

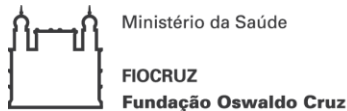
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA INTERAÇÃO  
PATÓGENO HOSPEDEIRO  
(PPGBIO - INTERAÇÃO)**

**CINDY ALVES DIAS**

**DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE FILÁRIAS EM *SAGUINUS*  
*BICOLOR* E ANÁLISE DE PAISAGEM DA PREVALÊNCIA FILARIAL**

Manaus - AM

2022



**CINDY ALVES DIAS**

**DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE FILÁRIAS EM *SAGUINUS*  
*BICOLOR* E A ANÁLISE DE PAISAGEM DA PREVALÊNCIA  
FILARIAL**

Projeto de Dissertação de pesquisa  
apresentado no Programa de Pós-  
Graduação em Biologia da Interação  
Patógeno Hospedeiro - PPGGIO  
INTERAÇÃO.

Orientadora: Prof. Dra. ALESSANDRA FERREIRA DALES NAVA

Co-orientador: Prof. Dr. JAMES LEE CRAINEY

Manaus - AM

2022

## FICHA CATALOGRÁFICA

D541d

Dias, Cindy Alves

Detecção e identificação de filárias em *Saguinus bicolor* e análise de paisagem da prevalência filarial. / Cindy Alves Dias. – Manaus: Instituto Leônidas e Maria Deane, 2022.

94 f.

Dissertação (Mestrado em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto Leônidas e Maria Deane, 2022.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra Ferreira Dales Nava.

Co-orientador: Prof. Dr. James Lee Crainey.

1. Zoonoses 2. Filária 3. Primatas – Amazônia 4. *Saguinus bicolor* I. Título

CDU 616.993(811) (043.3)

CDD 616.9509811

22. ed.

**Elaborado por Ycaro Verçosa dos Santos – CRB-11/ 287**

## AGRADECIMENTOS

- Quero agradecer primeiramente à minha mãe, que é uma das pessoas mais inspiradoras, inteligentes, competentes e corajosas que já conheci. Sei que a senhora vai fazer um trabalho excepcional no seu próprio mestrado e alcançar seu objetivo.
- Pai, a gente se encontra em Cumbuco, viu...?
- Natasha, Alessandra, Caio e Guilherme, temos que ir tocando o Clube do Café, que foi muito importante pra manter minha mente sã e distraída das questões do mestrado, quando não era momento de pensar nele.
- Dra. Nava, eu agradeço muito por ter aberto as portas pra mim no mundo da pesquisa, por ter visto algum potencial em mim e por ter me mostrado o caminho das pedras. Muito obrigada.
- Dr. Lee, obrigada por ter concordado em me deixar entrar nesse projeto e compartilhá-lo comigo. Aprendi muita coisa valiosa.
- Dr. Gordo, sinceramente, foi uma honra trocar ideias com o Sr. e participar num projeto que o Sr. está envolvido, ter conhecido o Projeto do Pan do Sauim-de-Coleira de perto e tudo o mais. Ouvia falar do senhor lá na minha graduação, e sempre tive uma admiração pelo seu trabalho. Obrigada por tudo!
- Aline, obrigada por tudo! Pelos ensinamentos, dados, pela atenção... você é muito solícita, serena e inteligente, eu realmente te admiro muito.
- Túllio, estou te devendo o *milk shake* de paçoca ainda, viu? Muito obrigada por todos aqueles ensinamentos preciosos e dicas. Pude aprender tanto! Desejo pra te muito sucesso nos teus objetivos (e nos treinos de natação também). Tudo de bom pra você e sua família!
- Natália, obrigada também por ter aberto as portas do CETAS pra mim e ser tão prestativa e acolhedora. Você é uma pessoa muito legal e batalhadora, e fiquei contente de conhecer você.
- Dr. Conga, você também foi uma pessoa que compartilhou seus conhecimentos e orientação comigo, que me foram muito valiosos. Aprendi muito com o Sr.! E continuo aprendendo. Foi uma honra conhecer o Sr. também.
- Helena, foi um caminho em tanto, não é? Obrigada por tanta ajuda e paciência com as minhas dúvidas e apertos. Desejo tudo de bom pra você e sua família.

- Prof. Antônio, obrigada pela ajuda na estatística. O Sr. é um excelente professor.
- Viviane, a tua pochete cinza vai fazer aniversário aqui em casa, desculpa! Ela está segura aqui, viu? Muito obrigada por todo o suporte e companheirismo que você me ofereceu. Você é incrível. E vamos de mais sushi!
- Felipe, apesar do adeus, estou eternamente em débito com os seus conselhos sem preço. Eu agradeço por tudo o que você me ensinou.
- Denise, Daniella, Yasmin e Karin... obrigada por toda a preocupação, paciência e suporte. Vocês são as melhores amigas que uma pessoa pode ter. Admiro muito todas vocês, sério. Espero poder um dia retribuir de forma decente tudo o que vocês fizeram por mim, e mais. Vocês merecem tudo de bom na vida, manas.
- Manu, *grazie di tutto! La tua intelligenza e dolcezza mi ispirano molto. I wouldn't have gone this far without your support. Best wishes.*
- Thaís, Heliana... vocês são duas das pessoas mais inteligentes, legais e únicas que eu já conheci. Obrigada pelo acolhimento e por todas as dicas e ajudas que vocês me deram. Desejo muito sucesso e muito Fini pra você!
- Aos meus terapeutas, Lúcia Helena Rattigueri e Antônio Carlos Moreira Alves Jr., muito obrigada por todo o suporte, cuidados e acolhimento, principalmente no momento fragilizado e destruído que eu me encontrava em 2021 (ecos de 2020). Agradeço muito.
- À FAPEAM e ao Instituto ILMD/Fiocruz Amazônia por todo o fomento, suporte e meios oferecidos para que eu conseguisse construir esse trabalho.
- NAP, staff técnico e de manutenção do ILMD, Laboratório de Instrumentação Meteorológica EST/UEA, obrigada por todo o suporte!
- Aos artistas que compõem as *playlists* que me acompanharam nessa jornada e foram fontes de inspiração e concentração: Milton Nascimento e o Clube da Esquina, Rita Lee, Raul Seixas, Cartola, Tim Maia, Djavan, Cazuza, Elza Soares, The Longest Johns, Blind Guardian, Michael Abels, Novos Baianos, Gonzaguinha, Blackmore's Night, Angra, Heater Dale, Rhapsody of Fire, Casa de Caba, Emicida, Ibeyi, Cássia Eller, Chico Buarque, Koji Kondo, Aqare, Karliene, Elis Regina, Toby Fox, Hajime Wakai, Erutan, Bruno Coulais...

- Por fim, a todos os cães, gatos e diversas criaturas que passaram pela minha vida: vocês deixaram um pouco de vocês em mim e, tenho certeza, isso fez de mim uma pessoa melhor.

Cindy A. Dias

“A única coisa que torna a vida possível é a incerteza permanente e intolerável; não saber o que vem a seguir.”

Ursula K. Le Guin

## RESUMO

O *Saguinus bicolor* é um calitriquídeo que habita fragmentos florestais e arredores dos municípios amazônicos de Manaus, Rio Preto da Eva e Itacoatiara. Ele sofre risco de extinção, sendo a limitação de seu território de ocorrência e fragmentação do seu habitat duas das maiores ameaças. Poucos estudos são realizados sobre as doenças infecciosas e parasitos que podem acometer esse primata, tais como as filárias. As filárias são vermes nematódeos que podem parasitar uma grande variedade de animais, incluindo primatas não humanos, humanos e animais domésticos. Além disso, algumas espécies podem causar doenças médicas e veterinárias. Este trabalho visou identificar parasitos de filária em *Saguinus bicolor* através de necropsia, microscopia e ferramentas moleculares, bem como compreender a influência da paisagem sobre a prevalência das filárias nesses primatas. Um total de 71 indivíduos foram amostrados, dentre os quais 62 foram submetidos à necropsia, com inspeção das cavidades torácicas, abdominais e do espaço subcutâneo, e 10 animais vivos tendo o sangue coletado (onde 1 dos animais foi coletado tanto em vida quanto em morte). Durante as necropsias, também foi possível coletar sangue de 46 carcaças, totalizando 56 amostras. Destas, 47 foram submetidas à microscopia em busca de microfilárias e todas foram submetidas ao diagnóstico molecular em *Nested PCR* com o alvo ITS-1, sequenciamento de Sanger e métodos de *Next Generation Sequencing*. As filárias adultas encontradas foram submetidas à análise morfológica e molecular. Adicionalmente, foi possível georreferenciar 50 animais e coletar dados para desenvolver variáveis demográficas, meteorológicas e geográficas para 49 deles. Esses dados foram usados para calcular a matriz da paisagem em buffers de 500 e 1000 metros e desenvolver modelos lineares generalizados sobre a influência dessas variáveis a prevalência. Um total de 6,45% (4/62) das carcaças foram positivas para a presença de filária adulta. Das 24 filárias adultas encontradas nas 4 carcaças, 14 puderam ser identificadas morfológicamente como *Dipetalonema* sp., 8 foram identificadas como da família Onchocercidae no Sequenciamento de Sanger e 1 como *Dipetalonema gracile*, utilizando os métodos de NGS. 6,38% (3/47) das amostras de sangue foram positivas para microfilária na microscopia. 28,57% (16/56) das amostras puderam ser amplificadas na análise molecular e, destas, 75% (12/16) eram de *Mansonella mariae*, 6,25% (1/16) *Dipetalonema* sp., 6,25% (1/16) da família Onchocercidae e 12,5% (2/16) não foram identificadas. Para a análise de paisagem,



47% (8/17) dos positivos foram oriundos do Bairro Coroado, em Manaus, especificamente do fragmento florestal da Universidade Federal do Amazonas (UFAM); 12% (2/17) do bairro Tarumã; 12% (2/17) da rodovia AM-010; 5,8% (1/17) do bairro Tarumã-açu; 5,8% (1/17) da rodovia BR-174; 5,8% (1/17) da junção dos bairros Distrito Industrial II/Puraquequara; 5,8% (1/17) no bairro Ponta Negra e 5,8% (1/17) sem localização encontrada. Para os negativos, 56,41% (22/39) foram do bairro Coroado, em Manaus, também do fragmento florestal da Universidade Federal do Amazonas; 5,12% (2/39) do bairro Aleixo; 5,12% (2/39) do bairro Tarumã; 5,12% (2/39) do bairro Jorge Teixeira; 2,56% (1/39) para cada uma das seguintes localidades: cidade de Rio Preto da Eva, para a avenida Governador José Lindoso, os bairros Zumbi dos Palmares II, Parque 10 de Novembro, Santo Agostinho e Nova Cidade, em Manaus, e para as rodovias BR-174 e AM-010. No buffer de 500m, observou-se matriz florestal 60% (9/15) dos positivos, com a urbana sendo a segunda mais ocorrida, em 26,7% (4/15); para os negativos, houve 76% (19/25) de matriz florestal e 20% (5/25) de matriz urbana. No buffer de 1000 metros, percebe-se esse padrão praticamente idêntico. O modelo linear generalizado demonstrou probabilidade maior de positivos conforme a temperatura média mensal aumenta e probabilidade maior de negativos conforme densidade demográfica humana aumenta. A identificação dos parasitos coincide com a literatura, que já descreveu *Mansonella mariae* e *Dipetalonema* sp. em primatas e vetores amazônicos. As filárias identificadas não têm relato de serem zoonóticas, porém a família Onchocercidae e o gênero *Mansonella* abrangem espécies de filária de interesse para saúde pública. A análise de paisagem também coincide com o georreferenciamento organizado nesse trabalho, no qual se observa maior ocorrência dos positivos em áreas periurbanas de Manaus, com características de pouca densidade demográfica e com matriz florestal. Esses aspectos indicam a necessidade de continuidade nos esforços para identificar parasitos filariais em outros municípios amazônicos e compreender as causas ambientais por trás do risco de infecção.

**Palavras-chave:** *Saguinus bicolor*, filária, parasitologia.

## ABSTRACT

*Saguinus bicolor* is a callitrichid that inhabits forest fragments and the outskirts of the Amazonian municipalities of Manaus, Rio Preto da Eva and Itacoatiara. It is at risk of extinction, being the limitation of its territory of occurrence and the fragmentation of its habitat two of the biggest threats. Also, few studies are carried out on infectious diseases and parasites that can affect this primate, such as filariae. Filariae are nematode worms that can parasitize a wide variety of animals, including primates, humans and domestic animals. Some can cause diseases of medical and veterinarian interest. This work aims to identify filarial parasites in *Saguinus bicolor* through necropsy, microscopy and molecular tools, as well as understand the influence of the landscape on the prevalence of filaria in these primates. 71 individuals were sampled, where 62 were submitted to necropsy, with inspection of the thoracic, abdominal and subcutaneous cavities, and 10 were sampled alive (where 1 of the animals was collected both in life and in death). From the necropsies, it was also possible to collect blood from 46 carcasses, totaling 56 blood samples. From these, 47 samples were submitted to microscopy to look for microfilariae and all samples were submitted to molecular analysis in Nested PCR with the ITS-1 target, Sanger sequencing and Next Generation Sequencing methods. The adult filariae found were submitted to morphological and molecular analysis. Additionally, it was possible to georeference 50 animals and collect data to develop demographic, meteorological and geographic variables for 49 of them. These data were used to calculate the landscape matrix in buffers of 500 and 1000 meters and to develop generalized linear models on the influence of these variables on prevalence. 6.45% (4/62) of the carcasses were positive for the presence of adult filaria. Of the 24 adult filariae found in 4 carcasses, 14 could be morphologically identified as *Dipetalonema* sp., 1 as *Dipetalonema* sp. with the NGS methods, 8 of the Onchocercidae family in the Sanger Sequencing. 6.38% (3/47) of blood samples were positive for microfilaria. 28.57% (16/56) of the samples could be amplified in the molecular analysis and, of these, 75% (12/16) were from *Mansonella mariae*, 6.25% (1/16) from *Dipetalonema* sp., 6.25% (1/16) from the Onchocercidae family and 12.5% (2/16) were not identified. For the landscape analysis, 47% (8/17) of the positives came from Coroado neighborhood in Manaus, in the forest fragment of the Federal University of Amazonas; 12% (2/17) from Tarumã

neighborhood; 12% (2/17) from the AM-010 highway; 5,8% (1/17) from Tarumã-açu neighborhood; 5,8% (1/17) from the BR-174 highway; 5,8% (1/17) from the junction area between the Industrial District II/Puraquequara neighborhood; 5,8% (1/17) from Ponta Negra neighborhood and 5,8% (1/17) with its location not found. For the negatives, 56.46% (22/39) were from Coroado neighborhood in Manaus, also in the forest fragment of the Federal University of Amazonas; 5,12% (2/39) from Aleixo neighborhood; 5,12% (2/39) from Tarumã neighborhood; 5,12% (2/39) from Jorge Teixeira neighborhood; 2,56% (1/39) for each one the following places: city of Rio Preto da Eva; Governador José Lindoso avenue; Zumbi dos Palmares II neighborhood; Parque 10 de Novembro neighborhood; Santo Agostinho neighborhood and Nova Cidade neighborhood, in Manaus; and for BR-174 and AM-010 highways. In the 500m buffer, 60% (9/15) of the positives were observed, with the urban matrix being the second most frequent, at 26.7% (4/15); for the negatives, there was 76% (19/25) of the forest matrix and 20% of the urban matrix (5/25). In the buffer of 1000 meters, this pattern is practically identical. The generalized linear model showed a greater probability of positives as the average monthly temperature increases and a greater probability of negatives as the human population density increases. The identification of the parasites coincides with the literature, which has already described *Mansonella mariae* and *Dipetalonema* sp. in primates and Amazonian vectors. None of the filariae detected cause zoonoses, but the Onchocercidae family and the *Mansonella* genus cover filarial species that are of public health interest. The landscape analysis also coincides with the georeferencing organized in this work, where a higher occurrence of positives is observed in peri-urban areas of Manaus, with characteristics of low population density and with a forest matrix. These aspects indicate the need for continuity in the efforts to identify filarial parasites in other Amazonian municipalities and to understand the environmental causes behind the risk of infection.

**Key words:** *Saguinus bicolor*, filaria, parasitology.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<i>AIC</i>	<i>Akaike Information Criterion</i> (Critério de Informação de Akaike)
EST/UEA	Laboratório de Instrumentação Meteorológica/Universidade Estadual do Amazonas
CETAS	Centro de Triagem de Animais Silvestres
CEUA/UFAM	Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Amazonas;
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis;
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
ILMD	Instituto Leônidas e Maria Deane/FIOCRUZ-Amazônia
INFRAERO	Empresa Brasileira de Infraestrutura Aeroportuária
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
IVDN	Índice de Vegetação por Diferença Normalizada
IOC/Fiocruz	Instituto Oswaldo Cruz
MLG	Modelo linear generalizado
MMA	Ministério do Meio Ambiente
<i>NGS</i>	<i>Next Generation Sequencing</i>
<i>PCR</i>	<i>Polymerase chain reaction</i>
RPPN	Reserva Particular do Patrimônio Natural
SEDECTI	Secretaria de Desenvolvimento, Ciência, Tecnologia e Inovação

SisGen Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do  
Conhecimento Tradicional Associado

UFAM Universidade Federal do Amazonas

UFRA Universidade Federal Rural do Pará

UICN União Internacional para a Conservação da Natureza

USP Universidade de São Paulo

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. *Saguinus bicolor*. Fonte: Diogo Lagroteria. ....21
- Figura 2. Distribuição geográfica do *Saguinus bicolor*. Fonte: Gordo et al., 2017.....22
- Figura 3. *Saguinus bicolor* em área residencial na cidade de Manaus. Fonte: Gordo et al., 2017.....24
- Figura 4. Cidade de Manaus, Amazonas. Fonte: Alexandre Neto (Acervo pessoal). 27
- Figura 5. Microfilária da espécie *Mansonella ozzardi*. Fonte: Banco de dados de parasitos, USP, 2012. ....30
- Figura 6. Localidades gerais de onde os sauins-de-coleira amostrados são oriundos. Confecção na plataforma Qgis (versões 3.16.16 e 3.22.8). Fonte: DATUM SIRGAS 2000, coordenadas UTM/Zonal 20 Sul.....41
- Figura 7. Morfologia de *Dipetalonema* sp. adulta. A: extremidade anterior da fêmea (b) abertura oral, (e) esôfago, (v) abertura vulvar e vagina em formato sinuoso. Barra: 20 µm. B: extremidade posterior do macho, mostrando órgãos reprodutores e área rugosa (ei) epículo esquerdo, (ed) epículo direito, (c) abertura cloacal e papilas cloacais. Barra: 20 µm. ....52
- Figura 8. Microfilária de sauim-de-coleira visualizada em microscópio óptico (objetiva de 100 X). Fonte: Thaís Pinto Nascimento (Acervo pessoal).....53
- Figura 9. Localizações dos sauins-de-coleira amostrados. Confecção na plataforma Quantumgis (versões 3.16.16 e 3.22.8), DATUM Sirgas 2000, coordenadas UTM/Zonal 20 Sul. ....56

Figura 10. Mapa das localizações dos <i>Saguinus bicolor</i> amostrados do fragmento florestal da UFAM. Confeccionado na plataforma Quantumgis (versões 3.16.16 e 3.22.8), DATUM Sirgas 2000, Coordenadas UTM/Zonal 20 Sul. ....	57
Figura 11. Localizações dos <i>Saguinus bicolor</i> cujo parasito filarial foi identificado. Confeccionado na plataforma Quantumgis (versões 3.16.16 e 3.22.8), DATUM Sirgas 2000, Coordenadas UTM/Zonal 20 Sul. ....	58
Figura 12. Mapa das localizações dos <i>Saguinus bicolor</i> cuja filária foi identificada, no fragmento florestal da UFAM. Confeccionado na plataforma Quantumgis (versões 3.16.16 e 3.22.8), DATUM Sirgas 2000, Coordenadas UTM/Zonal 20 Sul. ....	58
Figura 13. Correlograma das relações lineares das variáveis de interesse (valor-p <5%) em relação à multicolinearidade. ....	67
Figura 14. Correlograma geral do comportamento de todas as variáveis em relação à multicolinearidade. ....	68
Figura 15. Gráfico MLG da influência da temperatura média mensal sobre a prevalência de filária em <i>Saguinus bicolor</i> . ....	69
Figura 16. Gráfico MLG da influência da densidade demográfica sobre a prevalência de filária em <i>Saguinus bicolor</i> . ....	70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers utilizados para a detecção de filárias em <i>S. bicolor</i> usando o alvo ITS-1. ....	44
Tabela 2. Variáveis utilizadas para a construção de MLG. ....	47
Tabela 3. Visualização geral dos dados dos animais positivos para filárias. ....	55
Tabela 4. Visualização geral da localidade dos <i>S. bicolor</i> , número de positivos e número de negativos em cada local. ....	60
Tabela 5. Análise exploratória dos dados das variáveis. ....	62
Tabela 6. Descrição do resultado da presença de corpos d'água intermitentes para sauins-de-coleira positivos, negativos e negativos apenas na necrópsia, no buffer de 500 metros. ....	63
Tabela 7. Descrição do resultado para a presença de corpos d'água e corpos d'água intermitentes para sauins-de-coleira positivos, negativos e negativos apenas na necrópsia, no buffer de 1000 metros. ....	63
Tabela 8. Descrição do resultado para o tipo de matriz da paisagem encontrada para <i>S. bicolor</i> positivos, negativos e negativos apenas na necrópsia, no buffer de 500 metros. ....	64
Tabela 9. Descrição do resultado para o tipo de matriz da paisagem encontrada para <i>S. bicolor</i> positivos, negativos e negativos apenas na necrópsia, no buffer de 1000 metros. ....	64



Tabela 10. Tabela das análises exploratórias das variáveis. Testes: a análise exploratória através do Teste da Soma dos Postos e Teste da Soma Exata dos Postos de Wilcoxon, Teste Exato de Fisher e Teste do Qui-quadrado. ....65

Tabela 11. AIC dos modelos de regressão linear sobre a influência da variável em relação à prevalência de filárias em *Saguinus bicolor*.....68

Tabela 12. Resultado da razão de chances e do intervalo de confiança para as variáveis escolhidas para o MLG. ....69

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	19
<b>2. Revisão de literatura</b> .....	21
2.1. O <i>Saguinus bicolor</i> .....	21
2.2. A paisagem .....	25
2.2.1. A paisagem do município de Manaus.....	26
2.3. Filárias.....	30
2.4. Aspectos gerais das filarioses na Amazônia Brasileira .....	31
2.5. Biologia das filárias .....	32
2.5.1. Transmissão .....	34
2.5.2. Diagnóstico.....	35
<b>3. Justificativa</b> .....	38
<b>4. Objetivos</b> .....	39
<b>4.1. Objetivo geral</b> .....	39
<b>4.2. Objetivos específicos</b> .....	39
<b>5. Estratégias metodológicas</b> .....	40
5.1. Tipo de Pesquisa .....	40
5.2. Aspectos éticos .....	40
5.3. Local de estudo e população de interesse .....	40
5.4. Coleta de dados .....	41
5.4.1. Necrópsia de <i>Saguinus bicolor</i> .....	41
5.4.2. Amostras biológicas de animais vivos .....	42
5.5. Análise morfológica .....	42
5.5.1. Confeção de lâminas e contagem de microfilárias.....	43
5.6. Análise molecular .....	43
5.6.1. Extração de DNA.....	43
5.6.2. Nested PCR.....	43

5.6.3. Eletroforese em gel de agarose.....	44
5.6.4. Sequenciamento de Sanger e Next Generation Sequencing .....	44
5.7. Análise de paisagem da prevalência de filárias em <i>Saguinus bicolor</i> .....	45
5.7.1 Georreferenciamento e construção do buffer dos animais amostrados.....	45
5.7.2. As variáveis para análise de paisagem.....	46
5.7.3. Variáveis demográficas e meteorológicas .....	47
5.8. Análise de dados.....	50
<b>6. Resultados</b> .....	<b>51</b>
6.1. Detecção e identificação de filárias .....	51
6.2. Análise de paisagem da prevalência de filárias .....	56
<b>7. Discussão</b> .....	<b>71</b>
<b>8. Referências Bibliográficas</b> .....	<b>76</b>
<b>9. Anexos</b> .....	<b>87</b>
9.1. Anexo 1 .....	87
9.2. Anexo 2 .....	91
9.3. Anexo 3.....	92
9.4. Anexo 4.....	93

## 1. Introdução

O *Saguinus bicolor*, popularmente chamado de sauí-de-coleira, é um Calitriquídeo do Amazonas cuja área de ocorrência se limita a fragmentos florestais e arredores dos municípios de Manaus, Itacoatiara e Rio Preto da Eva, sendo uma das mais limitadas entre os primatas de território amazônico. Por conta disso, são animais que estão em grande contato com a população e os animais domésticos, sofrendo variadas ameaças oriundas de pressões antropogênicas, tais como desmatamento de seu habitat e atropelamentos (GORDO *et al.*, 2018, 2013). Portanto, este pequeno primata está na lista de animais criticamente ameaçados de extinção da Lista Oficial da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção estabelecida pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA) (BRASIL, 2014).

