1983). Há *primers* específicos para a amplificação dos genes *18S rRNA* e *24S rRNA* de alguns hemoparasitos, sendo utilizados principalmente para a identificação de trypanosomatídeos como *Trypanosoma vivax*, *Trypanosoma congolense* e *Trypanosoma minasense* (SOUTO & ZINGALES, 1993; GEYSEN *et al.* 2003; SATO *et al.* 2008). *Primers* para o *18S rRNA* e, neste caso, *28S rRNA*, também são utilizados para identificação de nematódeos da família Onchocercidea, ou microfilárias (LEFOULON *et al.* 2015).

Outros marcadores ribossomais utilizados na identificação de parasitos são as sequências de região intrônicas *ITS-1* e *ITS-2*, que pertencem à região não-codificante do rDNA para nematóides (ZHU *et al.* 2000). *Ascaris lumbricoides* que acometem humanos e outros mamíferos é uma das espécies que pode ser identificada através do *primer* para as regiões *ITS-1* e *ITS-2* (ZHU *et al.* 2000). Este *primer* possui um amplo espectro, podendo identificar diversas espécies de nematóides com apelo científico como *Toxocara canis*, *Ascaris suum*, e inclusive aqueles com menos visibilidade na ciência e medicina como as microfilárias *Dipetalonema gracile* e *Mansonela mariae* (ZHU *et al.* 2000; SATO *et al.* 2008).

Diante da possibilidade de identificação através de apenas uma única molécula de DNA, as análises de genética molecular são essenciais para a parasitologia moderna (BENSCH *et al.* 2000; GEYSEN *et al.* 2003; VALKIŪNAS *et al.* 2006). Os marcadores utilizados para investigar a ocorrência e identificar as espécies de tripanosomatídeos e nematódeos, como as sequências para o *18S rRNA* e *ITS-1*, são utilizadas no diagnóstico destes parasitos em saguis, tanto de vida livre quanto de cativeiro (SATO *et al.* 2008; ERKENS WICK *et al.* 2017).

Os objetivos deste capítulo foram: avaliar por PCR a ocorrência de infecção por *Trypanosoma* sp. microfilárias em saguis amostrados na Região Metropolitana do Rio de Janeiro, identificar a espécie de *Trypanosoma* detectado por microscopia nas mesmas amostras; comparar a eficiência deste método com a microscopia; e comparar os valores de prevalência parasitária entre as diferentes localidades de vida livre e cativeiro.

As hipóteses a serem testadas são: a PCR é mais sensível que a microscopia e, portanto, espera-se detectar um maior número de resultados positivos; que os *Trypanosoma* encontrados no JBRJ e UFRRJ pertencem à *T. minasense* de acordo com as análises morfométricas realizadas e já que este parasito já foi detectado em saguis no PNT; e que as localidades de vida livre, devido à maior diversidade biológica, apresentam maior prevalência do que as de cativeiro.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A área de estudo, os procedimentos de captura e coleta de material biológico, sedação e identificação, estão descritos nos itens 2.1 e 2.2 dos Materiais e Métodos do Capítulo I. As localidades de vida livre são: o campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e Jardim Botânico do Rio de Janeiro (JBRJ); e de cativeiro: o Centro de Triagem de Animais Silvestres do Rio de Janeiro (CETAS-RJ), o Biotério do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ (Biotério-UFRJ), incluindo como localidade externa à Região Metropolitana do Rio de Janeiro, o Centro de Reabilitação de Animais Silvestres na Universidade do Vale do Paraíba (CRAS-UNIVAP).

2.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada a partir de 150 µL de sangue total seguindo o protocolo de extração por fenol-clorofórmio (SAMBROOK *et al.* 1989). As amostras de DNA foram quantificadas por dois métodos: em gel de agarose a 0,8% utilizando como marcador o DNA de fago *Lambda* e corado com brometo de etídio e, em *Nanodrop 2000 Thermo Fisher Scientific*®. O gel foi analisado em transiluminador *L.Pix Loccus* (Biotecnologia®). As amostras também foram quantificadas no *Nanodrop* que avalia a absorvância de raios ultravioletas (UV) no caso do DNA na faixa de 260nm de proteínas na faixa de 280nm e de contaminantes orgânicos a 230nm. Utilizando as razões 260/280 e 260/230 se avalia a pureza das amostras. A pureza do DNA é estimada por volta de 1,8 a 260/280 e de 2 a 2,2 a 260/230. Outros valores refletem a presença de contaminantes.

2.2 Reação em Cadeia da Polimerase

Para a identificação da espécie de *Trypanosoma* detectado nas lâminas de esfregaços sanguíneos, foi utilizado um conjunto de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) na reação de PCR: 18ST nF2 (5'-CAA CGA TGA CAC CCA TGA ATT GGG GA-3') e 18ST nR3 (5'-TGC GCG ACC AAT AAT TGC AAT AC-3'), para amplificação de uma região de 700 a 800 pares de bases (pb) do gene ribossomal *18S rRNA*. (GEYSEN *et al.* 2003). As reações foram preparadas para um volume final de 25 µL, contendo solução tampão 1X (*Colorless GoTaq*® *Reaction Buffer - Promega*®), 3 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 mM de cada *primer*, 0,5 U de *Taq DNA polimerase*, acrescidos de 10 ng de DNA e completado o volume final com água ultrapura (*Promega*®). Em todas as análises foi incluído como controle positivo uma amostra de DNA de *Trypanosoma* sp. cedida pelo Departamento de Parasitologia Animal da UFRRJ, cuja sequência está depositada no GenBank® (MH184514), e um controle negativo acrescido de água ultrapura ao invés de DNA para avaliar possível

contaminação dos reagentes. A PCR foi realizada em Termociclador (*MyGene® Series Peltier Thermal Cycler Model Mg96+*) com temperatura inicial de desnaturação a 95 °C por 4 min, seguido de 40 ciclos de 94 °C por 30 seg, 58 °C por 45 seg e 72 °C por 40 seg, e extensão final de 72 °C por 4 min (modificado de GEYSEN *et al.* 2003). Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (10 mg/ml), a 100 V por 1 h e 30 min, incluindo um marcador de peso molecular, DNA *ladder* de 100 pb.

Para detecção das microfilárias por PCR foi utilizado um conjunto de *primers* para amplificação do gene ribossomal *ITS-1*, *primer* direto S.r.ITS1-NC5/F1 (5'-TTA CGT CCC TGC CCT TTG TA -3') e o *primer* reverso NC13R (5'- GCT GCG TTC TTC ATC GAT-3') (ZHU *et al.* 2000; SATO *et al.* 2006). Pela ausência de amostra de controle positivo, os fragmentos esperados para microfilária foram comparados aos publicados a literatura, entre 200 e 300 pb (ZHU *et al.* 2000; SATO *et al.* 2006). As reações consistiram em 3 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 mM de cada *primer*, 0,5 U de *Taq DNA polymerase* utilizando tampão 1X (*Colorless GoTaq® Reaction Buffer - Promega®*) e 10 ng de DNA. Os ciclos de temperatura do termociclador foram: desnaturação inicial por 3 min a 95 °C, seguidos de 35 ciclos de 45 seg a 94 °C, 60 seg a 65 °C, 90 seg a 72 °C e a extensão final de 72 °C por 7 min (ZHU *et al.* 2000).

2.3 Sequenciamento dos Fragmentos Amplificados por PCR.

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o *kit CleanSweep™ PCR Purification Product* (Thermo Scientific®) e sequenciados através do método de Sanger no Centro de Estudos do Genoma Humano – São Paulo, Brasil (CEGH-CEL) (*Csp10* e *Csp19*) e na ACTGene Análises Moleculares. Foram sequenciados os amplicons obtidos por PCR das amostras *Csp20*, *Csp45*, *Csp49*, *Csp50*, *Csp51*, *Csp52*, *Csp53*, *Csp57*, *Csp62* e Uni6. As sequências geradas foram alinhadas com a ferramenta BLAST® - *Basic local Alignment Search Tool* version 2.8.0, um algoritmo que compara sequências biológicas primárias com aquelas depositadas na base de dados do GenBank®, retornando os resultados que apresentaram maior similaridade (MORGULIS *et al.* 2008).

2.4 Análise Filogenética

Para avaliar a proximidade filogenética entre as sequências geradas e aquelas depositadas no GeneBank® com objetivo de identificar a espécie de *Trypanosoma* detectada em lâminas de esfregaços sanguíneos, foi utilizado o *software* Mega 7® (KUMAR *et al.* 2016), com alinhamento por *Clustal W*. A árvore foi construída através do método de *Maximum Likelihood* com *bootstrap* de 1000 replicações utilizando o modelo Kimura-2-parameter (KIMURA, 1980, 1981). Além das sequências geradas neste estudo, foram adicionadas sequências de *T. minasense* (AB36411.1, AB36412.1, MF141847.1) e de outras espécies de *Trypanosoma* para testar a proximidade

filogenética (*T. grayi* KF546526.1, *T. theileri* KF924257.1, *T. thomasbancrofti* KT728396.1, *T. avium* KT728401.1, *T. rangeli* AJ012414.1, *T. cruzi* AF228685.1, *T. cruzi* X53917.1, *T. ralphi* KF546523.1, *T. brucei* M12676.1, *T. vivax* MH184515.1, *T. simiae* AJ009162, *T. evansi* AJ009154.1, *T. triglæ* U39584.1, *T. boissoni* U39580.1, *T. wauwau* TCC1878, *T. rabinowitschæ* AY491765.1, *T. musculi* AJ223568.1, *T. microti* AJ009158.1, *T. talpæ* AJ620545.1, *T. sapaensis* AB242822.1). Também foi incluído um grupo externo representado por *Leishmania infantum* (KF302752.1) e *Crithidia fasciculata* (Y00055.1). As sequências geradas a partir das amostras dos indivíduos *Csp10* (MH578594.2), *Csp19* (MH578593.1) e *Csp20*(MN066342.1), foram publicadas no artigo “Molecular and morphometric identification of *Trypanosoma (Megatrypanum) minasense* in blood samples of marmosets (*Callithrix*: Callithrichidae) from the city of Rio de Janeiro, Brazil” (COIMBRA *et al.* 2019).

3. RESULTADOS

3.1 Análise do DNA Extraído

Do total de 62 amostras de DNA, 51 foram analisadas. A quantificação das 51 amostras em gel de agarose a 0,8% e espectrofotômetro, incluindo valores de 260/280 e 260/230 encontram-se na Tabela 4. Devido à falta de amostra biológica não foi possível realizar a PCR para 11 amostras (*Csp12*, *Csp13*, *Csp22*, *Csp26*, *Csp27*, *Csp28*, *Csp29*, *Csp31*, *Csp32*, *Csp42* e *Csp60*).

Tabela 4: Quantificação em gel de agarose a 0,8% e em *Nanodrop*[®] de DNA extraído a partir de amostras de sangue de saguis *Callithrix* sp. amostrados na cidade do Rio de Janeiro, no Jardim Botânico do Rio de Janeiro; em Seropédica, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e no Centro de Triagem de Animais Silvestres do Rio de Janeiro e no Centro de Reabilitação de Animais Silvestres da Universidade do Vale do Paraíba/Campinas, em São Paulo. - ausência de banda em gel.

ID	Gel Agarose		<i>Nanodrop</i>	
	ng/µl	ng/µl	260/280	260/230
<i>Csp10</i>	8,8	28	1,75	0,99
<i>Csp11</i>	1	112	1,8	0,36
<i>Csp14</i>	1,5	13,5	1,85	1,49
<i>Csp15</i>	3	110	1,88	0,58
<i>Csp16</i>	-	56	2,5	0,91
<i>Csp17</i>	-	136,5	1,91	3,69
<i>Csp18</i>	7	227	2,03	0,98
<i>Csp19</i>	14,9	8,7	1,78	1,06
<i>Csp20</i>	6	4,9	2,17	1,33
<i>Csp21</i>	1	35,9	1,97	2,17
<i>Csp40</i>	2	53,9	1,88	6,88
<i>Csp41</i>	1	8,5	1,79	0,45
<i>Csp33</i>	5	58,8	1,89	11,06
<i>Csp34</i>	1	46,3	1,83	5,75

Tabela 4 continuação.

<i>Csp35</i>	1	59,5	1,87	9,87
<i>Csp36</i>	1	45,5	1,92	3,71
<i>Csp37</i>	1	120	2,16	0,68
<i>Csp38</i>	1	198	1,9	0,42
<i>Csp39</i>	1	231	1,82	0,45
<i>Csp43</i>	10	18,1	2,01	1,73
<i>Csp44</i>	25	14,5	2	0,52
<i>Csp45</i>	20	5,5	2,77	2,35
<i>Csp46</i>	25	19	1,61	0,36
<i>Csp47</i>	18	25	2,09	0,53
<i>Csp48</i>	6	22,1	1,68	0,51
<i>Csp53</i>	12,5	62,4	1,68	0,79
<i>Csp54</i>	4	16,5	2,02	1,12
<i>Csp55</i>	3	154,1	1,8	1,6
<i>Csp58</i>	8	53	1,81	1,14
<i>Csp59</i>	7	76,2	1,84	1
<i>Csp61</i>	6	34	1,81	0,75
<i>Csp62</i>	6	33,9	1,93	1,2
<i>Csp49</i>	11	8,5	2,71	1,35
<i>Csp50</i>	50	10,9	2,39	1,40
<i>Csp51</i>	18	43,8	1,9	1,27
<i>Csp52</i>	60	8,4	2,17	0,76
<i>Csp56</i>	13	40,6	1,78	0,58
<i>Csp57</i>	10	58,8	1,82	1,22
<i>Csp63</i>	3	20,1	2,08	1,21
<i>Csp64</i>	7	20,2	1,97	0,71
<i>Csp65</i>	7	10,9	2,07	1,08
<i>Csp66</i>	35	107,1	1,82	1,46
<i>Csp67</i>	30	69,1	1,92	1,5
<i>Csp68</i>	-	7,7	1,72	0,47
Uni1	-	40,4	1,8	1
Uni2	-	7,7	1,91	0,6
Uni3	150	86,3	1,81	1,53
Uni4	100	14,6	1,94	0,81
Uni5	50	19,2	1,93	0,88
Uni6	100	48,4	1,84	1,43
Uni7	-	10,9	1,88	0,83

ng - nanograma; μ - microlitro; ng/ μ l – razão nanograma/microlitro; 260/280 - razão DNA/proteínas; 260/230 – razão DNA/contaminantes orgânicos.

As metodologias de quantificação apresentaram resultados divergentes, com a quantificação em gel apresentando, na maioria dos casos, concentrações inferiores de DNA em relação à quantificação em *Nanodrop*. Foi observado uma baixa concentração

de DNA quantificado em agarose nas amostras do JBRJ *Csp11*, *Csp14*, *Csp15*, *Csp16*, *Csp17*, *Csp18*, *Csp20*, *Csp21*, *Csp40* e *Csp41*; Biotério-UFRJ *Csp33*, *Csp34*, *Csp35*, *Csp36*, *Csp37*, *Csp38* e *Csp39*; CETAS-RJ *Csp48*, *Csp54*, *Csp55*, *Csp58*, *Csp59*, *Csp61* e *Csp62*; UFRRJ *Csp63*, *Csp64*, *Csp65* e *Csp68*; CRAS-UNIVAP Uni1, Uni2 e Uni7.

