

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**Achados patológicos e moleculares de infecção por nematódeos filarídeos em primatas
do Novo Mundo na região Sul do Brasil**

Luiza Presser Ehlers

Porto Alegre, 2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Achados patológicos e moleculares de infecção por nematódeos filarídeos em primatas do
Novo Mundo na região Sul do Brasil

Autora: Luiza Presser Ehlers

**Tese apresentada como requisito para a
obtenção de grau de Doutora em Ciências
Veterinárias na área de concentração em
Patologia Animal e Patologia Clínica, na
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.**

Orientadora: Prof^a Dr^a Luciana Sonne

Porto Alegre, 2023

**O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de
Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001**

Luiza Presser Ehlers

ACHADOS PATOLÓGICOS E MOLECULARES DE INFECÇÃO POR NEMATÓDEOS
FILARÍDEOS EM PRIMATAS DO NOVO MUNDO NA REGIÃO SUL DO BRASIL

APROVADO POR:

Prof. Dra. Luciana Sonne
Orientadora e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Saulo Petinatti Pavarini
Membro da Comissão

Prof. Dra. Renata Assis Casagrande
Membro da Comissão

Prof. Dr. Djeison Lutier Raymundo
Membro da Comissão

RESUMO

Estudos parasitológicos são importantes para avaliar a saúde das espécies e populações, e sua vulnerabilidade a infecções, para desenvolver estratégias precisas de manejo e conservação. A pesquisa em nematódeos filarídeos parece ser bastante negligenciada, além disso, a relação entre a ocorrência desses parasitos e doença, assim como a caracterização das lesões causadas por esses agentes em primatas residentes na América do Sul é pouco documentada. Este trabalho teve como objetivo descrever a ocorrência, achados patológicos e moleculares em primatas do Novo Mundo residentes na região Sul do Brasil infectados por nematódeos filarídeos. Realizou-se um estudo em 132 primatas neotropicais submetidos à exame *post mortem* no período de abril de 2017 a outubro de 2021. Foram selecionados casos que apresentavam infecção por nematódeos filarídeos. No total, 31,3% apresentavam infecção por nematódeos filarídeos, dos quais 35 eram bugios-ruivos (*Alouatta guariba clamitans*) e dois eram macacos-pregos (*Sapajus nigritus*). A causa da morte decorrente da infecção pelos nematódeos filarídeos foi diagnosticada em somente um caso, no qual a fibrose devido a migração parasitária ocasionou um encarceramento intestinal. A polisserosite, o principal achado de necropsia, e as formas adultas de nematódeos filarídeos, foram visualizados com maior frequência na cavidade abdominal, seguida pela na cavidade torácica e no saco pericárdico. Principais achados microscópicos compreenderam pericardites e pleurites fibrosas, por vezes fibrinosas, associadas principalmente à infiltrado linfo-histiocítico e eosinofílico, bem como, à secções de formas adultas e às microfilárias. Todas amostras foram positivas para o gene panfilarial ITS-2 através da reação em cadeia da polimerase. Onze amostras foram selecionadas para o sequenciamento; através da árvore filogenética, foi demonstrado que uma sequência ficou estreitamente relacionada à espécie *Dipetalonema gracile*, enquanto que as outras dez amostras formaram uma estreita relação ao gênero *Dipetalonema*. A identificação dos parasitos em primatas neotropicais e sua relação com as lesões causadas por esses é uma ferramenta importante para estudar e avaliar o estado de saúde de uma população, como também, o risco de doenças das populações silvestres.

Palavras chaves: Primatas neotropicais. Doenças parasitárias. Filariose. *Dipetalonema* spp.

ABSTRACT

*Parasitological studies are important to assess the health of species and populations and their susceptibility to infection so that accurate management and conservation strategies can be developed. Research on filarid nematodes seems to be quite neglected. Moreover, the relationship between the occurrence of these parasites and diseases, as well as the characterization of lesions caused by these pathogens in primates living in South America, is poorly documented. The aim of this work was to describe the occurrence, pathological and molecular findings in New World primates living in southern Brazil infected with filarial nematodes. A study was conducted on 132 Neotropical primates examined post mortem from April 2017 to October 2021. Cases were selected that had filarial nematode infection. A total of 31.3% were infected with filarial nematodes, including 35 howler monkeys (*Alouatta guariba clamitans*) and two capuchin monkeys (*Sapajus nigritus*). The cause of death due to filarial nematode infection was diagnosed in only one case, in which fibrosis due to parasite migration led to intestinal obstruction. Polyserositis, the most important necropsy finding, and adult forms of filarial nematodes were more commonly seen in the abdominal cavity, followed by the thoracic cavity and pericardium. Major microscopic findings included fibrous pericarditis and pleuritis, sometimes fibrinous, mainly in association with lymphohistiocytic and eosinophilic infiltrate, and sections with adult forms and microfilariae. All samples were positive for the ITS-2 panfilarial gene by polymerase chain reaction. Eleven samples were selected for sequencing. Based on the phylogenetic tree, one sequence was shown to be closely related to the species *Dipetalonema gracile*, while the other ten samples were closely related to the genus *Dipetalonema*. The identification of parasites in neotropical primates and their association with the lesions they cause is an important tool for studying and assessing the health status of a population and the risk of disease in wild populations.*

Keywords: Neotropical primates. Parasitic disease. Filariasis. Dipetalonema spp.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1 AMEAÇAS E IMPORTÂNCIA DE PRIMATAS NÃO HUMANOS	9
2.2 DOENÇAS INFECCIOSAS EM PRIMATAS NÃO HUMANOS	10
2.3 PARASITISMO EM PRIMATAS NEOTROPICAIS	11
2.3.1 Nematódeos filarídeos	12
2.3.1.1 Nematódeos filarídeos de primatas neotropicais	13
2.3.1.2 <i>Dipetalonema</i> spp.	14
2.3.1.3 Ciclo de Vida	15
3 ARTIGO	16
4 CONCLUSÕES	20
REFERÊNCIAS	21

1 INTRODUÇÃO

Primatas não humanos (PNH) são de grande importância para a biodiversidade tropical e a muitas funções, processos e serviços no ecossistema (ESTRADA *et al.*, 2017). A mudança dramática na ecologia de seus habitats resultou em uma interface cada vez maior entre humanos, animais domésticos e PNH. Estrada *et al.* (2017) estimou que mais de 75% de todas as populações de espécies de PNH estão diminuindo. A velocidade e a extensão dessas mudanças ecológicas antropocêntricas são as principais pressões para doenças infecciosas emergentes originadas da vida selvagem (DASZAK; CUNNINGHAM; HYATT, 2000). Com isso, estudos sobre a biodiversidade e a ecologia dos parasitas da vida selvagem foram negligenciados (THOMPSON; LYMBERY; SMITH, 2010).