Adicionalmente, não há muitos estudos acerca de doenças infecciosas que podem acometer o *S. bicolor*. Estudos sobre parasitos são necessários para programas de conservação, uma vez que esse tipo de problemática representa uma fragilidade notável para animais ameaçados de extinção. Até o momento, de acordo com a literatura, já se foi descrito patógenos importantes em *S. bicolor*, tais como os das arboviroses, Hantavírus, helmintos do trato digestório e as filárias (GOMES, 2019; GORDO *et al.*, 2018; SEVÁ *et al.*, 2018; SOLORIO, 2015).

Por isso, estudos envolvendo maior entendimento sobre as doenças infecciosas que podem vir a acometer o *S. bicolor* são de extrema importância, tal como estudos sobre as filárias. Filárias são parasitos do filo Nematoda de variadas famílias, que podem infectar diversos tipos de primatas, carnívoros, pássaros, anfíbios, ungulados, roedores, etc; eles provocam diversas doenças como oncocercose, mansonelose, loíase, bancroftose, dirofilariose cardiopulmonar, dentre outras; algumas das quais podem acometer tanto a seres humanos quanto a animais doméstico e silvestres. São doenças que afetam especialmente comunidades tropicais e vulneráveis, e alguma delas são tidas como negligenciadas (BAIN *et al.*, 2008, 2015; BRASIL, 2019; LEFOULON *et al.*, 2015; MORALES-HOJAS, 2009; TAYLOR, *et al.*, 2014). Seus vetores principais são artrópodes hematófagos, os quais certos indivíduos podem ocorrer na Amazônia, como os dípteros da Família Ceratopogonidae e Família Simuliidae (BAIN *et al.*, 2008, 2015; CONCEIÇÃO *et al.*, 2013; CONGA, 2018; CRAINEY *et al.*, 2014).

Adicionalmente, é relevante que se compreenda a dinâmica da paisagem envolvida dos *S. bicolor* neste cenário de risco de doença filarial, tendo em vista não apenas a vivência muito aproximada com o ser humano e os animais domésticos, mas também a forma como este primata sobrevive em meio a pressões antrópicas relacionadas a riscos de proliferação de doenças, tais como desmatamento, fragmentação florestal, ocupação imprópria de terra, problemas de saneamento básico, entre outros. Portanto, denota-se aqui um possível risco zoonótico – tanto para o ser humano quanto para o *S. bicolor* – e uma necessidade de desvendar os questionamentos epidemiológicos envolvidos.

A união destes aspectos é de grande interesse não só para a saúde pública, mas também para a conservação desse primata e do meio ambiente. São aspectos que são intrinsecamente ligados.

Desta forma, o presente trabalho tenciona identificar e caracterizar filárias detectadas em *S. bicolor*, um primata que corre grande risco de extinção, utilizando ferramentas de diagnóstico molecular, e também ajudar a elucidar a ecologia de paisagem da prevalência desses parasitos infecciosos, compreendendo as pressões antrópicas que podem vir a ter influência nesse processo.

## 2. Revisão de literatura

### 2.1. O *Saguinus bicolor*

Também chamado de sauim-de-coleira, sauim-de-Manaus, sauim-de-duas-cores ou *pied bare face tamarim* em inglês, o *Saguinus bicolor* é um primata neotropical da família Callitrichidae. Suas características físicas são: pelagem branca na região do tórax, membros superiores, pescoço e porção posterior da cabeça, e cores que variam entre marrom alaranjado, marrom-escuro e marrom claro na porção dorsal do corpo e membros inferiores; uma cauda longa e fina, bem como pele negra e ausência de pelos na cabeça, face e orelhas. Quando adultos, costumam pesar entre 450 e 550 gramas, medindo cerca de 28 a 32 cm de comprimento do corpo, com 38 a 42 cm de cauda (Figura 1) (GORDO *et al.*, 2017).



Figura 1. *Saguinus bicolor*. Fonte: Diogo Lagroteria.

É um animal de hábitos generalistas, capaz de explorar diferentes ambientes, com preferência por camadas inferiores de florestas densas e por vegetação marginal ou alterada, porém de uso conservador do seu hábitat, se concentrando na distribuição de recursos alimentares disponíveis na sua área de uso (GORDO, 2012; MONTEIRO NETO, 2015). Sua dieta, como a da maioria dos calitriquídeos, é a base de frutas, pequenos vertebrados (anfíbios, lagartos e filhotes de aves) e artrópodes,

ovos, exsudatos de árvores, néctar e flores (GORDO *et al.*, 2017; SOBROZA 2015). Reproduzem-se até duas vezes ao ano, podendo ter um a dois filhotes gêmeos por acasalamento (GORDO 2012; GORDO *et al.*, 2017; VIDAL, 2003).

O *S. bicolor* é considerado uma espécie criticamente ameaçada de extinção, constando, assim, na Lista Oficial da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção estabelecida pela Instrução Normativa nº 444, de 17 de dezembro de 2014, elaborada pelo MMA, bem como na Lista da União Internacional para a Conservação da Natureza (UICN), aparecendo como Criticamente em Perigo (BRASIL, 2014; GORDO *et al.*, 2017; VIDAL *et al.*, 2018). Uma gama de fatores apoia essas classificações. É uma espécie que possui uma das distribuições geográficas mais limitadas entre os primatas amazônicos (cerca de 7.500 Km<sup>2</sup>), sendo que grande parte desse território coincide com a região metropolitana da cidade de Manaus, Rio Preto da Eva e Itacoatiara (Figura 2) (GORDO *et al.*, 2013; RÖHE, 2006; SOBROZA, 2015).

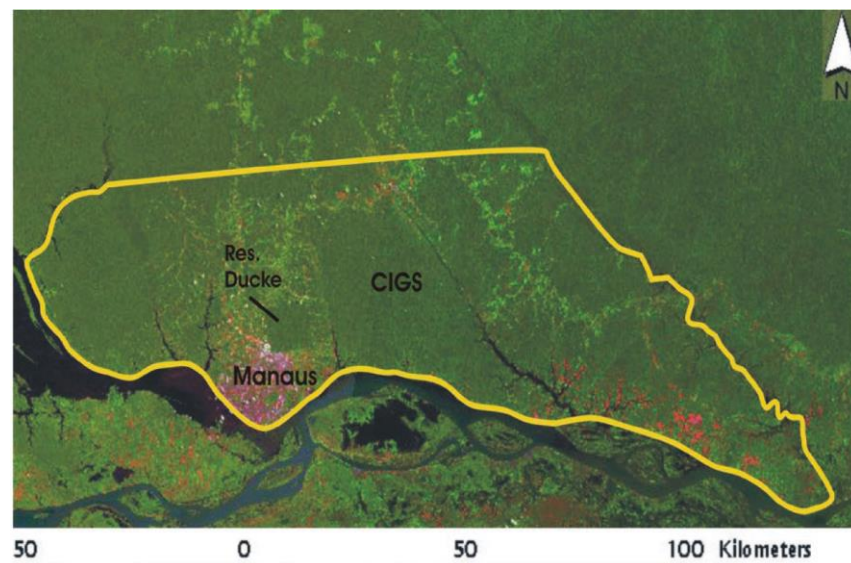


Figura 2. Distribuição geográfica do *Saguinus bicolor*. Fonte: Gordo et al., 2017.

Adicionalmente, nos fragmentos florestais isolados e nas áreas adjacentes da metrópole amazonense onde o *S. bicolor* habita, ocorre grande pressão antrópica. Expansão urbana, construção de estradas, colonização, aumento da agricultura e pecuária são comuns nas periferias da cidade; enquanto nos fragmentos inseridos na cidade os saúns-de-coleira são submetidos a atropelamentos em vias movimentadas, eletrocuções em linhas de energia, ataques de cães e gatos, capturas para se

tornarem animais de estimação, entre outros maus-tratos (GOMES, 2019; GORDO, 2012; GORDO *et al* 2018).

Notadamente, primatas não humanos podem ter diversos papéis dentro de certas populações humanas, que vão desde fonte de alimento até importância cultural – exemplos como representações simbólicas importantes para a crença e folclore regionais e até mesmo animais de estimação. No caso do *S. bicolor*, já se foi registrado relações de natureza negativa entre seres humanos e este primata, como incômodo e competição pelo espaço e alimento. Houve, também, registros de interação positiva entre ambos, como cooperação, admiração e afetividade para com os animais. Ainda, o *Saguinus bicolor* foi oficializado como espécie-símbolo do município de Manaus, através do decreto Nº 8101/2005 (GORDO, *et al.*, 2017; SANTOS, 2015; SANTOS *et al.*, 2017).

Portanto, o *S. bicolor* é um animal que entra em interação constante com seres humanos, tanto em ambientes rurais quanto urbanos (Figura 3). Por conta da expansão urbana da cidade de Manaus, novos ecótonos onde esses primatas e seres humanos entram em contato e interagem foram criados, onde há disputa por espaços e recursos, bem como com a fauna associada (GOMES, 2019; SANTOS 2015; SANTOS *et al.*, 2017). E como é tido como uma espécie guarda-chuva para a conservação de amplas áreas de vegetação local, áreas de maior contato com a matriz urbana aumentam o grau de risco para a espécie, presente por conta da interação com os seres humanos, o que reforça os perigos de extinção que esses primatas apresentam (RÖHE, 2006; SANTOS, 2015).





Figura 3. *Saguinus bicolor* em área residencial na cidade de Manaus. Fonte: Gordo et al., 2017.

Outra grande problemática enfrentada pelo *S. bicolor* são as doenças infecciosas. Parasitos representam um perigo importante para programas de conservação, recuperação e manejo de animais silvestres, com especial fragilidade para animais ameaçados de extinção. No caso do *Saguinus bicolor*, não há muitas informações sobre parasitos e demais patógenos que podem acometer estes animais, tanto em vida livre quanto em cativeiro, o que constitui uma problemática importante para medidas de conservação dessa espécie. Estudos descrevem a ocorrência de agentes infecciosos no *S. bicolor*, como o vírus Zika, Flavivírus, Chikungunya, Hantavírus, Rotavírus; parasitos de trato gastrointestinal do filo *Acanthocephala*, onde a espécie *Prosthenorchis elegans* é comum em primatas do novo mundo e uma das principais causas de óbito entre estes primatas, quando em cativeiro, e do filo Nematoda, com os gêneros *Subulura*, *Dipetalonema* e *Mansonella*. (CONGA, 2018; GOMES, 2019; GORDO *et al.*, 2018; SEVÁ *et al.*, 2018; SOLORIO, 2015).

Portanto, a luz das questões levantadas, é necessário foco na questão das doenças infecciosas e nas influências que o *Saguinus bicolor* sofre no contexto de pressão antrópica e fragmentação de habitat em que vive, com os objetivos de conservação da espécie e saúde pública.

## 2.2. A paisagem

Conceitua-se aqui “paisagem” de acordo com Metzger (2001), como “um mosaico heterogêneo formado por unidades interativas, sendo esta heterogeneidade existente para pelo menos um fator, segundo um observador e numa determinada escala de observação”. Esta é uma definição que procura integrar as abordagens geográficas e ecológicas para o conceito de paisagem, uma vez que elas podem ser distintas e até conflitantes. A definição geográfica destaca o estudo da influência do ser humano sobre a paisagem e a gestão de território, enquanto a ecológica destaca a importância da conjuntura espacial sobre os processos ecológicos e a relação destes para a conservação ecológica; ambas sendo importantes elementos para o estudo de doenças infecciosas e aos eventos de fragmentação florestal.

Um fragmento florestal pode ser determinado como uma área de vegetação natural que sofreu interrupção por barreiras que podem ser naturais (como montanhas, lagos etc.) ou antrópicas (como estradas, povoados, represas etc.). Ele é exposto, então, a um novo ambiente, e isso causa vários efeitos físicos e biológicos, tais como mudanças microclimáticas em seu interior e margem, dependendo do tamanho, forma e posição do fragmento; são mudanças capazes de diminuir, consideravelmente, o fluxo de animais, pólen e/ou sementes. Ocorre também alteração considerável nas interações patógeno-hospedeiro, exatamente por modificar o movimento dos hospedeiros, a distribuição de hospedeiros por vetor e a diversidade e interações entre espécies (CALEGARI *apud* VIANA, 2010; HUANG *et al.*, 2016 SERAFINI, 2007).

A paisagem onde se insere o fragmento florestal, ou a matriz, é um elemento central para entender a dinâmica do fragmento, em fatores como permeabilidade de passagem de espécies à outras vegetações e distúrbios que espécies associadas a tal matriz podem causar nos fragmentos (especialmente em habitats de borda) e perturbações oriundas de atividades antropogênicas (GONTIJO, 2008; GORDO 2012; SERAFINI, 2007).

Quando se trata de uma matriz urbana, o efeito é bastante intenso e complexo, principalmente por conta da forte pressão antrópica, as mudanças microclimáticas típicas do contexto e a constante presença de grande densidade de pessoas. As

mudanças provocadas pela população, tais como ocupações irregulares, trazem consigo problemáticas como ausência de saneamento básico e coleta de lixo, o que acarreta, juntamente com o desmatamento, o aparecimento de fauna invasora e insetos vetores de doenças. O uso intensivo das bordas dos fragmentos por parte das pessoas favorece o contato com a fauna, e essas ações antrópicas no ambiente produzem interferências na dinâmica de doenças que acometem os seres humanos e os animais (CALDAS, 2016; GONTIJO, 2008; LOBO 2013).

Essa interação desordenada entre animais silvestres, seres humanos e animais domésticos é tida como um dos potenciais causas de surtos de doenças infecciosas globalmente. Cães e gatos domésticos possuem facilidade para adentrar áreas florestais, onde podem preda espécies nativas e servir de reservatório para doenças infecciosas. O contrário também pode acontecer: animais silvestres transmitindo uma grande variedade de patógenos para animais domésticos e os seres humanos em contato com o habitat, ocorrendo sérios riscos para a saúde para os indivíduos envolvidos. Ocorrem agravos específicos também para doenças transmitidas por vetores, com o aumento dos movimentos de hospedeiros entre os habitats agora conectados, causando uma abundância de vetores e maior risco de transmissão de doenças (HUANG *et al.*, 2016; NAVA *et al.*, 2017; SEVÁ *et al.*, 2018).

Em vista dessas problemáticas levantadas, têm-se o ambiente como um importante requisito para compreender a ocorrência de doenças, uma vez que se analisa aspectos ambientais relevantes, podendo ser a nível global ou local. A abordagem geográfica parte de um ponto de vista geral, procurando observar como a doença obteve condições para sua ocorrência, do processo de interação entre a patologia e o ambiente, bem como a forma que o meio é transformado nessa relação. Adicionalmente, o estudo da ecologia da paisagem na ocorrência de doenças pode produzir embasamento científico importante na formulação de políticas para o controle e erradicação de doenças emergentes e reemergentes (LOBO, 2013).

### 2.2.1. A paisagem do município de Manaus

Manaus, em específico, possui uma área total de 11.401,110 Km<sup>2</sup> (onze mil quatrocentos e um e cento e dez quilômetros quadrados), onde a área urbana representa 4% de todo o município, contando com 457, 9 Km<sup>2</sup> (quatrocentos e cinquenta e sete e noventa quilômetros quadrados) (Figura 4). Possui uma população total de 2.219.580 habitantes. Cresce desorganizadamente, apresentando ocupação desordenada do solo, destruição de coberturas vegetais, poluição dos cursos de água e deficiência de saneamento básico, bem como disparidades socioeconômicas entre seus bairros, em termos de Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) e forte exclusão social (GONTIJO, 2008; IBGE, 2020).

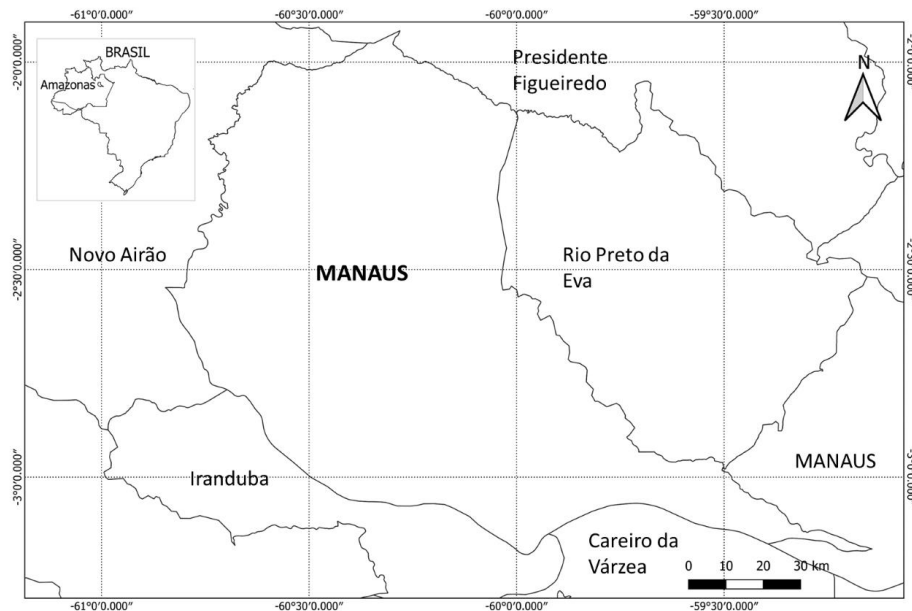


Figura 4. Cidade de Manaus, Amazonas. Fonte: Alexandre Neto (Acervo pessoal).

Portanto, esse município apresenta fragmentação florestal. No entendimento do Código Ambiental do município de Manaus (2001), os fragmentos florestais de áreas urbanas são zonas de vegetação nativa situadas dentro do perímetro urbano de Manaus, podendo ser em propriedade pública ou privada, e que possuem um papel na manutenção da qualidade do meio ambiente urbano. E, em termos jurídicos, os fragmentos florestais urbanos são incluídos na definição de “espaços territoriais especialmente protegidos” dentro do Código Ambiental do Município de Manaus, no capítulo IV, Artigo 31. Embora o artigo 38 do mesmo código estabeleça que essas

áreas devem receber atenção especial do Poder Público Municipal, não há definição de proteção para essas áreas (GONTIJO, 2008; SERAFINI, 2007).

Os fragmentos florestais da cidade de Manaus ocorrem em todas as zonas administrativas da cidade, sendo o maior deles o da UFAM, com uma área de 578, 8 ha. Em termos de regime de propriedade, existem fragmentos de propriedade privada e de propriedade pública; entre as unidades de conservação, também há os públicos, tais como Parque Municipal do Mindú (55 ha), Refúgio de Vida Silvestre Sauim-Castanheira (82,1 ha) e Parque Estadual Sumaúma (56,2 ha); e privados, como a Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Burity, com (73 ha); RPPN Soka Gakai, (80, 9 ha) e RPPN Philips (34 ha). Grande parte deles, porém, são de tamanhos menores que 30 ha e apresentam forte efeito de borda, perímetros irregulares e sofrem diferentes tipos de pressão antrópica. A cobertura vegetal da maioria desses fragmentos é composta por mata secundária, com a parte central dos fragmentos maiores possuindo vegetação com características de mata primária (GONTIJO, 2008; GORDO, 2012).

No caso de Manaus, a matriz primária é urbana e, portanto, apresenta grande pressão antrópica, com profundo efeito de borda; com o entorno dos fragmentos da cidade de Manaus abrangendo indústrias, residências, áreas verdes genéricas, área da própria instituição a qual o fragmento pertence, estradas e comércio. A matriz tipicamente composta por habitações é vista mais abundantemente junto a fragmentos menores. (GONTIJO, 2008; SERAFINI 2007).

A pressão antrópica no perímetro urbano do município de Manaus se caracteriza por derrubada de áreas florestais provocada principalmente por ocupações irregulares (invasões) pela população de baixa renda e setores da classe média alta. Enquanto na zona rural ocorrem ações antrópicas diversas, como desmatamento, corte de árvores, queimadas, introdução de pastagens, crescimento comercial e busca por matéria-prima. Quanto ao uso de recursos, uma grande parte das populações amazônicas ainda os utilizam em sistemas agro-florestais tradicionais. Pode-se relatar usos como caça de cutias, jacarés, tatus, entre outros; extração de frutas variadas como o açaí e buriti; pesquisa científica; caminhadas; usos religiosos; prática de sexo ao ar livre; despejo de lixo, entre outros. (GONTIJO, 2008; SERAFINI, 2007).

Na fauna dos fragmentos da cidade de Manaus, já se foram registrados diferentes animais, tais como aves, répteis, anfíbios, peixes, artrópodes variados e mamíferos. O levantamento de mamíferos feito em fragmentos do Parque Estadual Sumaúma, Reserva Florestal Adolpho Ducke, Parque Municipal Nascentes do Mindú, Parque Municipal do Mindú, Fragmento do Aeroporto Eduardo Gomes, na UFAM e na rodovia BR-174 consta na Lista 1 (Anexo 3). Porém, em alguns contextos, o levantamento é insuficiente, como no caso do Parque Nascentes do Mindú, e em outros, deve-se depender de monitoramento de atropelamento de animais em rodovias movimentadas (AMAZONAS, 2008; CALDAS, 2016; INFRAERO, 2017; LIMA, 2018; MEDEIROS, 2019; OLIVERIA, 2008; OLIVEIRA, 2012; OMENA-JÚNIOR *et al.*, 2012; SILVA, 2014).