3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

3.2.1 Para Diagnóstico de *Trypanosoma*

A amplificação por PCR foi executada para 51 amostras de DNA provenientes do JBRJ (*Csp10*, *Csp11*, *Csp14*, *Csp15*, *Csp16*, *Csp17*, *Csp18*, *Csp19*, *Csp20*, *Csp21*, *Csp40* e *Csp41*), Biotério-UFRJ (*Csp33*, *Csp34*, *Csp35*, *Csp36*, *Csp37*, *Csp38* e *Csp39*), UFRRJ (*Csp49*, *Csp50*, *Csp51*, *Csp52*, *Csp56*, *Csp57*, *Csp63*, *Csp64*, *Csp65*, *Csp66*, *Csp67* e *Csp68*), CETAS-RJ (*Csp43*, *Csp44*, *Csp45*, *Csp46*, *Csp47*, *Csp48*, *Csp53*, *Csp54*, *Csp55*, *Csp58*, *Csp59*, *Csp61* e *Csp62*) e da localidade externa CRAS-UNIVAP (Figuras 25 e 26). Devido à falta de amostra biológica não foi possível realizar a PCR para 11 amostras (*Csp12*, *Csp13* e *Csp22* do JBRJ; *Csp26*, *Csp27*, *Csp28*, *Csp29*, *Csp31* e *Csp32* do Biotério-UFRJ; *Csp42* e *Csp60* do CETAS-RJ).

A amplificação foi positiva em 14 das 51 amostras, sendo 10 de localidades de vida livre, ou seja, três do JBRJ e sete da UFRRJ, e quatro de localidades cativo, três do CETAS-RJ e uma do CRAS-UNIVAP.

Dentre as amostras do JBRJ, foram positivas para *Trypanosoma* sp. aquelas referentes aos indivíduos *Csp10*, *Csp19* e *Csp20*. Estas amostras estão entre as cinco amostras positivas para *Trypanosoma* através da microscopia óptica (Figura 25). Para as outras duas amostras positivas em lâmina e que não amplificaram (*Csp14* e *Csp41*), o DNA foi extraído novamente e foi aumentada a concentração no preparo da PCR, mesmo assim não houve amplificação.

Oito amostras negativas por análise do esfregaço sanguíneo foram positivas para *Trypanosoma* por PCR, sendo cinco da UFRRJ (*Csp50*, *Csp51*, *Csp52*, *Csp53* e *Csp57*), duas do CETAS-RJ (*Csp45* e *Csp62*) e uma do CRAS-UNIVAP/SP (Uni6) (Figura 25). Os amplicons apresentaram aproximadamente 700 pb em gel de agarose a 2% de acordo com o controle positivo (Figura 25).

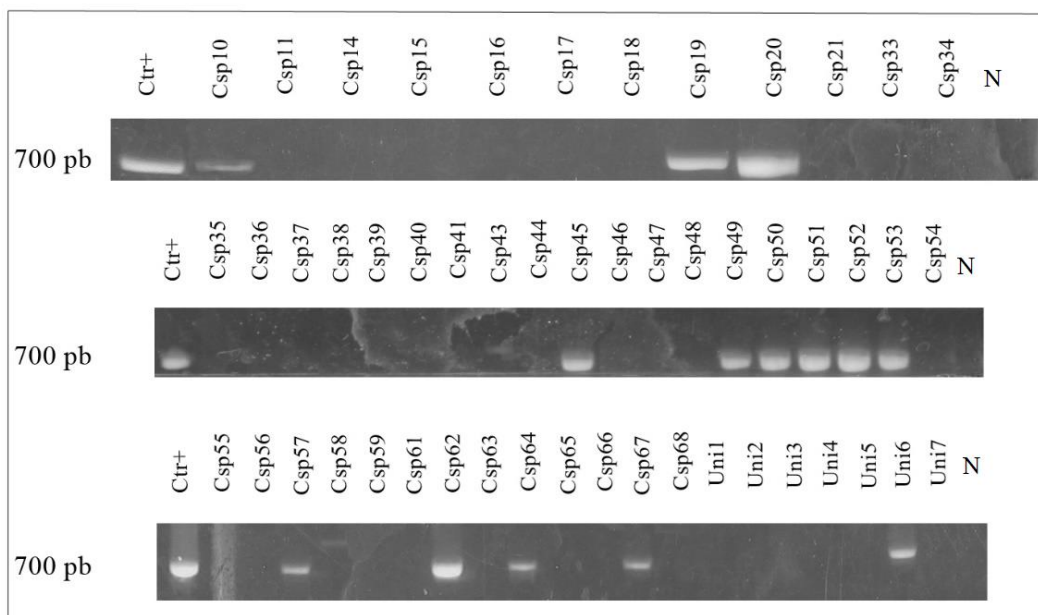


Figura 25: Géis de agarose a 2% com fragmentos de DNA corados com brometo de etídeo. Ctr+ representa o controle positivo e os demais fragmentos foram gerados a partir da amplificação por PCR do gene *18S rRNA* por PCR para identificação da espécie de *Trypanosoma* sp. detectado em *Callithrix* sp. (*Csp* seguido pelo número de identificação do indivíduo) da Região Metropolitana do Rio de Janeiro.

3.2.2 Para Diagnóstico de Microfilária

Não foi possível extrair DNA a partir de 11 amostras de sangue (*Csp12*, *Csp13* e *Csp22* do JBRJ; *Csp26*, *Csp27*, *Csp28*, *Csp29*, *Csp31* e *Csp32* do Biotério-UFRJ; *Csp42* e *Csp60* do CETAS-RJ). Para o diagnóstico de microfilárias, a amplificação por PCR da sequência intrônica *ITS-1* foi testada em 51 amostras de DNA de saguis das três localidades (Figura 26). A amplificação foi positiva para microfilária em 19 amostras, sendo seis da UFRRJ, localidade de vida livre, e 13 de localidades de cativeiro, nove do CETAS-RJ e quatro do CRAS-UNIVAP (Figura 26).

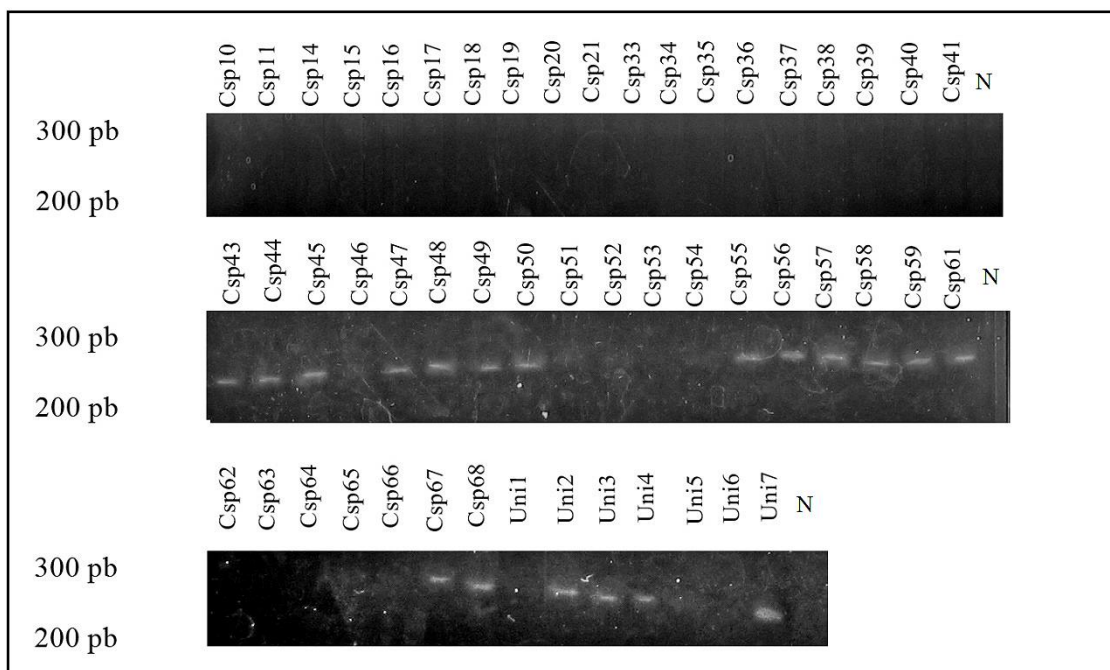


Figura 26: Géis de agarose a 2% com fragmentos de DNA corados com brometo de etídeo, gerados a partir da amplificação da sequência intrônica *ITS-1* por PCR para investigação de microfilárias em saguis *Callithrix* sp. (*Csp* seguido pelo número de identificação do indivíduo) da Região Metropolitana do Rio de Janeiro. No primeiro gel acima, não houve amplificação em nenhuma amostra. Nos géis acima os fragmentos entre 200 e 300 pares de bases estão de acordo com o esperado (ZHU *et al.* 2000; SATO *et al.* 2006). N – controle negativo.

Os dados referentes aos resultados da PCR e da microscopia (Capítulo 1) para detecção de *Trypanosoma* e microfilárias estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Relação dos indivíduos de *Callitrix* sp. amostrados em vida livre e cativeiro em localidades do Rio de Janeiro e uma localidade de cativeiro de São Paulo, com os respectivos hemoparasitos detectados em esfregaços sanguíneos e por reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras destes indivíduos: *Trypanosoma* sp. e microfilária. ID - identificação, *Csp* *Callitrix* sp. seguido da ordem de captura, + positivo para o parasito e – negativo para o parasito.

ID	Local	<i>Trypanosoma</i> sp.		Microfilária	
		Microscópio	PCR	Microscópio	PCR
<i>Csp</i> 10	JBRJ	+	+	-	-
<i>Csp</i> 11	JBRJ	-	-	-	-
<i>Csp</i> 12	JBRJ	-	-	-	-
<i>Csp</i> 13	JBRJ	-	-	-	-
<i>Csp</i> 14	JBRJ	+	-	+	-
<i>Csp</i> 15	JBRJ	-	-	-	-
<i>Csp</i> 16	JBRJ	-	-	-	-
<i>Csp</i> 17	JBRJ	-	-	-	-
<i>Csp</i> 18	JBRJ	-	-	-	-
<i>Csp</i> 19	JBRJ	+	+	-	-
<i>Csp</i> 20	JBRJ	+	+	-	-
<i>Csp</i> 21	JBRJ	-	-	-	-
<i>Csp</i> 22	JBRJ	-	-	+	-
<i>Csp</i> 40	JBRJ	-	-	-	-
<i>Csp</i> 41	JBRJ	+	-	+	-
<i>Csp</i> 26	Biotério-UFRJ	-	-	-	-
<i>Csp</i> 27	Biotério-UFRJ	-	-	-	-
<i>Csp</i> 28	Biotério-UFRJ	-	-	-	-
<i>Csp</i> 29	Biotério-UFRJ	-	-	-	-
<i>Csp</i> 31	Biotério-UFRJ	-	-	-	-
<i>Csp</i> 32	Biotério-UFRJ	-	-	-	-
<i>Csp</i> 33	Biotério-UFRJ	-	-	-	-
<i>Csp</i> 34	Biotério-UFRJ	-	-	-	-
<i>Csp</i> 35	Biotério-UFRJ	-	-	-	-
<i>Csp</i> 36	Biotério-UFRJ	-	-	-	-
<i>Csp</i> 37	Biotério-UFRJ	-	-	-	-
<i>Csp</i> 38	Biotério-UFRJ	-	-	-	-
<i>Csp</i> 39	Biotério-UFRJ	-	-	-	-
<i>Csp</i> 42	CETAS-RJ	-	-	-	-
<i>Csp</i> 43	CETAS-RJ	-	-	-	+
<i>Csp</i> 44	CETAS-RJ	-	-	-	+
<i>Csp</i> 45	CETAS-RJ	-	+	-	+
<i>Csp</i> 46	CETAS-RJ	-	-	-	-
<i>Csp</i> 47	CETAS-RJ	-	-	-	+
<i>Csp</i> 48	CETAS-RJ	-	-	-	+
<i>Csp</i> 53	CETAS-RJ	+	+	-	-
<i>Csp</i> 54	CETAS-RJ	-	-	-	-

Tabela 5 continuação

<i>Csp55</i>	CETAS-RJ	-	-	-	+
<i>Csp58</i>	CETAS-RJ	-	-	-	+
<i>Csp59</i>	CETAS-RJ	-	-	-	+
<i>Csp60</i>	CETAS-RJ	-	-	-	-
<i>Csp61</i>	CETAS-RJ	-	-	-	+
<i>Csp62</i>	CETAS-RJ	-	+	-	-
<i>Csp49</i>	UFRRJ	+	+	-	+
<i>Csp50</i>	UFRRJ	-	+	-	+
<i>Csp51</i>	UFRRJ	-	+	-	-
<i>Csp52</i>	UFRRJ	-	+	-	-
<i>Csp56</i>	UFRRJ	-	-	-	+
<i>Csp57</i>	UFRRJ	-	+	-	+
<i>Csp63</i>	UFRRJ	-	-	-	-
<i>Csp64</i>	UFRRJ	+	+	-	-
<i>Csp65</i>	UFRRJ	-	-	-	-
<i>Csp66</i>	UFRRJ	-	-	-	-
<i>Csp67</i>	UFRRJ	-	+	-	+
<i>Csp68</i>	UFRRJ	-	-	-	+
Uni 1	CRAS-UNIVAP	-	-	-	-
Uni 2	CRAS-UNIVAP	-	-	-	+
Uni 3	CRAS-UNIVAP	-	-	-	+
Uni 4	CRAS-UNIVAP	-	-	-	+
Uni 5	CRAS-UNIVAP	-	-	-	-
Uni 6	CRAS-UNIVAP	-	+	-	-
Uni 7	CRAS-UNIVAP	-	-	-	+

3.3 Análise de Sequenciamento do DNA

Dos amplicons gerados por PCR a partir do gene *18S rRNA* específico para identificação de *Trypanosoma* sp. (Anexo 2), o alinhamento pelo BLAST[®] revelou uma alta homologia com a sequência AB362411.1 depositada no *GenBank*[®] (SATO *et al.* 2008) correspondente à *T. minasense* (subgênero *Megatrypanum*), sendo de 97% para *Csp10*, 98% para *Csp45* e *Csp50* e 99% para *Csp19*, *Csp20*, *Csp49*, *Csp51*, *Csp52*, *Csp53*, *Csp57*, *Csp62* e Uni6. Todas as sequências geradas neste estudo foram depositadas no *GenBank*[®] (<https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/subs/genbank/>) (Anexo 2). Não foi realizado o sequenciamento das amostras *Csp64* e Uni1 devido à baixa concentração de DNA obtida.