A pesquisa sobre parasitas de primatas silvestres é de grande interesse devido à sua importância ecológica, através do conhecimento da diversidade parasitária, bem como instrumentos para avaliar a saúde do ecossistema e das populações silvestres, envolvendo as interações parasita-hospedeiro (GILLESPIE; NUNN; LEENDERTZ, 2008), sendo este grupo de animais particularmente vulneráveis a infecções parasitárias, devido as condições ambientais favoráveis, a dieta e o comportamento social estreito (SOLÓRZANO-GARCIA & DE LEÓN, 2018). Vários esforços têm sido feitos para determinar a fauna parasitária de primatas neotropicais. Entre os estudos parasitários, a pesquisa em nematódeos filarídeos é negligenciada, tanto em humanos como em animais silvestres (BUENO *et al.*, 2017; SOLÓRZANO-GARCIA & DE LEÓN, 2018; LOPES *et al.*, 2022; SOUZA *et al.*, 2023).

A filariose é um grupo de doenças causadas por nematódeos filarídeos pertencentes à família Onchocercidae. Diversas espécies podem ser encontradas em humanos e animais com alguns aspectos zoonóticos (ANDERSON, 2000). Dois gêneros dentro da Família Onchocercidae, *Mansonella* e *Dipetalonema*, são relatados infectando primatas não humanos nas Américas (DUNN; LAMBRECHT, 1963; BAIN *et al.*, 2015; LAIDOUDI *et al.*, 2020; LAIDOUDI *et al.*, 2021). Destes, seis espécies pertencem ao gênero *Dipetalonema* (LAIDOUDI *et al.*, 2020). Esses parasitos vivem em vários tecidos e cavidades fora do trato gastrointestinal (STRAIT; ELSE; EBERHARD, 2012), frequentemente sem causar qualquer enfermidade e sinal clínico. Todavia, ocasionalmente podem induzir lesões como pleurite, peritonite fibrinopurulenta e adesão fibrinosa (BAKER, 2019).

A vigilância da fauna nativa é urgentemente necessária para documentar a diversidade de patógenos, estabelecer sua importância potencial na etiologia de doenças e identificar as circunstâncias de quando isso é mais provável de ocorrer (LLOYD-SMITH *et al.*, 2009;

SMITH; ACEVEDO-WHITEHOUSE; PEDERSEN, 2009). Entender o impacto desses parasitos em seus hospedeiros primatas é um aspecto que não deve ser negligenciado como parte vital da conservação dessas espécies. Estudos sobre nematódeos são escassos nos primatas dos Neotrópicos. Dessa maneira, esse trabalho tem como objetivo descrever a ocorrência de nematódeos filarídeos em primatas do Novo Mundo residentes na região Sul do Brasil, através de exames de necropsia. Como também, descrever os achados patológicos e moleculares associados à infecção desse agente.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AMEAÇAS E IMPORTÂNCIA DE PRIMATAS NÃO HUMANOS

Os primatas não humanos (PNH) ocorrem em 90 países nos continentes africano, asiático e americano. Em escala decrescente de abundância são encontrados no Brasil, Madagascar, Indonésia e República Democrática do Congo 65% (286 de 439 espécies) da riqueza geral de espécies de primatas (ESTRADA *et al.*, 2018). Os PNH são essenciais para a regeneração das florestas tropicais devido ao seu papel insubstituível de dispersores de sementes, contribuindo assim para a retenção de carbono e mitigação indireta do aquecimento global (CHAPMAN *et al.*, 2013).

Recentemente, Estrada *et al.* (2017) demonstraram que 75% das espécies de PNH apresentam tendências de declínio populacional, e que 36% das espécies de PNH neotropicais (também conhecidas como macacos do Novo Mundo, infraordem Platyrrhini) estão listadas como ameaçadas pela União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN). Seis das 25 espécies de PNH mais ameaçadas são neotropicais (SCHWITZER *et al.*, 2019). Os fatores que contribuem para esse cenário são essencialmente a fragmentação das florestas tropicais americanas e a conversão das florestas em monoculturas e pastagens (ESTRADA *et al.*, 2017; SCHWITZER *et al.*, 2019). Dado o ritmo acelerado de expansão agrícola, estima-se que até o final do século 21 haverá um declínio de habitat de PNH, da ordem de 78% em território brasileiro (ESTRADA *et al.*, 2018).

Nesse contexto, os primatas são pressionados a ocupar fragmentos florestais próximos a áreas antropizadas, o que é inviável para a manutenção a longo prazo da maioria das espécies (ESTRADA; RABOY; OLIVEIRA, 2012). Consequentemente, acidentes por atropelamento ou eletrocussão, predação por cães, conflitos em áreas de cultivo e captura para manutenção como animais de estimação tornaram-se uma realidade para espécies de PNH periurbanas (JERUSALINSKY; AZEVEDO; GORDO, 2017; EHLERS *et al.*, 2021). A interação entre humanos e PNH também ocorre no comércio ilegal (SHANEE; MENDOZA; SHANEE, 2015), e na caça predatória, com esta última afetando aproximadamente 35% das espécies de primatas brasileiros (IUCN, 2020).

