

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ANIMAIS SELVAGENS

Identificação de Uakari-careca (*Cacajao calvus* ssp.) e levantamento
de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* de espécimes em
semiliberdade, Iquitos, Peru

PEDRO PAULO DE OLIVEIRA NOGUEIRA

BOTUCATU, 2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ANIMAIS SELVAGENS

Identificação de Uakari-careca (*Cacajao calvus* ssp.) e levantamento
de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* de espécimes em
semiliberdade, Iquitos, Peru

PEDRO PAULO DE OLIVEIRA NOGUEIRA

Dissertação apresentada junto ao Programa
de Pós- Graduação em Animais Selvagens
como parte dos requisitos para a obtenção do
título de Mestre.

Orientadora: Profa. Assoc. Lígia Souza Lima
Silveira da Mota.

BOTUCATU, 2023

N778i Nogueira, Pedro Paulo de Oliveira
Identificação de Uakari-careca (*Cacajao calvus* ssp.) e levantamento de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* de espécimes em semiliberdade, Iquitos, Peru / Pedro Paulo de Oliveira Nogueira. -- , 2023
96 p. : tabs., fotos, mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu,
Orientadora: Lígia Souza Lima Silveira da Mota

1. Uakari-vermelho-peruano. 2. identificação. 3. leishmaniose. 4. doença de chagas. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp.
Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu.
Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser
modificada.

A minha mãe Cláudia, por me ensinar a sonhar.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Cláudia, que exerce seu papel com excelência sendo minha melhor amiga em momentos de alegria e dificuldade. Obrigado por estar presente comigo em todas as fases da vida me inspirando, dando suporte e acreditando nos meus sonhos.

A minha orientadora professora Lígia, que depois de anos de convivência considero uma segunda mãe. Obrigado pelos anos de apoio, ensinamento e por sempre ser uma inspiração para mim.

A minha irmã Bia por anos de descontração e apoio durante nossa vida.

Ao meu amigo Guilherme que muito mais que um amigo se tornou um irmão depois de tantos anos juntos. Obrigado por ser a pessoa que posso falar sobre tudo, pelas risadas e apoio em todos os momentos.

A minha amiga Maira por todos os momentos e comidas maravilhosas que tornaram esses anos em Botucatu ainda mais especial.

A Maria Luiza, por todo suporte e companheirismo em nossos anos de graduação. Uma amiga que levo para toda vida como alguém que posso contar em todos os momentos.

A Camila, Carol e Lucas, meus amigos que proporcionam momentos únicos, anos de apoio e por me mostrarem que não há nada melhor do que ser quem a gente é de verdade.

A minhas amigas do Laboratório de Genética Animal Larissa e Bruna pelas conversas e por todos os ensinamentos ao longo desses anos. Saio desse mestrado com experiências e conhecimentos que só foram possíveis com o auxílio e vivência de vocês.

Aos Colegas Luís e Guilherme pela vivência incrível que pudemos ter em Iquitos e pelo suporte na coleta das amostras para este projeto.

A todos os servidores e colaboradores do Departamento de Ciências Biológicas e Químicas, setor de Genética, por todos os anos de convivência. Em especial a Val por me auxiliar nos primeiros passos dentro do departamento.

À Comissão Examinadora do Exame Geral de Qualificação Prof. Assoc. Adriane Pinto Wasko e Prof. Titular Jean Carlos Ramos da Silva pelas sugestões que contribuíram para a conclusão deste projeto.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia por ser minha casa durante todos esses anos e ao Programa de Pós-Graduação em Animais Selvagens.

À Re:Wild e a Margot Marsh Biodiversity Foundation pelo financiamento deste

projeto por meio do Primate Action Fund.

Ao Centro de Resgate “Pilpintuwasi” por permitir a realização do projeto e a seus servidores pelo suporte na coleta das amostras.

À Pró-Reitoria de Pós-Graduação da UNESP pela concessão da bolsa de estudos.

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

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Informações referentes a sexo, idade (anos) e peso (kg) dos espécimes amostrados.....	25
Tabela 2. Avaliação de sensibilidade dos conjuntos de <i>primers</i> na detecção de patógenos em diferentes diluições.....	29
Tabela 3: Amostras de sangue com seus respectivos valores de concentração (ng/μL) e qualidade (razão de absorbância 260/280 nm) de DNA.....	33
Tabela 4. Valores obtidos na ferramenta BLAST à partir do sequenciamento Sanger empregando <i>primer</i> CacajaoID.....	35
Tabela 5. Valores obtidos na ferramenta BLAST à partir do sequenciamento por nanoporos empregando o MinION (Nanopore Oxford).....	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. As cinco espécies de <i>Cacajao calvus</i> descritas por Hershkovitz (1987) e Silva et al. (2022) sendo: A- <i>C. amuna</i> B- <i>C. calvus</i> , C- <i>C. novaesi</i> , D- <i>C. rubicundus</i> , E- <i>C. ucayalii</i>	15
Figura 2. Extensão de ocorrência de <i>Cacajao calvus</i> ssp.....	16
Figura 3. Espécime de <i>Cacajao calvus ucayalii</i>	17
Figura 4. Punção venosa na veia femoral para coleta de amostra sanguínea.....	28
Figura 5. Local de ancoragem do conjunto de <i>primers</i> CacajaoID nas 4 subespécies descritas.....	30
Figura 6. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% da PCR para um fragmento do gene HSP70 em diferentes concentrações de DNA de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> . Coluna 1: Ladder 1Kb Plus (ABM® Opti-DNA Markers); Colunas 2 a 7: Amostra de DNA de <i>L. (V.) braziliensis</i> nas concentrações de 1; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001; 0,00001; 0,00001 ng respectivamente. As setas verdes indicam os valores do peso molecular e a seta vermelha indica o tamanho dos amplicons (330 pb).....	33
Figura 7. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% da PCR para um fragmento de kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> em diferentes concentrações de DNA deste protozoário. Coluna 1: Ladder 1Kb Plus (ABM® Opti-DNA Markers); Colunas 2 a 7: Amostra de DNA de <i>T. cruzi</i> nas concentrações de 1; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001; 0,00001; 0,00001 ng respectivamente. As setas verdes indicam os valores do peso molecular e a seta vermelha indica o tamanho dos amplicons (330 pb).....	34
Figura 8. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% da PCR para um fragmento do gene HSP70. Coluna 1: Ladder 1Kb Plus (ABM® Opti-DNA Markers); Coluna 2: controle positivo de <i>Leishmania amazonensis</i> ; Coluna 3 a 9: Amostra dos espécimes em estudo (1 a 7 respectivamente); Coluna 10: controle negativo. As setas verdes indicam os valores do peso molecular e a seta vermelha indica o tamanho dos amplicons (330 pb).....	34
Figura 9. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% da PCR para um fragmento de kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> . Coluna 1: Ladder 1Kb Plus (ABM® Opti-DNA Markers); Coluna 2: controle positivo de <i>T. cruzi</i> ; Coluna 3 a 9: Amostra dos espécimes em estudo (1 a 7 respectivamente); Coluna 10: controle negativo. As setas verdes indicam os valores do peso molecular e a seta vermelha indica o tamanho dos amplicons (330 pb).....	34
Figura 10. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% da PCR para um fragmento mitocondrial de <i>Cacajao calvus</i> ssp.. Coluna 1: Ladder 1Kb Plus (ABM® Opti-DNA Markers); Coluna 2 a 8: amostras dos espécimes de <i>Cacajao calvus</i> ssp.; Coluna 9: controle negativo. As setas verdes indicam os valores do peso molecular e a seta vermelha indica o tamanho dos amplicons (560 pb).....	35
Figura 11. Eletroforese em gel de agarose a 0,8% da PCR para um fragmento mitocondrial de <i>Cacajao calvus</i> ssp.. Os fragmentos amplificados para a espécie 3 estão positivos nas colunas 5 e 7.....	36

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

IUCN - União Internacional para Conservação da Natureza

PNH - Primatas não humanos

LC - Leishmaniose cutânea

LV - Leishmaniose visceral

LCL - Leishmaniose cutânea localizada

LCD - Leishmaniose cutânea difusa

LCM - Leishmaniose muco cutânea

PAHO - Organização Pan-Americana da Saúde

DC - Doença de Chagas

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

SERFOR - Serviço Nacional Florestal e de Fauna Silvestre

DEE - Departamento de Estudos Econômicos

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EPI - Equipamentos de Proteção Individual

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

µL – Microlitro

ng/ µL – Nanograma/ Microlitro

RCTT - Reserva Comunal Tamshiyacu Tahuayo

ha – Hectare

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	14
1 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
1.1 Introdução.....	14
1.2 <i>Cacajao calvus</i> ssp.....	14
1.2.1 Uakari-vermelho-peruano (<i>Cacajao calvus ucayalii</i>).....	16
1.3 Zoonoses e tripanossomíase.....	18
1.3.1 <i>Leishmania</i> spp. e a Leishmaniose.....	19
1.3.2 <i>Trypanosoma cruzi</i> e a Doença de Chagas.....	22
2 OBJETIVO.....	24
2.1 Objetivo geral.....	24
2.2 Objetivos específicos.....	24
3 MATERIAIS E METÓDOS.....	25
3.1 Local de estudo.....	25
3.2 Protocolo de COVID-19.....	26
3.3 Contenção física e química.....	27
3.4 Análises moleculares.....	28
3.4.1 Detecção de <i>Leishmania</i> sp.....	28
3.4.2 Detecção de <i>Trypanosoma cruzi</i>	29
3.4.3 Teste de sensibilidade.....	29
3.4.4 Sequenciamento Sanger.....	29
3.4.5 Sequenciamento por Nanoporos (MinION).....	31
3.5 Análise de dados.....	32
4 RESULTADOS.....	33
4.1 Extração de DNA.....	33
4.2 Detecção de <i>Leishmania</i> spp. e <i>Trypanosoma cruzi</i>	33
4.3 Análise genética.....	35
5 DISCUSSÃO.....	38
5.1 Levantamento de Zoonoses.....	38
5.2 Análises genéticas.....	40
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
APÊNDICE.....	53
CAPÍTULO II: TRABALHO CIENTÍFICO.....	58

ABSTRACT.....	59
INTRODUCTION.....	60
METHODS.....	62
RESULTS.....	66
DISCUSSION.....	69
ACKNOWLEDGMENT.....	72
REFERENCES.....	72
CAPÍTULO III: TRABALHO CIENTÍFICO.....	75
ABSTRACT.....	76
INTRODUCTION.....	77
MATERIALS AND METHODS.....	81
RESULTS.....	85
DISCUSSION.....	86
ACKNOWLEDGMENT.....	89
CONFLICT OF INTEREST STATEMENT.....	89
REFERENCES.....	90

RESUMO

NOGUEIRA, P.P.O. Identificação de Uakari-careca (*Cacajao calvus* ssp.) e levantamento de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* de espécimes em semiliberdade, Iquitos, Peru. Botucatu, 2023. 96 p. Dissertação (Mestrado em Animais Selvagens) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (FMVZ – UNESP).

Devido aos seus hábitos arbóreos e alimentação folivorosa-fruvorosa, primatas não humanos são altamente vulneráveis à destruição, fragmentação e degradação de seu habitat. Tais mudanças podem ser responsáveis pelo aparecimento de zoonoses infecciosas com resultados desfavoráveis à saúde humano-animal e ao meio ambiente. Os Uakaris-careca são endêmicos da região ocidental amazônica sendo divididos em quatro subespécies: *C. calvus calvus*, *C. c. rubicundus*, *C. c. ucayalii* e *C. c. novaesi*. Atualmente, o diagnóstico de subespécie das populações selvagens é feito com a observação do padrão de coloração de pelagem dos espécimes. O Uakari-vermelho-peruano (*Cacajao calvus ucayalii*) está presente na fauna brasileira e peruana e é classificado como Vulnerável pela IUCN. Estudos demonstraram que suas áreas de habitat se encontram entre as regiões em risco de desmatamento para o plantio de dendê, a curto e longo prazo. Este projeto teve como objetivo realizar a identificação a nível taxonômico de subespécie os espécimes de *Cacajao calvus* ssp., e investigar o papel dos uakaris no ciclo de *Leishmania* spp. e *T. cruzi*. O estudo foi realizado empregando DNA extraído a partir de amostras de sangue obtidas de 7 animais vítimas de tráfico e que se encontram no Centro de Resgate “Pilpintuwasi”, Iquitos, Peru. Reações em cadeia da Polimerase (PCRs) empregando *primers*, tanto para a constatação da presença dos patógenos estudados bem como para a identificação a nível taxonômico de subespécie foram realizadas. Os produtos de PCR obtidos foram então purificados e sequenciados por meio das técnicas de Sanger e Nanoporos. Os resultados demonstraram diagnóstico negativo para a presença dos agentes causadores de leishmanioses e doença de Chagas. O conjunto de *primers* desenhado demonstrou-se eficiente em distinguir indivíduos das subespécies *C. c. ucayalii* e *C. c. novaesi*. Estudos como esses são primordiais para a correta identificação de indivíduos voltados para reprodução *ex situ*, permitindo o desenvolvimento de projetos que viabilizem ações palpáveis para a conservação desses primatas.

Palavras chave: Uakari-vermelho-peruano; identificação; leishmaniose; doença de chagas.

ABSTRACT

NOGUEIRA, P.P.O. Identification of Bald-uakari (*Cacajao calvus* ssp.) and survey of *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* of specimens in semi-freedom, Iquitos, Peru. Botucatu, 2022. 96 p. Dissertation (Master in Wild Animals) Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu Campus, São Paulo State University (FMVZ – UNESP).

Due to their arboreal habits and folivorous-fruitful feeding, non-human primates are highly vulnerable to the destruction, fragmentation and degradation of their habitat. Such changes may be responsible for the appearance of infectious zoonosis with unfavorable results to human-animal health and the environment. The Bald-uakaris are endemic to the western Amazon region and are divided into four subspecies: *C. calvus calvus*, *C. c. rubicundus*, *C. c. ucayalii* and *C. c. novaesi*. Currently, the subspecies diagnosis of wild populations is done with the observation of the coat coloration pattern of specimens. Peruvian-red-uakari (*Cacajao calvus ucayalii*) is present in Brazilian and Peruvian fauna and is classified as Vulnerable by the IUCN. Studies have shown that their habitat areas are among the regions at risk of deforestation for palm oil plantation in the short and long term. This project aims to perform the identification at the taxonomic level of subspecies of specimens of *Cacajao calvus* ssp., and investigate the role of uakaris in the *Leishmania* spp. and *T. cruzi* cycle. The study was carried out using DNA extracted from blood samples obtained from 7 animals that were victims of trafficking and which are at "Pilpintuwasi" Rescue Center, Iquitos, Peru. Polymerase chain reactions (PCRs) using specific primers, both for the verification of the presence of the pathogens studied as well as the identification at the taxonomic level of subspecies were performed. The PCR products obtained were then purified and sequenced using Sanger and Nanopore techniques. The results showed a negative diagnosis for the presence of agents causing leishmaniasis and Chagas disease. The set of primers designed was efficient in distinguish individuals of the subspecies *C. c. ucayalii* and *C. c. novaesi*. Studies such as these are paramount for the correct identification of individuals focused on *ex situ* reproduction, allowing the development of projects that enable tangible actions for the conservation of these primates.

Keywords: Peruvian-red-uakari; identification; leishmaniasis; chagas disease.

CAPÍTULO I

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Introdução

Mudanças climáticas e fragmentação de habitat resultam na perda da biodiversidade, bem como na degradação dos ambientes naturais, ameaçando todo um ecossistema responsável pela manutenção da vida. Tais mudanças podem ser responsáveis pelo aparecimento de zoonoses infecciosas com resultados negativos à saúde humano-animal e ao meio ambiente (SLEEMAN *et al.*, 2019). Deve-se atentar à vigilância de doenças que afetam a fauna, detectar doenças infecciosas emergentes e maior integração entre a saúde da fauna silvestre e seus impactos sobre os seres humanos (WOODS *et al.*, 2019). A Medicina da Conservação é uma disciplina emergente que aborda a crescente ameaça que os agentes etiológicos causam à biodiversidade. Essa manutenção depende da qualidade dos estudos realizados para a produção de dados e posterior planejamento dessas ações de conservação.

A União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) lista em três níveis a necessidade de conservar a biodiversidade, sendo eles a diversidade genética, espécies e ecossistemas (MCNEELY *et al.*, 2006). As questões genéticas estão associadas aos três. (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010). Devido a combinação de ações associadas ao homem (perda de habitat, superexploração, espécies introduzidas, poluição e mudanças climáticas) e eventos estocásticos associados a populações de tamanho reduzido (estocasticidade demográfica, ecológica e genética bem como catástrofes), espécies são levadas à extinção (SHAFFER, 1981), tipicamente interagindo em um feedback sinérgico (BROOK; SODHI; BRADSHAW, 2008) denominado "vórtice de extinção" (GILPIN & SOULÉ, 1986).

Entre o trabalho de reprodução de espécies ameaçadas *ex situ*, há a necessidade de um banco genético confiável, originário de animais puros. Os principais focos do manejo genético dessas populações são manter a diversidade genética e minimizar a endogamia (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010).

1.2 *Cacajao calvus* ssp.

Cacajao é o maior membro da família de primatas do Novo Mundo Pitheciidae, ela é endêmica da Floresta Amazônica e compreende os Uakari-preto (*C. melanocephalus*, *C. ayresi* e *C. hosomi*) e Uakari-careca (*Cacajao calvus* ssp.). Os Uakaris-careca são endêmicos da região ocidental amazônica, ocorrendo nas florestas das bacias dos rios Ucayali, Solimões e Juruá (SILVA JR. *et al.*, 2013). Quatro subespécies foram descritas

por Hershkovitz (1987): *C. calvus calvus*, *C. c. rubicundus*, *C. c. ucayalii* e *C. c. novaesi*. Recentemente, Silva *et al.* (2022) verificou que as quatro subespécies consideradas por Hershkovitz (1987) são monofiléticas, geograficamente bem separadas e incluem apenas indivíduos com padrões consistentes de coloração de pelagem considerados diagnósticos para cada uma delas. Com base nessas informações, foi proposto que os Uakaris sejam classificados a nível taxonômico de espécie e incluiu uma nova espécie que teria divergido na região do Rio Tarauacá, sendo ela *Cacajao amuna* (Figura 1).