3.4 Análise Filogenética

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR a partir do gene *18S rRNA* para identificação de *Trypanosoma* sp. em amostras de *Callithrix* sp., alinharam com *T. minasense* com um grau de sustentação de 73%. Na análise filogenética todas as amostras agruparam com *T. minasense*, formando um clado distinto (Figura 27).

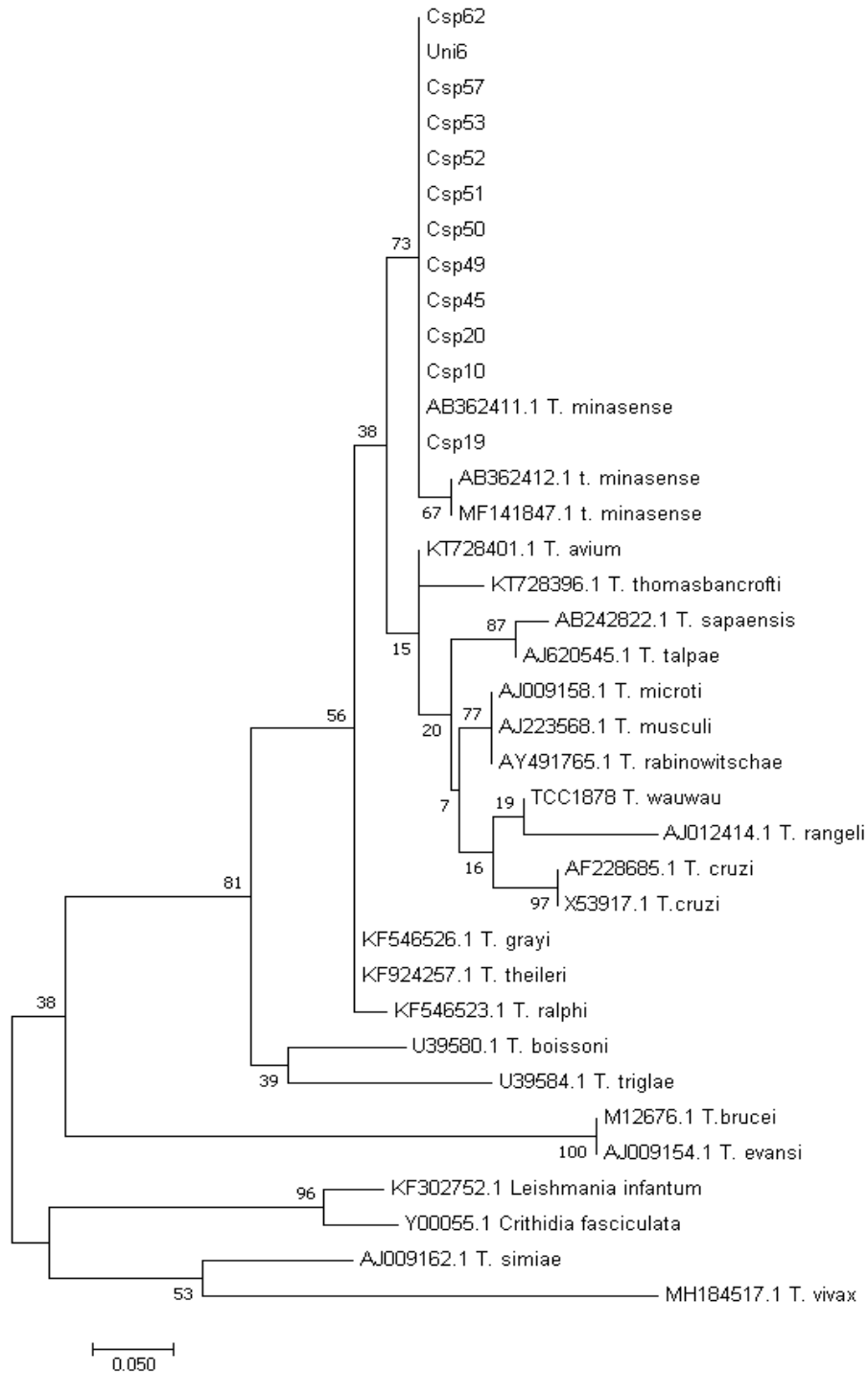


Figura 27: Árvore filogenética construída com o método de *Maximum Likelihood* baseada no alinhamento das sequências do gene *18S rRNA* de *Trypanosoma* sp. detectados em amostras de *Callithrix* sp. do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. As

sequências obtidas estão identificadas por *Csp*. Demais sequências representam outras espécies de *Trypanosoma*. Através do programa MEGA 7[®], foi utilizado *Bootstrap* com 1000 repetições, distâncias evolutivas foram computadas com o método Kimura 2-parameter (KIMURA, 1980, 1981; KUMAR *et al.* 2016).

4. DISCUSSÃO

A parasitologia é uma área da ciência que tem como base fundamental a identificação e classificação das espécies de parasitos, sendo necessário métodos e ferramentas eficazes para tal (MCMANUS & BOWLES, 1996). Existem diversos obstáculos para a identificação de parasitos pela microscopia óptica. Por exemplo, o polimorfismo de tamanho descrito em *Trypanosoma minasense* e *T. cruzi* (BRENER, 1969; ZICCARDI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1998, 1999) dificulta a confirmação da espécie. Do mesmo modo, a utilização apenas da genética molecular pode acarretar em subestimação dos resultados (VALKIŪNAS *et al.* 2006). Resultados discrepantes e falsos negativos por PCR para amostras positivas para parasitos em lâminas podem ocorrer como resultado de uma baixa concentração de DNA, devido à baixa parasitemia e à baixa qualidade da amostra (TENÓRIO *et al.* 2014; ERKENSWICK *et al.* 2017). A microscopia e a análise genética molecular quando combinadas apresentam resultados mais robustos (BENSCH *et al.* 2000; VALKIŪNAS *et al.* 2006).

Dentre as 15 amostras do JBRJ analisadas por microscopia, cinco foram positivas em lâmina para *Trypanosoma* sp., entretanto, apenas três apresentaram resultado positivo para este parasito por PCR. Dentre estas amostras, as negativas por PCR, apresentavam baixa parasitemia.

Apesar dos resultados falsos negativos no presente estudo, a genética molecular é considerada uma metodologia mais precisa para a detecção de parasitos (MCMANUS & BOWLES, 1996; GEYSEN *et al.* 2003). Por esse motivo, espera-se uma maior razão de resultados positivos por PCR nos casos de infecção, em comparação à microscopia. Isto ocorreu nas amostras da UFRRJ, do CETAS-RJ e do CRAS-UNIVAP, onde 11 amostras foram positivas para *Trypanosoma* por PCR e apenas três em lâmina. Igualmente, 17 amostras foram positivas para microfilária por PCR nestas localidades e nenhuma foi positiva na microscopia. Portanto, a genética molecular se confirma como metodologia mais eficaz para detecção de hemoparasitos, corroborando a hipótese inicial.

A baixa parasitemia isoladamente não parece um argumento sólido para o resultado de falso negativo por PCR nas amostras do JBRJ, pois do mesmo modo, as amostras da UFRRJ, CETAS-RJ e CRAS-UNIVAP foram negativas para microfilária pela microscopia, mas positivas pela PCR.

Outro fator que pode contribuir para o resultado falso negativo na PCR é a qualidade da amostra (ERKENSWICK *et al.* 2017). Deste modo, os dados referentes ao tempo em que a amostra foi coletada, quantas vezes foi utilizada, por quantos processos de congelamento e descongelamento passou, parecem ser variáveis importantes para o sucesso da PCR, além da possível taxa de parasitemia. As amostras do JBRJ haviam

sido coletadas há quatro anos e já haviam sido submetidas sucessivos congelamentos e descongelamentos para análises genéticas.

Dentre as amostras de indivíduos de vida livre houve maior número de resultados positivos para *Trypanosoma* sp. (43% de prevalência) do que as de cativeiro (14%). Antagonicamente, dentre as amostras coletadas em cativeiro houve maior número de resultados positivos para microfilárias (44%) se comparadas às localidades de vida livre (21%). Os resultados referentes aos tripanosomatídeos corroboram parcialmente com os resultados e hipóteses das análises do Capítulo I e a deste capítulo, com maior prevalência de infectados em localidades de vida livre. Ao contrário de uma das hipóteses levantadas, o resultado referente à análise genética para a detecção de microfilárias se opõe aos resultados na análise ao microscópio, com maior prevalência de infectados em localidades de cativeiro (44%). O mesmo ocorreu na localidade externa, o CRAS-UNIVAP, que mesmo cercado por telas anti-inseto, apresentou resultado positivo para microfilária por PCR, em quatro dos sete saguis amostrados. Inclusive, três dos saguis infectados nesta localidade (Uni2, Uni3, Uni4) nasceram dentro do recinto. A presença de humanos e demais animais domésticos nas áreas de vida dos saguis pode influenciar positivamente a infecção de nematódeos nos primatas não-humanos (TAVELA *et al.* 2013). Helmintos, principalmente os nematódeos são os parasitos mais comuns em primatas em cativeiro (PANNAYOTOVA-PENCHEVA, 2013). Uma alta densidade de primatas no mesmo recinto, é outro fator que pode aumentar a transmissão de parasitos por mosquitos vetores (WOLFE *et al.* 2002). Como microfilárias são transmitidas por *Aedes* spp., *Culex* spp. e *Anopheles* spp. (SILVA & LANGONI, 2008), a densidade de saguis do CETAS-RJ e do CRAS-UNIVAP pode ter sido um fator que contribuiu para a taxa de infecção maior do que nas localidades de vida livre.

A coinfeção de *T. minasense* e microfilárias é comum (RESENDE *et al.* 1994; SATO *et al.* 2008; ERKENSWIK *et al.* 2017). Já foi descrita para as espécies de calitriquídeos *Leontocebus weddellii* e *Saguinus imperator* de vida livre no Peru, e *Saguinus midas* e do cebídeo *Saimiri sciureus* em cativeiro no Japão (SATO *et al.* 2008; ERKENSWIK *et al.* 2017). Em *Callithrix penicillata*, foi descrita tanto para indivíduos de vida livre quanto de cativeiro no Brasil (RESENDE *et al.* 1994). Neste estudo, a coinfeção foi observada por microscopia a partir dos esfregaços sanguíneos dos indivíduos *Csp14* e *Csp41* do JBRJ descrita no Capítulo I, e através da PCR nos indivíduos *Csp45*, *Csp49*, *Csp50*, *Csp57* e *Csp67*. Sete casos de coinfeção confirmados representam 50% das infecções por *T. minasense* detectadas neste estudo (14) e 41% das infecções por microfilária (17). Os dados obtidos reafirmam o alto índice de coinfeção destes parasitos em *Callithrix* sp.

As sequências obtidas para o gene *18S rRNA* para *Trypanosoma* nas amostras de saguis da Região Metropolitana do Rio de Janeiro, apresentaram alta similaridade com *T. minasense*. Com exceção de três amostras, *Csp10* (97%), *Csp45* e *Csp49* (98%), todas as nove demais amostras apresentaram similaridade de 99% com *T. minasense* (AB362411.11). Este resultado corrobora os dados obtidos pela análise morfométrica que sugeriam esta classificação de acordo com as medidas e o polimorfismo de tamanho encontrado. Deste modo, novos valores de tamanho total (TL 24,14 - 52,11 μ m) foram registrados para a espécie. Embora por meio da microscopia tenha sido observado apenas um parasito no esfregaço do indivíduo *Csp53* cuja morfologia se assemelhava à de *T. cruzi*, a sequência de DNA obtida foi similar em 99% com *T. minasense* (AB362411.11). Uma possibilidade diante destes resultados é uma coinfeção dos dois parasitos com maior parasitemia de *T. minasense* apesar de não ter sido encontrado na

microscopia. Assim como nos resultados de alinhamento pelo BLAST[®], onde as amostras sequenciadas apresentaram em sua maioria 99% de similaridade com *T. minasense*, na análise filogenética elas agruparam entre si, evidenciando a proximidade com esta espécie.

O vetor de *Trypanosoma minasense* não é conhecido (HOARE, 1972; DEANE *et al.* 1974; ZICCARDI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1996; SATO *et al.* 2008). Portanto, não é possível inferir de que modo o tipo de vetor poderia influenciar na diferença entre os resultados positivos para *Trypanosoma* dentre amostras de vida livre e de cativeiro.

A confirmação por sequenciamento genético de que o hemoprotozoário detectado, dentre os indivíduos de *Callithrix* sp. de vida livre na Região Metropolitana do Rio de Janeiro, é *T. minasense*, reduz a preocupação quanto a saúde pública, visto que não há relatos deste parasito infectando humanos, sendo considerado, até o momento, específico de primatas não-humanos (ZICCARDI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1996; SILVA *et al.* 2008). Do mesmo modo, pelo fato deste parasito não causar patologias nos hospedeiros das espécies invasoras de saguis (CHAGAS, 1908; ZICCARDI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1996; SILVA *et al.* 2008) analisados até este momento, é esperado que este achado não represente uma ameaça adicional para a espécie nativa ameaçada de extinção *C. aurita*, embora seja recomendado o monitoramento parasitológico das populações de vida livre de todas estas espécies. É necessária a análise genética para a identificação taxonômica dos demais parasitos detectados no presente estudo, microfilárias e *Babesia* sp., para que se possa avaliar se há implicações em termos de Saúde Pública e para a preservação da biodiversidade nativa desta região.

5. CONCLUSÃO

A análise genética molecular por PCR foi mais eficaz na detecção de hemoparasitos comparada à microscopia em 43%, tanto para *Trypanosoma* quanto para microfilárias.

A baixa parasitemia e qualidade da amostra, referente ao tempo decorrente entre a sua coleta e análise genética molecular, influenciou no número de resultados falsos negativos por PCR nas amostras do JBRJ.

Para diagnóstico mais preciso na detecção de hemoparasitos, é recomendado associar as análises microscópicas e de genética molecular.

Na comparação entre localidades de vida livre x cativeiro, foram obtidos mais resultados positivos por PCR para *Trypanosoma*, dentre os indivíduos de *Callithrix* sp. amostrados em localidades de vida livre.

A maioria das detecções de microfilária por PCR foi em *Callithrix* sp. em cativeiro.

Através do sequenciamento dos 12 fragmentos do gene *18S rRNA* obtidos a partir das amostras de sangue de *Callithrix* sp. e do alinhamento das sequências obtidas, a espécie de *Trypanosoma* encontrada nos saguis deste estudo foi identificada com no

mínimo de 97% de similaridade genética como *T. minasense*, agrupando no mesmo mesmo clado na análise filogenética, com 73% de sustentação.

CONCLUSÕES GERAIS

Através das análises dos esfregaços sanguíneos por microscopia óptica e das análises de genética molecular, os saguis, *Callithrix* sp., da Região Metropolitana do Rio de Janeiro, das localidades JBRJ, CETAS-RJ e UFRRJ apresentaram infecção por *Trypanosoma minasense*, microfilárias e, possivelmente, por *Babesia* sp.