Saúde pública, bem-estar animal e transferência de patógenos de e para populações selvagens estão entre as principais questões atuais de preocupação no âmbito do conceito “*One-Health*”. Tais aspectos são ainda mais relevantes em localizações como a América do Sul, onde as taxas de biodiversidade diminuem e as de desmatamento estão crescendo. Existem evidências convincentes de que a perda e a fragmentação do habitat podem favorecer o contato entre

humanos e outros animais, representando uma ameaça potencial para ambos. Neste cenário, os PNHs são de particular interesse por sua estreita relação filogenética com humanos, bem como, por seu reconhecido papel de reservatórios de agentes zoonóticos (THOMPSON, 2013; RONDÓN; CAVALLERO; RENZI, 2021).

2.2 DOENÇAS INFECCIOSAS EM PRIMATAS NÃO HUMANOS

As doenças infecciosas desempenham papéis importantes nos sistemas naturais, desde influenciar a diversidade genética do hospedeiro até alterar a composição das espécies em comunidades ecológicas (ALTIZER; NUNN; LINDENFORS, 2007).

Este cenário de habitats, recursos e patógenos pré-existent e/ou adquiridos comuns facilita o surgimento de doenças zoonóticas (KARESH *et al.*, 2012; SMITH *et al.*, 2012). Ademais, do ponto de vista epidemiológico, a transferência de patógenos entre animais selvagens e humanos é geralmente mais preocupante do que entre animais domésticos e humanos (DEVAUX *et al.*, 2019).

Deve-se considerar também que, ao contrário da maioria das espécies de mamíferos, os PNH são altamente sociais e formam grupos complexos e heterogêneos, o que aumenta exponencialmente a disseminação intraespecífica de doenças (CAPITANIO, 2012; YOUNG *et al.*, 2013).

A necessidade de melhor vigilância e pesquisa básica sobre doenças infecciosas é de suma importância. Os primatas silvestres podem servir como sentinelas, sinalizando quais patógenos representam um risco para os humanos na área imediata, bem como em países distantes (CHAPMAN; GILLESPIE; GOLDBERG, 2005).

Ademais, a perturbação antropocêntrica à nível do habitat pode exacerbar a transmissão do patógeno, afetando a distribuição e o comportamento dos primatas (ALTIZER *et al.*, 2006; GILLESPIE & CHAPMAN, 2006; GILLESPIE; NUNN; LEENDERTZ, 2008; YOUNG *et al.*, 2013), bem como vetores de doenças infecciosas como febre amarela, dengue e malária (ALTIZER *et al.*, 2006). Nesse sentido, estudos de PNH com capacidade de sobreviver em habitats moderadamente perturbados são de grande importância para a compreensão da dinâmica de transmissão de doenças infecciosas e para avaliar a capacidade dos primatas de servirem como sentinelas, alertando-nos antes que os patógenos atinjam áreas periurbanas e áreas urbanas (KOWALEWSKY *et al.*, 2011).

2.3 PARASITISMO EM PRIMATAS NEOTROPICAIS

A pesquisa sobre parasitas de primatas silvestres é de grande interesse devido à sua importância ecológica, através do conhecimento da diversidade parasitária, bem como instrumentos para avaliar a saúde do ecossistema e das populações silvestres, envolvendo as interações parasita-hospedeiro (GILLESPIE; NUNN; LEENDERTZ, 2008), sendo este grupo de animais particularmente vulneráveis a infecções parasitárias, devido as condições ambientais favoráveis, a dieta e o comportamento social estreito (SOLÓRZANO-GARCIA & DE LEÓN, 2018). Adicionalmente, a estreita história evolutiva compartilhada entre primatas e humanos fazem primatas modelos adequados para o estudo da transmissão de parasitas humanos dinâmica e evolução (SOLÓRZANO-GARCIA & DE LEÓN, 2018).

Numerosos gêneros de protozoários e metazoários foram descritos como infectando os membros de todos os principais grupos de primatas não humanos (STRAIT; ELSE; EBERHARD, 2012). Alguns deles são considerados não patogênicos ou, pelo menos, seus efeitos prejudiciais ao hospedeiro ainda não foram elucidados (STRAIT; ELSE; EBERHARD, 2012). Entretanto, uma alta carga parasitária pode ter consequências na saúde das populações de primatas como, por exemplo, aumentar a susceptibilidade à predação ou diminuir a aptidão competitiva do indivíduo e ter um impacto negativo na reprodução (CHAPMAN; GILLESPIE; GOLDBERG, 2005). Adicionalmente, pode causar perda nutricional ou produzir lesões que resultam em debilitação grave e podem criar oportunidades para infecções secundárias que podem ser fatais. Esse processo pode ser exacerbado pela imunossupressão e vários fatores estressantes (STRAIT; ELSE; EBERHARD, 2012). Os primatas silvestres possuem um comportamento social caracterizado pelas interações frequentes, o que facilita a transmissão de algumas espécies parasitárias entre indivíduos (NUNN, 2012). Um dos exemplos de helmintos parasitas em primatas que dependem altamente do contato físico estreito entre os hospedeiros é o gênero *Trypanoxyuris*, e estaria intimamente ligado à coevolução com seus hospedeiros, existindo tantas espécies do gênero quanto espécies de hospedeiros primatas (CONGA *et al.*, 2016).

Como dito anteriormente, 75% das espécies de primatas são considerados em perigo de extinção (ESTRADA *et al.*, 2017), os estudos parasitológicos são importantes para avaliar a saúde das espécies e populações, e sua vulnerabilidade a infecções, para desenvolver estratégias precisas de manejo e conservação (ALTIZER; NUNN; LINDENFORS, 2007). Em comparação aos primatas do velho mundo, estudos sobre fatores que envolvem o parasitismo em primatas neotropicais ainda são escassos e focalizados em algumas espécies de hospedeiros. Atualmente, existem 171 espécies de primatas incluídos em 22 gêneros que habitam florestas na região

biogeográfica Neotropical (ESTRADA *et al.*, 2017). Estas espécies de primatas neotropicais representam 34% do total de espécies de primatas no mundo (ESTRADA *et al.*, 2017). Vários esforços têm sido feitos para determinar a fauna parasitária de primatas neotropicais. No entanto, essas informações são publicadas de forma dispersa e às vezes em recursos bibliográficos locais de difícil acesso (SOLÓRZANO-GARCIA & DE LEÓN, 2018).