Também foi descrito a aparição de espécies invasoras, tais como *Canis lupus familiares* (cão doméstico), *Felis silvestris catus* (gato doméstico). As espécies invasoras são aquelas que estão em processo de se tornarem abundantes fora da sua área de ocorrência natural e contribuem para a extinção de espécies nativas por competir com as mesmas e ocupar o nicho delas, bem como servir de reservatório para doenças infecciosas, como discutido no item 2.2. (CALDAS, 2016; SEVÁ *et al.*, 2018).

Em termos de doenças infecciosas, já se foi detectado Hantavirus, Rotavirus A e o gênero *Trypanosoma* em *S. bicolor* de fragmentos florestais, bem como parasitos dos filos Acanthocephala e Nematoda nos intestinos desse primata; existem descrições de agentes zoonóticos dos gêneros *Leptospira*, *Brucella* e *Mycobacterium*, ocorrendo em animais silvestres e ferais que podem habitar fragmentos florestais e suas bordas, da cidade de Manaus (Anexo 3); e a febre amarela tem como principal fonte de infecção os primatas, especialmente do gênero *Allouata*, *Atelles* e *Callithrix*. Insetos vetores podem transmitir dengue, malária e leishmaniose tegumentar, se beneficiando das pressões antrópicas e efeitos de borda em fragmentos florestais. (CALDAS, 2016; CAPELLÃO *et al.*, 2015; GOMES, 2019; MAIA DA SILVA, 2008; NAVA, 2008; SOLORIO, 2015).

Em suma, observa-se que o município de Manaus reúne vários elementos que podem ser de grande importância para um contexto de interação patógeno-hospedeiro.

### 2.3. Filárias

As filárias são vermes inseridos no filo Nematoda, Ordem Spirurida, superfamília Filarioidea, família Onchocercidae, que podem parasitar diversos tipos de animais, tais como répteis, aves, anfíbios e mamíferos como primatas não-humanos, roedores, seres humanos, cães, gatos, entre outros (Figura 5). Algumas espécies de filária são agentes de doenças humanas e veterinárias, sendo de grande importância para a saúde pública em comunidades tropicais (BAIN *et al.*, 2008, 2015; LEFOULON *et al.*, 2015; MEDEIROS *et al.*, 2015; MORALES-HOJAS, 2009; TAYLOR, *et al.*, 2014; TANG *et al.*, 2020; VIEIRA, 2019).



Figura 5. Microfilária da espécie *Mansonella ozzardi*. Fonte: Banco de dados de parasitos, USP, 2012.

São parasitos com ampla distribuição mundial, encontrados na África, Ásia, América do Sul, América Central, no Oriente Médio e Europa, sendo distribuídos em regiões tropicais, equatoriais, bem como em locais de clima temperado e costeiro desses continentes (FONTES E ROCHA, 2005; MORALHES-HOJAS, 2009; PEREIRA, 2014).

Os problemas de saúde provocados pelas filárias são um fardo socioeconômico e contribuem diretamente para a pobreza, sendo dessa forma consideradas doenças negligenciadas, relacionadas a populações de baixa renda, principalmente as de

países em desenvolvimento e que não despertam interesses em grandes indústrias farmacêutica, em agências de fomento e da comunidade científica; onde o ciclo de vida e as espécies reservatórios para muitas desses parasitos ainda são pouco conhecidos (BRASIL, 2019; MORALES-HOJA, 2009; OTRANTO *et al.*, 2012; SOUZA, 2010).

#### 2.4. Aspectos gerais das filariose na Amazônia Brasileira

As infecções parasitárias causadas pelas filárias são chamadas de filariose. Em termos de importância médica e para o contexto brasileiro, destacam-se a oncocercose e a mansoniase (FONTES E ROCHA, 2005).

A oncocercose, também chamada de “cegueira dos rios”, é causada pelo parasito *Onchocerca volvulus*. Os sintomas são caracterizados por quadros dermatológicos severos, que incluem prurido intenso, despigmentação, oncocercomas – ou nódulos subcutâneos consistidos de uma cápsula fibrosa envolvendo os parasitos adultos – liquenificação cutânea, entre outros. Ademais, pode provocar cegueira irreversível (CONCEIÇÃO *et al.*, 2013; CRAINEY, MATTOS-GLÓRIA, HAMADA E LUZ, 2014; FONTES E ROCHA, 2005).

Sua distribuição abarcava dezenas de países africanos, localidades no Oriente Médio e na América Latina, especificamente na Guatemala, Venezuela, Colômbia, Equador, México e Brasil. Todavia, graças ao Programa de Eliminação da Oncocercose para as Américas, a transmissão ativa desse parasito agora se restringe à alguns pontos isolados na Guatemala, Venezuela e Brasil, sendo este foco da Amazônia o mais significativo. Neste caso, ele abrange vastas áreas da Venezuela e dos estados brasileiros do Amazonas e Roraima, onde o principal grupo exposto são os indígenas do povo Yanomami, que preservam um estilo de vida seminômade. Ainda, se trata de uma região composta por áreas de savana adjacentes à floresta tropical pluvial. Portanto, compõe-se aqui um quadro complexo, em termos de logística (CONCEIÇÃO *et al.*, 2013; CRAINEY, MATTOS-GLÓRIA, HAMADA E LUZ, 2014; FONTES E ROCHA, 2005).



Sobre a mansonelose, ela é provocada pelas filárias *Mansonella ozzardi*, *M. perstans* e *M. streptocerca*. Tanto a *M. perstans* quanto a *M. streptocerca* são de território africano, enquanto a *M. ozzardi* é distribuída em localidades da América Latina, como Colômbia, Guiana, Venezuela e no Brasil, nos estados do Mato Grosso, Roraima e Amazonas. Especificamente, na Amazônia brasileira, foi registrado a presença em vários municípios amazonenses e comunidades ribeirinhas e indígenas dos rios Solimões, Purús e Negro, e de seus afluentes, tais como os povos (MEDEIROS *et al.*, 2007; TANG *et al.*, 2016).

Pouco estudada, a mansonelose é considerada como uma doença de sintomatologia incerta, onde ainda não há um conjunto de sintomas universalmente estabelecido para seu diagnóstico clínico. Pode se apresentar assintomática, mas também pode provocar quadros de febre, dores pelo corpo, cabeça e nas articulações, adenites inguinocrurais, inchaços subcutâneos, distúrbios hormonais, erupções cutâneas e hipereosinofilia, frieza nas pernas e lesões oculares, que podem levar a cegueira. Alguns de seus sintomas podem ser confundidos com doenças como a malária. Ainda, a percepção geral da comunidade internacional sobre essa doença é que ela é “benigna” ou “apatogênica”, de forma que a mansonelose não figura entre as doenças tropicais mais negligenciadas da lista da Organização Mundial da Saúde (OMS) e também não possui programas de erradicação e controle nacionais ou internacionais ligados a ela – muito embora ela ocorra entre povos vulneráveis de região amazônica e os sintomas atrelados a ela sejam muito debilitantes (BAIN *et al.*, 2015; MEDEIROS *et al.*, 2007, 2009, 2015).

## 2.5. Biologia das filárias

Como mencionado anteriormente, as filárias podem infectar uma grande gama de animais.

Embora existam poucas amostragens, infecções por parasitos Nematoda da família Onchocercidae são frequentes em primatas selvagens e populações humanas que habitam áreas de florestas neotropicais. Especificamente, já se foram registradas infecções em primatas selvagens, ou estes já foram descritos como hospedeiros definitivos, para certas espécies do gênero *Mansonella*, bem como outros gêneros da

família Onchocercidae, como o *Dipetalonema*, *Wuchereria* e o *Brugia* (BAIN *et al.*, 2015; CONGA 2018; CONGA *et al.*, 2019; DUVALLET e BOIREAU, 2015; MORALES-HOJAS, 2009; TANG, 2020).

Para o gênero *Mansonella*, particularmente os parasitos que provocam a mansonelose, têm-se que o único hospedeiro vertebrado definitivo da *M. ozzardi* é o ser humano, porém para a *M. perstans* e a *M. streptocerca*, outros primatas também podem servir como hospedeiros naturais. Para a espécie *Onchocerca volvulus*, o ser humano é descrito como o único hospedeiro vertebrado natural, porém o gênero *Onchocerca* pode ocorrer também em bovídeos e equinos no Brasil, através das espécies *Onchocerca gutturosa* e *Onchocerca cervicalis*, que são de importância veterinária (BRILHANTE *et al.*, 2020; DUVALLET e BOIREAU, 2015; MORALES-HOJAS, 2009; TA-TANG, 2020).

Além disso, existem relatos de filárias não-humanas infectando seres humanos há centenas de anos; há um relato de caso de infecção por *Dipetalonema reconditum* (filária usualmente encontrada no subcutâneo do cão doméstico) e outro por *Macacanema formosana* (filária associada ao *Macaca cyclopis*, um primata taiwanês), onde ambas as pessoas apresentaram infestação nos olhos e sintomas oculares (GREEN, 2002; HUYNH, THEAN, MAINI, 2001).

O ciclo de vida dos parasitos de filária ainda não está completamente esclarecido, porém, pode-se utilizar ciclos de filárias já elucidados para descrevê-los, tal como fez Conga (2018). De forma geral, estes são muito parecidos, diferenciando-se apenas onde a forma adulta da filária e as microfilárias (MF) se alojarão no corpo do hospedeiro ou o gênero e espécie do vetor e hospedeiros envolvidos. A fêmea do artrópode hematófago, ao realizar o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, pode ingerir MF. Essas MF migram pela cavidade hemocélica e musculatura torácica dos vetores, transformando-se no estágio larval L1 e, depois de alguns dias, para L2. Quando atingem o estágio L3, que é a larva infectante, elas migram pelo corpo do vetor até o aparelho bucal, por onde podem ser introduzidas na corrente sanguínea do hospedeiro durante o repasto sanguíneo. Na corrente sanguínea, as larvas L3 podem permanecer por um longo tempo, até que migram para diversos tecidos do organismo, a depender da espécie. Podem infectar vasos linfáticos, tecidos oculares, espaços subcutâneos ou cavidades abdominais e torácicas, onde se tornam filárias adultas e produzem MF de forma sexuada, em um processo que pode levar mais de

um ano após a infecção (BRASIL, 2009; CONGA, 2018; CRAINEY *et al.*, 2020; FONTES e ROCHA, 2005).

Para a *Mansonella* sp., as filárias adultas se alojam no mesentério, tecido conjuntivo subperitoneal e nas membranas serosas da cavidade abdominal do hospedeiro vertebrado; a migração das MF ocorre para os capilares sanguíneos periféricos do hospedeiro (*M. perstans* e *M. ozzardi*), ou pela derme (*M. streptocerca* e *M. ozzardi*) a fim de serem ingeridas pelo vetor. No caso da *Onchocerca volvulus*, as adultas podem se alojar no tecido subcutâneo, podendo provocar nódulos, e em cavidades oculares, onde suas MF são liberadas na derme (FONTES E ROCHA, 2005; TANG *et al.*, 2020).

### 2.5.1. Transmissão

As filárias são transmitidas por variados tipos de insetos hematófagos, dentre os quais, alguns são antropofílicos (ALHASSAN, LI, POOLE E CARLOW, 2015; BAIN, 2008; MORALES-HOJAS, 2009). Já foram registrados os gêneros *Simulium*, *Culicoide*, *Aedes*, *Anopheles*, *Chrysops* e *Mansonia* como vetores competentes desses parasitos, nos continentes africano, americano e asiático (ALHASSAN, LI, POOLE E CARLOW, 2015; MOLYNEUX, MITRE, BOCKARIE, KELLY-HOPE, 2014; MORALES-HOJAS, 2009).

Na região amazônica, cerca de seis espécies de simulídeos podem transmitir oncocercose, onde as espécies *Simulium guianense* e *S. incrustatum* são de grande importância (CONCEIÇÃO *et al.*, 2013); E, recentemente, Brilhante *et al.* 2020 reportou dois exemplares do flebotomíneo *Psychodopygus carrerai carrerai* infectados com filárias do gênero *Onchocerca* no estado do Acre, Amazonas.

Para a transmissão de *Mansonella* spp., destacam-se espécies do gênero *Culicoide* e também do gênero *Simulium* (CONGA, 2018; TANG *et al.*, 2020). No entanto, no Brasil, somente os simulídeos são reconhecidos como vetores de *Mansonella ozzardi*: o *Simulium amazonicum* em regiões do rio Purús e do rio Alto Solimões, no Amazonas; *S. argentiscutum*, do rio Alto Solimões e o *S. oyapockense* no estado de Roraima. E, recentemente, este último foi incriminado como o vetor da *Mansonella mariae*, em região de Amazônia brasileira – uma filária pouco estudada

que, até o momento, entende-se que só infecta primatas não-humanos (MEDEIROS *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2022).

### 2.5.2. Diagnóstico

Para fins de diagnóstico, diversos métodos são utilizados. Acompanhamento de manifestações clínicas, pesquisa de anticorpos e antígenos, diagnósticos parasitológicos, identificação morfológica das formas larvais, assim como de vermes adultos, estudos epidemiológicos, no qual realizam-se levantamentos sobre vetores, indivíduos acometidos e regiões envolvidas e, por fim, a utilização de ferramentas moleculares, como técnicas de detecção e caracterização de DNA (BRASIL, 2009; FONTES e ROCHA, 2005; TANG *et al.*, 2020).

No caso da oncocercose, pode-se fazer o diagnóstico clínico – observando os diagnósticos diferenciais, como adenopatias, dermatites e neoplasias – em conjunto com laboratorial, para confirmação da parasitemia (FONTES E ROCHA, 2005).

Para as *Mansonellas* sp., diagnósticos clínicos não são sensíveis; esfregaços sanguíneos com coloração de Giemsa é considerado o teste “padrão ouro” para se observar a presença da MF e identificar a morfologia da mesma, assim como a técnica com filtração de sangue periférico por membrana de policarbonato, combinada também com coloração de Giemsa, demonstrando alta sensibilidade e especificidade em estudo. As chaves morfológicas para identificação das MF são presença ou ausência de bainha ao redor do corpo, tamanho, formato, espaço da cauda e arranjo terminal dos núcleos da cauda (MEDEIROS *et al.*, 2007, 2015; TA-TANG *et al.*, 2016).

Porém, não há critérios morfológicos confiáveis para a diferenciação das MF, onde os caracteres podem ser difíceis de observar e podem variar dependendo da preservação da amostra, de sua montagem e do procedimento para a coloração, causando erros (TANG *et al.*, 2016; 2020).

Adicionalmente, esses métodos necessitam de habilidade e técnica para se distinguir espécies de microfilárias que podem ter características parecidas, como colonizar os mesmos tecidos ou ser transmitidas pelos mesmos vetores (CRAINEY *et al.*, 2020; TANG *et al.*, 2010; 2016; 2020).

Portanto, combinar esses métodos com as técnicas moleculares pode ser uma alternativa. A reação em cadeia da polimerase (PCR) pode ser utilizada tanto em amostras de sangue como em vetores e, por se utilizar de detecção de DNA, possui altos níveis de sensibilidade e especificidade, podendo até mesmo detectar infecções por mais de uma filária de forma precisa. Consegue, além disso, processar um número grande de amostras em um curto espaço de tempo. (BRASIL, 2009; MEDEIROS et al., 2018; CRAINEY *et al.*, 2020; LELES, 2019).

Utilizam-se PCR e técnicas de sequenciamento genético, a fim de fazer amplificação e, sucessivamente, a identificação por meio de genes-alvos específicos. Os alvos que podem ser usados para esse processo são: ITS-1 (espaçador interno de sequência transcrita 1), ITS-2 (espaçador interno de sequência transcrita 2), 18s rRNA (subunidade de RNA ribossomal 18s), 12s rRNA (subunidade de RNA ribossomal 12s), COX1 or CO1(citrocromo c-oxidase 1), rbp1 (grande subunidade de RNA polimerase 2), hsp70 (proteína de choque térmico 70-kilodaltons), myoHC (proteína miosina de cadeia pesada), 28S rDNA (subunidade de RNA ribossomal 28s), 5.8s rRNA (subunidade de DNA ribossomal 5.8s) (CRAINEY *et al.*, 2020; LEFOULON, 2015; LELES, 2019; TANG *et al.*, 2010, 2018).

Há também uma técnica de *Nested PCR*, que utiliza primers universais de filária para detecção desses parasitos em qualquer estágio dos seus ciclos de vida, tanto em hospedeiros vertebrados quanto em vetores. Nele, faz-se amplificação de uma porção do DNA ribossomal ITS-1 dos parasitos, necessitando apenas de equipamentos convencionais de PCR. Esta técnica permite a identificação baseada no tamanho do fragmento amplificado. Recentemente, ele também foi adaptado para PCR em tempo real, permitindo a identificação de filárias sem precisar de eletroforese em gel ou sequenciamento de Sanger. Entretanto, nessa adaptação, há a necessidade de estrutura e agentes mais caros do que o método de PCR tradicional, e ela não permite a caracterização direta de espécies de parasitos de filária novas ou inesperadas (CRAINEY *et al.*, 2020; TANG *et al.*, 2016, 2018, 2020).

Em termos de saúde pública, as ferramentas moleculares também são muito importantes para elucidar a taxonomia dos parasitos, o que é crucial para o entendimento da história evolutiva dos mesmos. A genética e a taxonomia, bem como a filogenia, são ferramentas cruciais que auxiliam a resolução de questionamentos da epidemiologia em níveis moleculares, chegando à elaboração de programas de

controle e prevenção das doenças relacionadas aos parasitos (NUNES, 2016; MORALES-HOJAS, 2009).

Para as filárias, há ainda grandes lacunas acerca da filogenia desses parasitos, por causas que abrangem desde regressão de suas características morfológicas, pouco material fossilizado disponível e até mesmo convergências no modo de vida deles, que fazem da tarefa de produzir hipóteses filogenéticas precisas um desafio. No momento, as análises moleculares costumam se basear em um número reduzido de espécies de filária ou utilizar marcadores genéticos adequados para diferenciação de espécies, mas não para desenvolver a história evolutiva do parasito. Contudo, existem estudos que procuram contornar essas dificuldades, com proposição de cinco clados principais dentro da família Onchocercidae, a fim de organizar a história evolutiva das filárias de forma acurada. (CHABAUD, ODAIN, 1994; CRAINEY *et al.*, 2018; LEFOULON, *et al.* 2015; YILMAZ *et al.*, 2016).

### 3. Justificativa

Têm-se um painel onde o *Saguinus bicolor*, um primata tido como espécie guarda-chuva e que está criticamente ameaçado de extinção, sofre grande pressão antrópica por conta da fragmentação e urbanização de seu habitat; e a problemática das filárias, vermes Nematoda que podem provocar doenças tropicais negligenciadas, levando à problemáticas de saúde pública, sendo uma parasitose endêmica no estado do Amazonas. Desta forma, fez-se oportuna a aplicação de epidemiologia molecular e estudo de paisagem para auxiliar na conservação desse primata e na ambiental, bem como para questões de saúde pública envolvendo o contexto da Amazônia.

## 4. Objetivos

### 4.1. Objetivo geral

Detectar e identificar filárias em *Saguinus bicolor* e analisar a ecologia de paisagem da prevalência dos parasitos identificados.

### 4.2. Objetivos específicos

- Identificar e caracterizar os parasitos filariais que infectam o sauí-de-coleira (*Saguinus bicolor*);
- Entendimento da distribuição da prevalência de infecção filarial em *S. bicolor* provenientes das áreas urbanas e periféricas de Manaus;
- Analisar os aspectos climatológicos, geográficos e ambientais da paisagem e a relação com a prevalência da infecção filarial em *S. bicolor*.



## 5. Estratégias metodológicas

### 5.1. Tipo de Pesquisa

Trata-se de um estudo descritivo, semiquantitativo e epidemiológico espacial.

### 5.2. Aspectos éticos

As coletas com animais vivos foram feitas mediante a aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Amazonas (CEUA/UFAM) (Anexo 2). Este trabalho também conta com licença do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) (código: 0671530320200723) (Anexo 3). O estudo também foi devidamente cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), sob o acesso A0A1A95, por motivos de manuseio de patrimônio genético (Anexo 4).

### 5.3. Local de estudo e população de interesse

Os *S. bicolor* são provenientes de Rio Preto da Eva e de diversas localidades da zona urbana e periférica de Manaus: UFAM, fragmento do Aeroporto Eduardo Gomes, rodovia BR-174 (Km 908), localidades do bairro Tarumã, bairro Ponta Negra, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA – V8, Campus 3), Estrada do Brasileiro (Distrito Industrial II e Puraquequara), rodovia AM-010, localidades do Conjunto Nova Cidade, localidades do Conjunto Atílio Andreaza (Bairro Japiim), Conjunto Acariquara (Bairro Coroado) e outras localidades do mesmo bairro, Parque Municipal do Mindú, Estrada do Alto Rio (município Rio Preto da Eva), Ramal do Ipiranguinha (Bairro Jorge Teixeira), localidades do bairro Puraquequara, do Bairro Santa Inês/Jorge Teixeira e bairro Zumbi dos Palmares II (Figura 6).

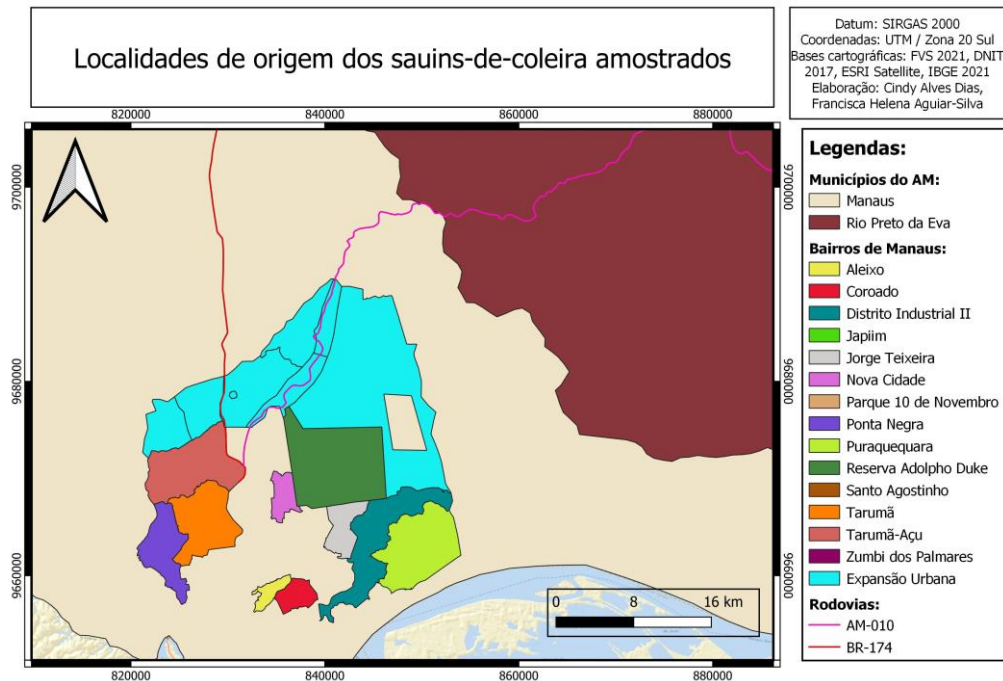


Figura 6. Localidades gerais de onde os sauins-de-coleira amostrados são oriundos. Confeção na plataforma Qgis (versões 3.16.16 e 3.22.8). Fonte: DATUM SIRGAS 2000, coordenadas UTM/Zonal 20 Sul.