A espécie *Trypanosoma minasense* foi confirmada pelas análises de microscopia óptica e de genética molecular por PCR. Este é o primeiro registro de infecção por este hemoparasito em *Callithrix* sp., nas localidades do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, RJ e do campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

Pelas análises de microscopia, amostras de vida livre apresentaram maior prevalência, intensidade média e diversidade de parasitos encontrados do que aqueles de cativeiro para todos os hemoparasitos detectados.

Análises genéticas por PCR com a amplificação dos fragmentos do gene *18S rRNA* para *Trypanosoma*, apresentaram maior taxa de prevalência parasitária em localidades de vida livre.

Para microfilárias o resultado foi oposto ao detectado para *Trypanosoma*, com a maioria dos resultados positivos por PCR, nas localidades de cativeiro.

A análise genética molecular apresentou resultados mais eficazes na detecção de *Trypanosoma* e microfilárias se comparado à microscopia em 43%.

Os resultados aqui obtidos corroboram com a hipótese de que os saguis nas localidades de vida livre, devido à diversidade de plantas e animais, alta densidade de humanos e a falta de barreiras físicas a vetores, carregam uma maior diversidade e intensidade média de parasitos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M.A.B.; CARDOSO, G.C.; SANTOS, E.; et al. 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*, 8(3): e2741. 2014.
- ALMEIDA, M.A.B.; SANTOS, E.; CARDOSO, G.C.; et al. Yellow fever outbreak affecting *Alouatta* populations in southern Brazil (Rio Grande do Sul State), 2008-2009. *American Journal of Primatology*, 74: 68-76. 2012.
- ALTAY, K.; DUMANLI, N; AKTAS, M. Molecular identification, genetic diversity and distribution of *Theileria* and *Babesia* species infecting small ruminants. *Veterinary Parasitology*, 147: 161-165. 2007.
- ALTIZER, S.; DOBSON, A.; HOSSEIN, P.; et al. Seasonality and the dynamics of infectious diseases. *Ecology Letters*, 9(4): 467-484. 2006.
- ANDESON, W. Climates of opinion: acclimatization in nineteenth-century France and England. *Victorian Studies*, 35: 135-138. 1992.
- ANTONELLI, A.; ZIZKA, A.; CARVALHO, F.A.; et al. Amazonia is the primary source of neotropical biodiversity. *PNAS Latest Articles*, 1-6. 2018.
- ARNOLD, D. "Illusory riches": representations of the tropical world. *Singapore Journal of Tropical Geography* 21(1): 6-18. 2010.
- ÁVILA-PIRES, F.D. Zoonoses: hospedeiros e reservatórios. *Caderno de Saúde Pública*, 5: 82-97. 1989.
- AZEVEDO, C. O santuário ameaçado da Mata Atlântica. *Geográfica Universal*, Rio de Janeiro, 265: 23-40. 1997.
- BABES, V. Sur l'hémoglobinurie du boef. *Comptes Rendus Academy Science*, 107: 692-694. 1888.
- BAIN, O.; BABAYAN, S. Behaviour of filarie: morphological and anatomical signatures of their life style within the arthropod and vertebrate hosts. *Filaria Journal*, 2: 2-12. 2003.
- BARRET A.D.; MONATH T.P. Epidemiology and ecology of yellow fever virus. *Advances in Virus Research*, 61: 291-315. 2003.
- BARTLETT, J.M.S.; STIRLING, D. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. *PCR Protocols 2 ed. Methods in Molecular Biology*, 226: 3-6. 2003.
- BENSCH, S.; STJERNMAN, M.; HASSELQUIST, D.; et al. Host specificity in avian blood parasites: a study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 267: 1583-1589. 2000.
- BERGALLO, H.G.; HATANO, F.M.; JUCÁ, N.; GETTINGER, D. The effect of botfly parasitism of *Metacuterebra apicalis* (Diptera) on reproduction, survival and general health of *Oryzomys russatus* (Rodentia) in Southeastern Brazil. *Mammalia*, 64(4): 439-446. 2000.

BEZERRA, B.; BICCA-MARQUES, J.; MIRANDA, J.; MITTERMEIER, R.A.; OLIVEIRA, L.; PEREIRA, D.; RUIZ-MIRANDA, C.; VALENÇA MONTENEGRO, M.; DA CRUZ, M.; DO VALLE, R.R. 2018. *Callithrix jacchus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2018: e.T41518A17936001. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T41518A17936001.e>. Acessado em 20 de Abril de 2019.

BICCA-MARQUES, J. Urbanization (and primate conservation). The International Encyclopedia of Primatology. 2016.

BICCA-MARQUES, J.; JERUSALINSKY, L.; MITTERMEIER, R.A.; PEREIRA, D.; RUIZ-MIRANDA, C.; RÍMOLI, J.; VALENÇA MONTENEGRO, M.; DO VALLE, R.R. 2018. *Callithrix penicillata*. The IUCN Red List of Threatened Species 2018: e.T41519A17935797. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T41519A17935797.en>. Acessado em 20 de Abril de 2019.

BONTROP, R.E. Non-human primates: essential partners in biomedical research. Immunological Reviews, 183: 5-9. 2001.

BONILLA-ALDANA, D. K.; DHAMA, K.; RODRIGUEZ-MORALES, A. J. Revisiting the One Health Approach in the context of COVID-19: A look into the ecology of this emerging disease. Advances in Animal and Veterinary Sciences, 8 (3): 234, 2020.

BRANDÃO, L.D.; DEVELEY, P.F. Distribution and conservation of the buffy-tufted-ear marmoset, *Callithrix aurita*, in lowland coastal Atlantic forest, south-east Brazil. Neotropical Primates, 3(2): 48-49. 1998.

BRENER, Z. Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. Annals of Tropical Medicine & Parasitology, 59(1): 19-26. 1965.

BRENER, Z. The behaviour of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood-stream of normal and immune mice. Annals of Tropical Medicine & Parasitology, 63: 215-220. 1969.

BUCKINGHAM, L.; FLAWS, M.L. Molecular Diagnostics: Fundamentals, Methods, & Clinical Applications, F.A. Davis, Philadelphia, Pa, USA, 2007.

BURLEIGH, B.A.; ANDREWS, N.W. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. Annual Review of Microbiology, 49: 175-200. 1995.

BUSH, A.O.; LAFFERTY, K.D.; LOTZ, J.M.; SHOSTAK, A.W. Parasitology Meets Ecology on its Own Terms: Margolis et al. Revisited. Journal of Parasitology, 83: 575-583. 1997.

CAMARGO, E.P. Doenças tropicais. Estudos Avançados, 22(64): 95-110. 2008.

CARVALHO, R.S.; SILVA, D.A.; LOIOLA, D.G.; PEREIRA, D.G.; CARVALHO, E.F.; BERGALLO, H.G. Molecular identification of a buffy-tufted-ear marmoset (*Callithrix aurita*) incorporated in a group of invasive marmosets in the Serra dos Órgãos National Park, Rio de Janeiro - Brazil. Forensic Science International: Genetics Supplement Series 4: 230-231. 2013.

CHANDY, A.; THAKUR, A.S.; SINGH, M.P.; MANIGAUHA, A. A review of neglected tropical diseases: filariasis. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 581-856. 2011.

- CHAGAS, C. *Trypanosoma minasense*. Brazil-Médico 22: 471. 1908.
- COHEN, J.M. The four voyages of Christopher Columbus. London, Cresset Library. 1988.
- COIMBRA, D.P.; PENEDO, D.M.; SILVA, M.O.M.; ABREU, A.P.M.; SILVA, C.B.; VERONA, C.E.; HELIODORO, G.C.; MASSARD, C.L.; NOGUEIRA, D.M. Molecular and morphometric identification of *Trypanosoma (Megatrypanum) minasense* in blood samples of marmosets (*Callithrix*: Callithricidae) from the city of Rio de Janeiro, Brazil. Parasitology International, 75. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2019.101999>
- COIMBRA-FILHO, A.F. Sagui-da-serra *Callithrix flaviceps* (Thomas, 1903). FBCN/Rio de Janeiro, 10(1): 3. 1986a.
- COIMBRA-FILHO, A.F. Sagui-da-serra-escuro *Callithrix aurita* (É. Geoffroy, 1812). FBCN/Rio de Janeiro, 10(2): 3. 1986b.
- COIMBRA-FILHO, A.F. Sistemática, distribuição geográfica e situação atual dos símios brasileiros (Platyrrhini-Primates). Revista Brasileira de Biologia, 50: 1063-1079. 1990.
- COIMBRA-FILHO, A.F.; CAMARA, I.G. Os limites originais do Bioma Mata Atlântica na região Nordeste do Brasil. Fundação Brasileira para a Conservação da Natureza, Rio de Janeiro. 1996.
- COIMBRA-FILHO, A.F.; MITTERMEIER, R.A. New data on the taxonomy of the Brazilian marmosets of the genus *Callithrix* Erxleben, 1777. Folia Primatologica, 20: 241-264. 1973.
- COLLINS, F.S.; MORGAN, M.; PATRINOS, A. The Human Genome Project: lessons fom large-scale biology. Science, 300: 286-290. 2003.
- COX, F.E.G. History of human parasitology. Clinical Microbiology Reviews, 15(4): 595-612. 2002.
- CUNHA, A.; VIEIRA, M. Present and past primate community of the Tijuca Forest, Rio de Janeiro. Neotropical Primates, 12(3): 153-154. 2004.
- DAHM, R. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. Developmental Biology, 278: 274-288. 2004.
- DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A.A.; HYATT, A.D. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. Acta Tropica, 78: 103-116. 2001.
- DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A.A.; HYATT, A.D. Emerging infectious diseases of wildlife – threats to biodiversity and human health. Science, 287: 442–449. 2000.
- DAVIES, T.; PEDERSEN, A. Phylogeny and geography predict pathogen community similarity in wild primates and humans. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 275: 1695-1701. 2008.
- 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.

- DETOGNE, N.; FERREGUETTI, A.C.; MELLO, J.H.; et al. Spatial distribution of buffy-tufted-ear marmoset (*Callithrix aurita*) in a tropical rainforest reserve in southeastern Brazil. *American Journal of Primatology*: 1-11. 2017.
- DOYLE, K. *The Source of Discovery: Protocols and Applications Guide*, PROMEGA, Madison, Wis, USA, 1996.
- DVORAK, J.A. New in vitro approach of to quantification of *Trypanosoma cruzi* – vertebrate interactions. In: *American Trypanosomiasis Research*. PAHO Scientific Publication No 318 Session II, A The parasite and the Host's response, Washington, 109-120. 1976.
- EBERHARD, M.L.; LOWRIE JR., R.C. Laboratory studies on *Mansonella marmosetae* in the squirrel monkey, *Saimiri sciureus*. *Journal of Parasitology*, 73: 233-234. 1987.
- EBERHARD, M.L.; ORIHHEL, T.C. The genus *Mansonella* (Syn. *Tetrapelonema*) A new classification. *Annales de Parasitologie Humaine et Comprée*, 59(5): 483-496. 1984.
- ECK, R.V.; DAYHOFF, M.O. Evolution of the Structure of Ferredoxin Based on Living Relics of Primitive Amino Acid Sequences. *Science*, 152(3720): 363-366. 1966.
- EL-SAYED, N.M.; MYLER, P.J.; BARTHOLOMEU, D.C.; et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*, 309: 409-415. 2005.
- ERKENSWICK, G.A.; WATSA, M.; GONZALO, A.S.; DMYTRYK, N.; PARKER, P.G. Temporal and demographic blood parasite dynamics in two free-ranging neotropical primates. *International Journal of Parasitology*, 6: 59-68. 2006.
- ERLICH, H.A. *PCR technology: Principles and applications for DNA amplification*. Stockton Press. 1989.
- ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. Canine heartworm disease. In: Atkins, C. (Ed.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Elsevier Saunders, St. Louis, pp. 1118-1144. 2005.
- EVANS, D.B.; GELBAND, H.; VLASSOFF, C. Social and economic factors and the control of lymphatic filariasis: a review. *Acta Tropica*, 53: 1-26. 1993.
- FOSTER, W.D. *A history of parasitology*. E & S Livingston-Ltda, Edimburgo-Londres. 1965.
- FOSTER, P.; FOSTER, L.; RENFREW, C.; FOSTER, M. Phylogenetic network analysis of SARS-COV-2 genomes. *PNAS*, 117 (17): 9241-9243, 2020.
- FOX, L.M.; KING, C.L. Lymphatic filariasis. In: Magill AJ, Hill DR, Solomon T, Ryan ET (ed) *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases*, 9th edn. Saunders Elsevier Press, 816-822. 2013.
- FREELAND, W.J. Functional aspects of primate grooming. *The Ohio Journal of Science*, 81(4): 173-175. 1981.
- GALARDO, A.K.; ZIMMERMAN, R.H.; LOUNIBOS, L.P.; et al. Seasonal abundance of anopheline mosquitoes and their association with rainfall and malaria. *Medical and Veterinary Entomology*, 23(4): 335-349. 2009.

- GARCEZ, L.M.; et al. Focos de dirofilariose canina na ilha do Marajó: um fator de risco para a saúde humana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical de São Paulo*, 39(4): 333-336, 2006.
- GENCHI, C. Human babesiosis, an emerging zoonosis. *Parassitologia*, 49(1): 29-31. 2007.
- GERALD, K. *Cell and Molecular biology Concepts and experiments*. Wiley, 5th edition, 864. 2008.
- GEYSEN, D.; DELESPAUX, V.; GEERTS, S. PCR-RFLP using *Ssu*-rDNA amplification as an easy method for species-specific diagnosis of *Trypanosoma* species in cattle. *Veterinary Parasitology*, 110: 171-180. 2003.
- GIEMSA, G. Eine Vereinfachung und Vervollkommnung meiner Methylenblau-Eosin-Färbemethode zur Erzielung der Romanowsky-Nocht'schen Chromatinfärbung. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 37: 308-311. 1904.
- GILLESPIE, T.R. Noninvasive assessment of gastrointestinal parasite infection in free-ranging primates. *International Journal of Primatology*, 27(4): 1129-1143. 2006.
- GOLDANI, L.Z. Yellow fever outbreak in Brazil, 2017. *The Brazilian Journal of Infectious Disease*, 21(2): 123-124. 2017.
- GRECO, D.B.; TUPINAMBÁS, U.; FONSECA, M. Influenza A (H1N1): histórico, estado atual no Brasil e no mundo, perspectivas. *Revista Médica de Minas Gerais*, 19(2): 132-139. 2009.
- GRIFFITHS, A.J.F.; WESSLER, S.R.; CARROL, S.B.; DOEBLEY, J. *Introdução à genética* 11 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, 2052 p. 2016.
- GUHL, F.; VALLEJO, G.A. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920 – An update review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(4): 435-442. 2003.
- HAAG, J.; O'HUIGIN, C.; OVERTH, P. The molecular phylogeny of trypanosomes: evidence for an early divergence of the Salivaria. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 91: 37-49. 1998.
- HEALY, G.R.; RUEBUSH, T.K. Morphology of *Babesia microti* in human blood smears. *American Journal of Clinical Pathology*, 73(1): 107-109. 1980.
- HERNANDES, R.; CASTAÑEDA, M. An endonuclease restriction analysis of the ribosomal RNA genes of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 8: 305-315. 1983.
- HELIODORO, G.; VERONA, C.E.; RAJÃO, H. Animais domésticos e o risco de transmissão de agentes patogênicos para a fauna silvestre na área de entorno do Parque Nacional da Tijuca. *Biodiversidade Brasileira*, 10(2): 132-147, 2020.
- HEARN, J.P. The Common Marmoset (*Callithrix jacchus*). In: HEARN, J.P. *Reproduction in New World Primates*, Springer, Dordrecht, 181-215. 1983.
- HILÁRIO, R.R.; FERRAZ, D.S.; PEREIRA, D.G.; MELO, F.R.; OLIVEIRA, L.C.; VALENÇA-MONTENEGRO, M.M. 2015. Avaliação do Risco de Extinção de *Callithrix flaviceps* (Thomas, 1903) no Brasil. Processo de avaliação do risco de extinção da fauna brasileira. ICMBio. <http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/lista-de-especies/7201->

mamiferos-callithrix-flaviceps-sagui-da-serra-claro.html. Acessado em 5 de maio de 2019.