Recentemente, a pesquisa em nematódeos filarídeos parece ser bastante negligenciada em parte por causa da logística e restrições éticas associadas à coleta de amostras de sangue ou tecido de populações protegidas de PNH (SOLÓRZANO-GARCIA & DE LEÓN, 2018).

2.3.1 Nematódeos filarídeos

Os nematódeos filarídeos são parasitas de tecidos e dos espaços entre os tecidos de todas as classes de vertebrados, exceto peixes. Pertencentes a superfamília Filarioidea que é dividida em duas famílias: Filariidae e Onchocercidae. Esses parasitos compreendem um grupo relativamente pequeno dentro do grande Filo Nematoda (Nemata) (ANDERSON, 2000). No entanto, a importância do grupo é considerável, pois compreende parasitos de relevância médica e veterinária (MORALES-HOJAS, 2001). A maioria dos parasitos da superfamília Filarioidea se desenvolve em espécies hospedeiras selvagens (mamíferos, pássaros, répteis e anfíbios) sem quaisquer sinais clínicos (VOTYPKA; BRZONOVA; PETRZELKOVA, 2020).

Os nematódeos filarídeos adultos são finos semelhantes a fios que vivem em tecidos, fluidos corporais ou cavidades corporais de seus hospedeiros definitivos. Variam, dependendo da espécie, de alguns centímetros a até 30 cm. As filarias fêmeas são geralmente muito maiores do que os machos. Os parasitos adultos podem sobreviver por anos, as fêmeas produzem larvas pequenas e primitivas chamadas microfíliárias que circulam por todo o sangue periférico ou vivem na pele e na região subcutânea do hospedeiro definitivo, medindo entre 100 a 400 μm (STRAIT; ELSE; EBERHARD, 2012; CONGA *et al.*, 2018; VOTYPKA; BRZONOVA; PETRZELKOVA, 2020).

A família Onchocercidae contém cerca de 70 a 80 gêneros, e taxonomia desses parasitos ainda está em curso (ANDERSON, 2000). A morfologia desses parasitos ainda é pouco documentada e mostra altos níveis de homoplasia. Essas características dificultam o uso de caracteres morfológicos em estudos taxonômicos. As histórias evolutivas hipotéticas dos Onchocercidae e seus relacionamentos, portanto, dependem fortemente da sua gama de hospedeiros e de sua distribuição geográfica das espécies. Os números de estudos moleculares filogenéticos publicados que incluem diferentes gêneros da família Onchocercidae ainda são escassos, e as relações intergêneros ainda não estão completamente compreendidas. Assim, um

estudo filogenético multilocus mais abrangente da família Onchocercidae parece ser necessário para testar os diferentes cenários evolutivos propostos para a evolução dessa família (MORALES-HOJAS *et al.*, 2001; LEFOULON *et al.*, 2015).

Esta família inclui algumas das doenças parasitárias de grande importância aos humanos, embora em sua maioria sejam negligenciadas (MORALES-HOJAS *et al.*, 2001). Entre as doenças humanas causadas por nematódeos filarídeos estão a filariose linfática (também conhecida como elefantíase, causada pela infecção por *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* e *B. timori*), a oncocercose (também conhecida como “cegueira dos rios” ou “mal do garimpeiro”, causada pela infecção por *Onchocerca volvulus*), a loíase (causada pela infecção por *Loa loa*) e outras filarioses (como as causadas pelos gêneros *Mansonella* e *Dirofilaria*) (MORALES-HOJAS *et al.*, 2001). O conhecimento atual, bastante fragmentado, sugere que a maioria das infecções em PNH são assintomáticas (STRAIT; ELSE; EBERHARD, 2012; VOTYPKA; BRZONOVA; PETRZELKOVA, 2020).

2.3.1.1 Nematódeos filarídeos de primatas neotropicais

Dois gêneros dentro da Família Onchocercidae, *Mansonella* e *Dipetalonema*, são relatados infectando primatas não humanos nas Américas (DUNN; LAMBRECHT, 1963; BAIN *et al.*, 2015; LAIDOUDI *et al.*, 2020; LAIDOUDI *et al.*, 2021). Destes, 13 espécies pertencem ao gênero *Mansonella* (Tetrapetalonema) e seis ao gênero *Dipetalonema* (BAIN *et al.*, 2015; LAIDOUDI *et al.*, 2020). Ainda, um estudo molecular recente relata a identificação de uma espécie não identificada de *Brugia* em um bugio-ruivo na Guiana Francesa (LAIDOUDI *et al.*, 2020).

A prevalência geralmente excede a 70%, e infecções múltiplas com duas a quatro espécies são comuns em áreas endêmicas para PNH (STRAIT; ELSE; EBERHARD, 2012). As filárias desses dois gêneros vivem nas cavidades abdominal ou torácica e podem causar peritonite fibrinopurulenta resultando no aprisionamento dos parasitos, como também, podem infectar os tecidos subcutâneos causando pouca ou nenhuma inflamação (CHALIFOUX, 1993; STRAIT; ELSE; EBERHARD, 2012).

Os hospedeiros intermediários que transmitem o estágio larval dos filarídeos, são dípteros principalmente da família Ceratopogonidae (*Culicoides* spp.) e Simuliidae (STRAIT; ELSE; EBERHARD, 2012; VOTYPKA; BRZONOVA; PETRZELKOVA, 2020).

2.3.1.2 *Dipetalonema* spp.

O gênero *Dipetalonema* pertence à família Onchocercidae, e teve outros nomes incluindo *Filaria* e *Acanthocheilonema* (CONGA *et al.*, 2018). Como citado anteriormente, o gênero *Dipetalonema* compreende 6 espécies, *Dipetalonema gracile* (RUDOLPHI, 1809); *Dipetalonema caudispina* (MOLIN, 1858); *Dipetalonema graciliformis* (FREITAS, 1943); *Dipetalonema robini* (PETIT, BAIN E ROUSSILHON, 1985); *Dipetalonema freitasi* (BAIN; DIAGNE; MULLER, 1987); e *Dipetalonema yatesi* (NOTARNICOLA; JIMENEZ; GARDNER, 2007).