Eles são encaminhados, quando vivos, para o Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS), na Superintendência do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama) na cidade de Manaus, e, quando mortos, ao laboratório do Projeto Sauim-de-Coleira, na UFAM. O armazenamento e processamento molecular das amostras coletadas nesses animais, bem como das filárias adultas, ocorreram no Instituto Leônidas e Maria Deane/FIOCRUZ-Amazônia (ILMD) e no Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), no Rio de Janeiro.

#### 5.4. Coleta de dados

##### 5.4.1. Necrópsia de *Saguinus bicolor*

As necrópsias foram realizadas em carcaças de *S. bicolor* armazenadas no laboratório do Projeto Sauim-de-Coleira, na UFAM. Elas são congeladas em freezer -20 °C, tendo seus dados catalogados quanto ao local onde foi achada, biometria, provável causa da morte, entre outros. As necrópsias também foram ocasionalmente

realizadas nas dependências do laboratório da Escola Superior Batista do Amazonas (ESBAM).

Primeiramente, foi realizada inspeção das cavidades abdominais e torácicas, bem como do tecido subcutâneo exposto através do rebatimento da pele de um dos membros superiores, a fim de se detectar a filária adulta. Quando localizadas, as filárias adultas foram coletadas e preservadas em solução tampão fosfato salina (PBS) ou em álcool 70%. Adicionalmente, quando havia sangue presente na cavidade abdominal ou torácica, foi realizado coleta deste material em tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Esses tubos foram transportados em caixa térmica com gelo reutilizável. Foram então armazenados em geladeira 4°C no ILMD, para a confecção de lâminas em busca de microfilária e para o diagnóstico molecular.

#### 5.4.2. Amostras biológicas de animais vivos

As coletas de sangue foram feitas em *S. bicolor* encaminhados ao CETAS, onde essas amostras foram colocadas em tubo EDTA e transportadas para armazenamento no ILMD. Tais amostras foram utilizadas para pesquisa de microfilária em esfregaços sanguíneos por meio de visualização em microscópio óptico, bem como para o diagnóstico molecular.

#### 5.5. Análise morfológica

Essa etapa foi realizada com auxílio do pesquisador Dr. David Marcial Fernandez Conga, parceiro da Universidade Federal Rural do Pará (UFRA), junto ao Laboratório de Patologia Animal. Primeiramente, a filária é colocada sobre uma placa de petri e submetida à inspeção utilizando lupa estereoscópica. Foi necessário lavá-la de momentos em momentos com lactofenol durante a inspeção. Caso o espécime esteja preservado, ele é montado em lâmina de microscópio e visualizado no mesmo (objetivas de 40x10 e 100x10). As chaves taxonômicas utilizadas para a identificação são descritas por Nortanicola *et al.*, 2008.

### 5.5.1. Confeção de lâminas e contagem de microfilárias

Para esta etapa, foi utilizado o método de esfregação sanguíneo, coloração em Panótico Rápido® e visualização em microscópio óptico (objetivas de 40X10 e 100X10).

## 5.6. Análise molecular

### 5.6.1. Extração de DNA

A fim de se extrair o DNA das filárias adultas localizadas nas necrópsias e de fazer detecção das microfilárias no sangue coletado, foi utilizado kit QIAGEN *DNeasy Blood and Tissue*, seguindo o protocolo do fabricante.

### 5.6.2. Nested PCR

Nessa etapa, a *nested PCR* é realizada para a amplificação do DNA de filárias adultas e para a detecção de microfilárias nas amostras de sangue (TANG *et al.*, 2010), usando o alvo ITS-1 (Tabela 1). São utilizados 5 µl de DNA para a preparação do mix da 1ª reação de 10 µl de Buffer, 4 µl de MgCl<sub>2</sub>, 1 µl de DNTPs, 0,2 µl de cada primer, 0,1 µl de GoTaq® DNA Polymerase e 29,5 µl de água pura. Para o mix da 2ª reação, utilizam-se 2 µl do produto da primeira reação, de 10 µl de Buffer, 4 µl de MgCl<sub>2</sub>, 1 µl de DNTPs, 0,1 µl de cada primer, 0,1 µl de GoTaq® DNA Polymerase e 32,6 µl de água pura. As condições de termociclagem foram: para a 1ª reação, 1 reação de 94°C por 7 minutos (420 segundos), 40 reações de 94°C por 20 segundos, 1 reação de 60°C por 20 segundos, 1 reação de 72°C por 30 segundos; para a 2ª reação é aplicado: 35 reações de 94°C por 20 segundos, 1 reação de 50°C por 20 segundos, 1 reação de 72°C por 20 segundos e 1 reação de 72°C por 10 minutos (600 segundos).

Tabela 1. Primers utilizados para a detecção de filárias em *S. bicolor* usando o alvo ITS-1.

Primers aplicados para detecção e identificação de filárias em <i>Saguinus bicolor</i>		
Alvo	Primers	Tamanho do fragmento
ITS-1: Espaçador Interno de Sequência Transcrita 1	JM-F-0021 Tan:GTGCTGTAACCATTACCGAAAGG JM-U-0022 Tan:CGCAGCTAGCTGCGTTCTTCATCG ITS1-F Tan: GGTGAACCTGCGGAAGGATC ITS-FBIS Tan: GGTGAACCTGCRGMWGGATCA JM-F-0022-R Tan: TGCTTATTAAGTCTACTTAA	1° Reação: ~ 710pb 2° Reação: ~ 305-312pb

### 5.6.3. Eletroforese em gel de agarose

Os resultados do item 5.4.4.2 foram submetidos à técnica de eletroforese em gel de agarose, utilizando tampão Tris-acetato-EDTA, 3 µl de brometo de etídio, 3 µ de ladder de 100 pares de base e voltagem de 100V por 1 hora na cuba de eletroforese, a fim de se ler o resultado das *Nested* PCRs.

### 5.6.4. Sequenciamento de Sanger e *Next Generation Sequencing*

Os sequenciamentos foram realizados no IOC/Fiocruz, através do Laboratório de Genética Molecular de Microorganismos, junto aos pesquisadores Dra. Ana Carolina Paulo Vicente e Dr. Carlos Henrique Aguiar Costa, e também junto ao Laboratório de Ecologia de Doenças Transmissíveis da Amazônia (EDTA), com o Dr. James Lee Crainey.

Primeiramente, as amostras positivas no *Nested PCR* foram purificadas com *QIAquick PCR Purification Kit* (protocolo do fabricante).

Foram realizados sequenciamentos de Sanger com os produtos de PCR gerados das amostras de sangue e DNA de filárias adultas que testaram positivo para o alvo ITS-1. Para os métodos de *Next Generation Sequencing*, foi usado o produto de extração de DNA de uma das filárias adultas encontradas no animal 967, num estudo

paralelo a este, da mesma equipe de pesquisadores, por Costa *et al.* (submetido à publicação).

Os cromatogramas resultantes dos sequenciamentos de Sanger foram então lidos nos programas *Chromas Lite* e *Chromas*, a fim de se destacar um fragmento da sequência. Esse fragmento é então submetido ao bando de dados *Genbank*, através da ferramenta *BLASTn* (configurações: *standard database*, *Onchocercidae taxid*, *somewhat similar sequences*), para comparação com sequências disponíveis, a fim de se identificar espécie, gênero ou família. Foram consideradas apenas sequências  $\geq 98\%$  de identificação no Genbank.

## 5.7. Análise de paisagem da prevalência de filárias em *Saguinus bicolor*

### 5.7.1 Georreferenciamento e construção do buffer dos animais amostrados

Para o georreferenciamento da localização dos animais estudados no estudo, foram utilizadas as as coordenadas geográficas do *S. bicolor* amostrados, com a ajuda dos dados coletados pelo Laboratório Sauim-de-coleira e pelo CETAS, em forma de fichas. Quando esse dado não estava diretamente disponível nas fichas dos animais, foi utilizado a descrição do local onde o *S. bicolor* foi encontrado para transformar em coordenada geográfica. Isso foi feito com ajuda dos programas *Google Earth™* e *Google Maps™*.

Essas coordenadas foram organizadas em tabelas no Excel em formato csv e inseridas no programa QuantumGis (versões 3.16.16 e 3.22.8), utilizando a propriedade de “dados de texto delimitado” na aba de Camadas. Elas puderam, então, tornar-se uma camada vetorial que pode ser projetada em mapas, no Datum SIRGAS 2000, usando coordenadas UTM, zona 20 Sul (EPSG:31980).

Adicionalmente, os dados referentes ao diagnóstico por filária – positivos e negativo, e a identificação da filária – foram organizados em forma quantitativa nessa mesma tabela. Dessa forma, os animais puderam ser visualizados no mapa também quanto ao seu estado infeccioso.

A partir do georreferenciamento dessas localizações, foi utilizado a ferramenta de “buffer” dentro da aba de Vetor e de Geoprocessamento, no Qgis, a fim de se traçar os buffers necessários para a análise. Os parâmetros estabelecidos foram a camada vetorial das amostras como “camada de entrada”, distância estabelecida de 500 metros e de 1000 metros, bem como formato redondo para ambos.

### 5.7.2. As variáveis para análise de paisagem

As variáveis utilizadas para a análise de paisagem foram de ordem demográfica, meteorológicas e geográficas (Tabela 2).

Variável	Unidade	Categoria	Fonte
População humana (por bairro)	Nº de pessoas/bairro	Demográfica	SEDECTI-AM/IBGE
Temperatura média anual	°C	Meteorológica	EST/UEA e INMET
Temperatura média mensal	°C	Meteorológica	EST/UEA e INMET
Precipitação média anual	mm/hora	Meteorológica	EST/UEA e INMET
Precipitação média mensal	mm/hora	Meteorológica	EST/UEA e INMET
Umidade relativa anual	%	Meteorológica	EST/UEA e INMET
Umidade relativa mensal	%	Meteorológica	EST/UEA e INMET
Presença de corpos d'água (por buffer)	Sim/não	Geográfica	Projeto Mapbiomas
Área total do corpo hídrico (por buffer)	ha	Geográfica	Projeto Mapbiomas
Densidade de corpos hídricos (por buffer)	%	Geográfica	Projeto Mapbiomas
Presença de corpos hídricos intermitentes (por buffer)	Sim/não	Geográfica	Projeto Mapbiomas
Comprimento total de estradas (por buffer)	Km	Geográfica	ESRI
Proporção de estradas (por buffer)	Km <sup>2</sup>	Geográfica	ESRI
Área Urbana total (por buffer)	ha	Geográfica	Projeto Mapbiomas
Proporção de área urbana (por buffer)	%	Geográfica	Projeto Mapbiomas
Área florestal total (por buffer)	ha	Geográfica	Projeto Mapbiomas
Proporção florestal (por buffer)	%	Geográfica	Projeto Mapbiomas
Matriz da paisagem (por buffer)	Florestal, Urbana, corpos	Geográfica	Projeto Mapbiomas

IVDN (por buffer)	d'água e outra formação	Geográfica	Earth Explorer
	Pixels		

Tabela 2. Variáveis utilizadas para a construção de MLG.

### 5.7.3. Variáveis demográficas e meteorológicas

Para construir as tabelas das variáveis de ordem demográfica, foram obtidas do site da Secretaria de Desenvolvimento, Ciência, Tecnologia e Inovação (SEDECTI) e do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE); nestes sites, há o censo demográfico realizado em 2010 e, no SEDECTI, especificamente, há estimativas de população por bairro organizados por essa secretaria, para os anos de 2015, 2017 e 2021.

As de ordem meteorológicas foram obtidas através de solicitação junto ao Laboratório de Instrumentação Meteorológica/Universidade Estadual do Amazonas (EST/UEA) e da série histórica de dados disponibilizado pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). Neste caso, foram utilizados os dados referentes aos anos e meses da localização do animal pelo Projeto Sauim-de-coleira ou o recebimento do animal no CETAS, para medições anuais e mensais. Portanto, foram utilizados dados das seguintes datas: 05/2005; 07/2007; 05 e 07/2008; 04 e 11/2010; 05, 07 e 11/2011; 07/2012; 03 e 07/2013; 10 e 12/2014; 03, 07, 08, 09 e 11/2015; 01, 03, 06 e 07/2016; 12/2017; 01, 02, 05, 06, 09, 10 e 11/2018; 01, 02, 04, 08 e 10/2019; 04, 05, 07 e 09/2020; 04 e 11/2021. Foi calculado a média da temperatura para cada ano e mês citado anteriormente utilizando o programa Excel.

### 5.7.4. Variáveis geográficas

Quanto às variáveis geográficas, foi necessário a confecção de mapas no Qgis. Tendo como fonte os *toolkits* de “Uso e Cobertura da Terra” (coleção 6) e do “Mapbiomas – Água” (coleção 1), desenvolvidos pelo Projeto Mapbiomas Alerta, foi possível obter a versão *raster* da série histórica dos mapas do mesmo nome (anos correspondentes aos citados no item 5.4.6.2.1). Esses mapas em *raster* foram então



inseridos no Qgis um a um e, utilizando o comando de “poligonizar”, eles se tornam uma versão vetorial deles mesmos, com diversas feições, onde cada uma corresponde à um tipo de uso e cobertura da Terra mapeado pelo projeto Mapbiomas.

A partir das versões vetoriais, pode-se destacar a feição de interesse para exportar numa nova camada vetorizada (projetada em SIRGAS 2000/ Zona UTM 20 Sul). Para o presente trabalho, foram escolhidas as feições DN1 – Floresta, DN24 – Área Urbana e DN1 – Corpos d’água, seguindo a legenda dos códigos das classes das duas coleções. A partir dessa camada exportada, pôde-se fazer o recorte dela dentro do buffer de 500m e de 1000m de cada animal georreferenciado, utilizando a ferramenta de “recorte”. Dessa forma, foi possível delimitar a área de cobertura florestal, urbana e de corpo d’água dentro de cada buffer, e conseguir os dados sobre essas variáveis em valor numérico (m<sup>2</sup> e ha) na tabela de atributos gerada dentro da camada recortada.

Para a medição de estradas dentro dos buffers, foi utilizado como base o *ESRI Satellite*, disponível no *plugin QuickMapServices*, e o *plugin* do projeto *OSM Downloader*, para o recorte e download de dados. A partir dessa ferramenta, foi destacado toda a área de estudo – onde se podia visualizar *S. bicolor* amostrados pelo presente trabalho projetados na imagem de satélite *ESRI*, no DATUM previamente citado – e transformar essa área destacada em um arquivo .osm. Com isso, esse arquivo pôde ser inserido no Qgis, na opção de “Gerenciador de fonte de dados” no botão de Camadas, escolhendo as feições da mesma. A partir desse arquivo, foi possível escolher a feição que representavam as ruas da área destacada, e exportá-la em um arquivo do tipo *shapefile*. e na projeção correta, para fazer o recorte dentro dos buffers. As variáveis correspondentes às estradas foram as únicas que não seguiram a série histórica dos animais do projeto.

As variáveis sobre o Índice de Vegetação por Diferença Normalizada (IVDN) foram calculadas utilizando imagens infravermelha e vermelha de Landsat 5, 7 e 8, baixadas em *raster* do projeto *Earth Explorer*, do USGS, correspondentes aos anos da série histórica dos *S. bicolor*, listada no item 5.4.6.2.1. Foi necessário fazer reprojeção para o DATUM e coordenadas utilizadas. Então, foi aplicada a fórmula para o cálculo de IVDN, na calculadora raster:

$$\underline{(NIR-R)}$$

### (NIR+R)

Onde NIR corresponde ao valor numérico da imagem infravermelha (feição B5 na imagem) e o R corresponde ao valor do espectro vermelho visível (feição B4). A camada gerada corresponde ao resultado, onde se pôde classificar uma paleta cores nas suas propriedades, selecionando “estilo”, para a visualização em imagem do resultado. Com isto preparado para todos os anos de interesse, foi utilizado a ferramenta “estatística zonais”, inserido essas camadas *raster* e a camada vetorial dos buffers dos animais. Dessa forma, o programa pôde distribuir os cálculos do IVDN correspondente a cada buffer, na tabela de atributos da camada dos buffers. A medição do índice é feita observando os valores da quantidade de pixels daquela paisagem, onde valores de 0 ou próximos à 0 indicam coberturas de plantas pouco ativas em termos de fotossíntese (ou seja, plantas “adoecidas”), e valores de 1 ou próximos indicam fotossíntese ativa (ou plantas muito saudáveis e vigorosas).

Para o cálculo da proporção das variáveis geográficas, em porcentagem, foi necessário dividir cada uma de suas áreas encontradas dentro do buffer pela área total de ambos os buffers (500m correspondendo à 785.000 m<sup>2</sup> e 78,5 ha; 1000m correspondendo à 3.140.000m<sup>2</sup> e 314 ha) e então multiplicar o resultado por 100. Isto foi feito com o programa Excel.

A matriz da paisagem foi considerada em 4 variáveis-respostas: “florestal”, “urbana”, “corpo d’água” e “outra formação”. “Florestal” se a cobertura de floresta dentro dos buffers for a de maior porcentagem; “urbana” se a área urbana for a de maior porcentagem; “corpo d’água” se a área com água for a de maior porcentagem; “outra formação” quando a cobertura de qualquer outro tipo de paisagem for a de maior porcentagem.

Para a presença de corpos d’água, foi considerado a visualização dos mesmos através dos mapas vetorizados e os anos correspondentes, dentro de ambos os buffers, como “sim” e a ausência anual como “não”. Para os corpos d’água intermitentes, foi considerado “sim” caso fosse observada a variação de sua presença numa faixa de 3 anos e “não” para a total ausência de água ou para a exclusiva presença corpos d’água permanentes.

Por fim, com os dados todos devidamente calculados, eles foram todos organizados em planilha Excel, com os mesmos títulos apresentados no item 5.7.2.

#### 5.8. Análise de dados

A análise descritiva foi feita no programa Excel, com a obtenção de porcentagem dos resultados das amostras, bem como média, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo de todas as variáveis.

Para fazer a modelagem estatística, os dados dos animais como ID, resultados da *Nested PCR* para sangue na cavidade e os dados correspondentes as variáveis foram todos organizados em planilha csv., do programa Excel, e inseridos no programa R (versão 4. 1. 3.). Os dados foram primeiramente submetidos a análise exploratória através do Teste da Soma dos Postos e Teste da Soma Exata dos Postos de Wilcoxon, Teste Exato de Fisher e Teste do Qui-quadrado. As variáveis que apresentaram valor-p menor que 5% e não apresentaram multicolinearidade foram consideradas adequadas para a construção do modelo.

Os modelos lineares generalizados (MLG) foram corridos no programa R para explorar a associação entre as variáveis demográficas, meteorológicas e geográficas e a prevalência das filárias (positivo e negativo). Aplicou-se o Critério de Informação de Aikake (AIC, em inglês) a fim de escolher o modelo mais parcimonioso. Também foi calculado a razão de chances e o intervalo de confiança para as variáveis dentro desses critérios. Por fim, foram feitos gráficos para a visualização do resultado do MLG no próprio programa R.

## 6. Resultados

### 6.1. Detecção e identificação de filárias

Um total de 62 necrópsias foram realizadas, nas quais foi possível retirar amostras de sangue da cavidade peritoneal de 46 das carcaças de *S. bicolor*. Quanto aos animais vivos, foi possível coletar amostras de sangue de 10 *S. bicolor*. Portanto, há um total de 71 animais amostrados como um todo (pois um dos animais teve sua amostra biológica coletada duas vezes: quando estava vivo e na sua necrópsia) e um total de 56 amostras de sangue. A quantidade de amostras é menor que a de animais amostrados pois, em algumas carcaças, não se foi possível recolher amostra de sangue devido ao estado avançado de decomposição e ressecamento.

Na necrópsia, 4/62 (6,45%) das carcaças tiveram presença de filária adulta na cavidade abdominal, sendo que um dos animais (ID: 967) apresentava infecção por 20 filárias tanto na cavidade torácica e outro (ID:1013), por 2 filárias na cavidade torácica. Nenhuma filária foi encontrada na região do subcutâneo. Das 56 amostras de sangue, foi-se feito esfregaço em 47 amostras, uma vez que a quantidade tirada dos animais foi pouca em vários deles e, neste caso, priorizou-se a investigação molecular. Dessas 47 lâminas, 3 foram positivas para a presença de microfilárias em esfregaços de sangue (6,38%).

Com exceção das 2 filárias adultas localizadas no animal 1013 e de 8 das filárias encontradas no animal 967, que estavam muito deterioradas para serem identificadas na dissecação, todas as outras filárias encontradas neste trabalho foram identificadas como *Dipetalonema* sp., utilizando as chaves morfológica de Notarnicola *et al.*, 2008 (Figura 7). Quanto às microfilárias visualizadas, 2 delas puderam ser identificadas como *Mansonella* sp., quanto aos corpos esbeltos, ausência de bainha ao redor do corpo e caldas nucleadas (Figura 8).

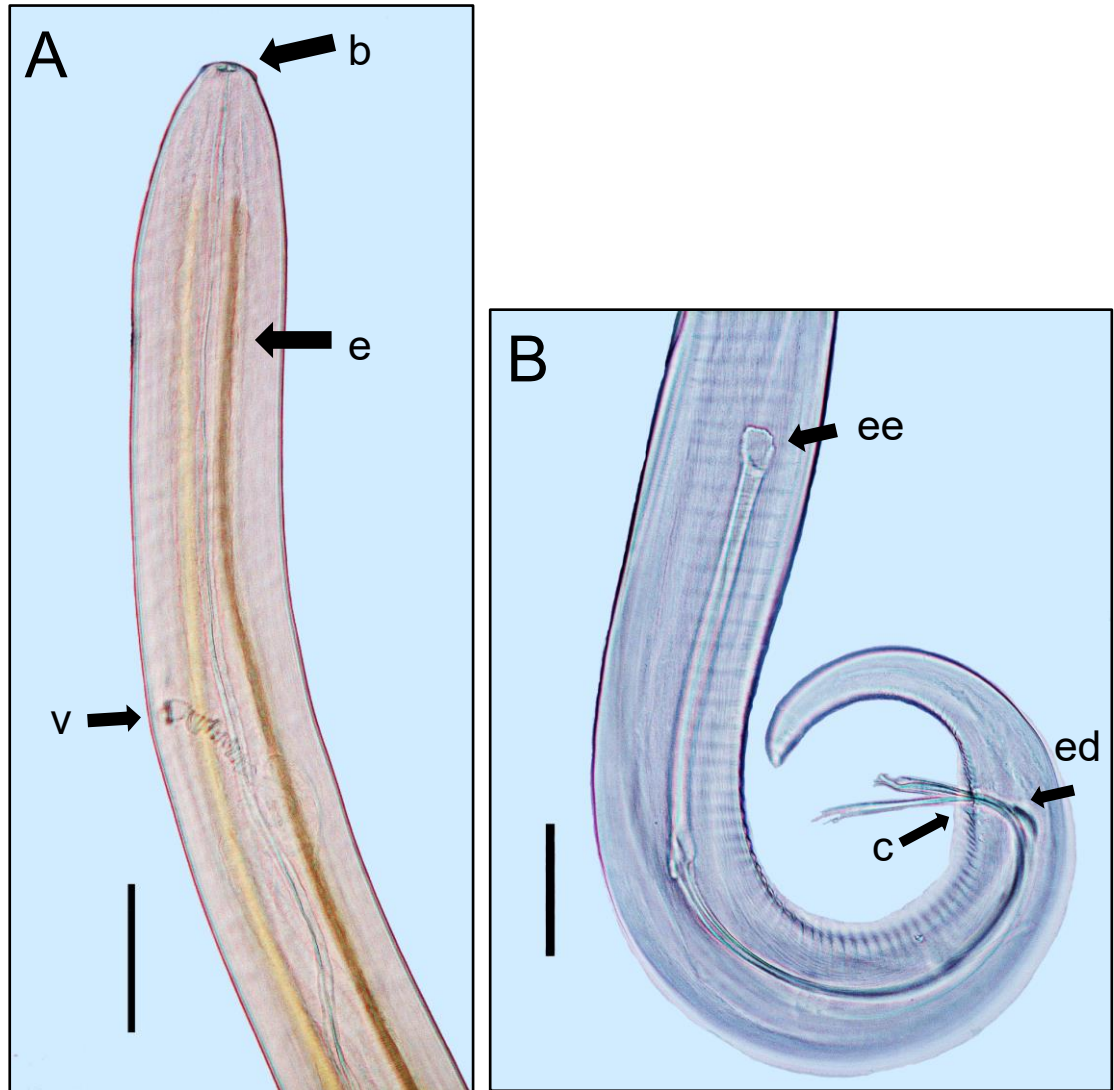


Figura 7. Morfologia de *Dipetalonema* sp. adulta. A: extremidade anterior da fêmea (b) abertura oral, (e) esôfago, (v) abertura vulvar e vagina em formato sinuoso. Barra: 20 µm. B: extremidade posterior do macho, mostrando órgãos reprodutores e área rugosa (ei) epiculo esquerdo, (ed) epiculo direito, (c) abertura cloacal e papilas cloacais. Barra: 20 µm.