Estes primatas possuem um sistema vascular complexo em sua face que lhe confere uma coloração avermelhada com ausência de pelos (MAYOR *et al.*, 2015). Todos os dados disponíveis sugerem distribuição irregular, em grande parte ao longo dos rios, raramente ocupando florestas não inundadas nas regiões mais centrais do interflúvio (SILVA JR. *et al.* 2013). Uma pesquisa realizada por Silva *et al.* (2021) coletou dados da literatura e, junto com pesquisa em campo, forneceu dados importante sobre a distribuição das 4 subespécies. Com a proposta de classifica-los como espécie e incluir *C. amuna* dentre eles, a distribuição foi reanalisada (SILVA *et al.*, 2022) (Figura 2).

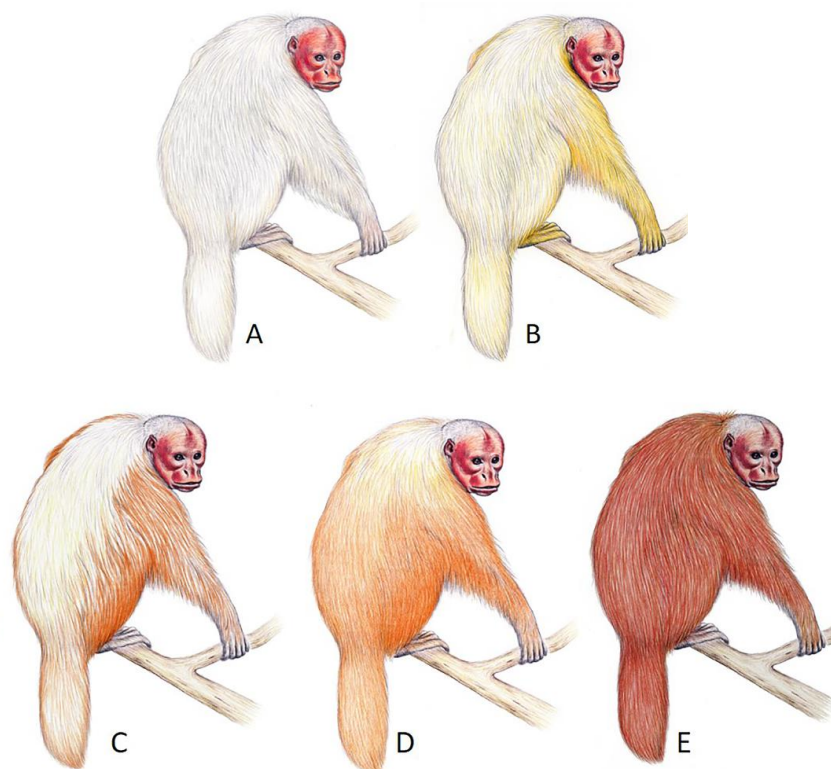


FIGURA 1. As cinco espécies de *Cacajao calvus* descritas por Hershkovitz (1987) e Silva *et al.* (2022) sendo: **A-** *C. amuna* **B-** *C. calvus*, **C-** *C. novaesi*, **D-** *C. rubicundus*, **E-** *C. ucayalii*
 Fonte: Stephen D. Nash.

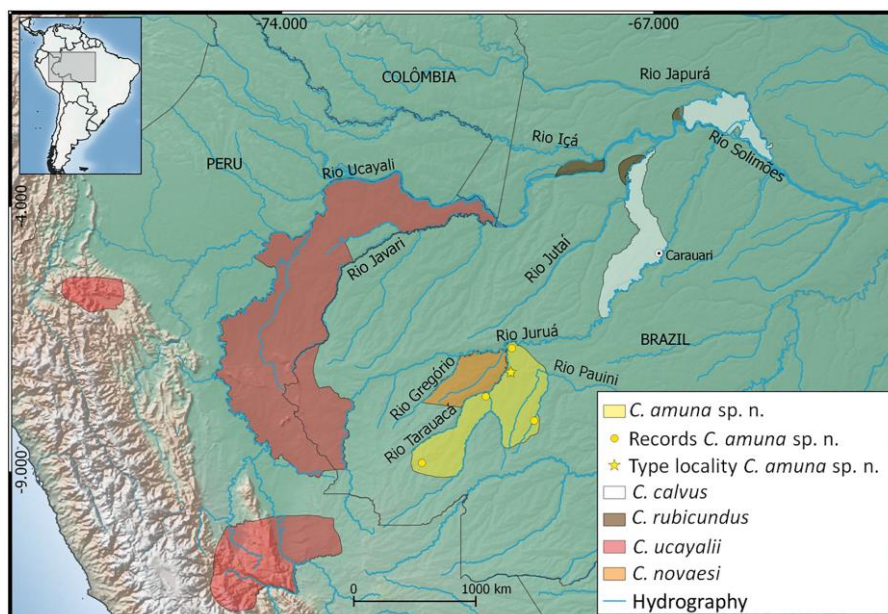


FIGURA 2. Extensão de ocorrência de *Cacajao calvus* ssp.
Fonte: SILVA *et al.*, 2022.

O trabalho realizado por Silva *et al.* (2022) utilizou análises filogenéticas demonstrando conformidade com as diferenças de pelagem em Cacajao. Utilizando o citocromo b e ddRADseq foi possível separar em dois grupos bem definidos os Uakari-brancos (*C. amuna* e *C. calvus*) e vermelhos (*C. novaesi*, *C. rubicundus* e *C. ucayalii*). A representação genômica em todo o genoma também recuperou uma estrutura dentro desses dois clados mostrando que as quatro subespécies consideradas por Hershkovitz (1987) são reciprocamente monofiléticas, além de terem caracteres diagnósticos únicos (SILVA *et al.*, 2022).

1.2.1 Uakari-vermelho-peruano (*Cacajao calvus ucayalii*)

O Uakari-vermelho-peruano (*Cacajao calvus ucayalii*) (Figura 3) está presente na fauna brasileira e peruana ocorrendo principalmente na Amazônia peruana e foi recentemente observado no Parque Nacional da Serra do Divisor, Acre, Brasil (SILVA *et al.*, 2021). Esta subespécie é a única encontrada em regiões de altitudes mais elevadas, sendo reportada na Serra de Contamana a 600-700m acima do nível do mar (AQUINO *et al.*, 2005; HEYMANN & AQUINO, 2010), nas montanhas da Cordilheira Cahuapanas a 1400m acima do nível do mar (VERMEER *et al.*, 2013) e na Serra do Divisor no Peru e Brasil (HEYMANN & AQUINO, 2010; JORGE & VELAZCO, 2006). A flexibilidade relatada em seus requisitos de habitats (HEYMANN & AQUINO, 2010; PERES, 1997) pode ser a chave para manter a população isolada nessas áreas.



FIGURA 3. Espécime de *Cacaiao calvus ucayalii*.
Fonte: Acervo pessoal do autor.

Em relação a outros indivíduos pertencentes aos Uakari, o status populacional de *C. c. ucayalii* é pouco estudado. Em pesquisa realizada por Bowler *et al.* (2013) na região da Concessão de Conservação de Lago Preto, Peru, o tamanho populacional foi estimado em 116,8 indivíduos/km². *Cacaiao c. ucayalii* é listada como vulnerável pela IUCN e sua população está decrescendo (BOUBLI *et al.*, 2020). As principais ameaças para a espécie são o desmatamento, a expansão da malha rodoviária e a caça (CALOURO, 2015). Uakaris tendem a viver em bandos de tamanhos variados que se dividem e reagrupam frequentemente, sendo “fissão-fusão” o termo utilizado para esse comportamento (AURELI *et al.*, 2008). Para *C. c. ucayalii* os grupos variam de 1 a mais de 200 indivíduos por bando, sendo mais comumente avistados grupos entre 20 e 50 indivíduos (BOWLER & BODMER, 2009).

A respeito de sua dieta, notamos seu papel na manutenção do ecossistema e sua importância para a dispersão de sementes. A mandíbula e dentição bem desenvolvidas desses animais (HERSHKOVITZ, 1987) permitem o consumo de uma grade variedade de frutos e sementes. Estudo realizado por Bowler & Bodmer (2011) na Concessão de Conservação de Lago Preto, Peru, demonstrou que seis dos dez frutos mais consumidos por *Cacaiao calvus ucayalii* foram classificados como médio-duro até muito duro, o que confirmou a seletividade por frutas mais duras na fase adulta ao invés de apenas consumi-las quando há baixa disponibilidade de frutas maduras. Ampliando para aspectos sociais relacionados à espécie, Alvarado *et al.* (2017) demonstraram a relação

de mamíferos e aves com povos nativos da região do Rio Abujao, Peru. Nesse estudo, foi observada a presença de *Cacajao calvus* em atividades de subsistência.

As atividades humanas fragmentaram florestas próximas a centros urbanos e atraíram mercado para produtos agrícolas, mesmo com a inacessibilidade de grande parte da região amazônica. Observa-se a rápida expansão da produção do óleo de dendê na América do Sul, impulsionada por incentivos econômicos, investimentos internacionais e grandes áreas ideais para sua produção (BUTLER & LAURANCE, 2009). Vijay *et al.* (2018) demonstraram que as áreas de habitat de *Cacajao calvus ucayalii* estão entre as regiões em risco de desmatamento para o plantio de dendê, a curto e longo prazo. Duas eco regiões estão em maior risco: floresta úmida (Napo, Solimões-Japurá, Ucayali e Sudoeste da Amazônia), que corresponde a 80,9% da conversão florestal em plantação de óleo de palma; e florestas de várzea (Iquitos e Purus), que correspondem a outros 19%.

1.3 Zoonoses e trimanossomíase

Com o estreitamento das relações entre humanos e animais domésticos com animais selvagens, o risco de circulação de agentes infecciosos e a transmissão de parasita para outras espécies se intensifica (TAYLOR *et al.*, 2001). A iniciativa da Saúde Única consiste em uma estratégia global que destaca a necessidade de uma abordagem holística e multidisciplinar que incorpore a expertise multissetorial no enfrentamento da saúde humana, animal e ambiental (HRISTOVSKI, 2010).

Devido aos seus hábitos arbóreos e alimentação folivorosa-fruvorosa, primatas não humanos (PNH) são altamente vulneráveis à destruição, fragmentação e degradação de seu habitat (CHALLENGER *et al.*, 2009; ESTRADA *et al.*, 2003). A consequência desse processo é o aumento da oportunidade de contato entre humanos, animais domésticos e animais selvagens (DEEM *et al.*, 2001; JANSEN *et al.*, 2018; MCCALLUM & DOBSON, 2002; OSTFELD & KEESING, 2000). Estudo realizado por Patz *et al.* (2000) demonstrou que a fragmentação do habitat pode elevar ou diminuir a prevalência de doenças dentro de uma espécie hospedeira, dependendo da biologia específica da relação hospedeiro-parasita.

O crescimento das cidades, desmatamento, a expansão da agricultura e a manutenção da fauna silvestre mantidas sob cuidado humano promoveram a interação entre primatas neotropicais e humanos, aumentando o risco de propagação de zoonoses. Portanto, estudar e compreender essa relação fornece informações pertinentes dentro de

um escopo epidemiológico, permitindo a aquisição de conhecimento a respeito da dinâmica de transmissão, papel sentinela do hospedeiro e riscos de surgimento de doenças (AYSANOVA *et al.*, 2017).

PNH podem servir como sentinelas para estudos epidemiológicos uma vez que estes podem atuar como reservatório para patógenos humanos (WOLFE *et al.*, 1998). Estes estudos tendem a fornecer informações importantes para a compreensão da epidemiologia, dinâmica de transmissão e risco relacionados a antropozoonoses emergentes. O contato próximo entre esses mamíferos e seres humanos pode resultar em riscos de transmissão em ambientes urbanos e rurais, possivelmente levando a zoonoses emergentes. Comunidades na Amazônia frequentemente caçam animais selvagens para subsistência e podem inadvertidamente introduzir parasitas infecciosos em novas áreas (AYSANOVA *et al.*, 2017).

Primatas oriundos de tráfico ilegal e de programas de conservação da biodiversidade são geralmente reintroduzidos na natureza sem um rastreamento detalhado de doenças. Assim, a disponibilidade de protocolos eficientes para detecção de tripanossomos pode mitigar riscos a populações residentes integras expostas a animais reintroduzidos ou translocados (LISBOA *et al.* 2004).

Tripanossomas são parasitas protozoários que infectam todas as classes de vertebrados do mundo inteiro. Seu ciclo de vida geralmente alterna entre hospedeiros vertebrados e uma variedade de hospedeiros invertebrados hematófagos que agem como vetores (PODLIPAEV, 2001). Existe uma variedade de espécies de *Trypanosoma*, mas apenas algumas representam um grave desafio à saúde pública e econômica. Essas doenças são invariavelmente fatais se não tratadas, apresentando uma variedade de patologias espectrais, incluindo doença cutânea severamente debilitante, e sintomas viscerais que podem ser fatais (COX, 2004). Os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* são os mais conhecidos dessa família e causam diversas doenças (HOARE, 1973), nas quais os mecanismos de interação parasita-hospedeiro-ambiente são complexos e carecem estudos (COOPER *et al.*, 2017).

1.3.1 *Leishmania* spp. e a Leishmaniose

Leishmaniose é uma doença transmitida por vetores causada por protozoários flagelados do gênero *Leishmania*. A doença é generalizada nas áreas tropical e subtropical e encontrada em países da Europa, África, Ásia e América (ALVAR *et al.*, 2012). No entanto, mais de 90% dos novos casos ocorrem em apenas 13 países

(Afeganistão, Argélia, Bangladesh, Bolívia, Brasil, Colômbia, Etiópia, Índia, Irã, Peru, Sudão do Sul, Sudão e Síria) (WHO, 2022). Estima-se que entre 0,9 e 1,7 milhão de pessoas são recém-infectadas a cada ano, mas apenas uma pequena fração delas desenvolverá a doença e 20.000-30.000 eventualmente morrerão (WHO, 2022).

Os flebotomíneos são insetos conhecidos popularmente como “mosquito-palha” (*Lutzomyia longipalpis*) e geralmente se deslocam por apenas alguns metros, durante o crepúsculo ou à noite. Apenas mosquitos-palha fêmeas atacam mamíferos em busca do sangue necessário para concluir o desenvolvimento dos ovos. Algumas mosquitos-palha se alimentam de sangue oriunda de uma ampla gama de canídeos, roedores e marsupiais, enquanto outras estão se alimentando principalmente de sangue humano. Assim, a leishmaniose humana pode ter padrões de transmissão zoonótica ou inter-humanos (STEVRDING, 2017).

Em seu hospedeiro mamífero, os parasitas *Leishmania* vivem e se multiplicam intracelularmente em células fagocíticas dentro dos chamados fagolisossomos. Atualmente, existem 18 espécies diferentes de *Leishmania* descritas que são patogênicas para humanos (AKHOUNDI *et al.*, 2016; ESPINOSA *et al.*, 2016; SHAW *et al.*, 2015). Embora as diferentes espécies de *Leishmania* sejam morfologicamente muito semelhantes, elas causam duas formas clínicas principais, leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose visceral (LV), dependendo de quais tipos de células fagocíticas são invadidas. Na LC, os parasitas infectam macrófagos residentes na pele. Quando a célula hospedeira está cheia de parasitas, ela se rompe e os amastigotos liberados infectarão macrófagos vizinhos (MARCONDES, 2011). Em LV, no entanto, os amastigotos liberados são espalhados pela circulação sanguínea e infectam células do sistema de fagócitos mononucleares (sistema reticulo-endotelial) de fígado, baço, medula óssea, linfonodos e intestino (MARCONDES, 2011).

A forma mais comum de leishmaniose é a LC com 0,6-1,0 milhões de novos casos ocorrendo anualmente em todo o mundo (WHO, 2022). A LC ocorre em três formas diferentes, leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose muco cutânea (LMC) (TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017). A LCL é caracterizada por lesões cutâneas e úlceras em partes expostas do corpo, deixando cicatrizes permanentes. LCD é menos comum e distingue-se da LCL pelo desenvolvimento de nódulos múltiplos e lentamente progredindo sem ulceração envolvendo todo o corpo. A LMC está restrita à América Latina. Após a cicatrização da lesão inicial da pele, a doença se espalha para as membranas mucosas do nariz, boca e

garganta. Posteriormente, as úlceras mucosas causam destruição do septo nasal, lábios e paladar levando a uma extensa desfiguração facial. A LV é a forma mais grave de leishmaniose, com uma estimativa de surgimento de 50-90 mil novos casos anualmente em todo o mundo (WHO, 2022). Sem tratamento, a LV é fatal em mais de 95% dos casos.

O aumento do número de casos de leishmaniose observados nos últimos 25 anos em todo o mundo deve-se a diversos fatores. A globalização e as mudanças climáticas são dois fatores que contribuem para a disseminação da leishmaniose para áreas não endêmicas (SHAW, 2007). Por exemplo, nas últimas décadas, o número de casos de leishmaniose em viajantes internacionais (turistas e empresários) aumentou (MANSUETO *et al.*, 2014). Além disso, o tráfego internacional de produtos sanguíneos resultou em infecções por *Leishmania* de pacientes que nunca viajaram para regiões endêmicas da leishmaniose (SHAW, 2007). Há também evidências de que o aquecimento global estenderá a distribuição de flebotomíneos mais ao norte, o que poderia resultar na transmissão da leishmaniose em regiões até então não endêmicas (ASPÖCK *et al.*, 2008; SHAW, 2007).

Em 2020, foram notificados 39.705 casos de LC à Organização Pan-Americana da Saúde (PAHO) por 17 países endêmicos e cerca de 3.400 novos casos de LV (PAHO/WHO, 2021). Devido à grande dispersão de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* nas Américas, a pesquisa e o levantamento de possíveis reservatórios da doença se tornam essenciais. Especialmente no caso de animais vítimas de tráfico, já que podem ter tido contato com diferentes doenças.