Estudos filogenéticos conduzidos por Lefoulon *et al.* (2015) restringiu os hospedeiros do gênero *Dipetalonema* à PNH nos Neotrópicos. No entanto, a distribuição geográfica de *Dipetalonema* ao longo dos Neotrópicos é imprecisa porque a maioria dos registros são de primatas cativos ou apenas um hospedeiro, como pode ser visualizado na Tabela 1. No caso de *D. caudispina* e *D. gracile*, a maioria dos registros no século passado concentra-se no Brasil e na Guiana (FREITAS, 1943; NOTARNICOLA; PINTO; NAVONE, 2008) e abrange um número maior de hospedeiros primatas não humanos (WEBBER & HAWKING, 1955; NOTARNICOLA; PINTO; NAVONE, 2008).

D. gracile foi relatado nos Neotrópicos do Equador, Peru e Brasil como parasita de *S. sciureus*, *Ateles paniscus* e *Saguinus nigricollis*, *Lagothrix poeppigii* mas como as outras espécies do gênero, a maioria dos relatos não são geograficamente explícito (CONGA *et al* 2018). Devido à grande diversidade de hospedeiros e à dificuldade de alcançar grandes áreas geográficas para pesquisa, ainda permanece uma falta no conhecimento sobre as infecções naturais por filárias em primatas neotropicais (CONGA *et al.*, 2018).

Tabela 1. Registros da distribuição geográfica de *Dipetalonema* e de espécies de PNH hospedeiras nos Neotrópicos.

Nematódeo filarídeo	Espécie afetada	País/local	Referência
<i>Dipetalonema freitasi</i>	<i>Cebus capucinus</i>	Zoológico de Londres	BAIN; DIAGNE; MULLER, 1987
<i>D. robini</i>	<i>Saimiri sciureus</i>	Guiana	PETIT, BAIN; ROUSSILHON, 1985
	<i>Sapajus nigritus</i>	Argentina	VANDERHOEVEN; NOTARNICOLA; AGOSTINI, 2017
<i>D. graciliformis</i>	<i>Saguinus midas</i>	Guiana Francesa	FREITAS, 1943
<i>D. yatesi</i>	<i>Ateles chamek</i>	região de Beni na Bolívia	NOTARNICOLA; JIMENEZ; GARDNER, 2007

2.3.1.3 Ciclo de Vida

O ciclo de vida de filárias de primatas neotropicais ainda é indeterminado (CONGA *et al.*, 2018). No entanto acredita-se que seja similar ao ciclo da filária *Mansonella ozzardi*. O ciclo de vida é considerado indireto, e apresenta hospedeiros intermediários obrigatórios, os quais incluem uma extensa variedade de insetos hematófagos. As formas adultas dos nematódeos filarídeos situam-se na cavidade abdominal e torácica do hospedeiro; após a cópula, as microfilárias L1 migram para os capilares sanguíneos periféricos do hospedeiro, à espera para serem ingeridos por artrópodes hematófagos das Famílias Ceratopogonidae e Simuliidae (STRAIT; ELSE; EBERHARD, 2012; VOTYPKA; BRZONOVA; PETRZELKOVA, 2020).

No hospedeiro intermediário, as larvas continuam a se desenvolver nos tecidos do vetor. Dentro do tubo digestivo do artrópode as microfilárias L1 migram para a cavidade hemocélica e posteriormente à musculatura torácica, maturam para L2. Após maturação da L3, esta migra para a região bucal do artrópode. Após o hospedeiro definitivo ser picado/mordido pelo artrópode, na circulação sanguínea a microfilária L3 inicia a fase parasitária, que migra pelos vasos sanguíneos até maturar ao estágio L4, onde procuram a sua localização final. No caso das filárias do gênero *Dipetalonema*, a localização final ocorre em membranas serosas que revestem a cavidade torácica e abdominal (STRAIT; ELSE; EBERHARD, 2012; VOTYPKA; BRZONOVA; PETRZELKOVA, 2020).

3 ARTIGO

Nesse item é apresentado o artigo intitulado “Achados patológicos e moleculares de infecção por nematódeos filarídeos do gênero *Dipetalonema* em primatas do Novo Mundo no Brasil”, o qual foi aceito para publicação no periódico *Parasitology Research*, <https://doi.org/10.1007/s00436-023-07895-3> .

ORIGINAL MANUSCRIPT

Achados patológicos e moleculares de infecção por nematódeos filarídeos do gênero *Dipetalonema* em primatas do Novo Mundo no Brasil

Luiza Presser Ehlers^a, Mônica Slaviero^a, Cíntia De Lorenzo^a, Renata Fagundes-Moreira^b, Viviane Kelin de Souza^b, Lívia Perles^c, Vinicius Baggio-Souza^b, Marcos Antonio Bezerra-Santos^c, David Modrý^{d,e,f}, Michal Benovics^d, Welden Panziera^a, David Driemeier^a, Saulo Petinatti Pavarini^a, João Fabio Soares^b, Domenico Otranto^{c,g*},
Luciana Sonne^a

^a *Setor de Patologia Veterinária, Faculty of Veterinary, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.*

^b *Laboratório de Protozoologia e Rickettsioses Vetoriais, Faculty of Veterinary, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.*

^c *Department of Veterinary Medicine, University of Bari, Valenzano, Italy.*

^d *Department of Botany and Zoology, Faculty of Science, Masaryk University, 61137 Brno, Czech Republic*

^e *Department of Veterinary Sciences, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources/CINeZ, Czech University of Life Sciences Prague, 16500 Praha-Suchdol, Czech Republic*

^f *Biology Center, Institute of Parasitology, Czech Academy of Sciences, 37005 Ceske Budejovice, Czech Republic*

^g *Faculty of Veterinary Sciences, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.*

*Corresponding author (Luiza Presser Ehlers):

Postal address: Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 91540-000, Brazil.