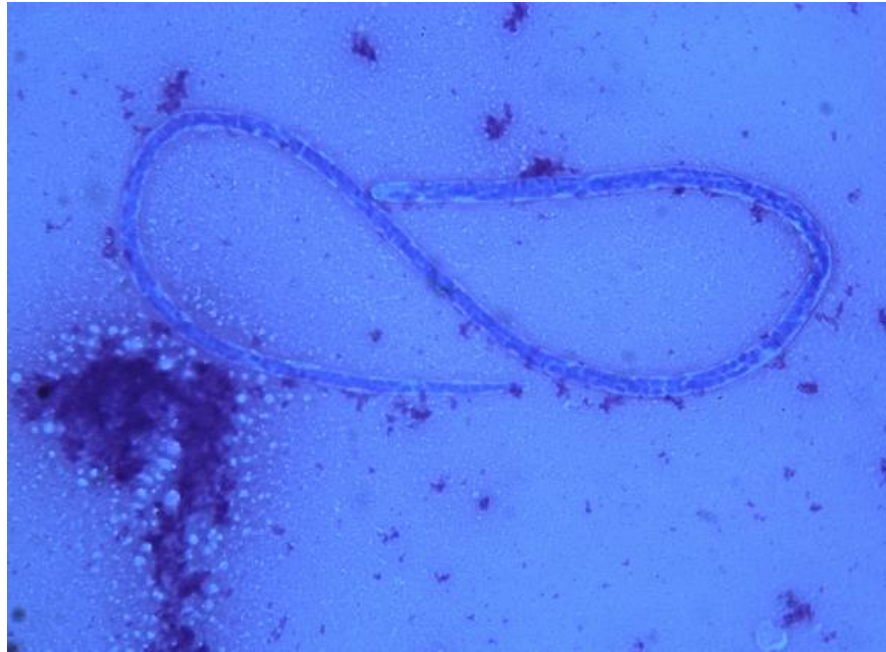


Figura 8. Microfilaria de sauim-de-coleira visualizada em microscópio óptico (objetiva de 40 X).

No que se refere às análises moleculares das amostras de sangue, das 56 amostras, 28,57% (16/56) foram positivas para a presença de DNA de filárias, e 71,42% (40/56) negativas.

Através de sequenciamento de Sanger e comparação com sequências do *Genbank*, constatou-se que cerca de 12 das 16 amostras de *S. bicolor* positivos apresentaram DNA de parasitos pertencentes à espécie *Mansonella mariae* (75%), apresentando  $\geq 98\%$  de identificação no banco de dados do *Genbank*, com a ferramenta *BLASTn*; 1 outro, como sendo *Dipetalonema gracile* (6,25%). 1 dos positivos foi possível identificar como sendo da Família Onchocercidae (6,25%), ou seja, a procura no *Genbank* produziu um retorno dentro desse táxon, porém nenhuma das sequências disponíveis teve identificação  $\geq 98\%$ . De 2 amostras (12,5%), não foi possível fazer nenhum tipo de identificação, pois a procura no *Genbank* não produziu nenhum retorno. Também, constatou-se coinfeção por *Dipetalonema* sp. adulta e microfilaremia de *Mansonella mariae* – resultado observado na análise molecular – em um dos casos.

No caso das filárias adultas, das 24 filárias, foi possível extrair e amplificar o DNA via *PCR* de 14 parasitos. Dessas, 1 foi identificada como *Dipetalonema* sp. através do *NGS*; 8 foram identificadas como sendo da família Onchocercidae no

Sequenciamento de Sanger e na comparação com o banco de dados *Genbank*, no mesmo processo de identificação que ocorreu com as amostras de sangue. As outras 5 filárias não puderam ser identificadas ao nível molecular.

Quanto à filária identificada com metodologia *NGS*, constatou-se que se trata de uma filária da espécie *Dipetalonema gracile* (COSTA, *et al.*, submetido à publicação).

Considerando todos os positivos, independentemente do método diagnóstico e das condições dos sinais vitais, a prevalência da infecção foi de 23, 94% (17/71) em *Saguinus bicolor* (tabela 3). A porcentagem de negativos tanto na necrópsia quanto na análise molecular foi de 51,61% (32/62) e a de animais que foram negativos apenas na necrópsia é de 24,19% (15/62). Entre todos os negativos na análise molecular, incluindo vivos e mortos, houve 56,33% (40/71).

Dos positivos, 70,58% (12/17) foram identificados com infecção por *Mansonella mariae*; 17, 64% (3/17) com *Dipetalonema* sp.; 11, 76 % (2/17) casos em que só se pôde identificar a filária a nível de família.

Para a amostragem entre animais vivos, 20% (2/10) dos animais apresentaram infecção por filária na análise molecular, com 80% negativos (8/10).

Tabela 3. Visualização geral dos dados dos animais positivos para filárias.

Identificação do <i>S. bicolor</i>	Sinais vitais	Amostra	Microscopia	Necrópsia	Deteção Molecular: ITS1	Deteção Molecular: NGS	Identificação geral	Local
848	Morto	Sangue	-	-	+	Não se aplica	Negativo	Coroado
972	Morto	Sangue	-	-	+	Não se aplica	<i>Mansonella mariae</i>	Coroado
967	Morto	Sangue/ filária	-	+	+	+	<i>Dipetalonema</i> sp./Família Onchocercidae	Tarumã
957	Morto	Sangue/ filária	-	+	+	Não se aplica	<i>Mansonella mariae</i> / <i>Dipetalonema</i> sp.	Puraquequara/ Distrito II
958	Morto	Sangue	-	-	+	Não se aplica	<i>Mansonella mariae</i>	Rodovia AM010
939	Morto	Sangue	-	-	+	Não se aplica	<i>Mansonella mariae</i>	Coroado
900B	Morto	Sangue	-	-	+	Não se aplica	<i>Mansonella mariae</i>	Coroado
812	Morto	Sangue	-	-	+	Não se aplica	<i>Mansonella mariae</i>	Coroado
105	Morto	Sangue	-	-	+	Não se aplica	<i>Mansonella mariae</i>	Coroado
914	Morto	Sangue	-	-	+	Não se aplica	<i>Mansonella mariae</i>	Coroado
922	Morto	Sangue	-	-	+	Não se aplica	<i>Mansonella mariae</i>	s/i
Saium 0	Morto	Sangue	+	-	+	Não se aplica	<i>Mansonella mariae</i>	Coroado
999	Morto	Sangue	Amostra insuficiente	-	+	Não se aplica	<i>Mansonella mariae</i>	Rodovia AM010
410/2019	Vivo	Sangue	+	Não se aplica	+	Não se aplica	<i>Mansonella mariae</i>	Tarumã
TR-02/22	Vivo	Sangue	+	Não se aplica	+	Não se aplica	Negativo	Tarumã-açu
947	Morto	Sangue/ filária	Amostra insuficiente	+	+	Não se aplica	<i>Dipetalonema</i> sp.	BR-174
1013	Morto	Filária	Sem amostra	+	+	Não se aplica	Família Onchocercidae	Ponta Negra



## 6.2. Análise de paisagem da prevalência de filárias

Dos 71 animais amostrados neste trabalho, foi possível fazer a localização e georreferenciamento de 50 deles (Figura 9, Figura 10; tabela 4). 16/71 não foram localizados com precisão, podendo apenas fazer uma leve estimativa ao nível de bairro ou de rodovia (Figura 6; tabela 4) e 5/71 não tiveram nenhum tipo de localização.

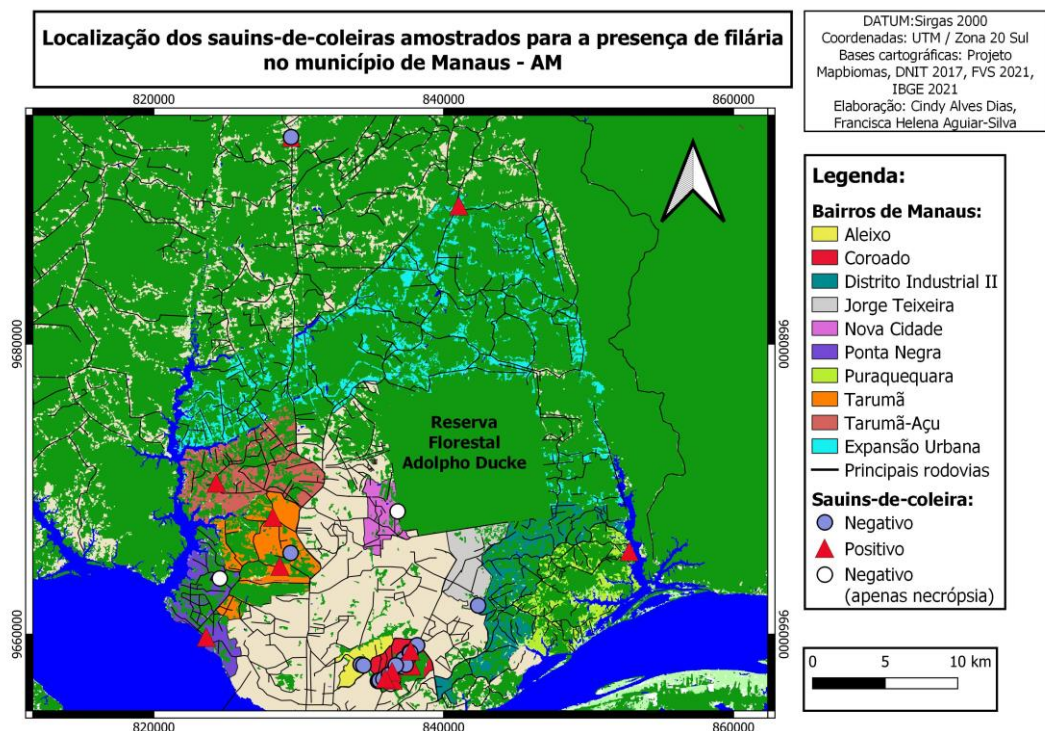


Figura 9. Localizações dos saúns-de-coleira amostrados. Confeção na plataforma Qgis (versões 3.16.16 e 3.22.8), DATUM Sirgas 2000, coordenadas UTM/Zonal 20 Sul.

Dos 12 animais positivos para *Mansonella marie*, 7 se localizam no fragmento da UFAM: 6 na área considerada da universidade, e 1 no Conjunto Acariquara, que compartilha do mesmo fragmento florestal (Figura 10, Figura 12); 1 em área que abrange os bairros Puraquequara e Distrito Industrial II, no ramal chamado “Estrada do Brasileirinho”; 2 na Rodovia AM-010; 1 no bairro Tarumã, na Avenida do Turismo e 1 não teve a localização encontrada (Figura 11; Tabela 4).

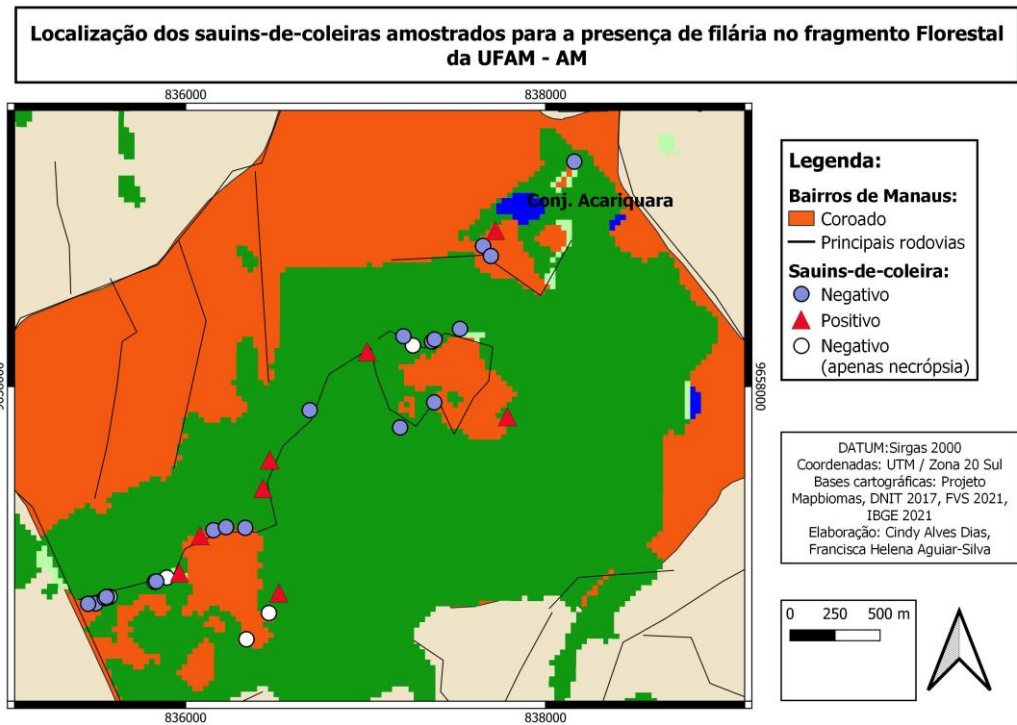


Figura 10. Mapa das localizações dos *Saguinus bicolor* amostrados do fragmento florestal da UFAM. Confeccionado na plataforma Qgis (versões 3.16.16 e 3.22.8), DATUM Sirgas 2000, Coordenadas UTM/Zonal 20 Sul.

Dos 3 *Saguinus bicolor* com infecção por *Dipetalonema* sp., 1 foi encontrado na rodovia 174 (animal 947); 1 outro foi encontrado no ramal “Estrada do Brasileirinho (animal 957) e 1 foi encontrado no Bairro Tarumã, Av. Santos Dummont, em frente ao Aeroporto Internacional Eduardo Gomes (animal 967) (Figura 11).

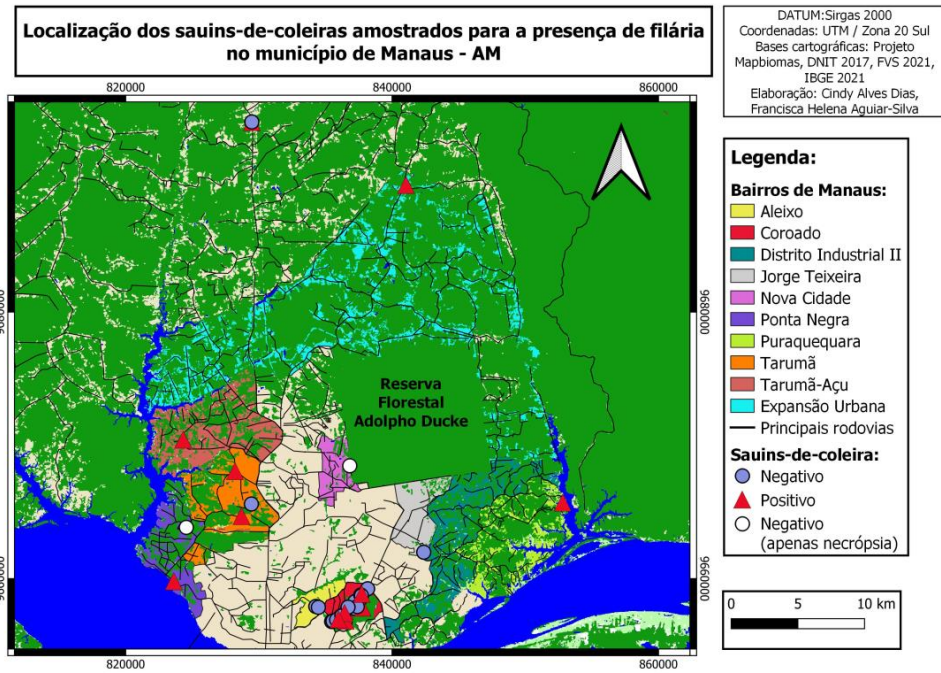


Figura 11. Localizações dos *Saguinus bicolor* cujo parasito filarial foi identificado. Confeccionado na plataforma Qgis (versões 3.16.16 e 3.22.8), DATUM Sirgas 2000, Coordenadas UTM/Zonal 20 Sul.

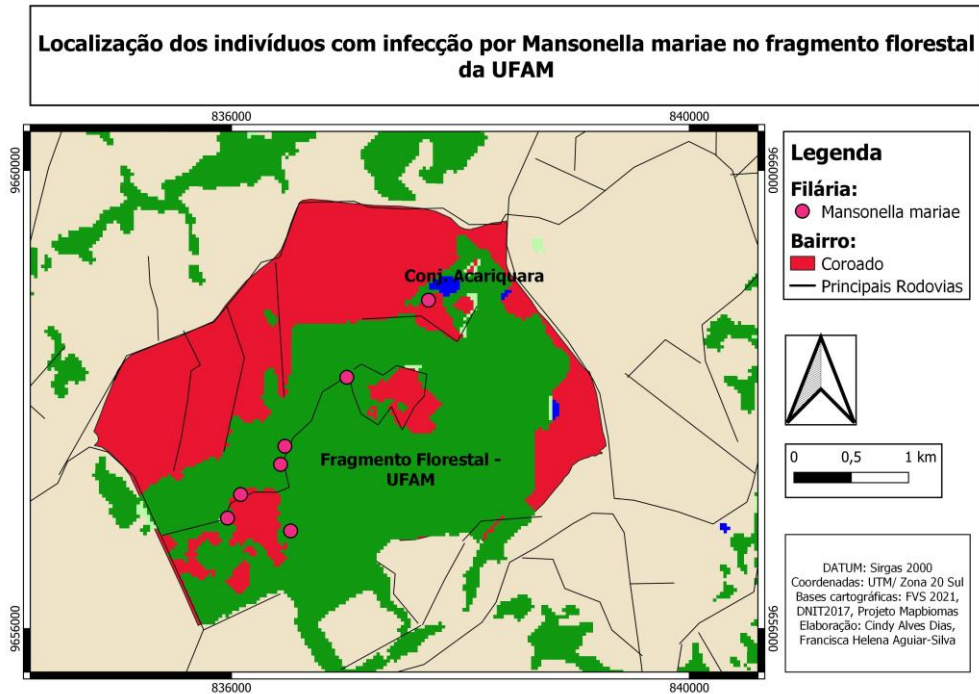


Figura 12. Mapa das localizações dos *Saguinus bicolor* cuja filária foi identificada, no fragmento florestal da UFAM. Confeccionado na plataforma Qgis (versões 3.16.16 e 3.22.8), DATUM Sirgas 2000, Coordenadas UTM/Zonal 20 Sul.

Como um todo, para os positivos: 47% (8/17) deles se encontram no bairro do Coroadó, especificamente no fragmento florestal da UFAM; 12% (2/17) no bairro Tarumã; 12% (2/17) na rodovia AM-010; 5,8% (1/17) no bairro Tarumã-açu; 5,8% (1/17) na rodovia BR-174; 5,8% (1/17) na junção dos bairros Distrito Industrial II/Puraquequara; 5,8% (1/17) no bairro Ponta Negra e 5,8% (1/17) sem localização encontrada (Tabela 4).

Para os negativos “seguros”: 56,46% (22/39) estão no bairro do Coroadó; nos bairros Aleixo, Tarumã e Jorge Teixeira há 5,12% (2/39) em cada um; 2,56% (1/39) em Rio Preto da Eva, na BR-174 – fora da região urbanizada de Manaus –, na AM-010, em alguma localidade da Av. das Torres (Manaus), nos bairros Zumbi dos Palmares II, Parque 10 de Novembro, Santo Agostinho e Nova Cidade, também em cada um dos locais; 7,7% (3/39) sem local identificado (Tabela 4).

Tabela 4. Visualização geral da localidade dos *S. bicolor*, número de positivos e número de negativos em cada local.

<b>Bairro/Localidade:</b>	<b>Nº de <i>S. bicolor</i></b>	<b>Positivos</b>	<b>Negativos</b>	<b>Negativos (apenas necrópsia)</b>
Rio Preto da Eva	1	0	1	0
Coroado	40	8	22	10
Av. das Torres	1	0	1	0
Zumbi dos Palmares II	1	0	1	0
Aleixo	2	0	2	0
Japiim	1	0	0	1
BR – 174	2	1	1	0
Tarumã	4	2	2	0
Tarumã-Açu	1	1	0	0
Parque 10 de Novembro	1	0	1	0
Distrito Industrial I	1	1	0	0
AM-010	3	2	1	0
Jorge Teixeira	2	0	2	0
Santo Agostinho	1	0	1	0
Nova Cidade	2	0	1	1
Cidade Nova	1	0	0	1
Ponta Negra	2	1	0	1
Não identificados	5	1	3	1
<b>Total</b>	<b>71</b>	<b>17</b>	<b>39</b>	<b>15</b>

A análise exploratória dos dados das variáveis foi realizada levando em conta a quantidade de animais que foram negativos apenas na necrópsia. Adicionalmente, o animal do ano de 2022 não foi incluído pois ainda não possui medições das variáveis citadas referentes a esse ano. Portanto, para esta etapa, foram considerados 49 animais: 15 positivos, 25 negativos e 9 negativos da necrópsia (Tabela 5).