Devido à diversidade de vetores, reservatórios e atividades humanas, a Amazônia peruana é uma área endêmica para a leishmaniose (ZORRILLA *et al.*, 2017). A interação entre essa zoonose e animais silvestres foi alvo do estudo de Roque & Jansen (2014), que coletou dados sobre a ocorrência da doença nas Américas. No Peru, Gambá-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*) e Camundongo-das-montanhas (*Phyllotis andinum*) foram identificados como reservatórios potenciais e hospedeiros do parasita, respectivamente (LLANOS-CUENTAS *et al.*, 1999). Além disso, em países fronteiriços ao Peru, há uma ampla gama de animais associados à leishmaniose (ROQUE & JANSEN, 2014), incluindo primatas da região Amazônica brasileira dos gêneros *Sapajus* (*Cebus apella*, *Cebus xanthosternos*), *Chiropotes* (*Chiropotes satanas*), *Aotus* (*Aotus nigriceps*), *Pithecia* (*Pithecia irrorata*), *Saguinus* (*Saguinus imperator*) e *Ateles* (*Ateles paniscus*). Estes dados demonstram a necessidade de identificar possíveis

reservatórios e hospedeiros.

Animais silvestres são suscetíveis à infecção e os primatas neotropicais são de grande importância pela possibilidade de atuarem como reservatórios para esses patógenos (ROVIROSA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2021; SOLÓRZANO-GARCÍA & PÉREZ-PONCE DE LEÓN, 2018). Portanto, a compreensão da Saúde Única na leishmaniose mostra sua importância, pois humanos e animais podem ser infectados por *Leishmania* spp. e compartilhar o mesmo ambiente, tornando necessário monitorar a doença em humanos e outros animais (KARDJADJ & BEN-MAHDI, 2019).

1.3.2 *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas

A Doença de Chagas (DC) é considerada a principal doença parasitária das Américas, afetando principalmente pessoas em ambientes rurais e com baixo status socioeconômico (CDC, 2019; WHO, 2022). Essa doença tropical negligenciada é endêmica em 21 países latino americanos, incluindo o Peru com 964 casos reportados entre 2000 e 2015 (WHO, 2022). Porém, estes números provavelmente são subestimados, já que esta doença é frequentemente assintomática. O *Trypanosoma cruzi* é endêmico nas Américas do Sul e Central, causando a doença de Chagas (Tripanossomíase americana) em aproximadamente 8-9 milhões de indivíduos infectados, e aproximadamente 14.000 mortes por ano (HOTEZ *et al.*, 2008). O diagnóstico da DC é complexo devido à dinâmica do parasita nas duas fases sucessivas da doença: uma fase aguda diagnosticada pela detecção direta do parasita circulante na corrente sanguínea (microscopia) onde o parasita é abundante e uma fase crônica onde o parasita está escondido nos tecidos hospedeiros e o diagnóstico geralmente é feito por meio da detecção de anticorpos contra *T. cruzi* (sorologia) (WHO, 2022).

DC é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* que é tipicamente transmitida por um inseto hematófago, triatomíneo (Hemiptera: Reduviidae), para diversas espécies de mamíferos, incluindo humanos (LEÃO *et al.*, 2013; ZINGALES *et al.*, 2011). Também há relatos de transmissão congênita, via transfusão de sangue, transplante de órgão, via oral e infecção acidental (LUQUETTI & SCHMUÑIS, 2010).

O consumo de sangue de animal infectado ou carne malcozida ou crua, também representa risco de transmissão pela presença de sangue tripomastigota e tecido amastigota (PEREIRA *et al.* 2010; RUEDA *et al.*, 2014). Estas vias de infecção devem ser mais comuns em regiões onde animais selvagens são consumidos ou comercializados em áreas urbanas. A prevalência de *T. cruzi* e outros

tripanossomatídeos em mamíferos frequentemente caçados na Amazônia peruana foi alvo de pesquisa de Morales *et al.* (2017). Os dados obtidos foram referentes a quatro ordens (Rodentia, Carnivora, Artiodactyla e Edentata), sendo observada uma prevalência de 38,3% de animais infectados com tripanossomatídeos e 5,0% de infectados com *T. cruzi*. A alta prevalência de *T. cruzi* e outros tripanossomatídeos em mamíferos selvagens caçados sugere um considerável reservatório silvestre de *T. cruzi* em locais remotos da Amazônia (MORALES *et al.*, 2017).

A DC é endêmica em toda região conhecida como Sul Maior do Peru, nos departamentos de Arequipa, Moquegua, Tacna, Ayacucho e Apurímac. Há registros de infestações generalizadas com o vetor *Triatoma infestans* e transmissão ativa da DC para humanos nesta área (BOWMAN *et al.*, 2008; CORNEJO & CARPIO, 2003). Além disso, os departamentos de Cajamarca, Amazonas, San Martín e Ucayali também detectaram a presença próspera do vetor *Panstrongylus herreri* (CORNEJO & CARPIO, 2003). Iquitos é uma cidade peruana localizada no departamento de Loreto. Alguns casos isolados da DC foram documentados na cidade e arredores (CABRERA *et al.*, 2010). No entanto, há pouco conhecimento sobre a prevalência e epidemiologia de *Trypanosoma cruzi* no norte do Peru (ALROY *et al.*, 2015); os recursos mais significativos foram alocados para os esforços de pesquisa e controle no Sul (ALROY *et al.*, 2015).

Estudos realizados por Aysanoa *et al.* (2017) com PNH presentes na Amazônia peruana demonstraram uma prevalência de 90,9% de tripanossomatídeos em *Pitheciidae*, representando a família com maior prevalência dentre as inclusas no estudo. A prevalência em relação a *T. cruzi* ficou em 4,5% para a família. Em ambos os casos, a prevalência foi maior para animais de vida livre em comparação aos mantidos sob cuidado humano, sugerindo que a transmissão destes parasitas em PNH ocorre mais ativamente no ciclo selvagem.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

O Centro de Resgate “Pilpintuwasi” presente na região de Iquitos, Peru, tem como projeto conservacionista a reprodução *ex situ* de espécimes de Uakari-vermelho-peruano. Para isso, 7 animais morfológicamente identificados como *Cacajao calvus ucayalii* são mantidos em semiliberdade no local. Empregando ferramentas de biologia molecular, este estudo teve como objetivo a identificação desses espécimes bem como o levantamento de zoonoses de importância para a região amazônica. E assim, a partir dos resultados obtidos, fornecer informações fundamentadas e confiáveis para as ações de manejo e conservação das populações de Uakari-vermelho-peruano a médio e longo prazo.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar a nível taxonômico de subespécie os espécimes de *Cacajao calvus* ssp. mantidos sob cuidados humanos em sistema de semiliberdade;
- Identificar a presença de DNA de *Leishmania* spp. em espécimes sob cuidados humanos de *Cacajao calvus* ssp.;
- Identificar a presença de DNA de *Trypanosoma cruzi* em espécimes sob cuidados humanos de *Cacajao calvus* ssp..

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto possui autorizações concedidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Campus de Botucatu, sob o protocolo 0046/2021 de 22/06/2021 e pelo Serviço Nacional Florestal e de Fauna Silvestre (SERFOR), do governo peruano, sob o protocolo N° D000319-2022-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS-DGSPFS de 31/05/2022.

3.1 Local de estudo

As coletas de material biológico foram realizadas no Centro de Resgate “Pilpintuwasi” localizado em Iquitos no Departamento de Loreto, Peru. A representante legal e gerente geral estava ciente e de acordo com a realização do projeto nas dependências do centro.

As amostras coletadas (Tabela 1) são oriundas de tráfico ilegal de animais selvagens e quando recuperados, são encaminhados para o centro de resgate pelo governo peruano. O Centro de Resgate “Pilpintuwasi” possui projeto com a subespécie (*C. c. ucayalii*) onde os filhotes nascidos no local são encaminhados para reintrodução. Todos os espécimes se encontram em situação de semiliberdade, com exceção do espécime 6 que, por ser o macho alfa do grupo, apresenta comportamento defensivo, sendo assim mantido em um recinto, porém com possibilidade de interação com os demais do grupo.

TABELA 1. Informações referentes a sexo, idade (anos) e peso (kg) dos animais amostrados.

ANIMAIS	SEXO	IDADE (anos)	PESO (kg)
1	F	05	4,25
2	F	04	3,95
3	F	11	4,70
4	F	07	3,90
5	F	03	3,70
6	M	09	4,20
7	M	01	3,30

Não foi possível coletar dados detalhados sobre a origem dos mesmos, porém, de acordo com os documentos fornecidos pela gerência do centro de resgate, os espécimes 1, 2, 3, 5 e 7 chegaram ao centro ainda jovens com idade inferior a 1 ano de vida. Os espécimes 4 e 6 chegaram ao Centro de Resgate “Pilpintuwasi” adultos, uma vez que haviam sido previamente encaminhados para outro centro de resgate da região.

O Departamento de Loreto ocupa uma extensão territorial de 368.852km², o equivalente a 28,1% de todo território nacional peruano (DEE, 2021). Faz fronteira com três países, sendo estes Equador, Colômbia e Brasil. De acordo com o Departamento de Estudos Econômicos (DEE) subdivisão de Loreto, contando com oito províncias, 53 distritos e uma população de 1.027.559 habitantes, Loreto é o distrito com a maior população indígena amazônica do país com 105.900 habitantes e é o mais diverso linguisticamente, com 27 línguas originárias (DEE, 2021). A pobreza monetária na região se encontrava entre de 35,1 e 40,1% em 2013, ocorrendo uma diminuição em 2017 ficando entre 33,3 e 36,8% (UNICEF, 2018). Todavia, estes valores permanecem a cima da média nacional.

Em relação ao clima, Loreto tem como característica ser quente, úmido e chuvoso. Com uma temperatura média anual de 22°C e máxima de 32°C, variando excepcionalmente a uma mínima de 17°C em alguns dias entre junho e julho, e uma máxima de 36°C entre outubro e janeiro (DEE, 2021). Possui duas estações bem definidas, sendo uma caracterizada por chuvas abundantes e aumento do nível dos rios, e outra com menos precipitações e diminuição do nível dos rios (GIA, 2019). Os dois principais ecossistemas presentes em Loreto são as florestas altas e florestas inundadas, sendo ambos influenciados pela dinâmica dos rios amazônicos (GIA, 2019).

3.2 Protocolo de COVID-19

Visando a segurança dos animais em estudo, seguimos as medidas estabelecidas pela Resolução Ministerial n° 0177-2020-MINAGRI de 31 de julho de 2020, sobre as atividades de fauna silvestre onde se tornou necessário o estabelecimento de protocolos para a implementação de medidas de vigilância, prevenção e controle da COVID-19 nas atividades faunísticas, formulado pelo SERFOR. Até o momento, não há evidências de transmissão cruzada entre humanos e primatas não humanos do Novo Mundo para COVID-19. Por enquanto a infecção *in vitro* de SARS-Cov-2 em macacos *Rhesus* saudáveis confirmou compatibilidade e consequente pneumonia em primatas (CHANDRASHEKAR *et al.*, 2020).

As boas práticas de biossegurança para profissionais que atuam diretamente no manejo de espécies silvestres incluem ações que sejam eficientes na proteção dos profissionais e animais contra possíveis infecções por qualquer agente que possa estar circulando no ambiente. A equipe de pesquisa utilizou Equipamentos de Proteção Individual (EPI) durante o manuseio, que consistiu em uso de máscara N95 (sem

válvula) ou similar (PFF3) com trocas entre procedimentos a cada 2 horas, avental descartável, luvas de látex, sapatos fechados e calças compridas (GILARDI *et al.*, 2015). Todos os participantes fizeram a higienização das mãos com álcool gel 70% antes de calçar luvas e demais EPIs.

3.3 Contenção física e química

O manejo teve como alvo sete espécimes de *Cacajao calvus* ssp. que após jejum de seis horas foram capturados de acordo com o grau de condicionamento e interação com os funcionários que trabalham no centro de resgate. Acostumados com este manejo, alguns primatas subiram nos ombros do zelador, que segurou os dois braços do animal, enquanto o veterinário se aproximou para ministrar em uma das pernas a injeção com os anestésicos. Para outros primatas não tão acostumados a esse manejo, foi utilizada um puçá para captura, que, por meio de giros em seu eixo, restringiu o movimento do animal permitindo o veterinário aplicar o anestésico (MILLER & FOWLER, 2014). No caso do macho alfa do grupo (Espécime 6) em estudo, que apresenta comportamento defensivo e está em ambiente isolado dos demais espécimes, para evitar o estresse da captura, foi utilizada uma zarabatana e dardo de 1mL para injetar os anestésicos, o qual foi aplicada na região mais protuberante da perna, sendo o músculo semimembranoso ou semitendinoso.

Os animais foram contidos quimicamente por administração intramuscular no músculo semimembranoso. Os anestésicos ministrados foram Midazolam 0,15mg/kg (Midanex®, AC Farma) associado a Dexmedetomidina 0,02mg/kg (Dexdomitor®, Zoetis). Posteriormente foi realizada a reversão anestésica com Atipamezol 0,2mg/Kg (Antisedan®, Zoetis). Parâmetros fisiológicos como frequência cardíaca e respiratória, saturação de oxigênio, pressão sistólica, diastólica e média e temperatura foram mensuradas ao longo do procedimento a cada 5 minutos, verificando a profundidade da sedação por meio da observação e checagem dos reflexos oculares e palpebrais. As amostras foram obtidas por punção venosa na veia femoral (Figura 4) (CAMPBELL *et al.* 2007; CUBAS, SILVA & CATAO-DIAS, 2014), com agulhas 21G x 1 ½” mm e seringas com capacidade de 5,0 mL. O volume de sangue coletado foi acondicionado em tubos contendo 5% de sal dissódico do ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e refrigerado para posterior extração de DNA.



FIGURA 4. Punção venosa na veia femoral para coleta de amostra sanguínea.
Fonte: Acervo pessoal do autor.

3.4 Análises moleculares

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Genética Animal do Departamento de Ciências Químicas e Biológicas do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP). Após as coletas de sangue, as amostras foram encaminhadas para o laboratório onde tiveram seu DNA extraído. A extração foi feita com o uso do kit comercial Cellco® *Blood and Animal Cells DNA Preparation Kit* seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Foram realizadas análises quantitativas e qualitativas com o auxílio de um espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer – Thermo Fisher Scientific).

3.4.1 Detecção de *Leishmania* sp.

Para a detecção da presença de fragmentos de DNA de *Leishmania* spp. nas amostras dos animais em estudo, foram empregados *primers* de segmentos de DNA dos genes codificadores de proteínas de choque térmico de 70kD (HSP70) de *Leishmania* HSP70F (5' AGGTGAAGGCGACGAACG 3') e HSP70R (5' CGCTTGTCCATCTTTGCGTC 3') (FOLGUEIRA *et al.*, 2007) que amplificam uma sequência de aproximadamente 330 pb.

As Reações em Cadeia da Polimerase (PCRs) foram realizadas no termociclador Eppendorf® Mastercycler® Nexus X2 com um volume final de 50µL, contendo: 20µL de 2,0x Taq DNA Polymerase Master Mix (Class Five PCR Master Mix), 0,5µL de cada primer, 1µL de DNA genômico (50ng/µL) e 28µL de água ultrapura. As reações foram , realizadas em triplicata e seguindo o seguinte perfil térmico: desnaturação inicial a 94°C

por 5 minutos, seguido de 40 ciclos a 94°C por 1 minuto, 59°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 10 minutos.

Cada ensaio foi composto por 10ng de DNA de *L. (Leishmania) amazonenses* (MHOM/BR/71973/M2269); *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/2002/LPC-RPV); *L. (L.) major* (MHOM/IL/1980/FRIEDLIN) e *L. (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) como controles positivos, além de água ultrapura como controle negativo.

3.4.2 Detecção de *Trypanosoma cruzi*

Os mesmos padrões de volume e concentração foram utilizados para detecção de *Leishmania* spp. foram empregados para detectar a presença de DNA de *T. cruzi* nos animais em estudos. Cada ensaio foi composto por 10ng de DNA extraído de cultivo *in vitro* da cepa CL Brener de *T. cruzi* e água ultrapura como controle negativo.

O conjunto de *primers* empregado foi o 121 (5' AAAATAATGTACGGGKGAGATGCATGA 3') e 122 (5' GGTTCGATTGGGGTTGGGTAATATA 3') (VIRREIRA *et al.*, 2003) que amplificam uma sequência de 330 pb do DNA do cinetoplasto (kDNA) do protozoário, realizando reações em triplicata e seguindo o seguinte perfil térmico: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 33 ciclos a 94°C por 1 minuto, 59°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 10 minutos.

3.4.3 Teste de sensibilidade

A sensibilidade dos conjuntos dos *primers* utilizados para a detecção de *Leishmania brasiliensis* e *T. cruzi* foi estimada pela avaliação da amplificação do DNA extraído de ambos os protozoários. As amostras foram diluídas em série na solução de DNA (Tabela 2) (VIRREIRA *et al.*, 2003) e foram feitas PCRs em duplicatas com os mesmos volumes, concentrações e perfis térmicos citados anteriormente.

TABELA 2. Avaliação de sensibilidade dos conjuntos de *primers* na detecção de patógenos em diferentes diluições.

DILUIÇÕES	A	B	C	D	E	F	G
Quantidade De DNA Por Diluição (ng)	1	0,1	0,01	0,001	0,0001	0,00001	0,000001

3.4.4 Sequenciamento Sanger

Para as análises referentes a identificação genética dos espécimes em estudo, foi desenhado um par de *primers* com auxílio do programa Primer3Plus (UNTERGASSER *et al.*, 2007). Para isso, sequências do genoma mitocondrial completo das quatro

subespécie de *Cacajao calvus* (JANIAK *et al.*, 2022) foram selecionadas do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Com isso foi observada e selecionada a região onde houve maior discrepância entre as subespécies. Esta região foi identificada como a região controle (*D-loop*) sendo esta classificada como a porção mais variável do DNA mitocondrial (mtDNA) em nível intraespecífico.

Na seleção de oligonucleotídeos no programa Primer3Plus foram considerados parâmetros de temperatura de fusão, comprimento, conteúdo de Citosinas e Guaninas, estabilidade 3', estrutura secundária estimada, probabilidade de anelamento ou amplificação de sequências, a probabilidade de formação de *primer*-dímero entre duas cópias do mesmo primer e a precisão da sequência de origem.