E-mail: lu.ehlers@hotmail.com;

Phone number: +55 51 33086107

Agradecimentos

Nós agradecemos o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Finance Code 001, Processo 307277/2021-6 (Chamada Bolsa Produtividade CNPq N° 04/2021), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Propesq/UFRGS). Agradecemos aos médicos veterinários e técnicos de zoológicos municipais e particulares, autoridades locais, centros de vigilância sanitária, tratadores de fauna e clínicas veterinárias da região metropolitana de Porto Alegre que contribuíram com este estudo ao encaminhar carcaças de primatas neotropicais para fins científicos durante o período deste estudo; também somos gratos aos colegas de pós-graduação que contribuíram para os relatórios de necropsia deste estudo.

Abstract

Among vector-borne helminths, filarioids of the genus *Dipetalonema* (Spirurida: Onchocercidae) localize in several tissues and body cavities of several animal species, causing mild to moderate lesions. The pathological findings associated with *Dipetalonema* spp. infection in Neotropical monkeys from southern Brazil are herein described, along with a fatal case due to filarial polyserositis and entrapment of an intestinal segment. At necropsy, nematodes were observed in abdominal and thoracic cavities, or in the pericardium of 37 (31.3%) out of the 118 individuals examined (i.e., 35 *Alouatta guariba clamitans* and two *Sapajus nigritus*). In addition, at histology, 27.0% of positive animals presented microfilariae (inside blood vessels of lung, spleen, liver, and brain) and 8.1% presented adult nematodes in the heart, lung, and liver. In two cases, cross-sections of filarioids were associated with areas of epicardial thickening with intense fibrosis and pyogranulomatous inflammation in the brain, heart, liver, lungs, or spleen. The DNA fragment was amplified using the *cox1* gene, sequenced and analyzed to identify the nematode species collected; presence of *Wolbachia* was assessed in the filarioids using the 16S rRNA gene. At BLAST analysis of the *cox1* gene, 10 sequences showed 91.7% nucleotide identity with *Dipetalonema gracile*, and two with *D. gracile* (98.5%) and *Dipetalonema graciliformis* (98.3%). Phylogenetic analyses clustered sequences the *cox1* obtained in this study in two clades corresponding with the host species. *Wolbachia* sp. endosymbiont was detected in four samples. Data herein reported provide a description of pathological lesions associated with the infection by *Dipetalonema* spp., suggesting that they may cause disease in Neotropical monkeys. In addition, a better understanding of diversity and biology of *Dipetalonema* spp. in South America is needed to assess the impact they may cause in native non-human primates from Brazil.

Keywords: Onchocercidae, Vector-borne nematodes, Filariasis, *Alouatta guariba clamitans*, *Sapajus nigritus*, Pathology

4 CONCLUSÕES

A infecção por nematódeos do gênero *Dipetalonema*, foi detectada em 31,3% dos primatas do Novo Mundo submetidos à exame *post mortem*.

As formas adultas de *Dipetalonema* spp., foram visualizados com maior frequência na cavidade abdominal, seguida pela na cavidade torácica e no saco pericárdico.

Principal achado macroscópico correspondeu a polisserosites fibrosantes a fibrinosas, leves a moderadas na maioria dos casos.

Principais achados microscópicos compreenderam peritonite, pleurites e pericardites fibrosantes, por vezes fibrinosas, associadas principalmente à infiltrado linfo-histiocítico e eosinofílico, bem como, à formas adultas e às microfilárias de *Dipetalonema* spp.

REFERÊNCIAS

- ALTIZER, S. *et al.* Seasonality and the dynamics of infectious diseases. **Ecology Letters**, v. 9, p. 467-484, 2006.
<http://dx.doi.org:10.1111/j.1461-0248.2005.00879.x>
- ALTIZER, S.; NUNN, C. L.; LINDENFORS, P. Do threatened hosts have fewer parasites? A comparative study in primates. **Journal of Animal Ecology**, v. 76, p. 304-314, 2007.
<http://dx.doi.org:10.1111/j.1365-2656.2007.01214.x>
- ANDERSON, R. The superfamily Filarioidea *In*: Anderson R. (Ed.) **Nematode Parasites of Vertebrates. Their Development and Transmission**. UK: CABI, 2000, p. 467-532.
- BAIN, O.; DIAGNE, M.; MULLER, R. Une cinquième filaire du genre *Dipetalonema*, parasite de singes Sud-Américains [A 5th filaria of the genus *Dipetalonema*, parasite of South American monkeys]. **Annales de parasitologie humaine et comparee**, v. 62, n.3, p. 262–270, 1987.
<https://doi.org/10.1051/parasite/1987623262>
- 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**, v. 3918, n. 2, p. 151–193, 2015.
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.3918.2.1>
- BAKER, D.G. Chapter 17 – Parasitic Diseases. *In*: MARINI, R.; WACHTMAN, L.; TARDIF, S.; MANSFIELD, K., (Eds.) **The Common Marmoset in Captivity and Biomedical Research**. USA: Academic Press, 2019, p. 289-303.
- BUENO, M.G. *et al.* Infectious diseases in free-ranging blonde capuchins, *Sapajus flavius*, in Brazil. **Int J Primatol**. v. 38, n. 6, p.1017-1031, 2017.
<https://doi.org/10.1002/ajp.23346>
- CAPITANIO, J. P. Social Processes and Disease in Nonhuman Primates: Introduction to the Special Section. **American Journal of Primatology**, v.74, p.491–496, 2012.
<http://dx.doi.org:10.1016/j.gde.2016.03.011>
- CHALIFOUX, L. V. Filariasis, New World Primates. *In*: JONES, T. C.; MOHR, U.; HUNT, R. D. (Eds.) **Nonhuman Primates I. Monographs on Pathology of Laboratory Animals**. Berlin: Springer, 1993, p. 206-214.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-84906-0_32
- CHAPMAN, C. A.; GILLESPIE, T. R.; GOLDBERG, T. L. Primates and the ecology of their infectious diseases: how will anthropogenic change affect host-parasite interactions? **Evolutionary Anthropology**, v. 14, p. 134-144, 2005.
<http://dx.doi.org:10.1002/evan.20068>
- CHAPMAN, C.A. *et al.* Are Primates Ecosystem Engineers? **International Journal of Primatology**, v.34, p.1–14, 2013.
<http://dx.doi.org:10.1007/s10764-012-9645-9>

CONGA, D. F. *et al.* Morphology of the oxyurid nematodes *Trypanoxyuris (T.) cacajao* n. sp. and *T. (T.) ucayalii* n. sp. from the red uakari monkey *Cacajao calvus ucayalii* in the Peruvian Amazon. **Journal of Helminthology**, v. 90, n. 4, p. 483-493, 2016.