Variável	Positivo: 15			Negativos: 25			Sem alíquota: 9		
	Média	±DP	(Min. - Max.)	Média	±DP	(Min. - Max.)	Média	±DP	(Min. - Max.)
População humana	36351,33	23089,64	3103-60709	54595,68	21602,65	10419-133441	51276,89	19290,69	5919-68030
Densidade demográfica	3005,55	2657,03	0,99-5882,65	5103,92	1700,59	0,99-8750,39	4923,79	1970,87	26,52-27,57
Temperatura média anual	27,62	0,30	27,15-28,24	27,7532	0,360	27,2-28,24	27,58	0,142	27,15-28,41
Temperatura média mensal	28,33	1,13	26,62-30,32	27,56	1,309	26,4-31,17	26,93	0,32	26,52-27,57
Precipitação média anual	0,12	0,13	0,03-0,36	0,065	0,078	0,03-0,33	0,153	0,149	0,042-0,36
Precipitação média mensal	0,06	0,05	0-0,19	0,062	0,084	0,002-0,45	0,181	0,169	0,041-0,44
Umidade relativa anual	78,42	2,62	75,65-81,55	74,98	1,337	73,25-78,31	77,70	4,17	73,3-81,55
Umidade relativa mensal	71,47	6,97	60,47-80	75,06	7,122	51,8-82,68	79,32	3,51	74,05-83,94
Área total do corpo hídrico – 500m	2,93	6,69	0-20,26	0,403	0,657	0-2,41	0,158	0,267	0-0,8
Densidade de corpos hídricos – 500m	3,71	8,53	0-25,80	0,52	0,83	0-3	0,196	0,334	0-0,22
Área total do corpo hídrico – 1000m	13,60	33,11	0,09-98,3	1,10	1,21	0-3,6	0,747	0,946	0-2,6
Densidade de corpos hídricos – 1000m	4,32	10,54	0,03-31,30	0,34	0,38	0-1,14	0,24	0,297	0-0,8
Comprimento total de estradas – 500m	6,71	4,52	0,94-17	9,63	3,51	2,31-25,47	9,631	1,729	7,7-12,71
Proporção de estradas – 500m	8,54	5,75	1,19-21,65	12,26	4,47	2,31-25,47	12,26	2,20	9,8-16,19

Comprimento total de estradas – 1000m	27,36	15,81	3,18-47,85	41,02	15,88	6,37-72,50	40,42	10,87	28,63-56,04
Proporção de estradas –1000m	8,71	5,03	1,21-15,23	13,04	5,06	2,02-23,08	12,82	3,397	9,11-17,6
Área Urbana total – 500m	18,44	19,43	0-54	25,36	18,12	0-67,09	22,27	10,55	11,39-41,25
Proporção de área urbana – 500m	23,48	24,72	0-68,58	32,34	23,05	0-85,46	28,37	13,44	14,5-52,54
Área Urbana total – 1000m	89,14	75,19	0-230,16	135,58	74,91	0-285,78	109,44	38,44	13,18-178,44
Proporção de área urbana –1000m	28,38	23,94	0-73,29	43,17	23,85	0-91,01	34,84	12,24	4,19-56,82
Área florestal total –buffer 500	43,89	21,71	2,76-71,08	45,35	17,29	9,91-71,55	48,56	8,89	35,84-62,22
Proporção florestal –500m	55,93	27,59	4-91	57,94	22,01	12,73-91	61,88	11,16	46-79
Área florestal total – 1000m	172,95	70,53	45,98-270,74	157,15	70,76	20,85-274,9	171,29	39,53	114,1-221,02
Proporção florestal –1000	55,11	22,39	14,60-86	50,04	22,60	7-88	54,44	12,66	36-70
IVDN – 500m	0,29	0,07	0,13-0,38	0,282	0,066	0,102-0,359	0,302	0,024	0,262-0,339
IVDN – 1000m	0,28	0,06	0,18-0,38	0,26	0,05	0,126-0,353	0,278	0,031	0,223-0,316

Tabela 5. Análise exploratória dos dados das variáveis.

Pôde-se calcular estatisticamente a quantidade de animais que tinham em seus buffers a presença de água como um todo, bem como a presença de água descontinuamente (tabela 6, tabela 7).

Tabela 6. Descrição do resultado da presença de corpos d'água intermitentes para sauins-de-coleira positivos, negativos e negativos apenas na necrópsia, no buffer de 500 metros.

<b>Presença de corpos d'água – 500m</b>	<b>Positivos: 15</b>		<b>Negativos: 25</b>		<b>Apenas necrópsia: 9</b>	
Sim	11	73,3%	17	68%	6	66,7%
Não	4	26,7%	8	32%	3	33,3%
<b>Presença de corpos d'água intermitentes – 500m</b>						
Sim	10	66,7%	16	64%	7	77,7%
Não	5	33,3%	9	36%	2	22,3%
<b>Total: 49</b>						

Tabela 7. Descrição do resultado para a presença de corpos d'água e corpos d'água intermitentes para sauins-de-coleira positivos, negativos e negativos apenas na necrópsia, no buffer de 1000 metros.

<b>Presença de corpos d'água – 1000m</b>	<b>Positivos: 15</b>		<b>Negativos: 25</b>		<b>Apenas necrópsia: 9</b>	
Sim	15	100%	22	88%	8	88,9%
Não	0	0	3	12%	1	11,1%
<b>Presença de corpos d'água intermitentes – 1000m</b>						
Sim	15	100%	23	92%	8	88,9%
Não	0	0	2	8%	1	11,1%
<b>Total: 49</b>						



Finalmente, a partir dos dados envolvendo proporção de corpos d'água, de área urbana, florestal e outra formação, pôde-se visualizar e calcular a matriz da paisagem dos *Saguinus bicolor*, dentro de ambos os buffers (tabela 8, tabela 9).

Tabela 8. Descrição do resultado para o tipo de matriz da paisagem encontrada para *S. bicolor* positivos, negativos e negativos apenas na necrópsia, no buffer de 500 metros.

<b>Matriz da Paisagem – 500m</b>	<b>Positivos: 15</b>		<b>Negativos: 25</b>		<b>Apenas necrópsia: 9</b>	
Florestal	9	60%	19	76%	7	88,9%
Urbana	4	26,7%	5	20%	2	11,1%
Corpo d'água	1	6,7%	0	0	0	0
Outra formação	1	6,6%	1	4%	0	0
<b>Total: 49</b>						

Tabela 9. Descrição do resultado para o tipo de matriz da paisagem encontrada para *S. bicolor* positivos, negativos e negativos apenas na necrópsia, no buffer de 1000 metros.

<b>Matriz da Paisagem – 1000m</b>	<b>Positivos: 15</b>		<b>Negativos: 25</b>		<b>Apenas necrópsia: 9</b>	
Florestal	10	66,67%	13	52%	7	88,9%
Urbana	4	26,66%	12	48%	2	11,1%
Corpo d'água	1	6,67%	0	0	0	0
Outra formação	0	0	0	0	0	0
<b>Total: 49</b>						

A modelagem da influência das variáveis em relação à prevalência das filárias foi realizada apenas com os animais que puderam ser georreferenciados e que foram submetidos à análise molecular do sangue, uma vez que esse método diagnóstico resultou na maior quantidade de positivos, bem como ofereceu negativos mais seguros, pois contaram também com a necrópsia. Portanto, o N final da análise das variáveis de paisagem contou com 25 animais negativos e 14 positivos (39).

Segundo os testes realizados, as variáveis que apresentaram valor-p < 5% foram densidade demográfica, temperatura média mensal, umidade relativa mensal, área urbana total no buffer de 500m, proporção de área urbana para o buffer de 500m, comprimento total de estradas no buffer de 500m, proporção de estradas no buffer de

500m, comprimento total de estradas no buffer de 1000m, proporção de estradas para o buffer de 1000m (tabela 10). Foram, portanto, consideradas para o desenvolvimento dos MLG.

Tabela 10. Tabela das análises exploratórias das variáveis. Testes: a análise exploratória através do Teste da Soma dos Postos e Teste da Soma Exata dos Postos de Wilcoxon, Teste Exato de Fisher e Teste do Qui-quadrado.

Variável	Análise Molecular – alvo ITS1		Valor-p
	0, N = 25	1, N = 14	
População humana	58,641 (51,354, 60,709)	51,354 (16,106, 56,819)	0.035
Densidade demográfica	5,682 (4,976, 5,883)	4,976 (278, 5,506)	0.030
Temperatura média anual	27.60 (27.51, 28.21)	27.60 (27.52, 27.60)	0.9
Temperatura média mensal	27.25 (26.62, 27.89)	28.44 (27.80, 29.07)	0.010
Precipitação média anual	0.04 (0.04, 0.05)	0.04 (0.04, 0.05)	0.5
Precipitação média mensal	0.04 (0.03, 0.07)	0.04 (0.02, 0.06)	0.6
Umidade relativa anual			0.5
Umidade relativa mensal	78.0 (72.7, 80.6)	69.7 (65.9, 77.7)	0.035
Presença de corpos d'água – 500m	17 (68%)	10 (71%)	>0.9
Área total de corpos d'água – 500m	0.09 (0.00, 0.45)	0.27 (0.02, 0.80)	0.5
Densidade de corpos d'água – 500m	0.11 (0.00, 0.60)	0.33 (0.03, 1.00)	0.6
Presença de corpos d'água – 1000m	22 (88%)	14 (100%)	0.5
Área total de corpos d'água – 1000m	0.35 (0.10, 2.14)	0.75 (0.20, 2.04)	0.5
Densidade de corpos d'água – 1000m	0.10 (0.03, 0.68)	0.24 (0.07, 0.65)	0.5
Corpos d'água intermitentes – 500m	16 (64%)	9 (64%)	>0.9
Corpos d'água intermitentes – 1000m	25 (100%)	14 (100%)	
Área urbana total – 500m	21 (16, 29)	13 (1, 18)	0.045
Proporção de área urbana – 500m	27 (20, 36)	16 (1, 23)	0.042

Área urbana total – 1000m	134 (87, 177)	82 (7, 124)	0.055
Proporção de área urbana – 1000m	43 (28, 56)	26 (2, 39)	0.055
Comprimento total de estradas – 500m	9.8 (8.0, 10.4)	7.2 (2.2, 8.7)	0.022
Proporção de estradas – 500m	12.4 (10.2, 13.2)	9.1 (2.7, 11.1)	0.022
Comprimento total de estradas – 1000m	37 (32, 56)	33 (9, 39)	0.038
Proporção de estradas – 1000m	11.7 (10.2, 17.7)	10.5 (2.9, 12.4)	0.038
Área florestal total – 500m	48 (40, 57)	53 (31, 58)	0.8
Proporção florestal – 500m	61 (52, 73)	68 (39, 74)	0.8
Área florestal total – 1000m	159 (115, 213)	194 (143, 228)	0.3
Proporção florestal – 1000m	51 (36, 68)	62 (46, 72)	0.3
Matriz da paisagem – 500m			0.6
Matriz da paisagem – 1000m			0.087
IVDN – 500m	0.31 (0.24, 0.33)	0.32 (0.27, 0.35)	0.3
IVDN – 1000m	0.28 (0.22, 0.31)	0.29 (0.26, 0.33)	0.3

---

No entanto, os modelos produzidos com a maior parte dessas variáveis apresentaram grande multicolinearidade, segundo o coeficiente de correlação de Pearson. Para a visualização da multicolinearidade das variáveis, foi produzido um correlograma segundo seus coeficientes de correlação, onde se pode observar o grau de relação linear entre elas (Figura 13, Figura 14). Isto, relacionado ao N com uma baixa quantidade de animais e desvios padrões insatisfatórios, resultaram em modelos inseguros e não confiáveis no teste de AIC (Tabela 5).

O modelo mais parcimonioso foi o de densidade demográfica + temperatura média mensal (md1), apresentando AIC de 45,821 (Tabela 11, Tabela 12). Um outro modelo com um AIC considerado aceitável foi o de proporção florestal no buffer de 1000. No entanto, o valor-p e a correlação desta variável com outras, bem como a análise exploratória dos seus dados, não se revelaram satisfatórias, e esse modelo não foi considerado o ideal (Tabela 5, Tabela 10; Figura 13). Os demais modelos de baixa qualidade não foram colocados aqui pois todos apresentaram AIC > 50 (Tabela 10, Tabela 11).

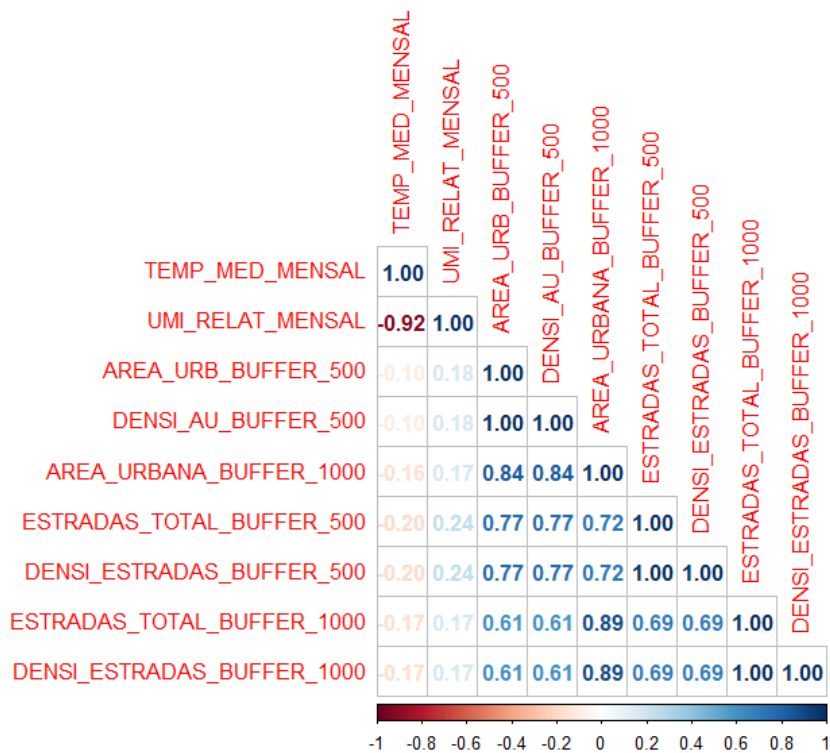


Figura 13. Correlograma das relações lineares das variáveis de interesse (valor-p <5%) em relação à multicolinearidade.

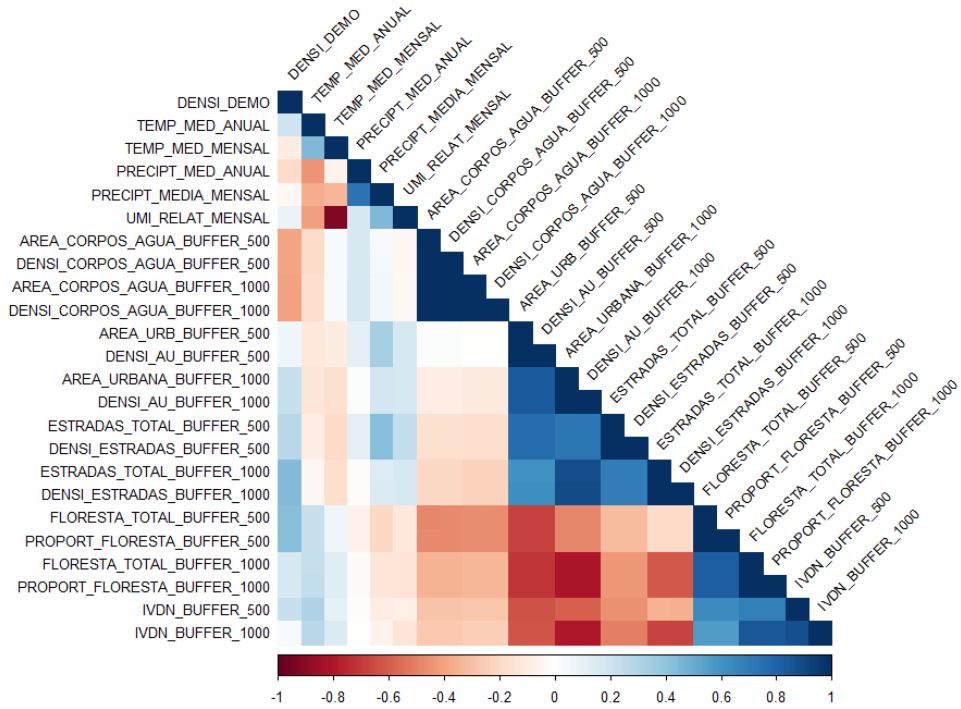


Figura 14. Correlograma geral do comportamento de todas as variáveis em relação à multicolinearidade.

Tabela 11. AIC dos modelos de regressão linear sobre a influência da variável em relação à prevalência de filárias em *Saguinus bicolor*.

	<b>Modelo</b>	<b>AIC</b>
md0	COD_ITS1SANGUE ~ DENS1_DEMO	48,342
<b>md1</b>	<b>COD_ITS1SANGUE ~ DENS1_DEMO + TEMP_MED_MENSAL</b>	<b>45,821</b>
md2	COD_ITS1SANGUE ~ DENS1_DEMO + TEMP_MED_MENSAL + PROPORT_FLORESTA_BUFFER_1000	45,794
md3	COD_ITS1SANGUE ~ IVDN_BUFFER_500	54,277
md4	COD_ITS1SANGUE ~ COD_MATRIZ_BUFFER_500	54,009

Tabela 12. Resultado da razão de chances e do intervalo de confiança para as variáveis escolhidas para o MLG.

Preditores	COD_ITS1SANGUE		valor-p
	Razão de chances	CI	
(Intercept)	0,0000	0,0000 – 0,7839	0,059
DENSI DEMO	0,9996	0,9992 – 0,9999	<b>0,026</b>
TEMP MED MENSAL	1,9775	1,0534 – 4,1781	<b>0,046</b>

O modelo de densidade demográfica + temperatura média mensal apresentou uma relação de positividade entre a probabilidade de animais positivos e maior temperatura média; e uma relação de negatividade entre a probabilidade de animais positivos e com maior taxa de densidade demográfica por bairro (Figura 15, Figura 16).

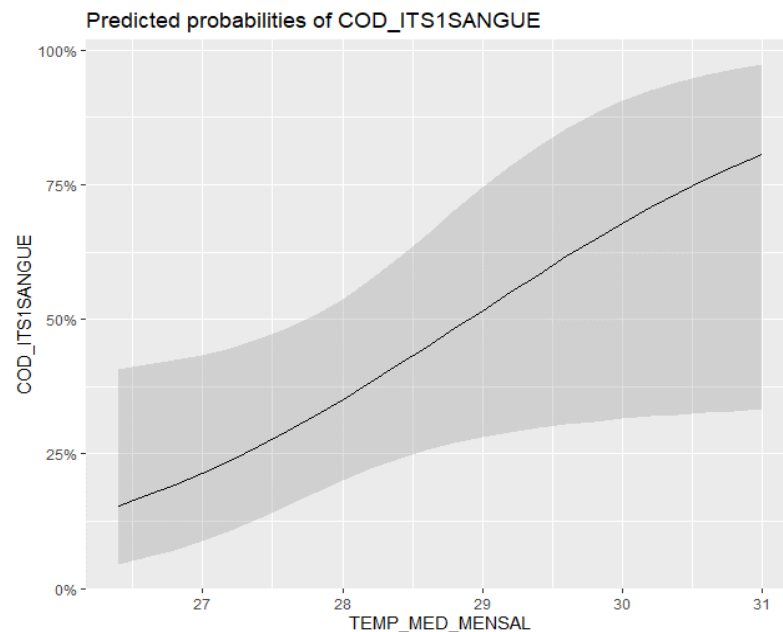


Figura 15. Gráfico MLG da influência da temperatura média mensal sobre a prevalência de filária em *Saguinus bicolor*.

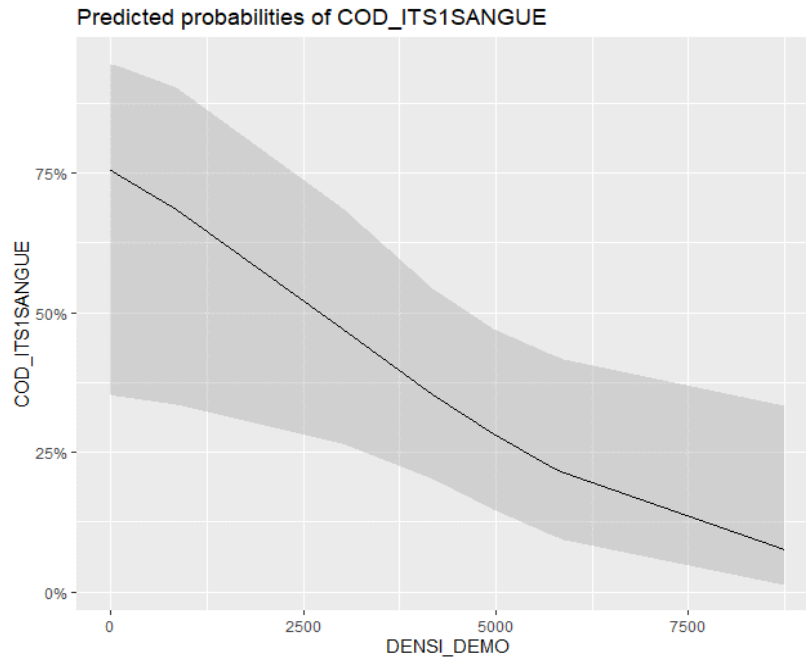


Figura 16. Gráfico MLG da influência da densidade demográfica sobre a prevalência de filária em *Saguinus bicolor*.

## 7. Discussão

Durante o período de estudo, foi possível detectar a presença de filárias em 23,94% (17/71) do total de *Saguinus bicolor* amostrados, bem como 56,33% (40/71) negativos na análise molecular. Foi identificada a presença de *Mansonella mariae* em 70,58% (12/17) desses positivos, e 17,64% (3/17) de *Dipetalonema* sp.; fazendo registro de coinfeção de *Dipetalonema* sp. adulta e microfilaremia de *Mansonella mariae*. Em 11,76% (2/17) dos positivos, indicou-se apenas presença de filária da família Onchocercidae. Apenas um dos animais teve a identificação de parasitemia tanto por adulto quanto por microfilária de *Dipetalonema* sp. O animal que apresentou status de infecção por filária adulta de *Dipetalonema* sp. e infecção por algum indivíduo da família Onchocercidae em sua amostra de sangue foi considerado inconclusivo para uma coinfeção.

Este trabalho, adicionalmente, é o primeiro relato de identificação de *Mansonella mariae* e *Dipetalonema* sp. em *Saguinus bicolor*, bem como de coinfeção por esses dois parasitos nesse primata.

A identificação de *Mansonella mariae* e *Dipetalonema* sp. neste primata condizem com os achados da literatura, que relatam a presença de *Mansonella mariae* e *Dipetalonema* spp. em *Saguinus imperator*, de região amazônica (Erkenswick *et al.*, 2017). Há também a ocorrência de *D. freitasi* e *D. gracile* em *Lagothrix poeppigii*, *Pithecia monachus monachus* e *Cacajao calvus ucayalii*, também em região amazônica (CONGA *et al.*, 2018; 2019). Também há descrição de co-infecção por *Mansonella* sp. em seres humanos, detectado em área periurbana de São Gabriel da Cachoeira, município amazonense (CRAINEY, *et al.*, 2020).