O conjunto de *primers* empregado foi denominado CacajaoID, sendo o *forward* CacajaoID_F (5' TTCCACCGTCAACACCCAAA 3') e o *reverse* CacajaoID_R (5' GTAGGAACCAGCTGCCCATT 3'), sendo estes do tipo *Sequence Tagged Sites* (STS). Foi observado que o conjunto de *primers* desenhado demonstrou possibilidade de ancoragem para todas as subespécies descritas (Figura 5). O conjunto amplifica uma sequência de ~560pb do mtDNA, realizando reações em triplicata e seguindo o seguinte perfil térmico: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos a 95°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 10 minutos.

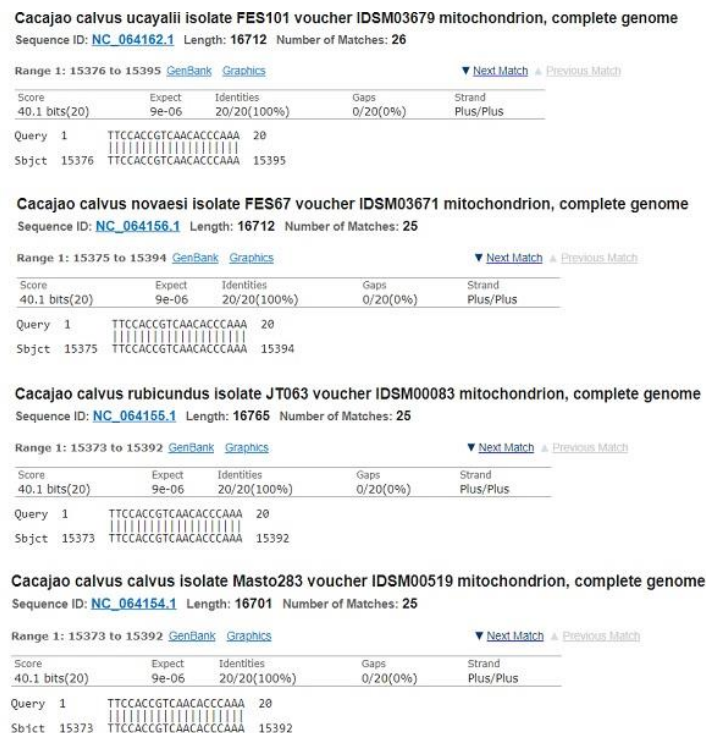


FIGURA 5. Local de ancoragem do conjunto de *primers* CacajaoID nas 4 subespécies descritas.

Os produtos amplificados em PCR foram observados em gel de eletroforese a 1,5% e purificados com mix de Exonuclease/Fosfatase alcalina. Os fragmentos foram sequenciados em ambas as direções utilizando o 2 µL BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit versão 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA), 2 µL de 2,5 Save Money (400 mM Tris-HCl pH 9, 0,10 mM MgCl₂) e 5pmol de cada *primer* no ABI3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) seguindo as instruções do fabricante.

3.4.5 Sequenciamento por Nanoporos (MinION)

Visando validar os dados obtidos na identificação a nível taxonômico de subespécie dos espécimes em estudo, foi realizado no Laboratório de Genética Molecular da Escola Politécnica da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), a amplificação de um fragmento de ~8670pb do Espécime 3. Para isso, um par de *primers* foi desenhado com base em uma sequência de referência para *Cacajao calvus ucayalii*, disponível no GenBank do NCBI (ID: OM328913.1). Os *primers* obtidos foram o Cacajao_Frag1_F (5' CCCAGTACAGCCCATTACC 3'), e Cacajao_Frag1_R (5' AAAGCGGATAGGGCTCCTGTA 3'). A PCR foi realizada com a enzima Invitrogen™ Platinum SuperFi II DNA Polymerase em um volume final de 25µL e seguindo as recomendações do fabricante.

Após a etapa de amplificação 5µL foram utilizados para avaliação da amplificação por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%. Uma vez confirmada amplificação, uma fração desse material amplificado foi utilizado para a etapa de sequenciamento.

Para a realização do sequenciamento por meio do equipamento MinION (Nanopore Oxford), é conduzida a etapa de preparo da biblioteca. Para tanto, seguimos o protocolo do produto: NEBNext® Companion Module for Oxford Nanopore Technologies® Ligation Sequencing, tubos de 1,5mL Eppendorf DNA LoBind, tubos de 0,2mL thin-walled PCR, água ultrapura e etanol 70% preparados com água ultrapura. O processo de preparo da biblioteca envolve duas etapas, sendo a primeira quando os terminais dos produtos amplificados são reparados. Para este procedimento e seguindo o protocolo já indicado do equipamento são empregadas enzimas (England Biolabs) que vão catalisar várias reações. Na segunda etapa, segue-se então com a rotina para a ligação dos adaptadores nos terminais dos produtos amplificados.

Após o preparo da biblioteca, quantificou-se o DNA e, uma alíquota foi utilizada para a etapa de sequenciamento propriamente dita. O processo de sequenciamento foi executado como uma rotina padrão do sequenciador empregando para tanto o software

MinION (Oxford Nanopore™). Após o processo de sequenciamento, os dados referentes as leituras dos sinais elétricos que foram realizadas pelo MinION durante a passagem do DNA nos poros da célula de leitura, devem ser decodificados a fim de indicar qual a base que passou pelo pólo de leitura. Esse processo de decodificação é chamado de *Basecalling* e é executado pelo programa Guppy (Oxford Nanopore™). Em seguida as leituras em formato FASTAQ foram recuperadas e foi possível prosseguir com as análises com auxílio de ferramentas de bioinformática.

3.5 Análise de dados

As sequências obtidas e os eletroferogramas foram analisados em Geneious v.10.0.9 (Biomatters, Auckland, Nova Zelândia), alinhados com o algoritmo *Muscle* e verificados manualmente. As sequências foram comparadas com as sequências genéticas que pertencem as 4 subespécies descritas para *Cacajao calvus* ssp. e espécies filogeneticamente semelhantes usando a ferramenta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4 RESULTADOS

4.1 Extração de DNA

As amostras de sangue tiveram seu DNA extraído e os valores referentes a concentração e qualidade são apresentadas na Tabela 3. A partir da avaliação da integridade do material por espectrofotometria, constatou-se que as 7 amostras de DNA apresentaram seus valores entre 1,70 a 1,90, o que reflete um material de boa qualidade, sem contaminações por proteína.

TABELA 3: Amostras de sangue com seus respectivos valores de concentração (ng/μL) e qualidade (razão de absorbância 260/280 nm) de DNA.

ESPÉCIME	ng/μL	260/280
1	24,85	1,86
2	23,50	1,80
3	17,01	1,72
4	32,13	1,86
5	12,00	1,80
6	13,24	1,80
7	21,40	1,77

4.2 Detecção de *Leishmania* spp. e *Trypanossoma cruzi*

Os testes de sensibilidade realizados com os *primers* selecionados mostrou ampliações do fragmento desejado até a diluição de 0,001ng de DNA para *Leishmania brasiliensis* (Figura 5). Para *T. cruzi* o conjunto de *primers* demonstrou ainda mais sensível amplificando o fragmento desejado até a diluição de 0,000001ng (Figura 6).

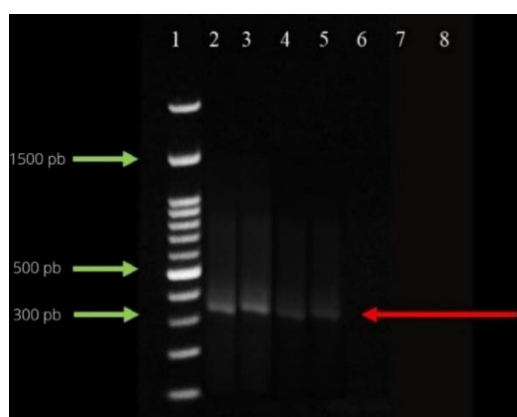


FIGURA 6. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% da PCR para um fragmento do gene HSP70 em diferentes concentrações de DNA de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Coluna 1: Ladder 1Kb Plus (ABM® Opti-DNA Markers); Colunas 2 a 7: Amostra de DNA de *L. (V.) braziliensis* nas concentrações de 1; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001; 0,00001; 0,000001 ng respectivamente. As setas verdes indicam os valores do peso molecular e a seta vermelha indica o tamanho dos amplicons (330 pb).

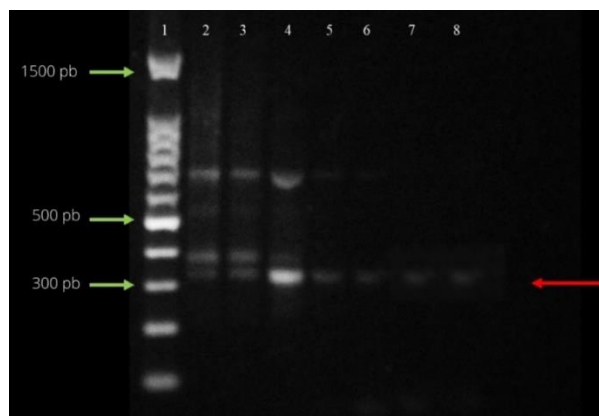


FIGURA 7. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% da PCR para um fragmento de kDNA de *Trypanosoma cruzi* em diferentes concentrações de DNA deste protozoário. Coluna 1: Ladder 1Kb Plus (ABM® Opti-DNA Markers); Colunas 2 a 7: Amostra de DNA de *T. cruzi* nas concentrações de 1; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001; 0,00001; 0,00001 ng respectivamente. As setas verdes indicam os valores do peso molecular e a seta vermelha indica o tamanho dos amplicons (330 pb).

Todas as amostras de sangue obtiveram diagnóstico negativo para a presença dos agentes causadores de leishmanioses (Figura 7) e doença de Chagas (Figura 8).

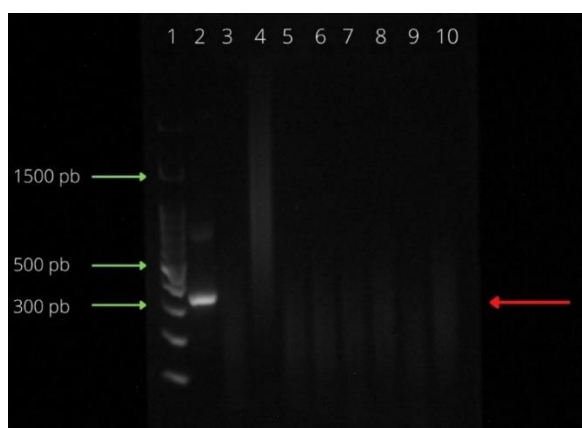


FIGURA 8. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% da PCR para um fragmento do gene HSP70. Coluna 1: Ladder 1Kb Plus (ABM® Opti-DNA Markers); Coluna 2: controle positivo de *Leishmania amazonensis*; Coluna 3 a 9: Amostra dos espécimes em estudo (1 a 7 respectivamente); Coluna 10: controle negativo. As setas verdes indicam os valores do peso molecular e a seta vermelha indica o tamanho dos amplicons (330 pb).

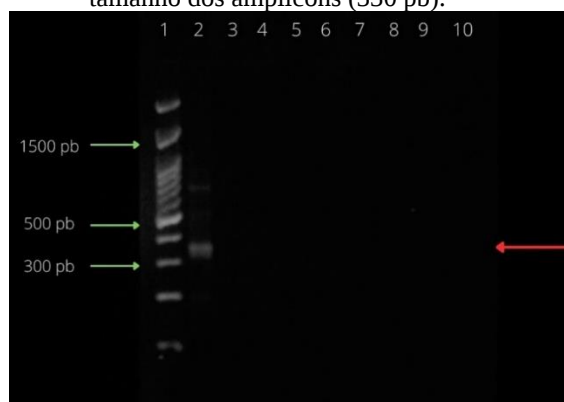


FIGURA 9. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% da PCR para um fragmento de kDNA de *Trypanosoma cruzi*. Coluna 1: Ladder 1Kb Plus (ABM® Opti-DNA Markers); Coluna 2: controle positivo de *T. cruzi*; Coluna 3 a 9: Amostra dos espécimes em estudo (1 a 7 respectivamente); Coluna 10: controle negativo. As setas verdes indicam os valores do peso molecular e a seta vermelha indica o tamanho dos amplicons (330 pb).

4.3 Análise genética

O conjunto de *primer* CacajaoID apresentou amplificação do segmento de ~560pb em todos os espécimes (Figura 9). A partir daí, os produtos de PCR foram purificados e sequenciados. Os resultados do sequenciamento (Apêndice 1) foram analisados por meio da ferramenta BLAST com o intuito de diferenciá-los a nível taxonômico de subespécie (Tabela 4).

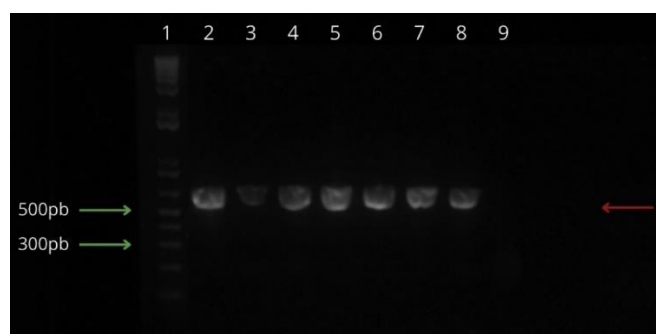


FIGURA 10. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% da PCR para um fragmento mitocondrial de *Cacajao calvus* ssp.. Coluna 1: Ladder 1Kb Plus (ABM® Opti-DNA Markers); Coluna 2 a 8: espécimes de *Cacajao calvus* ssp.; Coluna 9: controle negativo. As setas verdes indicam os valores do peso molecular e a seta vermelha indica o tamanho dos amplicons (560pb).

TABELA 4. Valores obtidos na ferramenta BLAST com os sequenciamentos Sanger referentes ao *primer* CacajaoID.

ESPÉCIMES	COBERTURA	E-VALUE	% DE IDENTIDADE	SUBESPÉCIE	SEQUÊNCIA REFERÊNCIA
1	100%	0,0	95,24	<i>C.c. ucayalii</i>	OM328913.1
2	100%	4e-121	91,21	<i>C.c. ucayalii</i>	OM328913.1
3	100%	0,0	98,18	<i>C. c. novaesi</i>	NC_064156.1
4	100%	0,0	98,71	<i>C.c. ucayalii</i>	NC_064162.1
5	100%	0,0	93,84	<i>C.c. ucayalii</i>	NC_064162.1
6	100%	0,0	95,39	<i>C.c. ucayalii</i>	OM328913.1
7	100%	0,0	98,43	<i>C. c. novaesi</i>	NC_064156.1

Todas as amostras apresentaram cobertura de 100% quando comparadas a sequencias referencia do NCBI. O *e-value* diz respeito ao valor estatístico (probabilidade) que apontará se o alinhamento é real ou foi obtido ao acaso pelo banco de dados, resultando em um falso positivo. Ou seja, quanto mais próximo de zero o *e-value* obtido, menores serão as chances do resultado apresentado ser casual. Todos os

espécimes apresentaram um *e-value* igual ou próximo de zero, o que é visto como um resultado probabilístico satisfatório.

Todos os espécimes obtiveram percentual de identidade superior a 90%, representando alta similaridade entre as sequências obtidas pelo sequenciamento e as sequências referências presentes no NCBI. Com esses valores, podemos observar que dentre os sete espécimes analisados, dois deles (Espécimes 3 e 7) apresentaram maior similaridade com sequências da subespécie *Cacajao calvus novaesi*, enquanto os demais (Espécimes 1, 2, 4, 5 e 6) demonstraram maior similaridade com sequências pertencentes a subespécie *Cacajao calvus ucayalii*. Os sítios polimórficos observados na comparação entre a sequência referência NC_064162.1 (*C. c. ucayalii*) presente no banco de dados da NCBI e os animais avaliados nesse estudo, foram identificados e encontram-se descritos no Apêndice 2.

O resultado proveniente da PCR que teve como alvo a amplificação de um fragmento de ~8670pb está representado na Figura 11. Com isto, foi possível avançarmos para o sequenciamento por nanoporos utilizando o MinION e compararmos os resultados utilizando a ferramenta BLAST (Tabela 5).



FIGURA 11. Eletroforese em gel de agarose a 0,8% da PCR para um fragmento mitocondrial de *Cacajao calvus* ssp.. Os fragmentos amplificados para a espécime 3 estão disponíveis nas colunas 5 e 7.

TABELA 5. Valores obtidos na ferramenta BLAST com os sequenciamentos pelo MinION.

ESPÉCIME	COBERTURA	E-VALUE	% DE IDENTIDADE	SUBESPÉCIE	SEQUÊNCIA REFERÊNCIA
3	100%	0,0	99,97	<i>C. c. novaesi</i>	NC_064156.1

Os resultados obtidos para a amostra sequenciada pela técnica de nanoporos demonstrou resultado idêntico à amostra do mesmo espécime submetida ao sequenciamento Sanger. A amostra apresentou cobertura de 100% quando comparada a sequências referência do NCBI. O *e-value* para este sequenciamento foi igual a zero. O

percentual de identidade foi superior chegando a 99,97%. Novamente a sequencia referente ao Espécime 3 apresentou maior similaridade com sequências da subespécie *Cacajao calvus novaesi*.

5 DISCUSSÃO

5.1 Levantamento de Zoonoses

No presente estudo espécimes de Uakari-vermelho-peruano foram testados para a presença de *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi*. Os resultados não demonstraram a presença de DNA dos parasitas alvo e, apesar da presença destes parasitas na região estudada, todos os espécimes foram diagnosticados como negativos. A metodologia aplicada foi baseada em estudos prévios e levou em consideração aspectos importantes no diagnóstico por meio de PCR sendo estes o tipo, volume e conservação das amostras, método de extração de DNA, *primers*, reagentes e perfil térmico. Ressaltamos ainda a confiabilidade dos resultados moleculares de diagnóstico tanto para *Leishmania* spp. como para *T. cruzi* visto a sensibilidade de detecção da presença de DNA dos protozoários observados nos testes de diluição.