<http://dx.doi.org:10.1017/S0022149X1500067X>

CONGA, D. F. *et al.* Occurrence of *Dipetalonema gracile* in a wild population of woolly monkey *Lagothrix poeppigii* in the northeastern Peruvian Amazon. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 27, n. 2, p. 154–160, 2018.

<https://doi.org/10.1590/s1984-296120180014>

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A.A.; HYATT, A.D. Emerging infectious diseases of wildlife - Threats to biodiversity and human health. **Science**, v.287, p.443–449, 2000.

<http://dx.doi.org:10.1126/science.287.5452.443>

DEVAUX, C.A. *et al.* Infectious Disease Risk Across the Growing Human-Non Human Primate Interface: A Review of the Evidence. **Frontiers in Public Health**, v.7, p.1–22, 2019.

<http://dx.doi.org:10.3389/fpubh.2019.00305>

DUNN, F.L.; LAMBRECHT, F.L. On some filarial parasites of South American primates, with a description of *Tetrapetalonema tamarinae* n. sp. from the Peruvian tamarin marmoset, *Tamarinus nigricollis* (Spix, 1823). **Journal of Helminthology**, v. 37, n. 4, p. 261-286, 1963.

<http://dx.doi.org/10.1017/S0022149X00019866>

EHLERS, L.P. *et al.* Causes of death in neotropical primates in Rio Grande do Sul State, Southern Brazil. **J Med Primatol**, v. 51, n. 2, p. 85-95, 2021.

<http://dx.doi.org/10.1111/jmp.12557>

ESTRADA, A.; RABOY, B.E.; OLIVEIRA, L.C. Agroecosystems and Primate Conservation in the Tropics: A Review. **American Journal of Primatology**, v.74, n. 8, p.696–711, 2012.

<https://doi.org/10.1002/ajp.22033>

ESTRADA, A. *et al.* Impending extinction crisis of the world's primates : Why primates matter. **Science Advances**, v.3, p.e1600946, 2017.

<http://dx.doi.org:10.1126/sciadv.1600946>

ESTRADA, A. *et al.* Primates in peril: The significance of Brazil, Madagascar, Indonesia and the Democratic Republic of the Congo for global primate conservation. **PeerJ**, v.6, p.1–57, 2018.

<https://doi.org/10.7717/peerj.4869>

FREITAS, J. F. T. Estudos sobre nematodeos filarídeos *Dipetalonema caudispina* (Molin, 1858). **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 38, p. 361–372, 1943.

GILLESPIE, T. R.; CHAPMAN, C. A. Prediction of parasite infection dynamics in primate metapopulations based on attributes of forest fragmentation. **Conservation Biology**, v. 20, n. 2, p. 441-448, 2006.

<https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2006.00290.x>

GILLESPIE, T. R.; NUNN, C. L.; LEENDERTZ, F. H. Integrative approaches to the study of primate infectious disease: implications for biodiversity conservation and global health.

American journal of physical anthropology, v. suppl 47, p. 53-69, 2008.

<https://doi.org/10.1002/ajpa.20949>

IUCN (International Union for the conservation of Nature). The IUCN red list of threatened species. 2020. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/> Acesso em: 10 dez. 2022.

JERUSALINSKY, L.; AZEVEDO, R. B.; GORDO, M. **Plano de ação nacional para a conservação do Sauim-de-coleira**. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, ICMBio, 2017, 207 p. Disponível em:

<https://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/docs-pan/pan-sauim-de-coleira/1-ciclo/pan-sauim-de-coleira-livro.pdf> Acesso em: 10 jan. 2023.

KARESH, W.B. *et al.* Ecology of zoonoses: natural and unnatural histories. **Lancet**, v.380, n.9857, p.1936-1945, 2012.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61678-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61678-X)

KOWALEWSKI, M. M. *et al.* Black and gold howler monkeys (*Alouatta caraya*) as sentinels of ecosystem health: patterns of zoonotic protozoa infection relative to degree of human-primate contact. **American journal of primatology**, v. 73, n. 1, p. 75-83, 2011.

<https://doi.org/10.1002/ajp.20803>

LAIODOUDI, Y. *et al.* New Molecular Data on Filaria and its Wolbachia from Red Howler Monkeys (*Alouatta macconnelli*) in French Guiana-A Preliminary Study. **Pathogens**, v. 9, n. 8, p.626, 2020.

<https://doi.org/10.3390/pathogens9080626>

LAIODOUDI, Y, *et al.* *Dipetalonema graciliformis* (Freitas, 1964) from the red-handed tamarins (*Saguinus midas*, Linnaeus, 1758) in French Guiana. **Parasitology**, v. 148, n. 11, p. 1353–1359, 2021.

<https://doi.org/10.1017/S0031182021000901>

LEFOULON, E. *et al.* Shaking the tree: multi-locus sequence typing usurps current Onchocercid (filarial nematode) phylogeny. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 11, p. e0004233, 2015.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004233>

LLOYD-SMITH, J. O. *et al.* Epidemic Dynamics at the Human-Animal Interface. **Science**, v.326, n.5958, p.1362-1367, 2009.

<https://doi.org/10.1126/science.1177345>

LOPES, S. *et al.* Necropsies disclose a low helminth parasite diversity in periurban howler monkeys. **American Journal of Primatology**, v. 84, n. 1, p. e23346, 2022.