HOARE, C.A. The Trypanosomes of Mammals – A Zoological Monograph. Blackwell Sc. Publications, Oxford (1972).

HOARE, C.A. The classification of mammalian trypanosomes, *Ergbn. Mikrobiol. Imm. Forsch. Exp. Ther.*, 39 43-57. 1966.

HOMER, M.J.; AGUILAR-DELFIN, I.; TELFORD III, S.R.; et al. Babesiosis. *Clinical Microbiology Review*, 13(3): 451. 2000.

HOORN, C.; WESSELINGH, F.P.; TER STEEGE, H.; et al. Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science*, 330: 927-931. 2010.

HUTCHINS, M.; BARASH, D.P. Grooming in primates: implications for its utilitarian functions. *Primates*, 17(2): 145-150. 1976.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. Disponível em <http://www.cidades.ibge.gov.br/>. Acessado em 02 de Janeiro de 2019.

INSTITUTO ESTADUAL DO AMBIENTE (INEA). Disponível em <http://www.inea.rj.gov.br/>. Acessado em 02 de Janeiro de 2019.

JHONSON-DELANEY, C. A. Common parasites of primates. *Veterinary Clinics: Exotic Animals*, 12: 563-581. 2009.

JOVANI, R.; TELLA, J.L. Parasite Prevalence and sample size: misconceptions and solutions. *Trends in Parasitology*, 22: 214-218. 2006.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16:111-120. 1980.

KIMURA, M.; OHTA, T. On Some Principles Governing Molecular Evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 71(7): 2848-2852. 1974.

KLUG, A. Rosalind Franklin and the Discovery of the Structure of DNA. *Nature*, 219: 808-844. 1968.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33: 1870-1874. 2016.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.M. Esporotricose e outras micoses gomosas. *Micologia Médica*, 233-247.1991.

LAKE, J.A.; DE LA CRUZ, V.F.; FERREIRA, P.C.G.; et al. Evolution of parasitism: Kinetoplastid protozoan history reconstructed from mitochondrial rRNA genes sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 85: 4779-4783. 1988.

LARDEUX, F.; RIVIERE, F.; SÉCHAN, Y.; LONCKE, S. Control of the *Aedes* vectors of the dengue viruses and *Wuchereria bancrofti*: The French Polynesian experience. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 96(2): 105-116. 2002.

- LEFOULON, E.; BOURRET, J.; JUNKER, K.; GUERRERO, R. Shaking the Tree: Multi-locus Sequence Typing Usurps Current Onchocercid (Filarial Nematode) Phylogeny. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(11): e0004233. 2015.
- LISBOA, C.V.; MANGIA, R.H.; RUBIÃO, E.; et al. *Trypanosoma cruzi* transmission in a captive primate unit, Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Tropica*, 90: 97-106. 2004.
- LOWIE, S.; BROWNE, M.; BOUDJELAS, S.; DE POORTER, R. 100 of the world's worst invasive alien species. A selection from the Global Invasive Species Database. Published by The Invasive Species Specialist Group (ISSG) a specialist group of the Species Survival Commission (SSC) of the World Conservation Union (IUCN), 12pp. 2000.
- LOWRIE, R.C.; EBERHARD, M.L.; ORIHIEL, T.C. Development of *Tetratopplema marmosetae* to infective stage in *Culicoides hollensis* and *C. furens*. *Journal of Parasitology*, 64(6): 1003-1007. 1978.
- LU, H.; STRATTON, C.W.; TANG, Y.; Outbreak of pneumonia of unknown etiology in wuhan China: the mystery and the miracle. *Journal of Medical Virology*, 2020.
- MAAMUN, J.M.; SULEMAN, M.A.; AKINYI, M.; et al. Prevalence of *Babesia microti* in free-ranging baboons and African green monkeys. *Journal of Parasitology*, 97(1): 63-67. 2011.
- MACHADO, A.A. How to prevent, recognize and diagnose infection with the swine-origin Influenza A (H1N1) virus in humans. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 35(5): 464-469. 2009.
- MADALOSSO, G.; PELLINI, A.C.; VASCONCELOS, M.J.; RIBEIRO, A.F.; WEISSMANN, L.; OLIVEIRA FILHO, G.S.; PENALVA DE OLIVEIRA, A.C.; VIDAL, J.E. Chagasic meningoencephalitis: case report of a recently included AIDS-defining illness in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo*, 46(4): 199-202. 2004.
- MALUKIEWICZ, J.; BOERE, V.; FUZESEY, L.F.; et al. Hybridization effects and genetic diversity of the common and black-tufted marmosets (*Callithrix jacchus* and *Callithrix penicillata*) mitochondrial control region. *American Journal of Physical Anthropology*, 15p. 2014.
- MALUKIEWICZ, J. A review of experimental, natural and anthropogenic hybridization in *Callithrix* marmosets. *International Journal of Primatology*, 4(1): 72-98. 2018.
- MASCARINI, L.M. Uma abordagem histórica da trajetória da parasitologia. *Ciência e Saúde Coletiva*, 8(3): 809-814. 2003.
- MCMANUS, D.P.; BOWLES, J. Molecular Genetics approaches to parasite identification: their value in diagnostic parasitology and systematics. *International Journal of Parasitology*, 26(7): 687-704. 1996.
- MELO, F.R. Helminth parasites of *Callithrix geoffroyi*. *Laboratory Primate Newsletter*, 46(2): 7-9. 2004.
- MELO, F.R.; FERRAZ, D.S.; VALENÇA-MONTENEGRO, M.M.; OLIVEIRA, L.C.; PEREIRA, D.G.; Port-Carvalho, M. Avaliação do Risco de Extinção de *Callithrix aurita* (É. Geoffroy, 1812) no Brasil, Processo de avaliação do risco de extinção da fauna brasileira. *ICMBio*. 2015.

- MELO, F.; BICCA-MARQUES, J.; FERRAZ, D. DA S.; JERUSALINSKY, L.; MITTERMEIER, R.A.; OLIVEIRA, L.C.; PORT-CARVALHO, M.; RUIZ-MIRANDA, C.R.; VALENÇA MONTENEGRO, M.; DA CUNHA, R.; DO VALLE, R.R. *Callithrix aurita* (amended version of 2019 assessment). The IUCN Red List of Threatened Species. 2020.
- MEYER, A.; TODT, C.; MIKKELSEN, N.T.; LIEB, B. Fast evolving 18S rRNA sequences of Solenogastres (Mollusca) resist standart PCR amplification and give new insights into mollusk substitution rate heterogeneity. *BMC Evolutionary Biology* 10: 70. 2010.
- MICHAUD, C.; TANTALEAN, M.; IQUE, C.; et al. A survey for helminth parasites in feral New world non-human primate populations and its comparison with parasitological data from man in the region. *Journal of Medical Parasitology*, 32: 341-345. 2003.
- MIRANDA, G.H.B.; FARIA, D.S. Ecological aspects of black-pinelled marmoset (*Callithrix penicillata*) in the Cerradão and Dense Cerrado of the Brazilian Central Plateau. *Brazilian Journal of Biology*, 61: 397-404. 2001.
- MITTERMEIER, R.A.; et al. The World's most endangered primates 2004-2005. IUCN/SSC Primate specialist group (PSG), International Primatological Society (IPS), Conservation International (CI). 2005, 48p.
- MOORE, J.A.; KUNTZ, R.E. *Babesia microti* infections in non-human primates. *Journal of Parasitology*, 67(3): 454-456. 1981.
- MORGULIS, A.; COULOURIS, G.; RAYTSELIS, Y.; MADDEN, T.L.; GARWALA, R.; SCHÄFFER, A.A. Database Indexing for Production MegaBLAST Searches. *Bioinformatics*, 24:1757-1764. 2008.
- MORRONE, J.J. Biogeographical regionalization of the Neotropical region. *Zootaxa*, 3782(1): 1-110. 2014.
- MORSE, S.S. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerging Infectious Diseases*, 1(1): 7-15. 1995.
- MULLIS, K.D.; FALLON, E.A. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155: 335-350. 1986.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; DA FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403: 853-858. 2000.
- NAYAR, J.K.; KNIGHT, J.W. *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): an experimental and natural host of *Dirofilaria immitis* (Filarioidea: Onchocercidae) in Florida, U.S.A. *Encomologic Society of America*, 36(4): 441-448. 1999.
- NEVES, D.P.; DE MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. *Parasitologia Humana* 11 edição. São Paulo: Atheneu. 2005.
- NEVES, L.; BICCA-MARQUES, J.; JERUSALINSKY, L.; MITTERMEIER, R.A.; PEREIRA, D.G.; RYLANDS, A.B. 2019. *Callithrix kuhlii*. The IUCN Red List of Threatened Species. 2019.
- NEWSON, H.D. Arthropod problems in recreation areas. *Annual Review of Entomology*, 22: 333-353. 1977.

NORRIS, D.; ROCHA-MENDES, F.; MARQUES, R.; et al. Density and spatial distribution of buffy-tufted-ear marmosets (*Callithrix aurita*) in a continuous Atlantic forest. *International Journal of Primatology*, 32: 811-829. 2011.

NOTARNICOLA, J.; PINTO, M.C.; NAVONE, G.T. Host occurrence and geographical distribution of *Dipetalonema* spp. (Nematoda: Onchocercidae) in neotropical monkeys and the first record of *Dipetalonema gracile* in Ecuador. *Comparative Parasitology*, 75(1): 61-68. 2008.

OI, M.; YOSHIKAWA, S.; ICHIKAWA, Y.; et al. Prevalence of *Dirofilaria immitis* among shelter dogs in Tokyo, Japan, after a decade: comparison of 1999-2001 and 2009-2011. *Parasite*, 21(10): 1-3. 2014.

ONU. Organização das Nações Unidas 2019. UN Report: Nature's Dangerous Decline 'Unprecedented'; Species Extinction Rates 'Accelerating'. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/blog/2019/05/nature-decline-unprecedented-report/>. Acessado em 8 de maio de 2019.

ORIHIL, T.C.; EBERHARD, M.L. Zoonotic filariasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(2): 366-381. 1988.

OVIEDO, G.F. *Natural History of the West Indies*, Chapel Hill: University of North Carolina Press. 1959.

PAGLIA, A.; FONSECA, G.A.B.; RYLANDS, A.B.; et al. Lista anotada de mamíferos do Brasil 2 ed. *Conservation International*. 2012.

PAIVA, F.; DE LEMOS, R.A.A.; NAKAZATO, L.; et al. *Trypanosoma vivax* em bonivos no pantanal do estado do Mato Grosso do Sul, Brasil: I- acompanhamento clínico, laboratorial e anatomopatológico de rebanhos infectados. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 9(2): 135-141. 2000.

PANAYOTOVA-PENCHEVA, M.S. Parasites in captive animals: a review of studies in some European zoos. *Zoology Garten* 82: 60-71. 2013.

PAVLOV, A.R.; PAVLOVA, N.V.; KOZYAVKIN, S.A.; SLESAREV, A.I. Recent developments in the optimization of thermostable DNA polymerases for efficient applications. *Trends in Biotechnology*, 22(5): 253-260. 2004.

PEDERSEN, A.B.; JONES, K.E.; NUNN, C.L.; ALTIZIER, S. Infectious disease and extinction risk in wild mammals. *Conservation Biology*, 21(5): 1269-1279. 2007.

PERSING, D.H.; HERWALDT, B.L.; GLASER, C.; LANE, R.S.; THOMFORD, J.W.; MATHIESEN, D.; KRAUSE, P.J.; PHILLIP, D.F.; CONRAD P.A. Infection with a *Babesia*-like organism in Northern California. *New England Journal Medicine*, 332: 298-303. 1995.

PEREIRA, D. G. 2015. Avaliação do Risco de Extinção de *Callithrix kuhlii* (Coimbra-Filho, 1985) no Brasil. Processo de avaliação do risco de extinção da fauna brasileira. ICMBio. <http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/estado-de-conservacao/7206-mamiferos-callithrix-kuhlii-sagui-de-wied.html>. Acessado em 5 de maio de 2019.

PEREIRA, D. G. 2015. Avaliação do Risco de Extinção de *Callithrix geoffroyi* (É. Geoffroy in Humboldt, 1812) no Brasil. Processo de avaliação do risco de extinção da fauna brasileira. ICMBio. <http://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/estado-de-conservacao/7206-mamiferos-callithrix-geoffroyi-sagui-de-wied.html>. Acessado em 5 de maio de 2019.

[conservacao/7203-mamiferos-callithrix-geoffroyi-sagui-da-cara-branca](#). Acessado em 5 de maio de 2019.

PESSÔA, S.B.; MARTINS, A.V. Parasitologia Médica. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan. 1982.

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

POST, R.J.; ADAMS, Z.; SHELLEY, A.J.; et al. The morphological discrimination of microfilarie of *Onchocerca volvulus* from *Mansonella ozzardi*. *Parasitology*, 127: 21-27. 2003.

RANGEL, C.H. Ecologia e comportamento de Callithrichidae (Primates) no Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Tese de Doutorado, Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, Rio de Janeiro, Brasil. 97 p. 2010.

RANGEL, C.H.; SOUSA, F.S.F.; GRELE, C.E.V. Dieta de *Callithrix jacchus* (Linnaeus 1758) e *Callithrix penicillata* (E. Geoffroy 1812) (Callitrichidae – Primates) e seus híbridos alóctones no Jardim Botânico do Rio de Janeiro. *A Primatologia no Brasil*, 12. 2011.

REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. Mamíferos do Brasil 2 ed. EDUR, Londrina. 2011.