Os PNHs são infectados naturalmente pela *Leishmania*, mas dúvidas ainda pairam em relação a forma como seus sintomas são apresentados, podendo ser semelhantes aos de cães e humanos infectados. Estudos realizados demonstram que os PNHs estão entre os animais que funcionam como hospedeiro ou reservatório natural de *Leishmania* (ROQUE & JANSEN, 2014). Os PNHs devem ser estudados durante levantamentos epidemiológicos, para evidenciar infecções naturais e potencial de transmissão (SANTOS & OLIVEIRA, 2020).

Em regiões endêmicas para leishmaniose, há o indicativo de melhor controle da doença tendo como alicerce a conservação da fauna silvestre sendo esta de vida livre ou sob cuidados humanos (LOMBARDI *et al.*, 2014). No Brasil, diversos relatos demonstrando casos positivos de PNHs sob cuidados humanos, incluindo animais nascidos nessas condições (GUIRALDI *et al.*, 2022; LOMBARDI *et al.*, 2014; MALTA *et al.*, 2010; REIS *et al.*, 2020). Estes resultados enfatizam a necessidade de ações de controle de vetores em regiões de risco.

Apesar de nosso estudo ter obtido resultados negativos para todos os espécimes testados, é de extrema importância o aumento de pesquisas que levem em consideração a interface homem-ambiente-animal. A literatura ainda é escassa nos relatos da ocorrência de leishmaniose em PNH (SILVEIRA *et al.*, 1990) e ainda mais escassa se focarmos no Uakari-vermelho-peruano. É importante controlar diferentes vetores e considerar a transmissão assintomática como um fator relevante no controle da doença (GUIRALDI *et al.*, 2022)

O comércio de animais selvagens para mercados de animais de estimação exóticos resulta em contato próximo entre humanos e PNHs, proporcionando novas oportunidades para o surgimento de doenças (WOLFE *et al.*, 1998). Este tipo de atividade está associada a violação do bem-estar de suas vítimas, resultando no comprometimento de seu sistema imunológico, que por sua vez, tendem a ser mais susceptíveis a manifestação de doenças. Estudo realizado por Godoy & Matushima (2010) avaliou aves vítimas de tráfico ilegal. Os dados obtidos, demonstraram que a maior parte das aves analisadas morreram devido a infecção, especialmente por patógenos oportunistas que dependem de um alto grau de imunossupressão de seu hospedeiro.

A Bacia Amazônica, habitada por 30 milhões de pessoas, é o maior bioma tropical em que coexistem reservatórios animais e múltiplas espécies de triatomíneos vetores de *Trypanosoma cruzi*, representando uma grande ameaça às populações humanas (COURA & JUNQUEIRA, 2012). Com isso devemos questionar se há resistência dos Uakari-careca aos parasitas alvos, ou seletividade dos vetores devido a ampla biodiversidade presente na região em estudo.

Apesar dos resultados negativos que obtemos, estudos realizados na região de Iquitos, Departamento de Loreto, demonstraram que apesar de incomum, a doença de Chagas está presente e casos assintomáticos já foram detectados (RAMOS-RINCÓN *et al.*, 2020). Mesmo em regiões com poucos casos humanos, casos de animais positivos para *T. cruzi* foram relatados nas regiões de Ucayali (6 casos desde 2004) e Amazonas (13 casos) (MINSA, 2015). Isso poderia representar a introdução de *T. cruzi* por PNHs em novas áreas e a transmissão vetorial futura não pode ser descartada, uma vez que o Peru possui pelo menos 19 espécies (9 gêneros) de triatomíneos, os quais estão presentes em diferentes regiões do país, incluindo o Departamento de Loreto (CHÁVEZ, 2013; NÁQUIRA & CABRERA, 2009).

Como os PNHs podem atuar como reservatórios para esse parasita, seus cuidadores correm o risco de infecção acidental, não apenas por inoculação por meio de agulhas infectadas, mas pela exposição de membranas mucosas a fluidos contaminados e lesões cutâneas durante o manuseio de animais infectados (HOFFLIN *et al.* 1987; KINOSHITA-YANAGA *et al.* 2009; KIRCHHOFF, 2011; NDAO *et al.*, 2000; PEREIRA *et al.* 2010; STRAIT; ELSE; EBERHARD, 2012).

A caça de subsistência na região amazônica é uma fonte tradicional de alimento para as populações rurais (FITZGIBBON, 1998) e os primatas representam uma

importante fonte de carne na região (PUERTAS & BODMER, 2004; BOWLER *et al.*, 2014; MAYOR *et al.*, 2015). Nesses ambientes, as carcaças são manuseadas com as mãos desprotegidas, além do consumo da carne crua ou mal cozida. Nestes casos, pseudocistos e tripomastigotas de forma sanguínea nos animais caçados, podem representar um alto risco de infecção (PEREIRA *et al.*, 2009).

5.2 Análises genéticas

Técnicas de biologia molecular vem demonstrado sua importância por ser uma ferramenta que permite a identificação correta e segura de espécies. No caso de indivíduos voltados para programas de conservação da biodiversidade, essas ferramentas se tornam ainda mais essenciais já que, em tais programas, há a necessidade de formação de um plantel puro de animais para reprodução. Neste estudo observamos animais destinados a reprodução *ex situ* de Uakari-vermelho-peruano. Apesar dos esforços para manter estável a população selvagem dessa subespécie, a indisponibilidade de uma técnica acessível para correta identificação levou a formação de plantel com indivíduos de subespécies diferentes.

Um dos métodos mais disseminados para a identificação de espécies é o DNA *barcoding*. Esse método emprega regiões do mtDNA padronizadas curtas que são mantidas por seleção a modo a serem idênticas dentro de um táxon, mas variando entre táxons (HEBERT *et al.*, 2003). Dois dos genes mais utilizados nesse tipo de análise são o citocromo b (cytB) e citocromo c oxidase (COX). Durante nosso estudo, ambos os genes foram analisados para as quatro subespécies descritas. Porém, por serem regiões altamente conservadas isso não permitiu a diferenciação a nível taxonômico de subespécie desses indivíduos. Para atingirmos tal precisão, os marcadores desenhados tiveram como alvo a região *D-loop* do mtDNA. Essa região é consistente para análises filogenéticas intraespecíficas, sendo aplicada há décadas na biologia molecular (BROWN; BECKENBACH; SMITH, 1993), devido a variação genética que ocorre em suas sequências hiper variáveis.

Embora a conservação *in situ* represente, a maneira mais eficaz de proteger espécies ameaçadas, é evidente que nem todas as espécies podem ser eficientemente preservadas em seus habitats naturais. Os programas de reprodução em cativeiro devem visar a criação e conservação de populações em cativeiro saudáveis e autossustentáveis que se assemelhem o máximo possível às suas contrapartes selvagens, tanto em termos

de comportamento como geneticamente (FRANKHAM, 2008; SILVA *et al.*, 2010; RALLS & BALLOU, 1986; ROBERT, 2009).

Os padrões de cores da pelagem, são consistentes e considerados, até então, um método diagnóstico para diferenciação entre as subespécies. Porém, devido à incerteza da origem desses animais vítimas de tráfico, os padrões de cores se demonstraram insuficientes na correta identificação de subespécie. Todos os animais foram encaminhados para o centro de resgate com base em dados fenotípicos, sendo todos classificados como *C. c. ucayalii*. Contudo, empregando dois conjuntos de *primers* desenhados para a subespécie e dois métodos distintos de sequenciamento, obtivemos como resultado dois animais (3 e 7) sendo da subespécie *C. c. novaesi*.

Amplamente, mas distribuído de forma irregular pela Amazônia Ocidental, cada subespécie tem prioridades diferentes em termos de pesquisa e medidas de conservação especialmente no que diz respeito à perda de habitat por desmatamento e mudanças climáticas antropogênicas (SILVA *et al.*, 2022). O Uakari-careca é considerada uma espécie bandeira no Brasil e no Peru. Criada como resultado de uma forte aliança entre a população local e conservacionistas, a Reserva Comunal Tamshiyacu Tahuayo (RCTT) foi a primeira área protegida conhecida por conter Uakari-vermelho-peruano. A reserva está situada próxima a cidade de Iquitos e abrange uma área de 322.500ha (NEWING & BODMER, 2003).

A presença de *Cacajao calvus ucayalii* tornou-se parte da justificativa para criação de três novas áreas de proteção no Peru, sendo elas a Zona Reservada Sierra del Divisor, Concessão de Conservação do Lago Preto e Reserva Grande Yavarí. O trabalho de conservação comunitária visa reduzir a caça de Uakari-vermelho-peruano nesta área e é conduzido pela *Wildlife Conservation Society* (WCS-Peru) e pelo Instituto Durrell de Conservação e Ecologia nos rios Yavari e Yavari-Mirin, no Peru.

O programa de conservação da biodiversidade voltado para espécimes de *Cacajao calvus ucayalii* aqui relatado faz parte de uma gama de ações voltadas para a estabilidade da subespécie. Porém, sem levar em consideração os dados genéticos e a correta identificação dos espécimes voltados para a reprodução *ex situ*, o programa tende a falhar com seu objetivo. Temos como exemplo o caso do Leão-asiático (*Panthera leo persica*) onde vários dos animais fundadores do programa foram posteriormente identificados como híbridos de leões africanos com asiáticos, resultando no término do programa, depois que recursos substanciais foram gastos (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010).

As particularidades presentes nas características físicas e comportamentais dos Uakaris-careca os tornam um membro expoente da fauna peruana e brasileira. Os desafios crescentes em relação a biodiversidade amazônica, torna primordial o desenvolvimento de projetos que viabilizem ações palpáveis para a conservação desses primatas. A união entre pesquisadores e conservacionistas é a chave para que essas ações sejam realizadas de forma eficiente e com resultados promissores.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A literatura demonstra a importância de PNH nos ciclos de transmissão tanto de *Leishmania* spp. quanto de *T. cruzi*. Os testes de sensibilidade realizados com os *primers* aplicados ressaltam a confiabilidade dos resultados obtidos, uma vez que ambos demonstraram capacidade de identificação de fragmentos de DNA em concentrações ínfimas. Apesar dos resultados negativos obtidos, a atenção em relação a esses animais deve se manter ativa. A elaboração de projetos voltados para a identificação dessas zoonoses em animais de vida livre é destacada. A aplicação de métodos que analisem os ciclos de transmissão envolvendo espécies de triatomíneos, a presença do agente nesses vetores e a avaliação da infecção em animais de vida livre e mantidos sob cuidados humanos, servirão para identificar *hotspots* de transmissão de doenças. Tal investigação permite uma melhor compreensão de aspectos epidemiológicos cruciais dessas zoonoses na Amazônia.

A presença de espécimes puros em planteis de programas para conservação da biodiversidade é essencial para seu sucesso. Aqui apresentamos um marcador molecular do tipo STS baseado na região *d-loop* do mtDNA de *Cacajao calvus ssp.*. Tal marcador, demonstrou-se eficiente em identificar na prática indivíduos das subespécies *C. c. ucayalii* e *C. c. novaesi*. Tendo como base as sequências referência presentes na plataforma NCBI, observamos que o conjunto de *primers* desenhado apresenta usabilidade também para as subespécies *C. c. rubicundus* e *C. c. calvus*. Estes dados representam um importante avanço para elaboração de ações viáveis na conservação da espécie e subespécies. Devido ao constante crescimento de atividades humanas na Amazônia, o habitat da espécie aqui em estudo segue sendo ameaçado e fragmentado. Como resultado, notamos o declínio de suas populações selvagens, o que representa um contínuo progresso na escala de risco de extinção. Estudos como esse são base para a correta identificação de indivíduos voltados para reprodução *ex situ*, viabilizando a continuidade desses programas e a obtenção de resultados promissores para a conservação de espécimes de vida livre.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKHOUNDI, M. *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **Plos Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v. 10, n. 3, p. 4349, 2016.
- ALROY, K.A. *et al.* Prevalence and Transmission of Trypanosoma cruzi in People of Rural Communities of the High Jungle of Northern Peru. **Plos Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v. 9, n. 5, p. 3779, 2015.
- ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **Plos One**, São Francisco, v. 7, n. 5, p. 35671, 2012.
- ALVARADO, J.W.V. *et al.* Mamíferos y aves silvestres usados por los pobladores de la cuenca del río Abujao (Ucayali, Perú). **Revista Peruana de Biología**, Lima, v. 24, n. 3, p. 263, 2017.
- AQUINO, R.; ALVAREZ, J.; MULANOVICH, A.. Diversidad y estado de conservación de primates en las Sierras de Contamana, Amazonía peruana. **Rev. Peru. Biol.**, Lima, n. 12, p. 427-434, 2005.
- ASPÖCK, H. *et al.* Sandflies and sandfly-borne infections of humans in Central Europe in the light of climate change. **Wiener Klinische Wochenschrift**, Nova Iorque, v. 120, n. 4, p. 24-29, 2008.
- AURELI, F. *et al.* Fission-Fusion Dynamics. **Current Anthropology**, Chicago, v. 49, n. 4, p. 627-654, 2008.
- AYSANOVA, E. *et al.* Molecular Epidemiology of Trypanosomatids and Trypanosoma cruzi in Primates from Peru. **Ecohealth**, Nova Iorque, v. 14, n. 4, p. 732-742, 2017.
- BOUBLI, J.P. *et al.* Cacajao calvus ssp. ucayalii. **IUCN Red List Of Threatened Species**, Cambridge, 2020.
- BOWLER, M. *et al.* Annual variation in breeding success and changes in population density of Cacajao calvus ucayalii in the Lago Preto Conservation Concession, Peru. In: VEIGA, L.. **Evolutionary Biology and Conservation of Titis, Sakis and Uakaris (Cambridge Studies in Biological and Evolutionary Anthropology)**. Cambridge: Cambridge University Press, 2013. p. 173-178.
- BOWLER, M. *et al.* Refining Reproductive Parameters for Modelling Sustainability and Extinction in Hunted Primate Populations in the Amazon. **Plos One**, São Francisco, v. 9, n. 4, p. 93625, 2014.
- BOWLER, M.; BODMER, R.. Social behavior in fission-fusion groups of red Uakari monkeys (Cacajao calvus ucayalii). **American Journal Of Primatology**, Nova Jersey, v. 71, n. 12, p. 976-987, 2009.
- BOWLER, M.; BODMER, R.E.. Diet and Food Choice in Peruvian Red Uakaris (Cacajao calvus ucayalii): selective or opportunistic seed predation?. **International Journal Of Primatology**, Nova Iorque, v. 32, n. 5, p. 1109-1122, 2011.

BOWMAN, N.M. *et al.* Chagas Disease Transmission in Periurban Communities of Arequipa, Peru. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 46, n. 12, p. 1822-1828, 2008.

BROOK, B; SODHI, N; BRADSHAW, C. Synergies among extinction drivers under global change. **Trends In Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 23, n. 8, p. 453-460, 2008.

BROWN, J R; BECKENBACH, A T; SMITH, M J. Intraspecific DNA sequence variation of the mitochondrial control region of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). **Molecular Biology And Evolution**, Oxford, p. 326-341, 1993.

BUTLER, R.A.; LAURANCE, W.F.. Is Oil Palm the Next Emerging Threat to the Amazon? **Tropical Conservation Science**, Londres, v. 2, n. 1, p. 1-10, 2009.

CABRERA, R. *et al.* Epidemiological investigation of an acute case of Chagas disease in an area of active transmission in Peruvian Amazon region. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 52, n. 5, p. 269-272, 2010.

CALOURO, A.. **Avaliação do risco de extinção de Cacajao calvus ucayalii (Thomas, 1928) no Brasil.** 2015. Disponível em: https://www.icmbio.gov.br/portal_antigo/component/content/article.html?id=7285:mamiferos-cacajao-calvus-ucayalii-Uakari. Acesso em: 24 set. 2021.

CAMPBELL, R.C. *et al.* Endotoxemia por lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*, em equinos: efeitos de antiinflamatórios nas concentrações sérica e peritoneal do fator de necrose tumoral alfa (tnf-alfa). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 4, p. 837-843, 2007.

Center For Disease Control And Prevention. **Parasites - American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease).** 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/diagnosis.html>. Acesso em: 05 set. 2022.

CHALLENGER, A.; DIRZO, R.. Estado de conservación y tendencias de cambio. In: CHALLENGER, A.; DIRZO, R.. **Factores de cambio y estado de la biodiversidad, en Capital natural de México.** 2. ed. Cidade do México: Conabio, 2009. p. 37-73.

CHANDRASHEKAR, A. *et al.* SARS-CoV-2 infection protects against rechallenge in rhesus macaques. **Science**, Washington DC, v. 369, n. 6505, p. 812-817, 2020.

CHÁVEZ, J.. Contribución al estudio de los triatominos del Perú: distribución geográfica, nomenclatura y notas taxonómicas. **Anales de La Facultad de Medicina**, San Marcos, v. 67, p. 65-76, 2013.

COOPER, C. *et al.* Host–Parasite Relationships and Life Histories of Trypanosomes in Australia. **Advances In Parasitology**, Amsterdam, p. 47-109, 2017.

CORNEJO, J.G.; CARPIO, D. **The Chagasic Endemic Situation in Peru.** 2003. Disponível em: <http://www.fac.org.ar/tcvc/llave/c296/cornejo.PDF>. Acesso em: 14 set. 2022.

COURA, J.R.; JUNQUEIRA, A.C.V.. Risks of endemicity, morbidity and perspectives regarding the control of Chagas disease in the Amazon Region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 2, p. 145-154, 2012.

COX, F.E.G. History of sleeping sickness (African trypanosomiasis). **Infectious Disease Clinics Of North America**, Amsterdam, v. 18, n. 2, p. 231-245, 2004.

CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L.. **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2014.

DEEM, S.L.; KARESH, W.B.; WEISMAN, Wendy. Putting Theory into Practice: wildlife health in conservation. **Conservation Biology**, Nova Jersey, v. 15, n. 5, p. 1224-1233, 2001.

DEPARTAMENTO DE ESTUDOS ECONÔMICOS. **CARACTERIZACIÓN DEL DEPARTAMENTO DE LORETO**. 2021. Disponível em: <https://www.bcrp.gob.pe/docs/Sucursales/Iquitos/loreto-caracterizacion.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2022.