<https://doi.org/10.1002/ajp.23346>

MOLIN, R. Versuch einer Monographie der Filarien. **Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften**, v. 28, p. 365–461, 1858.

MORALES-HOJAS, R. *et al.* Characterization of nuclear ribosomal DNA sequences from *Onchocerca volvulus* and *Mansonella ozzardi* (Nematoda: Filarioidea) and development of a PCR-based method for their detection in skin biopsies. **International journal for parasitology**, v. 31, n. 2, p. 169-177, 2001.

NOTARNICOLA, J.; JIMÉNEZ, F. A.; GARDNER, S. L. A new species of *Dipetalonema* (Filarioidea: Onchocercidae) from *Ateles chamek* from the Beni of Bolivia. **J Parasitol**, v. 93, n. 3, p. 661-667, 2007.
<https://doi.org/10.1645/GE-962R1.1>

NOTARNICOLA, J.; PINTO, C. M.; NAVONE, G. T. Host occurrence and geographical distribution of *Dipetalonema* spp. (Nematoda: Onchocercidae) in neotropical monkeys and the first record of *Dipetalonema gracile* in Ecuador. **Comparative Parasitology**, v. 75, n. 1, p. 61-68, 2008.
<https://doi.org/10.1654/4284.1>

NUNN, C. L. Primate disease ecology in comparative and theoretical perspective. **American journal of primatology**, v. 74, n. 6, p. 497–509, 2012.
<https://doi.org/10.1002/ajp.21986>

PETIT, G.; BAIN, O.; ROUSSILHON, C. Deux nouvelles filaires chez un singe, *Saimiri sciureus*, au Guyana. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 60, p. 65–81, 1985.

RONDÓN, S.; CAVALLERO, S.; RENZI, E. Parasites of Free-Ranging and Captive American Primates: A Systematic Review. **Microorganisms**, v. 9, n. 12, p. 2546, 2021.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9122546>

RUDOLPHI, C. A. **Entozoorum sive vermium intestinalium historia naturalis**. Volume 2. Amstelaedami, 1809, 457 pp.

SCHWITZER, C. *et al.* **Primates in Peril: The World's 25 Most Endangered Primates 2018-2020**. Washington, DC: IUCN SSC Primate Specialist Group (PSG), International Primatological Society (IPS), Global Wildlife Conservation (GWC), Bristol Zoological Society (BZS), 2019. p. 129. Disponível em: <https://www.globalwildlife.org/wp-content/uploads/2019/10/Primates-in-Peril-2018-2020.pdf> Acesso em: 10 jan. 2023.

SHANEE, N.; MENDOZA, A. P.; SHANEE, S. Diagnostic overview of the illegal trade in primates and law enforcement in Peru. **American journal of primatology**, v. 79, n.11, p. 1-12, 2015.
<https://doi.org/10.1002/ajp.22516>

SMITH, K.F.; ACEVEDO-WHITEHOUSE, K.; PEDERSEN, A. B. The role of infectious diseases in biological conservation. **Animal conservation**, v.12, n.1, p.1-12, 2009.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-1795.2008.00228.x>

SMITH, K. M. *et al.* Zoonotic Viruses Associated with illegally imported wildlife products. **Plos One**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2012.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029505>

SOLÓRZANO-GARCIA, B.; DE LÉON, G. P. P. Primates of neotropical primates: a review. **International Journal of Primatology**, v. 39, n. 2, p. 155-182, 2018.
<https://doi.org/10.1007/s10764-018-0031-0>

SOUZA, V.K. *et al.* Emergence of *Mansonella* sp. in free-ranging primates in southern Brazil. **Primates; journal of primatology**, v. 64, n. 1, p.153–159, 2023.
<https://doi.org/10.1007/s10329-022-01038-5>

STRAIT, K.S; ELSE, J.G.; EBERHARD, M.L. Parasitic Diseases of Nonhuman Primates. *In*: ABEE, C.R.; MANSFIELD, K.; TARDIF, S.; MORRIS, T. (Eds.) **Nonhuman Primates in Biomedical Research Diseases**. San Diego: Academic Press, 2012, p. 197-297.

THOMPSON, R. C.; LYMBERY, A. J.; SMITH, A. Parasites, emerging disease and wildlife conservation. **International journal for parasitology**, v.40, n.10, p.1163-1170, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.04.009>

THOMPSON, R.C.A. Parasite zoonoses and wildlife: one health, spillover and human activity. **International journal for parasitology**, v. 43, n. 12-13, p. 1079-1088, 2013.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.06.007>

VANDERHOEVEN, E.; NOTARNICOLA, J.; AGOSTINI, I. First record of *Dipetalonema Robini* Petit, Bain & Roussilhon 1985 (Nematoda: Onchocercidae) parasitizing *Sapajus nigrinus* in Northeastern Argentina. **Mastozoología Neotropical**, v. 24, n. 2, p., 483-488, 2017.

VOTYPKA, J.; BRZONOVA, J.; PETRZELKOVA, K. J. Trypanosomiasis and Filariasis. *In*: KNAUF, S. & JONES-ENGEL, L. (Eds.) **Neglected Diseases in Monkeys: From the Monkey-Human Interface to One Health**. Switzerland: Springer, 2020. cap. 15, p. 343-371.
<https://doi.org/10.1007/978-3-030-52283-4>

WEBER, W. A. F.; HAWKING, F. The filarial worms *Dipetalonema digitatum* and *D. gracile* in monkeys. **Parasitology**, v. 45, n. 3-4, p. 401-408, 1955.
<https://doi.org/10.1017/s0031182000027736>

WOLFE, N.D. *et al.* Wild primate populations in emerging infectious disease research: the missing link?. **Emerging infectious diseases**, v.4, n.2, 149-158, 1998.
<https://doi.org/10.3201/eid0402.980202>

YOUNG, H. *et al.* Does habitat disturbance increase infectious disease risk for primates? **Ecology letters**, v. 16, n. 5, p. 656-663, 2013.
<https://doi.org/10.1111/ele.12094>