RESENDE, D.M.; PEREIRA, L.H.; LOBO, A. Long-term patency of blood parasitism by *Trypanosoma minasense* and microfilariae in *Callithrix penicillata* marmosets (Primates: Callithrichidae) caught at the wild and maintained in captivity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 89(1): 127-128. 1994.

REY, L. Bases da parasitologia médica 3 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil. 2010

RIDLEY, M. A rainha de copas: o sexo e a evolução da natureza humana. Lisboa: Gradiva 429. 1993.

RÍMOLI, J.; PEREIRA, D. G.; Valle, R. R. 2015. Avaliação do Risco de Extinção de *Callithrix penicillata* (É. Geoffroy, 1812) no Brasil. Processo de avaliação do risco de extinção da fauna brasileira. ICMBio. <http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/estado-de-conservacao/7207-mamiferos-callithrix-penicillata-sagui-de-tufos-pretos.html>. Acessado em 5 de maio de 2019.

ROBINSON, T.R. Genetics for Dummies. Hoboken, NJ: Wiley Publishing. p. 9. 364. 2005.

ROCHA, B.M. Taxonomia de nematódeos parasitas de primatas neotropicais, *Callithrix penicillata* (Geoffroy, 1812) (Primata: Callithrichidae), *Alouatta guariba* (Humboldt, 1812) (Primata: Atelidae) e *Sapajus apella* (Linnaeus, 1758) Grooves, 2005 (Primata: Cebidae), do estado de Minas Gerais. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brasil, 70p. 2014.

RUIZ-MIRANDA, C.R.; AFFONSO, A.G.; MARTINS, A.; BECK, B.B. Distribuição do sagui (*Callithrix jacchus*) nas áreas de ocorrência do mico-leão-dourado no Estado de Rio de Janeiro. *Neotropical Primates*, 8: 98-101. 2000.

RYLANDS, A.B.; COIMBRA-FILHO, A.F.; MITTERMEIER, R.A. The Systematics and distribution of the Marmosets (*Callithrix*, *Callibella*, *Cebuella*, and *Mico*) and Calimico (*Callimico*) (Callitrichidae, Primates). Ford S.M., Porter L.M. & Davis L.C. (Eds), The Smallest Anthropoids, Developments in Primatology: progress and prospects. Springer, London. 2009.

RYLANDS, A.B.; COIMBRA-FILHO, A.F.; MITTERMEYER, R.A. Systematics, Geographic Distribution, and some notes on the Conservation of the Callitrichidae. Marmosets and Tamarins: Systematics. Behaviour and Ecology, Oxford University Press. 1993.

RYLANDS, A.B.; FARIA, D.S. Habitats, feeding ecology, and home range size in the genus *Callithrix*. In A. B. RYLANDS (Ed.) Marmosets and tamarins: Systematics, behavior, and ecology. Oxford University Press, 262-272. 1993.

RYLANDS, A.B.; FERRARI, S.F.; MENDES, S.L. 2008. *Callithrix flaviceps*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T3571A9951402. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T3571A9951402.en>. Acessado em 20 Abril de 2019.

RYLANDS, A.B.; KIERULFF, M.C.M.; MENDES, S.L.; DE OLIVEIRA, M.M. 2008. *Callithrix aurita*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T3570A9949843.en>. Acessado em 20 Abril de 2019.

RYLANDS, A.B.; KIERULFF, M.C.M. 2008. *Callithrix kuhlii*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T3575A9955873. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T3575A9955873.en>. Acessado em 20 Abril de 2019.

RYLANDS, A.B.; MENDES, S.L. 2008. *Callithrix penicillata*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T41519A10486326.en>. Acessado em 20 Abril de 2019.

RYLANDS, A.B.; MENDES, S.L. 2018. *Callithrix geoffroyi*. The IUCN Red List of Threatened Species 2018: e.T3572A17936610. . Acessado em 20 Abril de 2019.

RYLANDS, A.B.; MITTERMEIER, R.A.; SILVA JR, J.S. Neotropical primates: taxonomy and recently described species and subspecies. International Zoo Yearbook, 46: 11-24. 2012.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2^a ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press. 1989.

SANGENIS, L.; DE SOUZA, A.; DA SILVA, S.G. First report of acute chagas disease by vector transmission in Rio de Janeiro State, Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 57: 361-4. 2015.

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, 94(5): 1128-1138. 2008.

- SATO, H.; UNE, Y.; KAWAKAMI, S.; et al. Fatal Baylisascaris larva migrans in a colony of Japanese macaques kept in a safari-style zoo in Japan. *Journal of Parasitology*, 91(3): 716-719. 2005.
- SOHRABI, C.; ALSAFI, Z.; O'NEIL, N.; KHAN, M.; KERWAN, A.; AL-JABIR, A.; IOSIFIDIS, C.; AGHA, R.; World Health Organization declares global emergency: A review of the 2019 novel coronavirus (COVID-19). *International Journal of Surgery*, 76: 71-76, 2020.
- SETCHELL, J.M.; CURTIS, D.J. *Field and Laboratory Methods in Primatology*. 2 ed. New York. Cambridge University Press. 2011.
- SHEREEN, M. A.; KHAN, S.; KAZMI, A.; BASHIR, N.; SIDDIQUE, R. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *Journal of Advanced Research*, 24: 91-98, 2020.
- SILVA, F.M.; NAIFF, R.D.; MARCILI, A.; GORDO, M.; D'AFFONSECA NETO, J.A.; NAIFF, M.F.; MILES, M.A. Infection rates and genotypes of *Trypanosoma rangeli* and *T. cruzi* infecting free-ranging *Saguinus bicolor* (Callitrichidae), a critically endangered primate of the Amazon Rainforest. *Acta Tropica*, 107: 168-173. 2008.
- SILVA, M.B.T.; MÔNICA, M.M.C.; TORRES, C.C.S.; et al. Esporotricose urbana: epidemia negligenciada no Rio de Janeiro, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 28(10): 1-14. 2012.
- SILVA, M.O.M. Análise fenotípica e genética em indivíduos de *Callithrix* (Callitrichidae:Primates) no estado do Rio de Janeiro, Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brasil, 95. 2018.
- SILVA, R.C.; LANGONI, H. Dirofilariose. Zoonose emergente negligenciada. *Ciência Rural*, 39(5): 1615-1624. 2008.
- SILVEIRA, P.; BELO, N.O.; LACORTE, G.A.; et al. Parasitological and new molecular-phylogenetic characterization of the malaria parasite *Plasmodium tejerai* in South America penguins. *Parasitology International*, 62: 165-171. 2013.
- SINGH, G. Advanced techniques for detection of filariasis – a review. *International Journal of Research Studies in Biosciences*, 1(1): 17-22. 2013.
- SIQUEIRA-BATISTA, B.; GOMES, A.P.; RÔÇAS, G.; et al. Moléstia de Chagas e ecologia profunda: a “luta antivetorial” em questão. *Ciência e Saúde Coletiva*, 16(2): 677-687. 2011.
- SKRABALO, Z.; DEANOVIC, Z. Piroplasmosis in man. *Documenta de Medicina Geographica Tropical*, 9: 11-16. 1957.
- SMITH, T.; KILBOURNE, F.L. Investigation into the nature, causation and prevention of Texas or southern fever. 8th and 9th Reports of the Bureau of Animal Industry, US Department of Agriculture, 177-304. 1893.
- SNUSTAD, P.D.; SIMMONS, M.J. *Fundamentos da Genética* 6 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, 762 p. 2013.
- SOLÓRZANO-GARCIA, B.; LÉON, G.P.P. Parasites of Neotropical Primates: a review. *International Journal of Primatology*, 39: 155-182. 2018.

- SOSMA. Fundação SOS Mata Atlântica. Disponível em <https://www.sosma.org.br/>. Acessado em 02 de Janeiro de 2019.
- SOSMA. Fundação SOS Mata Atlântica. Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica. Relatório Técnico, 35 p. 2019.
- SOUTO, R.P.; ZINGALES, B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 62: 45-52. 1993.
- STEVENSON, M.F.; RYLANDS, A.B. The marmosets, genus *Callithrix*. Pp.131-222. MITTERMEIER, R.A.; RYLANDS, A.B.; COIMBRA-FILHO, A.; FONSECA, G.A.B. (eds.). *Ecology and Behavior of Neotropical Primates - vol. 2*. Littera Maciel Ltda. 610p. 1988.
- STOOPS, C.A.; GIONAR, Y.R.; RUSMIARTO, S.; et al. Laboratory and field testing of bednet traps for mosquito (Diptera: Culicidae) sampling in west Java, Indonesia. *Journal of Vector Ecology*, 35(1): 187-196. 2010.
- TAN, S.C.; YIAP, B.C. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 10p. 2009.
- TARTAROTTI, E.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.C.; CERON, C.R. Problemática vetorial da doença de Chagas. *Arquivos de Ciência da Saúde*, 11(1): 44-47. 2004.
- TAVELA, A.O.; FUZESEY, L.F.; DORNELAS E SILVA, V.H.; et al. Helminths of wild hybrid marmosets (*Callithrix* sp.) living in an environment with high human activity. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 22(3): 391-397. 2013.
- TAYLOR, L.H.; LATHAM, S.M.; WOOLHOUSE, M.R. Risk factors for human disease emergence. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 356: 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, 1-47. 1993.
- TENÓRIO M.S.; et al. Molecular identification of trypanosomatids in wild animals. *Veterinary Parasitology*, 203: 203-206. 2014.
- TYLER, K.M.; ENGMAN, D.M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*, 31: 472-481. 2001.
- URDANETA-MORALES M.S. Pleomorphism in trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* from blood and cell culture. *Tropical Medicine and Parasitology*, 34: 225-228. 1983.
- VALENÇA-MONTENEGRO, M.M.; OLIVEIRA, L.C.; PEREIRA, D.G.; OLIVEIRA, M.A.B.; VALLE, R.R. 2012 Avaliação do Risco de Extinção de *Callithrix jacchus* (LINNAEUS, 1758) no Brasil. Processo de avaliação do risco de extinção da fauna brasileira. ICMBio. <http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/estado-de-conservacao/7204-mamiferos-callithrix-jacchus-sagui-de-tufo-branco.html>. Acessado em 5 de maio de 2019.
- VALKIŪNAS, G.; BENSCH, S.; IEZHOVA, A.; et al. Nested cytochrome B Polymerase chain reaction diagnostics underestimate mixed infections of avian blood

- haemosporidian parasite: Microscopy is still essential. *Journal of Parasitology*, 92(2): 418-422. 2006.
- VANNIER, E.; GEWURZ, B.E.; KRAUSE, P.J. Human babesiosis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 22: 469-488. 2008.
- VASCONCELOS P.F.; SPERB A.F.; MONTEIRO H.A.; et al. Isolations of yellow fever virus from *Haemagogus leucocelaenus* in Rio Grande do Sul State, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 97: 60-62. 2003.
- VASCONSELOS, P.F.C. Febre amarela. *Revistas da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(2): 275-293. 2003.
- VENTER, J.C.; ADAMS, M.D.; MYERS, E.W.; et al. The sequence of the human genome. *Science*, 291: 1304-1351. 2001.
- VERONA, C.E. Parasitos em saguis-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*) no Rio de Janeiro, Tese de Doutorado, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, Brasil, 99 p. 2008.
- VERONA, C.E.S.; PISSINATTI, A. Primates. In: *Medicina de Animais Selvagens*. Ed. Roca: 358-377. 2007.
- VIEIRA, A.L.; VIEIRA, M.J.; OLIVEIRA, J.M.; et al. Prevalence of canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) diseases in dogs of central of Portugal. *Parasite*, 21(5): 1-7. 2014.
- VILELA, S.L.; FARIA, D.S. Seasonality of the activity pattern of *Callithrix penicillata* (Primates: Callithrichidae) in the cerrado (scrub savana vegetation). *Brazilian Journal of Biology*, 64: 363-370. 2004.
- VIVO, M. On some monkeys from Rondônia, Brasil (Primates: Callithichidade, Cebidae). *Papéis Avulsos de Zoologia*, 4: 1-31. 1958.
- WEBBER, W.A.F. The filarial parasites of primates: a review. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 49(2): 123-141. 1995.
- 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*, 78: 643-645. 2008.
- WHO. Chagas Disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *The Weekly Epidemiological Record*, 90: 33-43. 2015.
- WHO. World Malária report 2018. Geneva: World Health Organization. 2018.
- WHO. World Health Organization, Novel Coronavirus (2019-nCoV), advice for public, 2020.
- WILSON, L.B.; CHOWING, W.M. Studies in *Pyrosoma hominis* ("spotted fever" or "tick fever" of the Rocky Mountains). *Journal of Infectious Diseases*, 1: 31-57. 1904.
- WOLFE N.D.; KAERSH W.B.; KILBOURN A.M.; et al. The impact of ecological conditions on the prevalence of malaria among orangutans. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 2: 97-103. 2002.

XAVIER, M.O.; NOBRE, M.O.; JUNIOR, D.P.S.; et al. Esporotricose felina com desenvolvimento humano na cidade de Pelotas, RS, Brasil. *Ciência Rural*, 34(6): 1961-1963. 2004.

ZAROCOSTAS, J. World health organization declares A (H1N1) influenza pandemic. *British Medical Journal*. 2009.

ZHU, X.Q.; GASSER, R.B.; CHILTON, N.B.; JACOBS, D.E. Molecular approaches for studying ascaroid nematodes with zoonotic potential, with emphasis on *Toxocara* species. *Journal of Helminthology*, 75: 101-108. 2001.

ZICCARDI, M.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Morphological features of Trypanosomes from Squirrel Monkeys from the Brazilian Amazon. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93: 46-55. 1998.

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*, 94: 649-653. 1999.

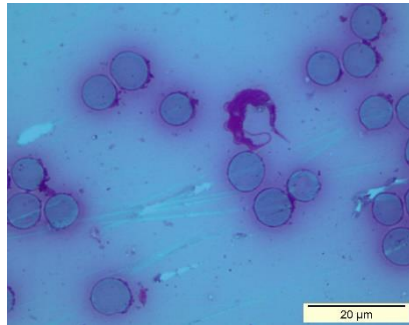
ZICCARDI, M.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; LAINSON, R.; et al. Trypanosomes of non-human primates from the national centre of primates, Ananindeua, State of Pará, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95(2): 157-159. 2000.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Tropica*, 184: 38-52, 2017.

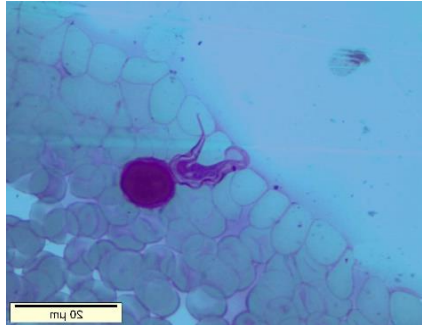
ANEXOS

Anexo I – Imagens fotografadas em microscópio Olympus bx45® e *software* D'Cell® do Departamento de Parasitologia Animal, ao Laboratório de Sanidade Avícola (LASAVE - DESP) e do laboratório de Hemoparasitos e Vetores (LHV).