ESPINOSA, O. A. *et al.* An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology**, Washington Dc, v. 145, n. 4, p. 430-442, 2016.

ESTRADA, A.; MANDUJANO, S.. Investigaciones con *Alouatta* y *Ateles* en México. In: BARRUETA, T. *et al.* **Reconocimiento demográfico de *Alouatta pigra* y *Ateles geoffroyi* en la reserva El Tormento, Campeche, México**. Campeche: Neotropical Primates, 2003. p. 145-154.

FITZGIBBON, C.. The Management of Subsistence Harvesting: behavioural ecology of hunter and their mammalian prey. In: CARO, T. **Behavioral Ecology and Conservation Biology**. Nova Iorque: Oxford University Press, 1998. Cap. 16. p. 449-473.

FOLGUEIRA, C. *et al.* Genomic organization and expression of the HSP70 locus in New and Old World *Leishmania* species. **Parasitology**, v. 134, n. 3, p. 369–377, 2007.

FRANKHAM, R.. Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. **Molecular Ecology**, Nova Jersey, v. 17, n. 1, p. 325-333, 2008.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A.. **Introduction to Conservation Genetics**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2010. 618 p.

FUNDO DE EMERGÊNCIA INTERNACIONAL DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A INFÂNCIA. **Loreto**. 2018. Disponível em: <https://www.unicef.org/peru/donde-estamos/loreto#:~:text=Cuenta%20con%20ocho%20provincias%20y,ling%C3%BC%C3%ADsticamente%2C%20con%2027%20lenguas%20originarias..> Acesso em: 12 ago. 2022.

GILARDI, K. *et al.* Best practice guidelines for health monitoring and disease control in great ape populations. **Iucn Ssc Primate Specialist Group**, Gland, 2015.

GILPIN, M.E.; SOULÉ, M.E.. Minimum viable populations: processes of species extinction. In: SOULÉ, M.E.; WILCOX, B.A.. **Conservation Biology: an evolutionary-**

ecological perspective. Sunderland: Sinauer, 1986. p. 14-34.

GODOY, S.N.; MATUSHIMA, E.R.. A Survey of Diseases in Passeriform Birds Obtained From Illegal Wildlife Trade in São Paulo City, Brazil. **Journal Of Avian Medicine And Surgery**, Washington Dc, v. 24, n. 3, p. 199-209, 2010.

GOVERNANÇA E INFRAESTRUTURA DA AMAZÔNIA. **Loreto (Peru)**. 2019. Disponível em: <https://giamazon.org/pt-br/mosaicos-focais/loreto-peru/>. Acesso em: 12 ago. 2022.

GUIRALDI, L.M. *et al.* Identification of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* in captive primates from a zoo in Brazil. **American Journal Of Primatology**, Nova Iorque, v. 84, n. 4-5, p. e23376, 2022.

HEBERT, P.D. N. *et al.* Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings Of The Royal Society Of London. Series B: Biological Sciences**, Londres, v. 270, n. 1512, p. 313-321, 2003.

HERSHKOVITZ, P.. Uakaries, new world monkeys of the genus *Cacajao* (Cebidae, Platyrrhini): a preliminary taxonomic review with the description of a new subspecies. **American Journal Of Primatology**, Nova Jersey, v. 12, n. 1, p. 1-53, 1987.

HEYMANN, E.W.; AQUINO, R.. Peruvian Red Uakaris (*Cacajao calvus ucayalii*) Are Not Flooded-Forest Specialists. **International Journal Of Primatology**: Nova Iorque, v. 31, n. 5, p. 751-758, 2010.

HOARE, C.A.. The Trypanosomes of Mammals: a zoological monograph. **Medical Journal Of Australia**, Sydney, v. 1, n. 3, p. 140-140, 1972.

HOFFLIN, J.M. *et al.* Laboratory-acquired Chagas disease. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, Oxford, v. 81, n. 3, p. 437-440, 1987.

HOTEZ, P.J. *et al.* The Neglected Tropical Diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. **Plos Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v. 2, n. 9, p. 300, 2008.

HRISTOVSKI, M. *et al.* Concept of One Health - a New Professional Imperative. **Macedonian Journal Of Medical Sciences**, Escópia, v. 3, n. 3, p. 229-232, 2010.

JANIAK, Mareike C. *et al.* Two hundred and five newly assembled mitogenomes provide mixed evidence for rivers as drivers of speciation for Amazonian primates. **Molecular Ecology**, Nova Jersey, v. 31, n. 14, p. 3888-3902, 2022.

JANSEN, A.M.; XAVIER, S.C.C.; ROQUE, A.L.R.. Trypanosoma cruzi transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. **Parasites & Vectors**, Londres, v. 11, n. 1, 2018.

JORGE, M.L.S.P.; VELAZCO, P.M.. Mammals. In: VRIESENDORP, C. *et al.* **Perú, Sierra del Divisor. Rapid Biological Inventories Report 17**. Chicago: The Field Museum, 2006. p. 196-204.

KARDJADJ, M.; BEN-MAHDI, M.H.. Epidemiology of dog-mediated zoonotic diseases in Algeria: a one health control approach. **New Microbes And New Infections**, Amsterdam, v. 28, p. 17-20, 2019.

KINOSHITA-YANAGA, A.T. *et al.* Accidental infection by *Trypanosoma cruzi* follow-up by the polymerase chain reaction: case report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 51, n. 5, p. 295-298, 2009.

KIRCHHOFF, L.V.. Epidemiology of American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Advances In Parasitology**, Amsterdam, p. 1-18, 2011.

LEÃO, R.N.Q.. **Medicina tropical e infectologia na Amazônia**. 2. ed. Belém: Lilacs, 2013. 848 p.

LISBOA, C.V. *et al.* *Trypanosoma cruzi* transmission in a captive primate unit, Rio de Janeiro, Brazil. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 90, n. 1, p. 97-106, 2004.

LLANOS-CUENTAS, E.A. *et al.* Natural infections of *Leishmania peruviana* in animals in the Peruvian Andes. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, Londres, v. 93, n. 1, p. 15-20, 1999.

LOMBARDI, M.C. *et al.* Diagnosis of *Leishmania infantum* infection by Polymerase Chain Reaction in wild mammals. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, São Paulo, v. 34, n. 12, p. 1243-1246, 2014.

LUQUETTI, A.O.; SCHMUÑIS, G.A.. Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* Infection. In: TELLERIA, J.; TIBAYRENC, M.. **American Trypanosomiasis Chagas Disease**. 2. ed. Londres: Elsevier, 2017. p. 743-792.

MALTA, M.C.C. *et al.* Naturally acquired visceral leishmaniasis in non-human primates in Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 169, n. 1-2, p. 193-197, 2010.

MANSUETO, P. *et al.* Leishmaniasis in travelers: a literature review. **Travel Medicine And Infectious Disease**, Amsterdam, v. 12, n. 6, p. 563-581, 2014.

MARCONDES, C. B. Entomologia médica e veterinária. **Monografia (Coleção SUS, LILACS, Coleção SUS)**. São Paulo: Atheneu, p. 526, 2011.

MAYOR, P. *et al.* Effects of selective logging on large mammal populations in a remote indigenous territory in the northern Peruvian Amazon. **Ecology And Society**, Dedham, v. 20, n. 4, p. 36, 2015.

MAYOR, P. *et al.* Proximate causes of the red face of the bald uakari monkey (*Cacajao calvus*). **Roy. Soc. Open Sci.**, Londres, n. 2, p. 1-7, 2015.

MCCALLUM, H.; DOBSON, A.. Disease, habitat fragmentation and conservation. **Proceedings Of The Royal Society Of London. Series B: Biological**

Sciences, Londres, v. 269, n. 1504, p. 2041-2049, 2002.

MCNEELY, J.A. *et al.* **Conserving The World's Biological Diversity**. Washington DC: World Bank Publications, 2006. 196 p.

MILLER, R.E.; FOWLER, M.E.. **Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine**. 8. ed. Filadélfia: W.B. Saunders Company, 2014. 773 p.

MINSA. **Sala Situacional Para El Análisis De Situacion De Salud**. 2015. Disponível em:
http://www.dge.gob.pe/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=14&Itemid=121. Acesso em: 09 abr. 2022.

MORALES, E.A. *et al.* Prevalence of *Trypanosoma cruzi* and Other Trypanosomatids in Frequently-Hunted Wild Mammals from the Peruvian Amazon. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, Arlington, v. 97, n. 5, p. 1482-1485, 2017.

NÁQUIRA, C.; CABRERA, R.. Breve Reseña Histórica De La Enfermedad De Chagas, A Cien Años De Su Descubrimiento Y Situación Actual En El Perú. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, Lima, v. 4, n. 26, p. 494-504, 2009.

NDAO, M. *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection of squirrel monkeys: comparison of blood smear examination, commercial enzyme-linked immunosorbent assay, and polymerase chain reaction analysis as screening tests for evaluation of monkey-related injuries. **Comparative Medicine**, Memphis, v. 6, n. 50, p. 658-665, 2000.

NEWING, H.S.; BODMER, R.E.. Collaborative Wildlife Management and Adaptation to Change: the tamshiyacu tahuayo communal reserve, peru. **Nomadic Peoples**, Winwick, v. 1, n. 7, p. 110-122, 2003.

Organização Pan Americana da Saúde. Leishmanioses:: informe epidemiológico das américas. informe epidemiológico das Américas. 2021. Nº 10. Disponível em:
<https://iris.paho.org/handle/10665.2/51742>. Acesso em: 12 set. 2022.

OSTFELD, R.S.; KEESING, F.. The function of biodiversity in the ecology of vector-borne zoonotic diseases. **Canadian Journal Of Zoology**, Ontário, v. 78, n. 1, p. 2061-2078, 2000.

PATZ, Jonathan A.; GRACZYK, Thaddeus K.; GELLER, Nina; VITTOR, Amy Y.. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. **International Journal For Parasitology**, Amsterdam, v. 30, n. 12-13, p. 1395-1405, 2000.

PEREIRA, K.S. *et al.* Chagas' Disease as a Foodborne Illness. **Journal Of Food Protection**, Amsterdam, v. 72, n. 2, p. 441-446, 2009.

PEREIRA, K.S. *et al.* Transmission of Chagas Disease (American Trypanosomiasis) by Food. In: STEVE, L.T. (Editor). **Advances in Food and Nutrition Research**. Nova Iorque: Academic Press, 2010. Cap. 3. p. 63-85.

PERES, C.A.. Primate community structure at twenty western Amazonian flooded and unflooded forests. **Journal Of Tropical Ecology**, Cambridge, v. 13, n. 3, p. 381-405, 1997.

PODLIPAEV, S. The more insect trypanosomatids under study-the more diverse Trypanosomatidae appears. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 5-6, p. 648-652, 2001.

PUERTAS, P.; BODMER, R.E.. Hunting effort as a tool for community-based wildlife management in Amazonia. In: SILVIUS, K.M.; BODMER, R.E.; FRAGOSO, J.M. **People in Nature: wildlife conservation in south and central america**. Nova Iorque: Columbia University Press, 2004. p. 123-135.

RALLS, K.; BALLOU, J.. Captive breeding programs for populations with a small number of founders. **Trends In Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 1, n. 1, p. 19-22, 1986.

RAMOS-RINCÓN, J.M. *et al.* Chagas Disease in Pregnant Women in the Peruvian Amazon Basin. Cross-Sectional Study. **Frontiers In Veterinary Science**, Lausanne, v. 7, p. 556, 2020.

REIS, F.C. *et al.* Trypanosomatid infections in captive wild mammals and potential vectors at the Brasilia Zoo, Federal District, Brazil. **Veterinary Medicine And Science**, Nova Jersey, v. 6, n. 2, p. 248-256, 2020.

ROBERT, A.. Captive breeding genetics and reintroduction success. **Biological Conservation**, Amsterdam, v. 142, n. 12, p. 2915-2922, 2009.

ROQUE, A.L.R.; JANSEN, A.M. Wild and synanthropic reservoirs of Leishmania species in the Americas. **International Journal For Parasitology: Parasites and Wildlife**, Amsterdam, v. 3, n. 3, p. 251-262, 2014.

ROVIROSA-HERNÁNDEZ, M.J. *et al.* Natural infection with Trypanosoma cruzi in three species of non-human primates in southeastern Mexico: a contribution to reservoir knowledge. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 213, p. 105754, 2021.

RUEDA, Karina *et al.* Transmisión oral de Trypanosoma cruzi: un nuevo escenario epidemiológico de la enfermedad de chagas en colombia y otros países suramericanos. **Biomédica**, Bogotá, v. 34, n. 4, p. 631, 2014.

SANTOS, R.L.; OLIVEIRA, A.R.. Leishmaniasis in non-human primates: clinical and pathological manifestations and potential as reservoirs. **Journal Of Medical Primatology**, Nova Jersey, v. 49, n. 1, p. 34-39, 2020.

SHAFFER, M.L.. Minimum Population Sizes for Species Conservation. **Bioscience**, Kettering, v. 31, n. 2, p. 131-134, 1981.

SHAW, J. *et al.* Characterization of Leishmania (Leishmania) waltoni n.sp. (Kinetoplastida: trypanosomatidae), the parasite responsible for diffuse cutaneous leishmaniasis in the dominican republic. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, Arlington, v. 93, n. 3, p. 552-558, 2015.

SHAW, J.. The leishmaniasis: survival and expansion in a changing world. a mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 5, p. 541-547, 2007.

SILVA JUNIOR, J.S.; FIGUEIREDO-READY, W.M.B; FERRARI, S.F.. Taxonomy and geographic distribution of the Pitheciidae. In: VEIGA, L.M. *et al.* **Evolutionary Biology and Conservation of Titis, Sakis and Uacaris**. Cambridge: Cambridge University Press, 2013. p. 31-42.

SILVA, A.G. *et al.* Genetic Approaches Refine Ex Situ Lowland Tapir (*Tapirus terrestris*) Conservation. **Journal Of Heredity**, Kettering, v. 101, n. 5, p. 581-590, 2010.

SILVA, F.E. *et al.* Molecular phylogeny and systematics of bald uakaris, genus *Cacajao* (Primates: pitheciidae), with the description of a new species. **Molecular Phylogenetics And Evolution**, Amsterdam, v. 173, p. 107509, 2022.

SILVA, F.E. *et al.* On the Geographic Distribution of the Bald Uakaris (*Cacajao calvus* ssp.) in Brazilian Amazonia. **Primate Conservation**, Washington Dc, v. 35, n. 1, 2021.

SILVEIRA, F.T. *et al.* Leishmaniose cutânea experimental. III- Aspectos histopatológicos do comportamento evolutivo da lesão cutânea produzida em *Cebus apella* (Primates: cebidae) por leishmania (viannia) lainsoni, l. (v.) braziliensis e l. (leishmania) amazonensis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 387-394, 1990.

SLEEMAN, J.M.; RICHGELS, K.L.D.; WHITE, C.L.; STEPHEN, C.. Integration of wildlife and environmental health into a One Health approach. **Revue Scientifique Et Technique de L'Oie**, Paris, v. 38, n. 1, p. 91-102, 2019.

SOLÓRZANO-GARCÍA, B.; LEÓN, G.P.P. Parasites of Neotropical Primates: a review. **International Journal Of Primatology**, Nova Iorque, v. 39, n. 2, p. 155-182, 2018.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, Londres, v. 10, n. 1, p. 82, 2017.

STRAIT, K.; ELSE, J.G.; EBERHARD, M.I. Parasitic Diseases of Nonhuman Primates. In: ABEE, C. *et al.* **Nonhuman Primates in Biomedical Research**. Boston: Academic Press, 2012. Cap. 4. p. 197-297.

TAYLOR, L.H.; LATHAM, S.M.; WOOLHOUSE, M.E.J.. Risk factors for human disease emergence. **Philosophical Transactions Of The Royal Society Of London. Series B: Biological Sciences**, Londres, v. 356, n. 1411, p. 983-989, 2001.

TORRES-GUERRERO, E. *et al.* Leishmaniasis: a review. *F1000Research*, Londres, v. 6, p. 750, 2017.

UNTERGASSER, A. *et al.* Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*, Oxônia, v. 35, n. , p. 71-74, 2007.

VERMEER, J *et al.*. A New Population of Red Uakaris (*Cacajao Calvus* ssp.) in the Mountains of North-Eastern Peru. **Neotropical Primates**, Washington DC, v. 20, n. 1, p. 12-17, 2013.

VIJAY, V. *et al.* Deforestation risks posed by oil palm expansion in the Peruvian Amazon. **Environmental Research Letters**, Bristol, v. 13, n. 11, p. 114010, 2018.

VIRREIRA, M. *et al.* Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene** 574, v. 68, n. 5, p. 574–572, 2003.

WOLFE, N. *et al.* Wild Primate Populations in Emerging Infectious Disease Research: the missing link?. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 4, n. 2, p. 149-158, 1998.

WOODS, R. *et al.* The Importance of Wildlife Disease Monitoring as Part of Global Surveillance for Zoonotic Diseases: the role of australia. **Tropical Medicine And Infectious Disease**, Basel, v. 4, n. 1, p. 29, 6 fev. 2019.

World Health Organization. **Leishmaniasis**. 2022. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 21 set. 2022.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de chagas?. **Revista da Biologia**, São Paulo, v. 6, p. 44-48, 2011.

ZORRILLA, V. *et al.* Distribution and identification of sand flies naturally infected with *Leishmania* from the Southeastern Peruvian Amazon. **Plos Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v. 11, n. 11, 2017.

APÊNDICE

APÊNDICE 1: Sequências obtidas por meio do sequenciamento Sanger aplicando o *primer* CacajaoID Os números ao lado das figuras representam o número designado para cada espécime.