Ainda, dados sobre a transmissão de parasitos filariais em primatas não-humanos são escassos, porém, recentemente, ocorreu detecção molecular de *Mansonella mariae* em *Simulium oyapockense*. Esta detecção também foi feita em área periurbana de São Gabriel da Cachoeira, mostrando a possibilidade do risco zoonótico devido a presença do parasita em vetor antropofílico na Amazônia brasileira (SILVA, *et al.*, 2022).

Os resultados dos indivíduos que só puderam ser identificados a nível da família Onchocercidae – em 2 casos para amostras de sangue e para 8 das filárias



adultas encontradas – evidencia a necessidade de análises de maior robustez para uma adequada identificação. A utilização de uma maior quantidade de alvos, resultando numa maior quantidade das amplificações, podem gerar um trabalho filogenético mais detalhado.

Dos 17 positivos, 47% estão no fragmento florestal da UFAM, no bairro Colorado; 12% no bairro Tarumã; 5,8% no bairro vizinho Tarumã-açu; 12% na rodovia AM-010, em zona de expansão urbana de Manaus; 5,8% na rodovia BR-174, em área fora da região urbana e de expansão urbana de Manaus; 5,8% na junção dos bairros Distrito Industrial II e Puraquequara; 5,8% no bairro Ponta Negra e 5,8% sem localização encontrada.

Para estes positivos, no buffer de 500 metros, 73,3% tiveram a presença de corpos d'água em sua paisagem e 66,7% tiveram a presença de corpos d'água que não perduravam de um ano ao outro. No buffer de 1000m, todos os positivos tiveram ambas essas categorias de corpos d'água. Os negativos também apresentaram alta taxa de presença de água, tanto no geral como o intermitente.

Observou-se que a matriz florestal foi a dominante para 60% dos positivos, com a urbana sendo a segunda mais ocorrida, em 26,7% e com ocorrência de matriz caracterizada por corpo d'água em 6,7%. A paisagem foi similar para os negativos, com 76% de matriz florestal e 20% de matriz urbana, porém com ausência de matriz de corpo d'água. No buffer de 1000 metros, percebe-se esse padrão praticamente idêntico.

Não se percebeu grande diferenciação entre a matriz da paisagem dos animais positivos e negativos, nem em relação à presença de água. A grande semelhança entre os resultados pode ser consequência da área de abrangência da prevalência das filárias – isto é, a região periurbana e de expansão urbana de Manaus – que não demonstraram características muito diferenciadas umas das outras.

O mesmo ocorreu para o IVDN, não se observando diferenciação entre positivos e negativos, ou entre seus buffers. De forma geral, descreve-se um nível de fotossíntese baixo à moderadamente saudável, nas coberturas florestais estudadas e para ambos os resultados de infecção filarial.

As variáveis das análises de paisagem – tais como densidade demográfica, temperatura, precipitação e presença de corpos d'água – procuraram ser desenvolvidas levando em conta principalmente o contexto de ciclo de vida de vetores em geral, como sugere a literatura, e uma vez que eles são a peça-chave para a infecção por filárias (CANO *et al.*, 2014; CHESNAIS *et al.*, 2019; SAPADA, ANWAR E PRIADI *et al.*, 2015).

Entretanto, muitas variáveis se revelaram redundantes, como observado em seus coeficientes de correlação. Muitas estavam próximas ao -1 ou ao 1 (azul e vermelho), o que indica forte correlação negativa e positiva, respectivamente. Para complementar, a análise dos números demonstrou desvio padrões muito altos em uma amostragem de N muito pequeno, o que indica que essa amostragem pode não refletir uma população corretamente.

O N pequeno foi resultante do fato de que nem todo animal recebido no CETAS e no Projeto Sauim-de-coleira pôde ter sua localização apontada com precisão. Isso ocorre especialmente em casos de entrega do animal a instituições por terceiros, onde o indivíduo pode esconder a origem do animal que está entregando por temer alguma punição por parte dos órgãos competentes. Por vezes, em casos de apreensão ou resgate pela polícia ambiental, os agentes envolvidos não buscam essa informação.

Além disso, ele também foi diretamente influenciado pela pandemia do novo SARS-CoV-2 e seus efeitos devastadores. O cronograma de coletas coincidiu com momentos de fechamento de comércio e órgãos do governo e as problemáticas gerais dessa pandemia afetaram não só a execução desse cronograma, como também os participantes. Também por causa disso, optou-se por coleta de dados das variáveis exclusivamente junto a bancos de dados, ao invés de coleta em *in situ*.

Ademais, 10 animais não entraram nas análises de paisagem pois eram negativos apenas na necrópsia, não possuindo resposta na análise molecular, sendo considerados vieses, por não se ter certeza do seu estado de infecção.

Para o resultado do MLG demonstrando a probabilidade maior de positivos conforme a temperatura média mensal aumenta, isto condiz com análises similares encontradas na literatura; observa-se correlação entre temperaturas altas e estáveis com atividade dos vetores. Também se observa maior risco de transmissão em locais úmidos, com alta precipitação, associados a temperaturas mais altas (CANO *et al.*,

2014; CHESNAIS *et al.*, 2019; MANHENJE, GÁLAN-PUCHADES E FUENTES, 2013; SABESAN *et al.*, 2006; SAPADA, ANWAR E PRIADI *et al.*, 2015; SIMÓN *et al.*, 2014).

Enquanto para o resultado demonstrando uma relação de negatividade para uma maior densidade demográfica humana condiz com afirmações de parte da literatura, onde não se observou correlação de densidade populacional com maior chance de infecção por filariose, porém também se pode observar o contrário. A hipótese principal seria que, quanto maior a densidade demográfica, maior pressão antrópica e abundância de áreas para os vetores prosperarem, aumentando assim o índice de infecção entre os primatas – também expostos a degradação ambiental – porém este modelo não a corroborou (CANO *et al.*, 2014; CHESNAIS *et al.*, 2019; SOLORIO, 2015).

Porém, isto coincide com o georreferenciamento organizado nesse trabalho, onde se observa a maior ocorrência dos positivos em áreas periurbanas de Manaus, com características de pouca densidade demográfica e com matriz florestal.

Mesmo no caso do fragmento da UFAM que, embora esteja situado num bairro manauara populoso e que reflete problemáticas de expansão urbana observada em toda o município, apresentou essas características para a prevalência lá georreferenciada, em ambos os buffers (ALVES, FREITAS e SANTOS, 2020). Isto se atribui ao grande tamanho desse fragmento.

Complementarmente, parece ocorrer um destaque em relação ao número de positivos para *Mansonella mariae*, e negativos em geral, no fragmento florestal da UFAM. Isto pode ser fruto de um viés na amostragem, uma vez que grande parte das carcaças dos animais utilizados nas necrópsias provinham dessa instituição; ocorre uma maior eficiência em encontrar e deslocar a carcaça do *Saguinus bicolor* para o laboratório do Projeto Sauim-de-Coleira, localizado dentro da própria UFAM, do que de outras partes do município.

O fragmento da UFAM possui uma fauna de mamíferos diversa, de acordo com o levantamento realizado (ver Anexo 4). Na literatura, já se foi identificado filárias da espécie *Dipetalonema gracile* em macacos do gênero *Pithecia*, que é outro gênero que ocorre no fragmento da UFAM (CONGA, 2018). Outra problemática envolvendo esse fragmento é a grande presença de cães e gatos ferais, que são dois animais que podem ser portadores de parasitos de filária, como a *Dirofilaria immitis*, que também

pode vir a acometer primatas, além de estarem envolvidos em contato através de ataques com o *Saguinus bicolor* (GORDO, 2012; CALDAS, 2016; SANTOS *et al.*, 2011).

Como um todo, ainda que não tenha sido possível determinar especificamente suas áreas de risco, uma vez que a amostra estudada foi pequena e todo o território representado aqui apresentou características extremamente semelhantes, Manaus pode ser considerada como uma área de interesse para o risco envolvendo infecções filariais, de acordo com os resultados alcançados. Observa-se a ocorrência de filárias em zona urbana, em situação favorável para eventos zoonóticos, considerando o contato entre humanos e o *Saguinus bicolor*, e a situação de pressão antrópica que este primata vive. Do mesmo modo, em termos de paisagem, Manaus carrega todos os atributos para que vetores de interesse prosperem: temperaturas altas que se mantém estáveis por meses, alta umidade, longos meses com precipitação e áreas de água parada.

Ademais, embora não haja na literatura relatos de eventos zoonóticos envolvendo as filárias identificadas neste estudo, é importante destacar que a família Onchocercidae abrange as espécies de filária de interesse para saúde pública, bem como o gênero *Mansonella* (MORALES-HOJAS, 2009; TANG, 2020).

A soma de todos esses aspectos levantados neste estudo indica a necessidade de continuidade nos esforços em identificar parasitos filariais na região de municípios amazônicos, bem como os vetores envolvidos, e de procurar compreender o ambiente e a geografia por trás do risco de infecção por esses agentes.

## 8. Referências Bibliográficas

ALHASSAN A.; LI Z.; POOLE C. B.; CARLOW C.K. **Expanding the MDx toolbox for filarial diagnosis and surveillance**. Trends in Parasitology, v. 31, e. 8, p. 391-400, 2015. Doi: 10.1016/j.pt.2015.04.006.

ALVES, A. C.; FREITAS, I. S.; SANTOS, M. Q. **Análise multitemporal da expansão urbana da cidade de Manaus, Amazonas, utilizando imagens de satélite**. Revista GeoSabereres, v.11, p. 305-317, Fortaleza, CE, 2020.

AMAZONAS (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. **Coordenadoria de Planejamento Ambiental. Estudo de impacto ambiental – EIA, Relatório de impacto ambiental – RIMA: Para revitalização do Igarapé do Mindu**. 86 p. Manaus, 2008.

AMAZONAS (Estado). Secretaria de Estado de Desenvolvimento Econômico, Ciência, Tecnologia e Inovação. **Densidade demográfica e população estimada por bairro de Manaus – AM**. Manaus, 2015.

AMAZONAS (Estado). Secretaria de Estado de Desenvolvimento Econômico, Ciência, Tecnologia e Inovação. **Mapa da área urbana da cidade de Manaus**. Manaus, 2017.

AMAZONAS (Estado). Secretaria de Estado de Desenvolvimento Econômico, Ciência, Tecnologia e Inovação. **População estimada por bairros de Manaus – AM**. Manaus, 2021.

BAIN, O., *et al.* **The nematoda Filarioidea: critical analysis linking molecular and traditional approaches**. Parasite, v.15, n. 3, p. 342-348, 2008. Doi: 10.1051/parasite/2008153342.

BAIN, O., *et al.* **Human intraocular filariasis caused by *Pelecitus* sp. nematode, Brazil**. Emerg Infect Dis. V.17, n. 5, p. 867-9, 2011. Doi: 10.3201/eid1705.101309.

BAIN, O., *et al.* **Review of the genus *Mansonella* Faust, 1929 sensu lato (Nematoda: Onchocercidae), with descriptions of a new subgenus and a new subspecies**. Zootaxa. 2015; 3918, 151–93.

BRASIL, MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Gabinete da ministra. **Portaria nº 444, de 17 de dezembro de 2014**.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de Vigilância Epidemiológica e Eliminação da Filariose Linfática**, Brasília, 2009.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças tropicais negligenciadas – Uma Agenda Inacabada**, Fiocruz, Rio de Janeiro, 2019.

BRILHANTE, A. F., *et al.* **First report of an Onchocercidae worm infecting *Psychodopygus carrerai carrerai* sandfly, a putative vector of *Leishmania braziliensis* in the Amazon**. In: Scientific Reports. V.10, n. 1, p. 15246-15255, 2020.

CALDAS, S. R. **Impactos ambientais sobre a floresta da UFAM** (dissertação de mestrado). Programa de Pós-Graduação em Geografia, UFAM, Manaus, AM, p. 177, 2016.

CALEGARI, L., *et al.* **Análise da dinâmica de fragmentos florestais no município de Carandaí, MG, para fins de restauração florestal**. Rev. Árvore, Viçosa, v.34, n.5, p.871-880, 2010. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-67622010000500012&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-67622010000500012&lng=en&nrm=iso)>. Access on 09 May 2021. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622010000500012>.

CANO, J., *et al.* **The global distribution and transmission limits of lymphatic filariasis: past and present**. Parasites & Vectors. V. 7, n. 466, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0466-x>.

CHABAUD, A. G. BAIN, O. **The evolutionary expansion of the Spirurida**. International Journal for Parasitology. V. 24, n.8, p. 1179-1201, 1994. ISSN 0020-7519. doi: 10.1016/0020-7519(94)90190-2.

CHESNAIS, C. B., *et al.* **Risk factors for lymphatic filariasis in two villages of the Democratic Republic of the Congo**. Parasites & Vectors. V. 12, n. 162, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3428-5>.

CONCEIÇÃO, P.A., *et al.* **New molecular identifiers for *Simulium limbatum* and *Simulium incrustatum* s.l. and the detection of genetic substructure with potential implications for onchocerciasis epidemiology in the Amazonia focus of Brazil**. Acta Trop. 2013 Aug;127(2):118-25. Doi: 10.1016/j.actatropica.2013.03.012. Epub 2013 Mar 30. PMID: 23545131.

CONGA, D. M. F. **Estudo de nematódeos filarídeos em primatas neotropicais na Bacia do Rio Yavari – Mirin, Amazônia peruana (Tese de doutorado)**. Programa de Pós-graduação em Biologia de Agentes Infeciosos e Parasitários (PPGBAIP), Instituto de Ciências Biológicas, UFPA, Pará , Belém, p., 2018.

CONGA, D. M. F., *et al.* **First report of filarial nematodes in free-living pitheciid primates**. *Systematic Parasitology*, V. 96, p. 257–264, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11230-019-09838-y>

COSTA, C. H. A., *et al.* ***Dipetalonema gracile* ribosomal, mitochondrial and Wolbachia sequences obtained from a wild pied tamarin (*Saguinus bicolor*) host (Manaus, Brazil)**. Submetido à publicação.

CRAINEY J. L., *et al.* **New tools and insights to assist with the molecular identification of *Simulium guianense* s.l., main *Onchocerca volvulus* vector within the highland areas of the Amazonia onchocerciasis focus**. *Acta Trop.* V. 131, p. 47-55, 2014. Doi: 10.1016/j.actatropica.2013.10.019.

CRAINEY, J. L., *et al.* ***Mansonella ozzardi* mitogenome and pseudogene characterisation provides new perspectives on filarial parasite systematics and CO-1 barcoding**. *Scientific Reports*, v. 8, n. 6158, p.1-11, 2018.

CRAINEY, J. L., *et al.* **Deep sequencing reveals occult Mansonellosis coinfections in residents from the Brazilian Amazon village of São Gabriel da Cachoeira**. *Clin Infect Dis*, V. 71, e.8, p.1990-1993, 2020. Doi: 10.1093/cid/ciaa082.

DUVALLET, G; BOIREAU, P. **Other vector-borne parasitic diseases: animal helminthiases, bovine besnoitiosis and malaria**. *Rev Sci Tech.* V.34, n.2, p.651-658, 2015.

ERKENSWICK G. A., *et al.* **Temporal and demographic blood parasite dynamics in two free-ranging neotropical primates**. *Int J Parasitol Parasites Wildl*, Vol. 6, ed. 2, p. 59-68, 2017. Doi: 10.1016/j.ijppaw.2017.03.004.

FONTES, G.; ROCHA, E. M. M. ***Onchocerca volvulus* e Outros Filarídeos Humanos**. In: NEVES, D. P. (Ed.). *Parasitologia humana*. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

- GREEN, W. R. **Human subconjunctival infection of *Macacananema Formosana*: The first case of human infection reported worldwide**. Arch ophthalmol. V. 120, p. 643-646, 2002.
- GOMES, A. W. M. **Parasitos helmintos intestinais em *Saguinus bicolor* (Spix, 1823) (Primates, Callitrichidae)** (Dissertação de mestrado). Programa de Pós-Graduação em Zoologia da UFAM/INPA, Manaus, AM, p.43, 2019.
- GONTIJO, J. C. F. **Uso de características dos fragmentos florestais urbanos da cidade de Manaus/AM (Dissertação de Mestrado)**. Programa de Pós Graduação em Ciência do Ambiente e Sustentabilidade na Amazônia – PPG-CASA/UFAM, Manaus ,AM, p. 99, 2008.
- GORDO, M., *et al.* **Contextualização do Sauim-de-Coleira**. In: ICMBIO. Plano de Ação Nacional para a Conservação do Sauim-de-Coleira – Séries Espécies Ameaçadas nº 29. Brasília, 2017.
- GORDO, M., *et al.* **The Challenges of Survival in a Concrete Jungle: Conservation of the Pied Tamarin (*Saguinus bicolor*) in the Urban Landscape of Manaus, Brazil**. Primates in Fragments (pp. 357-370): Springer, 2013.
- GORDO, M. **Ecologia e conservação do sauim-de-coleira, *Saguinus bicolor* (Primates; Callitrichidae)** (Tese de Doutorado). Museu paraense Emilio Goeldi/Universidade Federal do Pará, Pará, p. 143, 2012.
- GORDO, M., *et al.* **Pied Tamarin: *Saguinus bicolor* Spix, 1823**. In: MITTERMEIER, R., *et al.* (Ed). PRIMATES IN PERIL: The world's 25 most endangered primates, 2018.
- HUANG, Z. Y. X., *et al.* **The diversity–disease relationship: evidence for and criticisms of the dilution effect**. Parasitology. V. 143, p. 1075–1086, 2016. Doi: 10.1017/S0031182016000536.
- HUYNH T., THEAN J., MAINI R. ***Dipetalonema reconditum* in the human eye**. British Journal of Ophthalmology, V. 85, p. 1391-1392, 2001. Doi: 10.1136/bjo.85.11.1384i.
- IBGE. **Censo Brasileiro de 2020**. Rio de Janeiro: IBGE, 2020.



INFRAERO. **Programa de gerenciamento do risco da fauna do aeroporto internacional de manaus – Eduardo Gomes – SBEG**. INFRAERO Meio Ambiente, Manaus, AM, 2017.

INMET. **Dados Históricos Anuais**. Brasília: INMET, 2022.

LIMA, M. B. **O processo de gestão do Parque Municipal Nascentes do Mindú** (trabalho de conclusão de curso). Programa de pós-graduação em Gestão de Áreas Protegidas da Amazônia, INPA, Manaus, AM, p. 88, 2018.

LELES, L. F. **O. Avaliação da Diversidade Genética Populacional e Prevalência de Infecção por Wolbachia em *Mansonella ozzardi* no Estado do Amazonas, Brasil (Dissertação de Mestrado)**. Programa de e Pós-graduação em Biologia da interação patógeno hospedeiro, ILMD/FIOCRUZ, Manaus, Amazonas, p. 64, 2019.

LEFOULON E., *et al.* (2015) **Shaking the Tree: Multi-locus Sequence Typing Usurps Current Onchocercid (Filarial Nematode) Phylogeny**. PLoS Negl Trop Dis. V. 9, n. 11, e. 0004233. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004233>.

LOBO, J. R. **A paisagem e sua relação com as doenças infecciosas e parasitárias**. Disciplina de Seminários Aplicados, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Escola de Veterinária e Zootecnia da UFGO, 2013.

MANHENJE, I.; GALÁN-PUCHADES, M. T.; FUENTES, M. V. **Socio-environmental variables and transmission risk of lymphatic filariasis in central and northern Mozambique**. Geospatial Health. V. 7, n.2, p. 391-398, 2013. Doi: 10.4081/gh.2013.96.

MAIA DA SILVA, F., *et al.* **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 Trop, V. 107, e. 2, p. 168-73, 2008. Doi: 10.1016/j.actatropica.2008.05.015.

MARCON, J. L., *et al.* (Org). **Biodiversidade Amazônica: caracterização, ecologia e conservação**. Programa de Pós-graduação em diversidade biológica, UFAM, EDUA, Manaus, AM, 2012. 372 p.

MEDEIROS, J. F., *et. al.* **Epidemiological studies of *Mansonella ozzardi* (Nematoda, Onchocercidae) in indigenous communities of Pauini municipality, Amazonas, Brazil.** Acta Amazonica. V. 37, e.2, p. 241 – 246, 2007.

MEDEIROS, A. S. M. **Vertebrados atropelados na Amazônia: monitoramento em longo prazo, influência do fluxo de veículos e alternância de *hotspots* em um trecho da rodovia BR-174, Brasil** (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ecologia, INPA, Manaus, AM, p. 39, 2019.

MEDEIROS, J. F., *et. al.* **Sensitivity of diagnostic methods for *Mansonella ozzardi* microfilariae detection in the Brazilian Amazon Region.** Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. V. 113, e.3, p. 173-177, 2018. Doi: 10.1590/0074-02760170321.

MEDEIROS, J. F., *et. al.* **Epidemiological snapshot of the mansonelliasis infection in the Amazonian riverine communities in two contiguous municipalities of Solimões river, Amazonas State, Brazil.** Rev Pan-Amaz Saúde 2. V. 6, e. 2, p. 83-87, 2015. Doi: 10.5123/S2176-62232015000200011.

MEDEIROS, J. F., *et. al.* **A field trial of a PCR-based *Mansonella ozzardi* diagnosis assay detects high-levels of submicroscopic *M. ozzardi* infections in both venous blood samples and FTA® card dried blood spots.** Parasites & Vectors, v. 8, p. 280, 2015.

METZGER, J. P. **O que é ecologia de paisagens?** Biota Neotrop., Campinas, v.1, n.1-2, p.1-9, 2001. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1676-06032001000100006&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-06032001000100006&lng=en&nrm=iso)>. Access on 10 May 2021. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-06032001000100006>.

MOLYNEUX D.H., MITRE E., BOCKARIE M.J., KELLY-HOPE L.A. **Filaria zoogeography in Africa: ecology, competitive exclusion, and public health relevance.** Trends Parasitol, V. 30, e. 4, p. 163-169, 2014. Doi: 10.1016/j.pt.2014.02.002.

MONTEIRO NETO, B. D. **Área de uso e dinâmica de uso do espaço em grupos de *Saguinus bicolor* (primates: callitrichidae)** (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-graduação em Diversidade biológica, UFAM, Manaus, AM, p. 49, 2015.

MORALES-HOJAS, R. **Molecular systematics of filarial parasites, with an emphasis on groups of medical and veterinary importance, and its relevance for epidemiology.** Infect Genet Evol. V.9, n.5, p. 748-59, 2009. Doi: 10.1016/j.meegid.2009.06.007.

NAVA, A. F. D. **Espécies sentinelas para a Mata Atlântica: as conseqüências epidemiológicas da fragmentação florestal no Pontal do Paranapanema, São Paulo.** 2008. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008. doi:10.11606/T.10.2008.tde-16122008-162731. Acesso em: 2021-05-10.

NAVA, A. F. D., et al. **The Impact of Global Environmental Changes on Infectious Disease Emergence with a Focus on Risks for Brazil.** Institute for Laboratory Animal Research Journal. V. 58, n. 3, p. 393 – 400, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1093/ilar/ilx034>.

NIEHAUS C., et al. **Environmental factors associated With *Toxoplasma gondii* Exposure in Neotropical Primates of Costa Rica.** Front Vet Sci Vol. 7, e. 583032, 2020. doi: 10.3389/fvets.2020.583032.