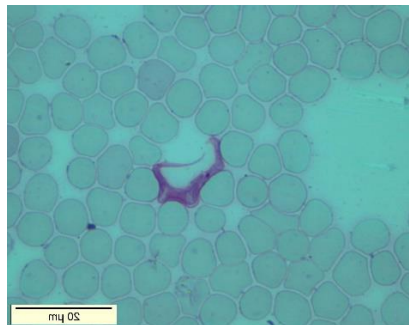
Csp10 – 1



Csp10 – 2



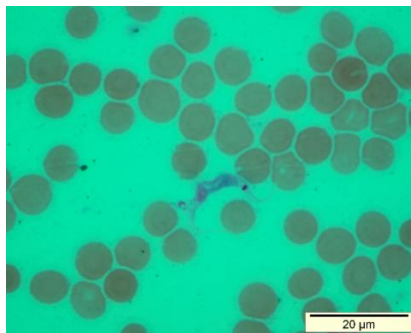
Csp14 – 1



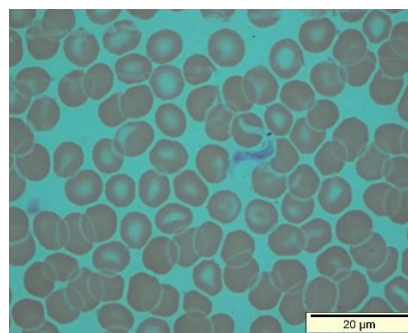
Csp14 – 2



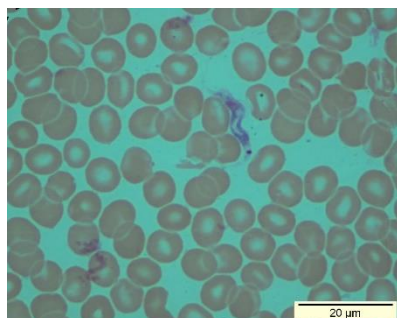
Csp19 – 1



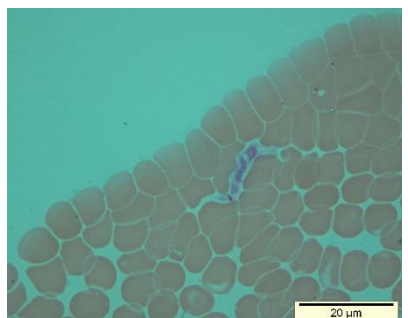
Csp19 – 2



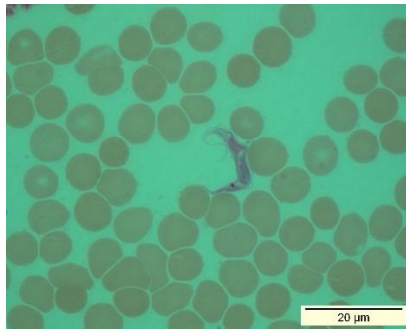
Csp19 – 3



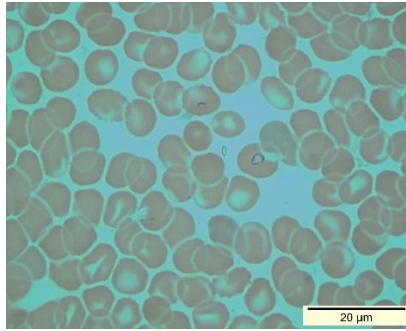
Csp19 – 4



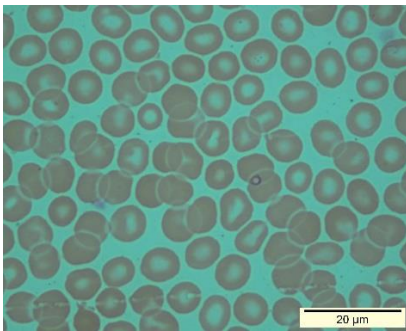
Csp19 - 5



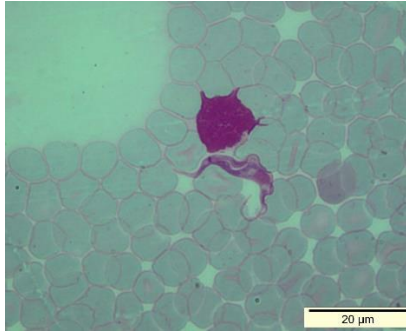
Csp19 - 6



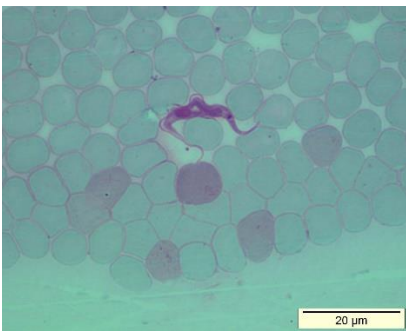
Csp19 - 7



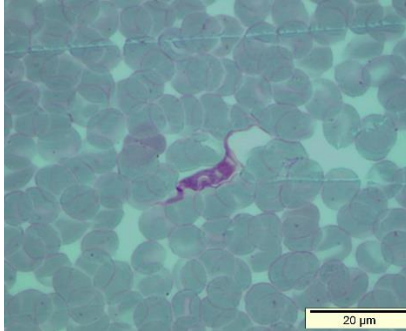
Csp20 - 1



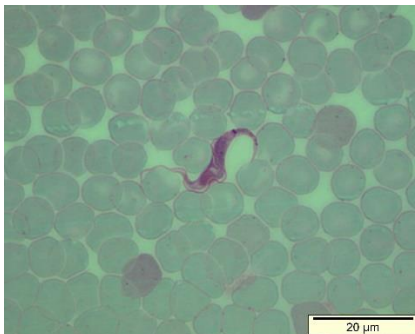
Csp20 - 2



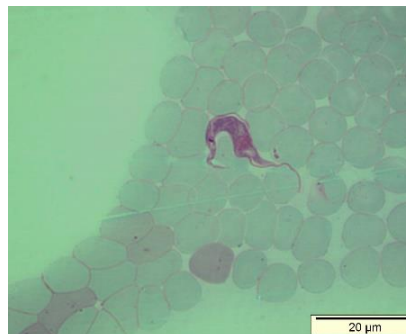
Csp20 - 3



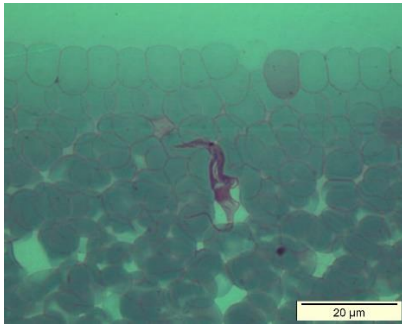
Csp20 - 4



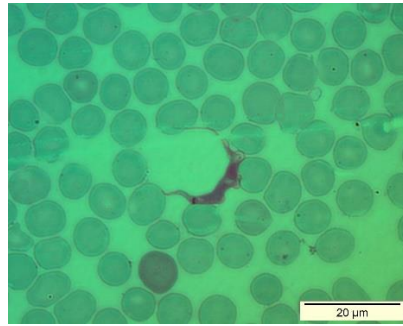
Csp20 - 5



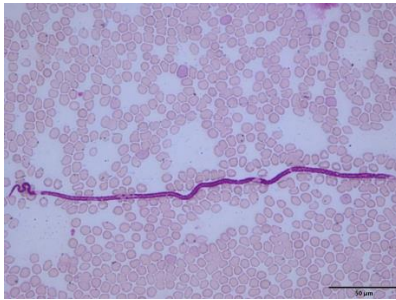
Csp20 – 6



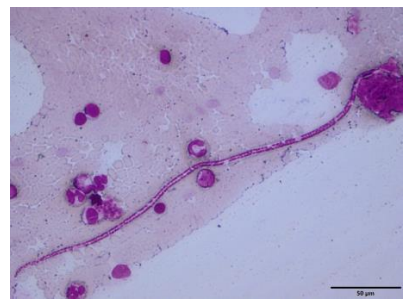
Csp20 – 7



Csp22 – 1



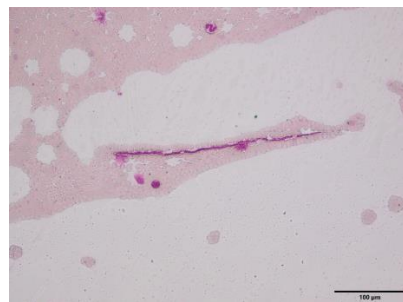
Csp22 – 2



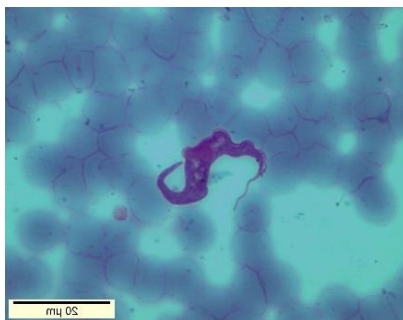
Csp22 – 3



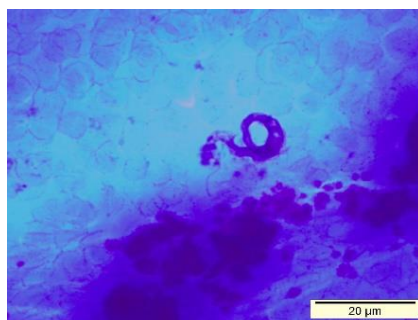
Csp22 – 4



Csp41 – 1



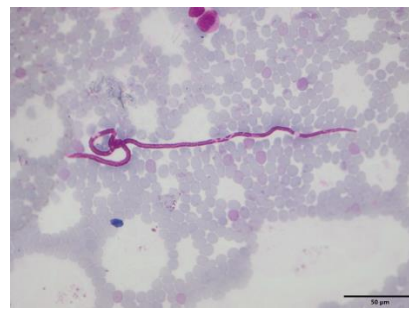
Csp41 – 2



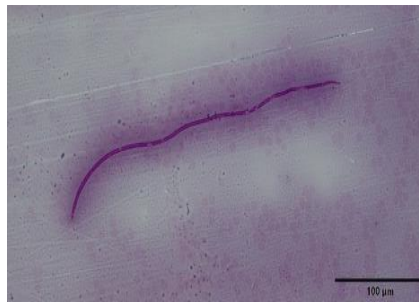
Csp41 – 3



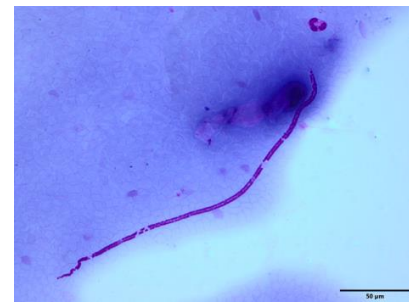
Csp41 – 4



Csp41 – 5



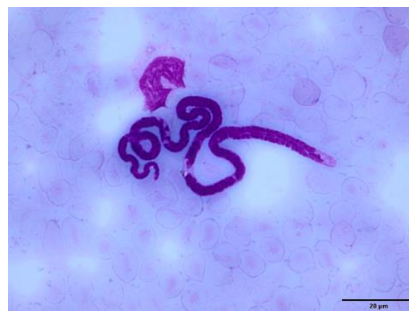
Csp41 – 6



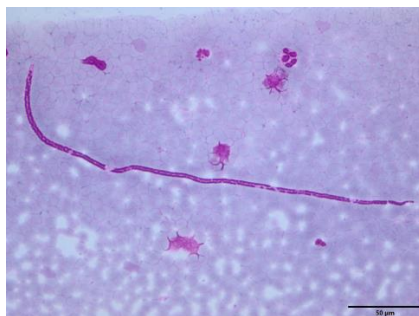
Csp41 – 7



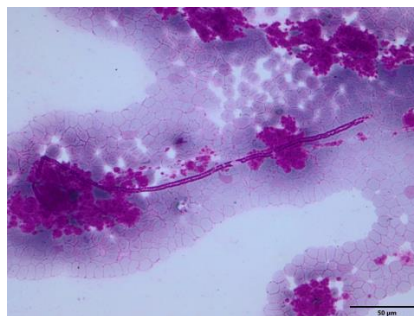
Csp41 – 8



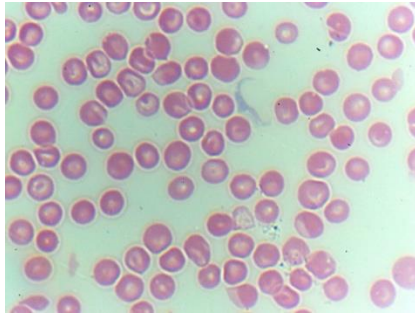
Csp41 – 9



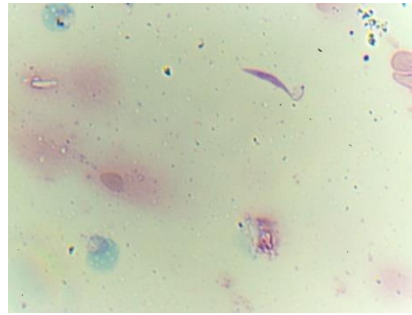
Csp41 – 10



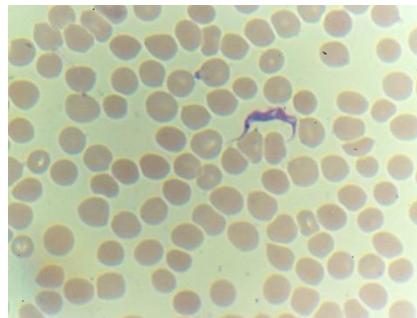
Csp49 – 1



Csp53 – 1



Csp64 – 1



Anexo II – Sequências do gene *18S rRNA* para identificação de *Trypanosoma* obtidos a partir das amostras de sangue de saguis *Callithrix* sp. que ainda não foram depositadas no *Genebank*.