Cacajao calvus ucayalii isolate FES100 voucher IDSM03678 mitochondrion, complete genome
Sequence ID: [OM328913.1](#) Length: 16763 Number of Matches: 1

Range 1: 15424 to 15863 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
697 bits(377)	0.0	420/441(95%)	1/441(0%)	Plus/Plus
Query 1	TACTTACTATGCCCTTTATTGAGGGCATTACCTTAAGGTAATTTACAAGTACATACAAC	60		
Sbjct 15424	TACTTACTATGCCCTTTATTGAGGGCATTACCTTAAGGTAATTTACAAGTACATACAAC	15483		
Query 61	CACCTTTCCCCCTTATGTACCTAATGCTTAATGCTTGGCCCCATGAATAATATATAGTA	120		
Sbjct 15484	CA-CTTTCCCCCTATGTACCTAATGCTTAATGCTTGGCCCCATGAATAATATATAGTA	15542		
Query 121	CTAAGCGTGTAAATTATACATAGCACATAGCAATAAGACGTACATTACACATTTTCCCG	180		
Sbjct 15543	CTAAGCATGCTTAATTATACATAGCACATAAGAATAAGACGTACATTACACATTTTCCCG	15602		
Query 181	AACATGCTTACAAGCAAGTAATTCAATCTCTTACAGGACTATAGTACATTATAACAATGG	240		
Sbjct 15603	AACATGCTTACAAGCAAGTAATTCAATCTCTTACAGGACTGTAATACATCACAAATGG	15662		
Query 241	TAGTACATTAATCCTAGTCCATACGGATATCATTCCAGTACATAAAATAGTTAACAGTAC	300		
Sbjct 15663	CAGTACATTAATCCTAGTCCGACGAATATCTTCTAATGCATAGAGTAGTTAACAGTAC	15722		
Query 301	ATTTGTACATAACATGATTAATCGGACATGGCACATTCTAACTCAAAGATCCATTAACA	360		
Sbjct 15723	ATTTGTACATAACATGATTAATCGGACATGGCACATTCTAACTCAAAGATCCATTAACA	15782		
Query 361	TCCTTTTCAACATGAATATCCTTCACTGCAAGTGGTCCCTTAATCTACCATCTCCGTGA	420		
Sbjct 15783	TCCTTTTCAACATGGATATCCTTCACTGCAAGTGGTCCCTTAATCTACCATCTCCGTGA	15842		
Query 421	AACCAACAACCCATCCACTAC 441			
Sbjct 15843	AACCAACAACCCATCCACTAC 15863			

Cacajao calvus ucayalii isolate FES100 voucher IDSM03678 mitochondrion, complete genome
Sequence ID: [OM328913.1](#) Length: 16763 Number of Matches: 1

Range 1: 15437 to 15765 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
448 bits(242)	4e-121	301/330(91%)	2/330(0%)	Plus/Plus
Query 1	CTTTATTGAGGGCATTACCTTAAGGTAATATACAAGTACTTACAACCTCACTTTCCCCCTT	60		
Sbjct 15437	CTTTATTGAGGGCATTACCTTAAGGTAATATACAAGTACTTACAACCTCACTTTCCCCCTT	15496		
Query 61	ATGTACCTAATGCATTAATGCTTGGCCCCATGAATAATATATAGTACTAAGTATGCTTAA	120		
Sbjct 15497	ATGTACCTAATGCATTAATGCTTGGCCCCATGAATAATATATAGTACTAAGCATGCTTAA	15556		
Query 121	TTATACATAGCACATAACAATAAGACGTACATTACACATTTTCTCGGACATGCTTACAAG	180		
Sbjct 15557	TTATACATAGCACATAAGAATAAGACGTACATTACACATTTTCCCGAACATGCTTACAAG	15616		
Query 181	CAAGCAACTTGATCTCTTACAGGACTGTAATACATTAAAGTAAACAGTACATTAAATCC	240		
Sbjct 15617	CAAGTAATTCAATCTCTTACAGGACTGTAATACATCACAAATGGCAGTACATTAAATCC	15676		
Query 241	TAATCCACACGGATATTATCCTAGTACACTAAA-TAGTTAACAGTACATTTGTACATAAC	299		
Sbjct 15677	TAGTCCGCACGAATATCATTCTAATGCA-TAGAGTAGTTAACAGTACATTTGTACATAAC	15735		
Query 300	ATGATTAACCGGACATGGCACATTTCAACT 329			
Sbjct 15736	ATGATTAATCGGACATGGCACATTTCTAACT 15765			

Cacajao calvus novaesi isolate FES67 voucher IDSM03671 mitochondrion, complete genome

Sequence ID: [NC_064156.1](#) Length: 16712 Number of Matches: 1
[See 1 more title\(s\)](#) [See all Identical Proteins\(IPG\)](#)

Range 1: 15435 to 15928 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
863 bits(467)	0.0	485/494(98%)	0/494(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGCCCTTTATTGAGGGCATTACCTTAAAGTAATATACAAGTACATACAACCTCCTTTTC	60		
Sbjct 15435	ATGCCCTTTATTGAGGGCATTACCTTAAAGTAATATACAAGTACATACAACCTCCTTTTC	15494		
Query 61	CCCCCTATGTACCTAATGCATTAACTTGGCCCCATGAATAATATATAGTACTAAGCAT	120		
Sbjct 15495	CCCCCTATGTACCTAATGCATTAACTTGGCCCCATGAATAATATATAGTACTAAGCAT	15554		
Query 121	GCTTAATTATACATAGTACATGAATAAGACGTACATTACACATTTTCCCGAACATGCT	180		
Sbjct 15555	GCTTAATTATACATAGCAGTGAATAAGACGTACATTACACATTTTCCCGAACATGCT	15614		
Query 181	TACAAGCAAGTAATTCAATCTCTTACAGGGCCATATGCATATAACAGGCGAGTACAT	240		
Sbjct 15615	TACAAGCAAGTAATTCAATCTCTTACAGGACCAATAACATACACAAACGGCGAGTACAT	15674		
Query 241	TAATCCTAGTCCACACGGATATCTTTTAATACATGAAGTAGTTAACAGTACATTGTGAC	300		
Sbjct 15675	TAATCCTAGTCCACACGGATATCTTTCAATACATGAAGTAGTTAACAGTACATTGTGAC	15734		
Query 301	ATAACATGATTAAACCGGACATGGACATCTAACTCAAGATCATTAAACATCCTTTAC	360		
Sbjct 15735	ATAACATGATTAAACCGGACATGGACATCTAACTCAAGATCATTAAACATCCTTCCC	15794		
Query 361	AGCATGGATATCCTTCAATGCAAGTGGTCTCTTAATCTACCATCTCCGTGAACCAACA	420		
Sbjct 15795	AGCATGGATATCCTTCAATGCAAGTGGTCTCTTAATCTACCATCTCCGTGAACCAACA	15854		
Query 421	ACCCGTCCACTACTGCTAAATAATACCTTGGCGCTCATATAATGAGAGTGGCATCAAT	480		
Sbjct 15855	ACCCGTCCACTACTGCTAAATAATACCTTGGCGCTCATATAATGAGAGTGGCATCAAT	15914		
Query 481	TGCTCTCCAATGGG 494			
Sbjct 15915	TGCTCTCCAATGGG 15928			

03

Cacajao calvus ucayalii isolate FES101 voucher IDSM03679 mitochondrion, complete genome

Sequence ID: [NC_064182.1](#) Length: 16712 Number of Matches: 1
[See 1 more title\(s\)](#) [See all Identical Proteins\(IPG\)](#)

Range 1: 15428 to 15929 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
758 bits(410)	0.0	472/503(94%)	1/503(0%)	Plus/Plus
Query 1	TAGTTACTATGCCCTTTATTGAGGGCATTACCTTAAAGTAATATACAAGTACATACAAC	60		
Sbjct 15428	TAGTTACTATGCCCTTTATTGAGGGCATTACCTTAAAGTAATATACAAGTACATACAAC	15487		
Query 61	CACCTTTCCCTTTATGTACTTAATGCATTAAGCTTGGCCCCATGAATAATATATAGTA	120		
Sbjct 15488	CACCTTTCCCTTTATGTACTTAATGCATTAAGCTTGGCCCCATGAATAATATATAGTA	15546		
Query 121	CTAAGCATGCTTAATTATACATAGCACATAACAATAAGACGCACATTACACATTTTCCCG	180		
Sbjct 15547	CTAAGCATGCTTAATTATACATAGCHCATAGTAACAAGATGTACATTACACATTTTCCCG	15606		
Query 181	GACATGCTTTACAGGACAGGTAATTTAACTCCTCACAGAAGCTGGGCACATCATAGCAATAA	240		
Sbjct 15607	GACATGCTTTACAGCAAGTAATTTAACTCCTCACAGAAGCTGTAGTACATTATAACGACAA	15666		
Query 241	CAGTACATCAATCCTAATCCATACGGATATCATCTTAATACATCAAGTAGCTAACGATAC	300		
Sbjct 15667	CAGTACATTAATCCTAATCATACGGATATCATCTTAACACATCAAGCAGTTAACAGTAC	15726		
Query 301	ATTTGTACATAACATGATTAACTGGGACATAGCACATTTCAACTCAAGAGTCCATTAAACA	360		
Sbjct 15727	ATTTGTACATAACATGATTAACTGGACATAGCACATTTCCAGTCCAAGATCCATTAGACA	15786		
Query 361	TCCCCCCCACATGGATATCCVCCACTGCAAGTGGTCTTAAATCTACCATCTCCGTGA	420		
Sbjct 15787	TTCTCCCAAGCATGGATATCTCCACATGCAAGTGGTCTTAAATCTACCATCTCCGTGA	15846		
Query 421	AACCAACAACCCATCCACTACTGCTAATTAATATCCCTTGGCTCATACAATGTAGAGTG	480		
Sbjct 15847	AACCAACAACCCATCCACTACTGCTAATTAATATCCCTTGGCTCATATAATGTAGAGTG	15906		
Query 481	GCATCAATTGCTCCTCCAATGGGC 503			
Sbjct 15907	GCATCAATTGCTCCTCCAATGGGC 15929			

05

Cacajao calvus ucayalii isolate FES101 voucher IDSM03679 mitochondrion, complete genome

Sequence ID: [NC_064162.1](#) Length: 16712 Number of Matches: 1
[See 1 more title\(s\)](#) [See all Identical Proteins\(IPG\)](#)

Range 1: 15436 to 15901 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
828 bits(448)	0.0	460/466(99%)	0/466(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGCCCTTTATTGAGGGCATTACCTTAAAGTAATATACAAGTACATACAACCCACTTTCC	60		
Sbjct 15436	ATGCCCTTTATTGAGGGCATTACCTTAAAGTAATATACAAGTACATACAACCTCCTTTCC	15495		
Query 61	CCCCCTATGTACCTAATGCATTAACTTGGCCCCATGAATAATATAGTACTAAGCATG	120		
Sbjct 15496	CCCCCTATGTACCTAATGCATTAACTTGGCCCCATGAATAATATAGTACTAAGCATG	15555		
Query 121	CTTAATTATACATAGCACATAATAACAGACGTACATTACACATTTTCCCGACATGCTT	180		
Sbjct 15556	CTTAATTATACATAGCACATAGTAACAAGATGTACATTACACATTTTCCCGACATGCTT	15615		
Query 181	ACAAGCAAGTAATTTAACTCCTTACAGAACTGTAATACATCATAACGCAACAGTACATT	240		
Sbjct 15616	ACAAGCAAGTAATTTAACTCCTTACAGAACTGTAGTACATTATAACGCAACAGTACATT	15675		
Query 241	AATCCTAATCCATACGGATATCATCTTAACACATCAAGCAGTTAACAGTACATTGTGACA	300		
Sbjct 15676	AATCCTAATCCATACGGATATCATCTTAACACATCAAGCAGTTAACAGTACATTGTGACA	15735		
Query 301	TAAATGATTAACTGGACATAGCACATCCAGTTCAAGATCATTAGACATCTTCCCA	360		
Sbjct 15736	TAAATGATTAACTGGACATAGCACATCCAGTTCAAGATCATTAGACATCTTCCCA	15795		
Query 361	GCATGGATATCTCCACTGCAAGTGGTCTTAACTTACCATCTCCGTGAACCAACAA	420		
Sbjct 15796	GCATGGATATCTCCACTGCAAGTGGTCTTAACTTACCATCTCCGTGAACCAACAA	15855		
Query 421	CCCATTCACACTACTGCTAATTAATACCTTGGCGCTCATATAATGTA 466			
Sbjct 15856	CCCATTCACACTACTGCTAATTAATACCTTGGCGCTCATATAATGTA 15901			

04

Cacajao calvus ucayalii isolate FES100 voucher IDSM03678 mitochondrion, complete genome

Sequence ID: [OM328913.1](#) Length: 16763 Number of Matches: 1

Range 1: 15425 to 15879 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
725 bits(392)	0.0	435/456(95%)	1/456(0%)	Plus/Plus
Query 1	ACTTACTATGCCCTTTATTGAGGGCATTACCTTAAAGTAATTTACAAGTACATACAAC	60		
Sbjct 15425	ACTTACTATGCCCTTTATTGAGGGCATTACCTTAAAGTAATTTACAAGTACATACAAC	15484		
Query 61	ACCTTTCCCTTTATGTACCTAATGCATTAACTTGGCCCCATGAATAATATATAGTAC	120		
Sbjct 15485	A-CTTTCCCTTTATGTACCTAATGCATTAACTTGGCCCCATGAATAATATATAGTAC	15543		
Query 121	TAAAGCTGCTTAATTATACATAGCACATAGCAATAAGATGTACATTACACATTTTCCCGA	180		
Sbjct 15544	TAAAGCTGCTTAATTATACATAGCACATAAGAATAAGACGTACATTACACATTTTCCCGA	15603		
Query 181	ACATGCTTTACAAGCAAGTAATTCAATCTCTTACAGGACTATAGTACATTATAACAATGGT	240		
Sbjct 15604	ACATGCTTTACAAGCAAGTAATTCAATCTCTTACAGGACTATAGTACATTATAACAATGGC	15663		
Query 241	AGTACATTAACTTCTAGTCCATACGGATATCATCTCAGTACATAAAGTAGTTAACAGTACA	300		
Sbjct 15664	AGTACATTAACTTCTAGTCCGACGAATATCATCTTAATGATAGAGTAGTTAACAGTACA	15723		
Query 301	TTTGTACATAACATGATTAACTGGACATGGCACATTTCAACTCAAGATCCATTAAACAT	360		
Sbjct 15724	TTTGTACATAACATGATTAACTGGACATGGCACATTTCAACTCAAGATCCATTAAACAT	15783		
Query 361	CCTTTCCAACATGAATATCCTTCACTGCAAGTGGTCCCTTAACTACCATCTCCCGTGAA	420		
Sbjct 15784	CCTTTCCAACATGGATATCCTTCACTGCAAGTGGTCCCTTAACTACCATCTCCCGTGAA	15843		
Query 421	ACCAACAACCCATCCACTACTGCTAATTAATAATCC 456			
Sbjct 15844	ACCAACAACCCATCCACTACTGCTAATTAATAATCC 15879			

06

Cacajao calvus isolate FES46 voucher IDSM03665 mitochondrion, complete genome

Sequence ID: [OM328948.1](#) Length: 16711 Number of Matches: 1

Range 1: 15425 to 15935 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
900 bits(487)	0.0	503/511(98%)	0/511(0%)	Plus/Plus
Query 1	TACTTACTATGCCCTTTATTGAGGGCATTACCTTAAGGTAATATACAAGTACATACAAC	60		
Sbjct 15425	TACTTACTATGCCCTTTATTGAGGGCATTACCTTAAGGTAATATACAAGTACATACAAC	15484		
Query 61	CACTTTTCCCCCTTATGTACCTAATGCATTAATGCTTGGCCCCATGAATAATATATAGTA	120		
Sbjct 15485	CACTTTTCCCCCTTATGTACCTAATGCATTAATGCTTGGCCCCATGAATAATATATAGTA	15544		
Query 121	CTAAGCATGCTTAATTATACATAGTACATGATAATAAGACGTACATTACACATTTTCCCG	180		
Sbjct 15545	CTAAGCATGCTTAATTATACATAGTACATGATAATAAGACGCACATTACACATTTTCCCG	15604		
Query 181	AACATGCTTACAAGCAAGTAATTCAATCTCTTACAGGACCATAACATCATAACAACGG	240		
Sbjct 15605	AACATGCTTACAAGCAGGTAATTCAATCTCTTACAGGACCATAACATCATAACAATGG	15664		
Query 241	CAGTACATTAATCCTAGTCCACACGGATATCATTTAATACATGAAGTAGTTAACAGTAC	300		
Sbjct 15665	CAGTACATTAATCCTAGTCCACACGGATATCATTTAATGATGAAGTAGTTAACAGTAC	15724		
Query 301	ATTTGTACATAAATGATTAACCGGACATGGCACATTCTAACTCAAAGATCCATTAAACA	360		
Sbjct 15725	ATTTGTACATAAATGATTAACCGGACATGGCACATTCTAACTCAAAGATCCATTAAACA	15784		
Query 361	TCCTTTCCAGCATGGATATCCTTCATTGCAAGTGGTCTCTTAATCTACCATCCTCCGTGA	420		
Sbjct 15785	TTCTTTCCAGCATGGATATCCTTCATTACAAGTGGTCTCTTAATCTACCATCCTCCGTGA	15844		
Query 421	AACCAACAACCCATCCACTACTGCTAATTAAATATCCTTGGGCTCATATAATGTAGAGTG	480		
Sbjct 15845	AACCAACAACCCGTCCACTATTGCTAATTAAATATCCTTGGGCTCATATAATGTAGAGTG	15904		
Query 481	GCATCAATTGTCCTCCAATGGGCAGCTGGTT	511		
Sbjct 15905	GCATCAATTGTCCTCCAATGGGCAGCTGGTT	15935		

APÊNDICE 2: Tabela indicando os sítios polimórficos identificados entre a região *D-loop* da sequência referência para *C. c. ucayalii* (NCBI: NC_064162.1) e animais avaliados neste estudo.