NOTARNICOLA, J., et al. **Host Occurrence and Geographical Distribution of *Dipetalonema* spp. (Nematoda: Onchocercidae) in Neotropical Monkeys and the First Record of *Dipetalonema gracile* in Ecuador.** Comparative Parasitology, vol. 75, n.1, p. 61-68, 2008. Doi: 10.1654/4284.1

NUNES, R. V. **Caracterização molecular de isolados de *Leishmania infantum* em municípios do estado de Minas Gerais, Brasil (Dissertação de Mestrado).** Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, UFSJ – Campus Centro Oeste Dona Lindu, p. 64, 2016.

Parasitologia – Arquivo digital de slides. **Helmintos – filárias (com):** [http://www.coccidia.icb.usp.br/parasite\\_db/galerias\\_a.php?id\\_galeria=FI&nome\\_gal=Helmintos+-+Fil%C3%A1rias+%28com%29](http://www.coccidia.icb.usp.br/parasite_db/galerias_a.php?id_galeria=FI&nome_gal=Helmintos+-+Fil%C3%A1rias+%28com%29). Acessado em 14 de agosto de 2022.

PEREIRA, J. S. F. S. **Efeito do tratamento em massa com dietilcarbamazina na microfilaremia, antigenemia e anticorpos antifilariais em uma área endêmica do**

**município de Olinda - PE.** (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-graduação em Saúde Pública - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, p. 70, Recife, 2014.

Projeto MapBiomas Alerta. **Sistema de Validação e Refinamento de Alertas de Desmatamento com Imagens de Alta Resolução:** [https://mapbiomas.org/colecoes-mapbiomas-1?cama\\_set\\_language=pt-BR](https://mapbiomas.org/colecoes-mapbiomas-1?cama_set_language=pt-BR). Acessado em 27 de junho de 2022.

OLIVEIRA, M. L., *et al.* (Org). **Reserva Ducke: Biodiversidade amazônica através de uma grade.** Programa de Pesquisa em Biodiversidade, Reserva Florestal Adolpho Ducke, Attema Design Editorial, Manaus, AM, 2008. 166 p

OLIVEIRA, V. L. F. **Subsídios para o plano de uso público do Parque Estadual Sumaúma** (dissertação de mestrado). Programa de Pós-Graduação em Gestão de Áreas Protegidas da Amazônia, INPA, Manaus, AM, p. 89, 2012.

OMENA-JÚNIOR, R., *et al.* **Caracterização da fauna de vertebrados atropelada na rodovia br – 174, Amazonas, Brasil.** Rev. Colombiana cienc. Anim. V. 4, n.2, p. 291-307, 2012.

OTRANTO, D., *et al.* **Human ocular filariasis: further evidence on the zoonotic role of *Onchocerca lupi*.** Parasites & vectors. V. 5, n. 1, p.84-84, 2012. Doi: 10.1186/1756-3305-5-84.

RÖHE, F. **Área de contato entre as distribuições geográficas de *Saguinus midas* e *Saguinus bicolor* (Callitrichidae-Primates): a importância de interações e fatores ecológicos** (dissertação de mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais, INPA/UFAM, Manaus, AM, p. 71, 2006.

SABESAN, S., *et al.* **Delimitation of lymphatic filariasis transmission risk areas: a geo-environmental approach.** Filaria Journal. V. 5, n. 12, 2006. Doi: <https://doi.org/10.1186/1475-2883-5-12>.

SANTOS, L. S. **Interações entre população humana e sauí-de-coleira (*Saguinus bicolor*) no uso de recursos em quintais nos fragmentos florestais urbanos de Manaus** (dissertação de mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências do Ambiente Sustentabilidade na Amazônia, UFAM, Manaus, AM, p. 60, 2015.

SANTOS, L. A. C., *et al.* **Dirofilariose em pequenos animais – revisão de literatura.** Revista científica eletrônica de Medicina Veterinária. V. 9, n. 17, 2011.

SANTOS, L. S; PEREIRA, H. S; GORDO, M. **Simpatria entre populações humanas e de sauím-de-coleira (*Saguinus bicolor*) em fragmentos florestais de Manaus, Amazonas**. Neotropical Primates. V. 23, n. 2, p. 25 -30, 2017.

SAPADA, I. E; ANWAR, C.; PRIADI, S. D. P. **Environmental and Socioeconomics Factors Associated with Cases of Cinical Filariasis in Banyuasin District of South Sumatera, Indonesia**. International Journal of Collaborative Research on Internal Medicine & Public Health. V. 7, n. 6, p. 132 – 140, 2015.

SERAFINI, R. T. **Estrutura de fragmentos florestais urbanos de Manaus-AM: implicações para seu manejo e conservação** (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais, INPA/UFAM, Manaus, AM, p. 95, 2007.

SEVÁ, A. P., *et al.* Endoparasites in domestic animals surrounding an Atlantic Forest remnant, in São Paulo State, Brazil. Brazilian Journal of Veterinary Parasitology. V. 27, n. 1, p. 12 – 18, 2018. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612017078>.

SILVA, I. M. P. **Desafios de gestão do Parque Municipal do Mindu (Manaus-AM)** (Dissertação de Mestrado). Programa de Profissional em Processos Construtivos e Saneamento Urbano, ITEC/UFPA, Belém, PA, p. 69, 2014.

SILVA, T. R. R., *et al.* **Molecular detection of *Mansonella mariae* incriminates *Simulium oyapockense* as a potentially important bridge vector for Amazon-region zoonoses**. Infection, Genetics and Evolution. V. 8, p. 1 – 3, 105200, 2022. Doi.: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105200>.

SIMÓN, L. *et al.* **Geo-environmental model for the prediction of potential transmission risk of *Dirofilaria* in an area with dry climate and extensive irrigated crops. The case of Spain**. Veterinary Parasitology. V. 200, p. 257 – 264, 2014. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.12.027>.

SITOE, H. M. **Avaliação do impacto da Administração Massiva de Medicamentos contra a filariase linfática, em Murrupula, Província de Nampula** (Dissertação de Mestrado). Programa de pós-graduação em ciências de saúde, IOC-FIOCRUZ, Maputo, MOZ, p. 55, 2017.

SOBROZA, TV. **Ecologia Comportamental de *Saguinus midas* e *Saguinus bicolor* (Primates: Callitrichidae) em áreas de contato entre distribuições geográficas**

(Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ecologia, INPA, Manaus, AM, p. 39, 2015.

SOLORIO, M R. **Levantamento de agentes infecciosos nas sub-populações de sauím-de-coleira (*Saguinus bicolor*) na cidade de Manaus, Estado de Amazonas** (tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental aplicada às Zoonoses, USP, São Paulo, p. 54, 2015.

SOUZA, W (Coord). **Doenças Negligenciadas**. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, p.56, 2010.

TAYLOR, M.J., *et al.* **Anti-Wolbachia drug discovery and development: safe macrofilaricides for onchocerciasis and lymphatic filariasis**. *Parasitology*, V. 141, e.1, p. 119-27, 2014. Doi: 10.1017/S0031182013001108.

TANG, T., *et al.* **Nested PCR to detect and distinguish the sympatric filarial species *Onchocerca volvulus*, *Mansonella ozzardi* and *Mansonella perstans* in the Amazon Region**. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.105, n. 6, p. 823-828, Sept. 2010. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02762010000600016&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762010000600016&lng=en&nrm=iso)>. Access on 09 May 2021. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762010000600016>.

TANG, T., *et al.* **Atypical *Mansonella ozzardi* Microfilariae from an Endemic Area of Brazilian Amazonia**. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. V. 95, n. 3, p. 629-632, 2016. doi:10.4269/ajtmh.15-0654

TANG, T. Et al. **Geographical Distribution and Species Identification of Human Filariasis and Onchocerciasis in Bioko Island, Equatorial Guinea**. *Acta Tropica*. V. 180, p. 12-17, 2018. DOI: 10.1016/j.actatropica.2017.12.030

TANG, T., *et al.* **Mansonellosis: current perspectives**. *Research and Reports in Tropical Medicine*. V. 9, p. 9-24, 2020. Doi: 10.2147/RRTM.S125750

VIDAL, M.D. **Influência de componentes da estrutura da floresta no uso do habitat, tamanho de grupos e densidade do sauím de Coleira (*Saguinus bicolor* – *Callitrichidae*) em floresta de terra firme na Amazônia Central**. Dissertação de Mestrado, INP A/UFAM, Manaus, AM, 2003.

VIDAL, M. D; GORDO, M; ROHE, F. ***Saguinus bicolor* (Spix, 1823)**. In: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. (Org.). Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume II - Mamíferos. Brasília: ICMBio. p. 244-248, 2018.

VIEIRA, V. M. A. **Potencial zoonótico por *Dirofilaria immitis* (LEIDY, 1856) Raillet & Henry, 1911 na baixada fluminense do Rio de Janeiro (Dissertação de Mestrado)**. Programa de Pós-graduação em Medicinal Tropical, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, p. 78, 2019.

YILMAZ E., *et al.* **The Mitochondrial Genomes of the Zoonotic Canine Filarial Parasites *Dirofilaria (Nochtiella) repens* and *Candidatus* *Dirofilaria (Nochtiella) hongkongensis* Provide Evidence for Presence of Cryptic Species**. PLoS Negl Trop Dis, V. 10, n. 10, e. 5028, p. 1-22, 2016. Doi: 10.1371/journal.pntd.0005028.

YILMAZ E., *et al.* **High genetic diversity in the *Dirofilaria repens* species complex revealed by mitochondrial genomes of feline microfilaria samples from Narathiwat, Thailand**. Transbound Emerg Dis, V. 66, ed. 1, p. 389-399, 2019. Doi: 10.1111/tbed.13033.

## 9. Anexos

### 9.1. Anexo 1

#### **Lista de Mamíferos avistados em 5 fragmentos da cidade de Manaus e uma rodovia do estado do Amazonas:**

##### A) Parque Estadual Sumaúma (Bairro Cidade Nova, Zona Norte, 53 ha)

Marsupialia: *Didelphis marsupialis* (mucura), *Marmosa murina* (mucurinha)

Xenarthra: *Bradypus tridactylus* (preguiça comum), *Choloepus didactylus* (preguiça-real), *Tamandua tetradactyla* (tamanduá), *Cyclopes didactylus* (tamanduáí).

Cingulata: *Dasybus novemcinctus* (tatu galinha, tatu-bola).

Primata: *Pithecia pithecia* (parauacu), *Saguinus bicolor* (sauim-de-coleira).

Rodentia: *Coendou melanurus* (ouriço), *Dasyprocta agouti* (cutia), *Agouti paca* (paca), roedor não especificado (rato-do-mato).

Carnivora: *Canis lupus familiares* (cão doméstico), *Felis silvestris catus* (gato doméstico).

##### B) Reserva Adolpho Ducke (Bairro Cidade de Deus, Zona Norte, 10.000 ha)

Xenarthra: *Bradypus tridactylus* (preguiça comum), *Choloepus didactylus* (preguiça-real), *Tamandua tetradactyla* (tamanduá), *Cyclopes didactylus* (tamanduáí), *Myrmecophaga tridactyla* (tamanduá bandeira).

Cingulata: *Priodontes maximus* (tatu-canastra), *Dasybus novemcinctus* (tatu galinha, tatu-bola), *Dasybus kappleri* (tatu-15-kg), *Cabassous unicinctus* (tatu-rabo-de-couro).

Artiodactyla: *Pecari tajacu* (caititu), *Tayassu pecari* (queixada), *Mazama* cf. *Gouazoubira* (veado catingueiro), *Mazama americana* (veado mateiro),



Primata: *Alouatta macconnelli* (guariba), *Ateles paniscus* (macaco-aranha), *Cebus apella* (macaco-prego), *Chiropotes sagulatus* (cuxiú), *Pithecia pithecia* (parauacu), *Saguinus bicolor* (sauim-de-coleira).

Rodentia: *Hydrochoerus hydrochaeris* (cavivara), *Cuniculus paca* (paca), *Dasyprocta* cf. *Leporina* (cutia), *Myoprocta acouchy* (cutiara), *Guerlinguetus aestuans* (esquilo), *Coendou prehensilis* (porco-espinho).

Lagomorpha: *Sylvilagus brasiliensis* (coelho tapiti).

Perissodactyla: *Tapirus terrestris* (anta).

Carnivora: *Nasua nasua* (quati), *Speothos venaticus* (cachorro-do-mato, cachorro-vinagre), *Cerdocyon thous* (raposa), *Procyon cancrivorus* (guaxinim), *Pteronura brasiliensis* (ariranha), *Galictis vittata* (furão), *Eira barbara* (irara), *Lontra longicaudis* (lontra), *Leopardus tigrinus* (gato-do-mato), *Leopardus pardalis* (jaguaritica), *Puma yagouaroundi* (jaguarundi), *Leopardus wiedii* (maracajá peludo), *Puma concolor* (onça parda), *Pantera onca* (onça pintada).

C) Parque Municipal Nascentes do Mindú (Bairro Cidade de Deus, Zona Norte)

Marsupialia: *Didelphis marsupialis* (mucura).

Xenarthra: *Bradypus tridactylus* (bicho-preguiça, preguiça comum, preguiça bentinho), *Choloepus didactylus* (preguiça-real).

Cingulata: *Dasybus novemcinctus* (tatu galinha, tatu-bola).

Primata: *Saguinus bicolor* (sauim-de-coleira), *Saimiri sciureus* (macaco-de-cheiro).

Rodentia: *Dasyprocta* sp. (*cutia*), *Cuniculus paca* (paca), *Sciurus spadiceus* (esquilo, quatipuru).

D) Parque Municipal do Mindú (Parque 10 de Novembro, Zona Centro-sul)

Marsupialia: *Didelphis marsupialis* (mucura).

Xenarthra: *Bradypus tridactylus* (bicho-preguiça, preguiça comum, preguiça bentinho), *Choloepus didactylus* (preguiça-real).

Cingulata: *Dasybus novemcinctus* (tatu galinha, tatu-bola).

Primata: *Saguinus bicolor* (sauim de coleira).

Rodentia: *Dasyprocta aguti* (cutia), *Cuniculus paca* (paca), *Sciurus spadiceus* (esquilo, quatipuru).

E) Aeroporto Eduardo Gomes (Bairro Tarumã, Zona Oeste)

Artiodactyla: *Mazama americana* (veado mateiro).

Marsupialia: *Didelphis marsupialis* (mucura), *Didelphis* sp.

Xenarthra: *Tamandua tetradactyla* (tamanduá-mirim), *Cyclopes didactylus* (tamanduáí), *Bradypus tridactylus* (bicho-preguiça), *Choloepus didactylus* (preguiça-real).

Cingulata: *Dasybus novemcinctus* (tatu galinha, tatu-bola).

Primata: *Alouatta* sp. (bugio), *Saguinus bicolor* (sauim-de-coleira).

Rodentia: *Dasyprocta* sp. (cutia), *Cuniculus paca* (paca), roedores não especificados.

Carnivora: *Canis lupus familiaris* (cachorro doméstico), *Felis silvestris catus* (gato-doméstico).

Chiropteras: animais não especificados.

F) UFAM (Bairro Coroado, Zona Leste)

Artiodactyla: elemento da família Cervidae não especificado.

Xenarthra: *Bradypus tridactylus* (preguiça comum), *Choloepus didactylus* (preguiça-real).

Cingulata: *Dasybus novemcinctus* (tatu galinha, tatu-bola), *Tolypeutes* sp. (tatu-bola).

Primata: *Saguinus bicolor* (sauim-de-coleira), *Pithecia pithecia* (parauacu).

Rodentia: *Dasyprocta* cf. *Leporina* (cutia), *Myoprocta acouchy* (cutiara), *Guerlinguetus aestuans* (esquilo), *Cuniculus* sp. (paca), *Coendou prehensilis* (ouriço-cacheiro).

Carnivora: *Potos flavus* (jupará), *Nasua* sp. (quati), *Canis lupus familiares* (cão doméstico), *Felis silvestris catus* (gato doméstico).

G) BR-174 (Rodovia interligando Mato Grosso, Rondônia, Amazonas e Roraima à Venezuela)

Marsupialia: *Caluromys philander* (cuíca), *Didelphis marsupialis* (mucura), *Didelphis* spp. e *Caluromys* spp (cucuíca).

Artiodactyla: *Pecari tajacu* (porco catitu), animais da subordem Suiforme não especificados, animais da família Cervidae não identificados.

Xernathra: *Myrmecophaga tridactyla* (tamanduá-bandeira), *Tamandua tetradactyla* (tamanduá mirim, tamanduá mambira), *Bradypus tridactylus* (preguiça-aí, preguiça comum, bicho-preguiça), *Bradypus variegatus* (preguiça-de-bentinho), *Cyclopes didactylus* (tamanduá), animais da família Dasypodidae, Bradypodidae e do gênero *Tamandua* não especificados.

Cingulata: *Priodontes maximus* (tatu-canastra), *Dasybus novemcinctus* (tatu galinha, tatu-bola).

Primata: *Ateles paniscus* (macaco-aranha), *Saimiri sciureus* (macaco-de-cheiro), *Alouatta macconnelli* (guariba), *Pithecia chrysocephala* (parauacu), *Saguinus midas* (sagui-da-mão-dourada, macaco sagui), *Cebus apella* (macaco-prego) e outros animais dessa ordem não especificados.

Rodentia: *Hydrochoerus hydrochaeris* (capivara), *Myoprocta acouchy* (cutiara), *Dasyprocta agouti* e *Dasyprocta* sp. (cutia), *Cuniculus paca* (paca), *Coendou paraguayensis*, *Coendou prehensilis* e *Coendou* sp. (porco-espinho).

Perissodactyla: *Tapirus terrestris* (anta).

Carnivora: *Pteronura brasiliensis* (ariranha), *Leopardus wiedii* (gato maracajá, maracajá peludo), *Procyon cancrivorus* (guaxinim), *Eira barbara* (irara), *Leopardus pardalis* (jaguaritica), *Panthera onca* (onça pintada), *Puma concolor* (onça vermelha), *Nasua nasua* (quati), *Speothos venaticus* (cachorro-do-mato, cachorro-vinagre), *Canis lupus familiaris* (cão doméstico), *Felis silvestris catus* (gato doméstico), animais da família dos canídeos e dos felídeos não especificados.

Chiroptera: animais não especificados.

## 9.2. Anexo 2

**Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais da UFAM (CEUA/UFAM).**

Poder Executivo  
Ministério da Educação  
Universidade Federal do Amazonas  
Comissão de Ética no Uso de Animais

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada “Aspectos Sanitários e Epidemiológicos dos animais silvestres recebidos pelos órgãos de fiscalização de Manaus e criação de um biobanco de amostras de animais silvestres”, sob a responsabilidade do pesquisador Doutor Marcelo Gordo (docente ICB/UFAM) – que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – e por encontrar-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), após análise pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS, foi aprovada *ad hoc* sob o N. 017/2020.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	De Abril/2020 à Maio/2022
Espécie/inhagem/raça	Primates não humanos / Mamíferos em geral
N. de animais	200
Peso/idade	40g a 15kg e 40g a 150kg, respectivamente / várias fases de vida
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	CETAS IBAMA Manaus e Projeto Sauim de Coleira
Atividade(s) a ser(em) realizada(s): captura, coleta de espécimes, marcação e/ou outras (neste caso, é necessário especificar).	Protocolo SISBIO: 67153-2. Utilização de armadilhas metálicas com disparo automático e uso de iscas.

Manaus, 16 de abril de 2020.

Profa. Dra. Cinthya Iamile Frithz Brandão de Oliveira  
Presidente do CEUA-UFAM

## 9.3. Anexo 3

## Licença SISBIO/ICMBio.



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

## Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 67153-3	Data da Emissão: 23/07/2020 11:53:21	Data da Revalidação*: 01/06/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

## Dados do titular

Nome: DIOGO CESAR LAGROTERIA OLIVEIRA FARIA	CPF: 280.086.908-95
Título do Projeto: Aspectos sanitários e epidemiológicos dos primatas amazônicos recebidos nos Centros de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) do estado do Amazonas, Brasil.	
Nome da Instituição: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade	CNPJ: 08.829.974/0001-94

## Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	02/2019	02/2021

## Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Alessandra Ferreira Dales Nava	Médica veterinária	278.752.598-94	Brasileira
2	Laerzio Chiesorin Neto	Médico Veterinário	032.768.029-61	Brasileira
3	MARCELO GORDO	Biólogo	120.767.438-98	Brasileira
4	Natalia Aparecida de Souza Lima	Bióloga	614.721.316-49	Brasileira

## Observações e ressalvas

1	O pesquisador somente poderá realizar atividade de campo após o término do estado de emergência devido à COVID-19, assim declarado por ato da autoridade competente.
2	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade e fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade.
3	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando de violação de legislação vigente, ou quando de inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiarem a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos de legislação brasileira em vigor.
4	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
5	As atividades de campo exercidas por pessoas naturais ou jurídicas estrangeiras, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes de cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
6	O titular de licença ou autorização e os membros de sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condições in situ.
7	Esta autorização NÃO isenta o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, possessor ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
8	Este documento não dispensa o cumprimento de legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/icgen">www.mma.gov.br/icgen</a> .

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

Código de autenticação: 0671530320200723

Página 1/3

## 9.4. Anexo 4

## Comprovante de Cadastro de Acesso – Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado



Ministério do Meio Ambiente  
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**  
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

**Comprovante de Cadastro de Acesso**  
**Cadastro nº A0A1A95**

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A0A1A95**  
 Usuário: **Fiocruz**  
 CPF/CNPJ: **33.781.055/0001-35**  
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**  
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

### Espécie

**Mansonella sp.**  
**Dipetalonema sp.**  
**Saguinus bicolor**  
**Pithecia Pithecia**  
**Lagothrix lagotricha**  
**Sapajus apella**  
**Ortalis sp.**

Título da Atividade: **Deteção e Identificação de filárias em variados animais silvestres da Amazônia**

### Equipe

<b>Alessandra Ferreira Dales Nava</b>	<b>Fiocruz</b>
<b>James Lee Crainey</b>	<b>Fiocruz Amazônia - ILM D</b>
<b>Marcelo Gordo</b>	<b>Universidade Federal do Amazonas</b>

David Maciel Fernandez Conga	Universidade Federal Rural da Amazônia
Natália Aparecida Souza Lima	Superintendência do Ibama no Amazonas - Centro de Tri
Ana Carolina Paulo Vicente	Fiocruz IOC
Carlos Henrique Aguiar Costa	Fiocruz IOC
Cindy Alves Dias	Fiocruz Amazônia - ILM
Laerzio Chiesorin Neto	Superintendência do Ibama no Amazonas - Centro de Tri
Diogo Cesar Lagroteria Oliveira Faria	Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiver
Sérgio Luiz Bessa Luz	Fiocruz Amazônia – ILM
Túllio Romão Ribeiro da Silva	Fiocruz Amazônia – ILM

#### Parceiras Nacionais

04.378.626/0001-97 / Fundação Universidade do Amazonas  
03.659.166/0003-74 / Superintendência do Ibama no Amazonas  
05.200.001/0001-01 / UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA  
33.781.055/0001-35 / Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz  
08.829.974/0001-94 / Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

#### Resultados Obtidos

Outros resultados

Data do Cadastro: 16/02/2022 14:56:21

Situação do Cadastro: Concluído

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 15:01 de 16/02/2022.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
ASSOCIADO - SISGEN