Csp45

GTTTGGGYGWAGGCGGGGTCGGGTTTCATCTCGCTCCTCGTCTCGCCAATGG
 ATATCAATTTACGTGCATATTCTTTACGGTCCTCGCAAGGGGGCCTTTAACG
 GGAATATCCTCAGCACGTTATCTGACTTCTTCACGCGAAAGCTTTGAGGTTA
 CAGTCTCAGGGGGGAGTACGTTTCGCAAGAGTGAACTTAAAGAAATTGACG
 GAATGGCMCCACAAGACGTGGAGCGTGCGGTTTAATTTGACTCAACACGGG
 GAACTTTACCARATCCGGACAGGGTGAGGATTGACAGATTGAGTGTTCTTTC
 TCGATCCCCTGAATGGKGGTGCATGGCCGCTTTTGGTCGGTGGAGTGATTTG
 TTTGGTTGATTCCGTCAACGGACGARATCCAAGCTGCCAGTAGGATACAG
 GATTGTCCATAGGATAGCAATCCCTTCCGCGGGTTCTACCCAAGGGGGGGC
 GGTATCCGTTGTATCCTTCTCTGCGGGATTCCCTTGTTTTGCACAAGGTGAG
 ATTTTGGGCAACAGCAGGTCTGTGATGCTCCTCAATGTTCTGGGCGACACGC
 GCACTACAATGTCAGTGARAACAARAAAACGACTTTTGTCGGACCTACTT
 GATCAAAGAGTGGGGAAACCCCGGAATCACATAGACCCACTTGGGACCG
 AGTATTGCAATTATGGGKTCGCGCAA

Csp49

CTTGGGGMCRRRWGMRRGGTTCGGGTTTCATCTCGCTCCTCGTCTCGCCWA
 TGGATATCAATTTACGTGCWTATTCTTTACGGTCCTCSCAAGGGGGCCTTTA
 ACGGGAATATCCTCAGCACGTTATCTGACTTCTTCACGCGAAAGCTTTGAGG
 TTACAGTCTCAGGGGGGAGTACGTTTCGCAAGAGTGAACTTAAAGAAATTG
 ACGGAATGGCACCACAAGACGTGGAGCGTGCGGTTTAATTTGACTCAACAC
 GGGGAACTTTACCAGATCCGGACAGGGTGAGGATTGACAGATTGAGTGTTT

TTTCTCGATCCCCTGAATGGTGGTGCATGGCCGCTTTTGGTTCGGTGGAGTGA
TTTGTGGTTGATTCCGTCAACGGACGARATCCAAGCTGCCAGTAGGATA
CAGGATTGTCCATAGGATAGCAATCCCTTCCGCGGGTTCTACCCAAGGGGG
GGCGGTATCCGGTTGTATCCTTCTCTGCGGGATTCCCTGTTTTGCACAAGGT
GARATTTTGGGCAACAGCAGGTCTGTGATGCTCCTCAATGTTCTGGGCGACA
CGCGCACTACAATGTCAGTGAGAACAAGAAAAACGACTTTTGTTCGGACCTA
CTTGATCAAAAGAGTGGGGAAACCCCGGAATCACATAGACCCACTTGGGAC
CGAGTATTGCAATTATTGGGGTTCGCGCAA

Csp50

CKKKGGGYSCWKGCGGGGTCGGGYTCATCTCGCTCCTCGTCTCGCCAATGG
ATATCAATTTACGTGCATATTCTTTACGGTCCTCSAAGGGGGCCTTTAACG
GGAATATCCTCAGCACGTTATCTGACTTCTTCACGCGAAAGCTTTGAGGTTA
CAGTCTCAGGGGGGAGTACGTTTCGCAAGAKTGAAACTTAAAGAAATTGACG
GAATGGCACCACAAGACGTGGAGCGTGCGGTTTAATTTGACTCAACACGGG
GAACTTTACCAGATCCGGACAGGGTGAGGATTGACAGATTGAGTGTTCTTTC
TCGATCCCCTGAATGGKGGTGCATGGCCGCTTTTGGTTCGGTGGAGTGATTTG
TTTGGTTGATTCCGTCAACGGACGARATCCAAGCTGCCAGTAGGATACAG
GATTGTCCATAGGATAGCAATCCCTTCCGCGGGTTCTACCCAAGGGGGGGC
GGTATCCGGTTGTATCCTTCTCTGCGGGATTCCCTGTTTTGCACAAGGTGAG
ATTTTGGGCAACAGCAGGTCTGTGATGCTCCTCAATGTTCTGGGCGACACGC
GCACTACAATGTCAGTGAGAACAARAAAACGACTTTTGTTCGGACCTACTT
GATCAAAAGAGTGGGGAAACCCCGGAATCACATAGACCCACTTGGGACCG
AGTATTGCAATTATGGGKTCGCGCAARA

Csp51

ATTTGGGAYGWGCGGGGTCGGGTTTCATCTCGCTCCTCGTCTCGCCAATGGA
TATCAATTTACGTGCATATTCTTTACGGTCCTCGCAAGGGGGCCTTTAACGG
GAATATCCTCAGCACGTTATCTGACTTCTTCACGCGAAAGCTTTGAGGTTAC
AGTCTCAGGGGGGAGTACGTTTCGCAAGAGTGAAACTTAAAGAAATTGACGG
AATGGCACCACAAGACGTGGAGCGTGCGGTTTAATTTGACTCAACACGGGG
AACTTTACCARATCCGGACAGGGTGAGGATTGACAGATTGAGTGTTCTTTCT
CGATCCCCTGAATGGTGGTGCATGGCCGCTTTTGGTTCGGTGGAGTGATTTGT
TTGGTTGATTCCGTCAACGGACGARATCCAAGCTGCCAGTAGGATACAGG
ATTGTCCATAGGATAGCAATCCCTTCCGCGGGTTCTACCCAAGGGGGGGCG
GTATCCGGTTGTATCCTTCTCTGCGGGATTCCCTGTTTTGCACAAGGTGAGA
TTTTGGGCAACAGCAGGTCTGTGATGCTCCTCAATGTTCTGGGCGACACGCG
CACTACAATGTCAGTGAGAACAAGAAAAACGACTTTTGTTCGGACCTACTTG
ATCAAAAGAGTGGGGAAACCCCGGAATCACATAGACCCACTTGGGACCGA
GTATTGCAATTAGGGGGKYCSCMCAAGRA

Csp52

TGGYYAWRGC GG GTCGGGTTTCATCTCGCTCCTCGTCTCGCCAATGGATAT
CAATTTACGTGCATATTCTTTACGGTCCTCGCAAGGGGGCCTTTAACGGGAA
TATCCTCAGCACGTTATCTGACTTCTTCACGCGAAAGCTTTGAGGTTACAGT
CTCAGGGGGGAGTACGTTTCGCAAGAGTGAAACTTAAAGAAATTGACGGAAT
GGCACCACAAGACGTGGAGCGTGCGGTTTAATTTGACTCAACACGGGGAAC
TTTACCAGATCCGGACAGGGTGAGGATTGACAGATTGAGTGTTCTTTCTCGA
TCCCCTGAATGGTGGTGCATGGCCGCTTTTGGTTCGGTGGAGTGATTTGTTT
GTTGATTCCGTCAACGGACGARATCCAAGCTGCCAGTAGGATACAGGATT

GTCCATAGGATAGCAATCCCTTCCGCGGGTTCACCCAAGGGGGGGCGGTA
TCCGGTTGTATCCTTCTCTGCGGGATTCTTGTGTTTGCACAAGGTGAGATTTT
GGGCAACAGCAGGTCTGTGATGCTCCTCAATGTTCTGGGCGACACGCGCAC
TACAATGTCAGTGAGAACAAGAAAAACGACTTTTGTTCGGACCTACTTGATC
AAAAGAGTGGGGAAACCCCGGAATCACATAGACCCACTTGGGACCGAGTAT
TGCAATTTGGGKKYSGCGCCAAGRA

Csp53

GTTTGGGKYGWAGGCGGGGTCGGGTTTCATCTCGCTCCTCGTCTCGCCAATG
GATATCAATTTACGTGCATATTCTTTACGGTCCTCGCAAGGGGGCCTTTAAC
GGGAATATCCTCAGCACGTTATCTGACTTCTTCACGCGAAAGCTTTGAGGTT
ACAGTCTCAGGGGGGAGTACGTTTCGCAAGAGTGAAACTTAAAGAAATTGAC
GGAATGGCACCACAAGACGTGGAGCGTGCGGTTTAATTTGACTCAACACGG
GGAACTTTACCARATCCGGACAGGGTGAGGATTGACAGATTGAGTGTCTTT
CTCGATCCCCTGAATGGTGGTGCATGGCCGCTTTTGGTTCGGTGGAGTGATTT
GTTTGGTTGATTCCGTCAACGGACGARATCCAAGCTGCCAGTAGGATACA
GGATTGTCCATAGGATAGCAATCCCTTCCGCGGGTTCACCCAAGGGGGGG
CGGTATCCGGTTGTATCCTTCTCTGCGGGATTCTTGTGTTTGCACAAGGTGA
GATTTTGGGCAACAGCAGGTCTGTGATGCTCCTCAATGTTCTGGGCGACACG
CGCACTACAATGTCAGTGAGAACAAGAAAAACGACTTTTGTTCGGACCTACT
TGATCAAAAAGAGTGGGGAAACCCCGGAATCACATAGACCCACTTGGGACCG
AGTATTGCAATTTGGGGKTYSSSSCAAAG

Csp57

GTTTKGGYGWGGCGGGGTCGGGTTTCATCTCGCTCCTCGTCTCGCCAATGGA
TATCAATTTACGTGCATATTCTTTACGGTCCTCGCAAGGGGGCCTTTAACGG
GAATATCCTCAGCACGTTATCTGACTTCTTCACGCGAAAGCTTTGAGGTTAC
AGTCTCAGGGGGGAGTACGTTTCGCAAGAGTGAAACTTAAAGAAATTGACGG
AATGGCACCACAAGACGTGGAGCGTGCGGTTTAATTTGACTCAACACGGGG
AACTTTACCAGATCCGGACRGGGTGAGGATTGACAGATTGAGTGTCTTTCT
CGATCCCCTGAATGGTGGTGCATGGCCGCTTTTGGTTCGGTGGAKTGATTTGT
TTGGTTGATTCCGTWCWACGGACGAGATCCAAGCTGCCAGTAGGATACAGG
ATTGTCCATAGGATAGCAATCCCTTCCGCGGGTTCACCCAAGGGGGGGCG
GTATCCGGTTGTATCCTTCTCTGCGGGATTCTTGTGTTTGCACAAGGTGAGA
TTTTGGGCAACAGCAGGTCTGTGATGCTCCTCAATGTTCTGGGCGACACGCG
CACTACAATGTCAGTGAGAACAAGAAAAACGACTTTTGTTCGGACCTACTTG
ATCAAAAAGAGTGGGGAAACCCCGGAATCACATAGACCCACTTGGGACCGA
GTATTGCAATTTGGGKTYSGCSCMAA

Csp62

CTTTTKGGYGWGGCGGGGTCGGGTTTCATCTCGCTCCTCGTCTCGCCAATGGAT
ATCAATTTACGTGCATATTCTTTACGGTCCTCGCAAGGGGGCCTTTAACGGG
AATATCCTCAGCACGTTATCTGACTTCTTCACGCGAAAGCTTTGAGGTTACA
GTCTCAGGGGGGAGTACGTTTCGCAAGAGTGAAACTTAAAGAAATTGACGGA
ATGGCACCACAAGACGTGGAGCGTGCGGTTTAATTTGACTCAACACGGGGA
ACTTTACCAGATCCGGACAGGGTGAGGATTGACAGATTGAGTGTCTTTCTC
GATCCCCTGAATGGTGGTGCATGGCCGCTTTTGGTTCGGTGGAGTGATTTGTT
TGGTTGATTCCGTCAACGGACGARATCCAAGCTGCCAGTAGGATACAGGA
TTGTCCATAGGATAGCAATCCCTTCCGCGGGTTCACCCAAGGGGGGGCGG
TATCCGGTTGTATCCTTCTCTGCGGGATTCTTGTGTTTGCACAAGGTGAGATT

TTGGGCAACAGCAGGTCTGTGATGCTCCTCAATGTTCTGGGCGACACGCGC
ACTACAATGTCAGTGAGAACAAGAAAAACGACTTTTGTTCGGACCTACTTGA
TCAAAGAGTGGGGAAACCCCGGAATCACATAGACCCACTTGGGACCGAGT
ATTGCAATTTTGGKKYSSCSMMAARA

Uni6

CTTTKGGYGWGGCGGGGTCGGGTTTCATCTCGCTCCTCGTCTCGCCAATGG
ATATCAATTTACGTGCATATTCTTTACGGTCCTCGCAAGGGGGCCTTTAACG
GGAATATCCTCAGCACGTTATCTGACTTCTTCACGCGAAAGCTTTGAGGTTA
CAGTCTCAGGGGGGAGTACGTTTCGCAAGAGTGAACTTAAAGAAATTGACG
GAATGGCACCACAAGACGTGGAGCGTGC GGTTTAATTTGACTCAACACGGG
GAACTTTACCAGATCCGGACAGGGTGAGGATTGACAGATTGAGTGTTCTTTC
TCGATCCCCTGAATGGTGGTGCATGGCCGCTTTTGGTCGGTGGAGTGATTTG
TTTGGTTGATTCCGTCAACGGACGARATCCAAGCTGCCCAGTAGGATACAG
GATTGTCCATAGGATAGCAATCCCTTCCGCGGGTTCTACCCAAGGGGGGGC
GGTATCCGGTTGTATCCTTCTCTGCGGGATTCCCTTGTTTTGCACAAGGTGAG
ATTTTGGGCAACAGCAGGTCTGTGATGCTCCTCAATGTTCTGGGCGACACGC
GCACTACAATGTCAGTGAGAACAAGAAAAACGACTTTTGTTCGGACCTACTT
GATCAAAGAGTGGGGAAACCCCGGAATCACATAGACCCACTTGGGACCG
AGTATTGCAATTATGGGGTCGCGCAAG



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**



TERMO Nº 239 / 2020 - PPGBA (12.28.01.00.00.00.42)

Nº do Protocolo: 23083.046340/2020-61

Seropédica-RJ, 15 de setembro de 2020.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

DIOGO PIGNATARA COIMBRA

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre (a)**, no **Programa de Pós Graduação em Biologia Animal**, Área de Concentração em **Biodiversidade Animal**

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 31/07/2020

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação.

Dra. Denise Monnerat Nogueira - UFRRJ
(Orientadora)

Dr. Jorge Luis Azevedo de Armada - UFRRJ

Dra. Claudia Bezerra da Silva - UFRRJ

Dra. Maristela Peckle Peixoto - UFRRJ

Dr. Carlos Eduardo da Silva Verona - TRÍADE

(Assinado digitalmente em 16/09/2020 11:25)
CLAUDIA BEZERRA DA SILVA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)
Matrícula: 3103528

(Assinado digitalmente em 20/09/2020 19:22)
DENISE MONNERAT NOGUEIRA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptG (12.28.01.00.00.00.50)
Matrícula: 1539011

(Assinado digitalmente em 16/09/2020 11:11)
JORGE LUIS AZEVEDO DE ARMADA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptG (12.28.01.00.00.00.50)
Matrícula: 386276

(Assinado digitalmente em 16/09/2020 12:10)
MARISTELA PECKLE PEIXOTO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)
Matrícula: 3103478

21/09/2020

https://sipac.ufrj.br/sipac/protocolo/documento/documento_visualizacao.jsf?imprimir=true&idDoc=616921

(Assinado digitalmente em 15/09/2020 14:50)

CARLOS EDUARDO DA SILVA VERONA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 139.910.588-47

Para verificar a autenticidade deste documento entre em
<https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **239**, ano:
2020, tipo: **TERMO**, data de emissão: **15/09/2020** e o código de verificação: **60e4bad05f**