	SÍTIOS POLIMÓRFICOS																				
	003	043	053	060	064	073	081	125	126	127	145	150	151	152	155	160	162	178	181	193	197
<i>C. c. ucayalii</i> (NC_064162.1)	G	A	A	T	-	C	C	A	C	A	C	A	G	T	C	T	T	C	G	A	A
AMOSTRAS																					
01	C	T	.	.	C	T	.	G	.	G	.	.	.	C	T	C	.	.	A	.	.
02	-	.	T	.	-	T	.	G	T	.	.	.	A	.	T	C	.	T	.	.	.
03	-	.	.	.	T	T	.	G	.	.	T	G	A	.	T	C	.	.	A	.	.
04	-	.	.	C	-	.	.	G	.	.	.	.	A	C	.	C	.	.	.	G	G
05	.	.	.	.	T	T	T	G	.	.	.	.	A	C	T	C	C	.	.	.	.
06	C	T	.	.	C	T	.	G	.	G	.	.	.	C	T	.	.	.	A	.	.
07	C	.	.	.	T	T	.	G	.	.	T	G	A	.	T	C	.	.	A	.	.
	SÍTIOS POLIMÓRFICOS																				
	199	202	204	205	209	212	217	218	220	221	223	224	225	226	230	232	233	234	235	236	238
<i>C. c. ucayalii</i> (NC_064162.1)	T	T	T	A	C	T	A	A	T	G	A	G	T	A	T	T	A	A	C	G	C
AMOSTRAS																					
01	.	.	C	.	T	.	G	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	T
02	C	C	.	G	T	.	G	.	.	.	.	A	.	.	.	A	G	G	C	A	T
03	.	.	C	.	T	.	G	G	C	A	.	A	.	G	C	.	.	.	.	.	.
04	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	C	.	.	.	.	A	.
05	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	G	.	C	.	C	.	.	G	.	A	T
06	.	.	C	.	T	.	G	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	T
07	.	.	C	.	T	.	G	.	C	A	.	A	.	.	C	.	.	.	.	A	.

	SÍTIOS POLIMÓRFICOS																				
	239	240	241	249	257	262	271	274	275	276	278	279	283	284	287	288	291	313	322	330	339
<i>C. c. ucayalii</i> (NC_064162.1)	A	A	C	T	A	T	C	C	C	T	A	C	T	C	G	C	T	C	T	A	C
AMOSTRAS																					
01	G	G	T	.	G	.	.	T	.	C	G	.	.	A	A	.	.	.	.	G	T
02	.	.	.	.	.	C	T	.	T	.	G	.	C	T	A	.	.	.	C	G	.
03	G	G	.	.	G	C	.	T	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	C	G	T
04	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	C	.	.	.	.	.
05	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.
06	G	G	T	.	G	.	.	T	.	C	G	.	.	A	.	.	.	.	.	G	T
07	G	G	.	.	G	C	.	T	T	.	.	.	.	G	.	.	.	T	C	G	T
	SÍTIOS POLIMÓRFICOS																				
	341	342	357	362	364	365	366	367	370	375	383	386	398	433	435	469					
<i>C. c. ucayalii</i> (NC_064162.1)	G	T	G	T	C	T	C	C	G	G	C	C	T	A	T	T					
AMOSTRAS																					
01	A	.	.	C	T	.	T	.	A	A	T	.	C	.	.	-					
02	A	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
03	A	.	.	C	T	.	T	A	.	.	T	T	.	G	.	.					
04	.	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.					
05	A	.	.	C	.	C	.	.	A	.	.	.	.	.	.	C					
06	A	.	.	C	T	.	T	.	A	A	T	.	C	.	.	-					
07	A	.	.	C	T	.	T	.	.	.	T	T	.	.	.	.					

CAPÍTULO II: TRABALHO CIENTIFICO

Trabalho a ser enviado para a American Journal of Primatology

Normas disponíveis em

[https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/10982345/homepage/forauthors.html# 4. PREPARING THE](https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/10982345/homepage/forauthors.html#4.1)

Using STS markers for the identification at the subspecies taxonomic level of *Bald-uakari* (*Cacajao calvus* ssp.)

Uso de marcadores STS para identificação em nível taxonômico de subespécie de Uakari-careca (*Cacajao calvus* ssp.)

Pedro Paulo de Oliveira Nogueira¹; Luis Orlando Beselly Cueva¹;

Luize Hoffmann Dall'Agnese²; André Oliveira de Souza Lima²;

Lígia Souza Lima Silveira da Mota¹

¹ Department of Chemistry and Biological Sciences, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP).

² Molecular Genetics Laboratory, Polytechnic School, Vale do Itajaí University (UNIVALI).

ABSTRACT

Due to their arboreal habits and folivorous-fruitful feeding, non-human primates are highly vulnerable to their habitat's destruction, fragmentation, and degradation. The Bald-uakaris are endemic to the western Amazon region and are divided into four subspecies: *C. calvus calvus*, *C. c. rubicundus*, *C. c. ucayalii*, and *C. c. novaesi*. Currently, the subspecies diagnosis of wild populations is done with the observation of the coat coloration pattern of specimens. Peruvian-red-uakari (*Cacajao calvus ucayalii*) is present in Brazilian and Peruvian fauna and is classified as Vulnerable by the IUCN. Studies have shown that their habitat areas are among the regions at deforestation risk for palm oil plantations in the short and long term. Aiming to perform the identification at the subspecies taxonomic level of specimens of *Cacajao calvus* ssp., this study was carried out using DNA extracted from blood samples obtained from seven animals that were victims of trafficking and which are at the *Pilpintuwasi* Rescue Center, Iquitos, Peru. Polymerase chain reactions (PCRs) using specific primers for subspecies identification were performed. The PCR products obtained were then purified and sequenced using Sanger and Nanopore techniques. The designed set of primers was efficient to anchor on all four described subspecies. Two specimens previously identified, by their coat color, as *C. c. ucayalii* showed greater genetic similarity with *C. c. novaesi*. Studies such as these are essential for *ex situ* reproduction and individuals' correct identification, allowing the development of projects that enable feasible actions for these primates' conservation.

Keywords: Peruvian-red-uakari; identification; molecular biology; conservation.

INTRODUCTION

Cacajao is the largest member of the New World primates' family Pitheciidae, it is endemic to the Amazon Rainforest and comprises the Black-uakari (*C. melanocephalus*, *C. ayresi*, and *C. hosomi*) and Bald-uakari (*Cacajao calvus* ssp.). Bald-uakaris are endemic to the western Amazon region, occurring in the forests of the Ucayali, Solimões, and Juruá river basins (Silva Jr. et al., 2013). Four subspecies were described by Hershkovitz (1987): *C. calvus calvus*, *C. c. rubicundus*, *C. c. ucayalii* and *C. c. novaesi*. Recently, Silva et al. (2022) found that the four subspecies considered by Hershkovitz (1987) are monophyletic, geographically well separated, and include only individuals with consistent patterns of coat staining considered diagnostic for each of them. Based on this information, it was proposed that the Uakaris be classified at the species level and included a new species that would have diverged in the Tarauacá River region, which is *Cacajao amuna*.

The study conducted by Silva et al. (2022) used phylogenetic analyses demonstrating conformity with the coat differences in Cacajao. Using cytochrome b and ddRADseq, it was possible to separate white (*C. amuna* and *C. calvus*) and red (*C. novaesi*, *C. rubicundus*, and *C. ucayalii*) into two well-defined groups. Genomic representation throughout the genome also recovered a structure within these two clades showing that the four subspecies considered by Hershkovitz (1987) are reciprocally monophyletic, besides having unique diagnostic characteristics (Silva et al., 2022).

Peruvian-red-uakari (*Cacajao calvus ucayalii*) is present in Brazilian and Peruvian fauna occurring mainly in the Peruvian Amazon and was recently observed in the Serra do Divisor National Park, Acre, Brazil (Silva et al., 2021). This subspecies is the only one found in regions of higher altitudes, being reported in the Serra de Contamana at 600-700m above sea level (Aquino et al., 2013; Heymann and Aquino, 2010), in the mountains of the Cahuapanas Mountain Range at 1400m above sea level

(Vermeer et al., 2013) and in the Divisor Mountain Range in Peru and Brazil (Heymann & Aquino, 2010; Jorge & Velazco, 2006). The flexibility reported in your habitat requirements (Heymann & Aquino, 2010; Peres, 1997) may be the key to keeping the population isolated in these areas.

Compared to other individuals belonging to the Uakari, the population status of *C. c. ucayalii* is little studied. In a study conducted by Bowler et al. (2013) in the region of the Conservation Concession of Lago Preto, Peru, the population size was estimated at 116.8 individuals/km². *Cacajao c. ucayalii* is listed as vulnerable by the International Union for Conservation of Nature (IUCN) and its population is decreasing (Boubli et al., 2020). The main threats to the species are deforestation, road network expansion, and hunting (Calouro, 2015).

Regarding their diet, we note its role in maintaining the ecosystem and its importance for seed dispersal. The well-developed mandible and dentition of these animals (Herskovitz, 1987) allow the consumption of a variety grid of fruits and seeds. Expanding to social aspects related to the species, Alvarado et al. (2017) demonstrated the relationship of mammals and birds with native peoples of the Abujao River region, Peru. In this study, the presence of *Cacajao calvus* in subsistence activities was observed.

Human activities fragmented forests near urban centers and attracted a market for agricultural products, even with the inaccessibility of much of the Amazon region. The rapid expansion of palm oil production in South America is observed, driven by economic incentives, international investments, and large areas ideal for its production (Butler & Laurance, 2009). Vijay et al. (2018) demonstrated that the habitat areas of *Cacajao calvus ucayalii* are among the regions at risk of deforestation, for the planting of oil, in the short and long term. Two ecoregions are at greater risk: humid

forests (Napo, Solimões-Japurá, Ucayali, and Southwest Amazon), which corresponds to 80.9% of forest conversion in palm oil plantation; and lowland forests (Iquitos and Purus), which correspond to another 19%.

The IUCN lists on three levels the need to conserve biodiversity, including genetic diversity, species, and ecosystems (Mcneely et al., 1990). Genetic issues are associated with all three. (Frankham et al., 2010). Due to the combined actions associated with human activities (habitat loss, overexploitation, introduced species, pollution, and climate change) and stochastic events associated with reduced-size populations (demographic, ecological, and genetic stochasticity as well as catastrophes), species are driven to extinction (Shaffer, 1981), typically interacting in synergistic feedback (Brook et al., 2008) called "extinction vortex" (Gilpin & Soulé, 1986).

Among the *ex situ* reproduction work for threatened species, there is the need for a reliable genetic bank, originating from pure animals. The main focuses of genetic management of these populations are maintaining genetic diversity and minimizing inbreeding (Frankham et al., 2010). Using molecular biology tools, this study aimed to identify specimens of *Cacajao calvus* ssp. at the taxonomic level of subspecies. Thus, the results obtained, provide reasoned and reliable information for the management and conservation actions of the populations of Peruvian-red-uakari in the medium and long term.

METHODS

The project has authorizations granted by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of the Veterinary Medicine and Animal Science Faculty of São Paulo State University (UNESP), Botucatu Campus, under protocol 0046/2021 of June 22, 2021, and by the Peruvian Government's National Forest and Wildlife Service

(SERFOR), under protocol No. D000319-2022-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS-DGSPFS of May 31, 2022.

Biological material was collected at the *Pilpintuwasi* Rescue Center located in Iquitos in the Department of Loreto, Peru. The legal representative and general manager was aware and according to the project execution in the center's premises.

The samples collected (Table 1) are from animals victims of illegal wildlife trafficking and when recovered, are sent to the rescue center by the Peruvian government. The *Pilpintuwasi* Rescue Center has a project with the subspecies (*C. c. ucayalii*) where the puppies born on-site are sent for reintroduction. All specimens are in a semi-freedom environment, except for specimen 6 which would be the group's alpha male and, because it presents defensive behavior, is kept in an enclosure, but with the possibility of interaction with the others of the group.

TABLE 1. Information regarding gender, age (year) and weight (kg) of the sampled animals.

ANIMALS	GENDER	AGE (year)	WEIGHT (kg)
1	F	5.0	4.25
2	F	4.0	3.95
3	F	11.0	4.70
4	F	7.0	3.90
5	F	3.0	3.70
6	M	9.0	4.20
7	M	1.5	3.30

It was not possible to collect detailed data on their origin, however, according to the documents provided by the rescue center's management, specimens 1, 2, 3, 5, and 7 arrived at the center at a young age of less than one year of life. Specimens 4 and 6 arrived at *Pilpintuwasi* Rescue Center as an adult, as they previously have been sent to another rescue center in the region.

Aiming at the safety of the animals under study, we follow the measures established by Ministerial Resolution No. 0177-2020-MINAGRI of July 31, 2020, on

wildlife activities where it became necessary to establish protocols for the implementation of surveillance, prevention, and control measures of COVID-19 in the fauna activities formulated by SERFOR.

The animals were chemically contained by intramuscular administration in the semimembranosus muscle. The anesthetics given were Midazolam 0.15mg/kg (Midanex®, AC Farma) associated with Dexmedetomidine 0.02mg/kg (Dexdomitor®, Zoetis). Subsequently, anesthetic reversal was performed with Atipamezol 0.2mg/Kg (Antisedan®, Zoetis). Physiological parameters such as heart and respiratory rate, oxygen saturation, systolic pressure, diastolic and mean pressure, and temperature were measured throughout the procedure every 5 minutes, verifying the depth of sedation by observing and checking the eye and eyelid reflexes. The samples were obtained by venous puncture in the femoral vein (Campebell et al. 2007; Cubas et al., 2014), with 21G x 1 1/2" mm needles and syringes with a capacity of 5.0 mL. The volume of blood collected was packed in tubes containing 5% disodium salt of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and refrigerated for subsequent DNA extraction.

Molecular analyses

Molecular analyses were performed at the Animal Genetics Laboratory of the Department of Chemical and Biological Sciences of the Biosciences Institute (IBB), São Paulo State University (UNESP). After blood collection, the samples had their DNA extracted using the Cellco© Blood and Animal Cells DNA Preparation Kit following the protocol provided by the manufacturer. Quantitative and qualitative analyses were executed with a spectrophotometer (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer – Thermo Fisher Scientific). Evaluating the extraction's integrity by spectrophotometry, it was found that all DNA samples presented their values between 1.70 and 1.90, which

reflects a good quality material without protein contamination, which allowed us to move forward with the analyses.

For the specimens' genetic characterization analyses, a pair of primers was designed with the Primer3Plus program (Untergasser et al., 2007). Complete mitochondrial genome sequences of *the Cacajao calvus* subspecies were selected from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database. The most discrepant was selected and identified as the control region (D-loop), which is classified as the most variable part of mitochondrial DNA (mtDNA) at the intraspecific level.

The used primers set was called CacajaoID, where the forward was CacajaoID_F (5' TTCCACCGTCAACAACAAA3') and reverse CacajaoID_R (5' GTAGGAACCAGCTGCCCATT 3'), these are the Sequence Tagged Sites (STS) types. The primer set anchors on all subspecies described (Figure 1), amplifying a mtDNA sequence of ~560bp, following the thermal profile: initial denaturation at 95°C for 5 minutes, followed by 35 cycles at 95°C for 30 seconds, 56°C for 30 seconds, 72°C for 1 minute, and final extension at 72°C for 10 minutes.

Polymerase chain reactions (PCRs) were performed in triplicate and its amplified products were observed in 1.5% electrophoresis gel and purified with an alkaline Exonuclease/Phosphatase mix. The fragments were sequenced in both directions using the 2µL BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit version 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA), 2µL of 2.5 Save Money (400 mM Tris-HCl pH 9, 0.10 mM MgCl₂) and 5pmol of each primer in the ABI3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) following the manufacturer's instructions.

To validate the data obtained in the subspecies identification, we executed an amplification of a fragment of approximately 8,670 bp from Specimen 3. A pair of primers was designed based on a reference sequence for *Cacajao calvus ucayalii*,

available in NCBI's GenBank (ID: OM328913.1). The primers obtained were Cacajao_Frag1_F (5' CCCAGTACAGCCCATTCACC 3') and Cacajao_Frag1_R (5' AAAGCGGATAGGGCTCCTGTA 3'). PCR reactions were performed with a total volume of 25 μ L containing the following ingredients: 50 ng of genomic DNA from the organism of interest, 1x Platinum™ SuperFi II DNA Polymerase buffer (Thermo Fisher), 0.2 mM dNTPs (Promega), 0.5 mM of each primer, 2 mM magnesium chloride, and 0.25 U Platinum™ SuperFi II DNA Polymerase (Thermo Fisher). The final volume was adjusted with ultrapure water. PCR was conducted in a Veriti thermocycler (Applied Biosystems) with an initial denaturation step at 94°C for 4 minutes, followed by 35 cycles consisting of denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 62°C for 40 seconds, and polymerization at 72°C.

After the amplification stage, amplicons were evaluated by electrophoresis on a 0.8% agarose gel. Positive reactions, resulting in the amplified DNA of interest (single band) with a minimum concentration of 50 ng/ μ L, were selected for the sequencing step. To perform sequencing using the MinION (Nanopore Oxford), the library preparation stage was conducted using the NEBNext® Companion Module for Oxford Nanopore Technologies® Ligation Sequencing and following the Ligation Sequencing Kit SQK-LSK112 (Oxford Nanopore) protocol. After preparing the library, the DNA was quantified, and an aliquot was used for sequencing. The sequencing process was performed using a MinION sequencer (Oxford Nanopore™) with a FLO-MIN106D R9.4.1 flow cell, aiming to obtain at least 1,000 copies of the mitochondrial DNA sequence studied.

The obtained sequences were basecalled using the Guppy module in MinKNOW (Oxford Nanopore Technologies), which employs a bidirectional recurrent neural network algorithm. The resulting FASTQ files, containing nucleotide sequences and

associated quality information, were used for post-processing and sequence data analysis. The extracted sequences were assembled and evaluated as a set to obtain the consensus sequence using the "multiple NGS alignment with reference" tool in the CLC Genomics Workbench (v 6.15) bioinformatics package. The consensus sequence was then compared with genetic *Cacajao calvus ucayalii* (ID: OM328913.1) reference using BLAST tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Also, the Sanger sequences obtained and the electropherograms were analyzed in Geneious v.10.0.9 (Biomatters, Auckland, New Zealand), aligned with the Muscle algorithm, and manually verified. The sequences were compared with the genetic sequences belonging to all four subspecies described for *Cacajao calvus* ssp. and phylogenetically similar species using the BLAST tool.

RESULTS

The CacajaoID primer set presented an amplification of ~560bp for all specimens (Image 2). With this result, PCR products were purified and sequenced. The sequencing results (Appendix 1) were analyzed using the BLAST tool to differentiate them at the taxonomic level of subspecies (Table 2).

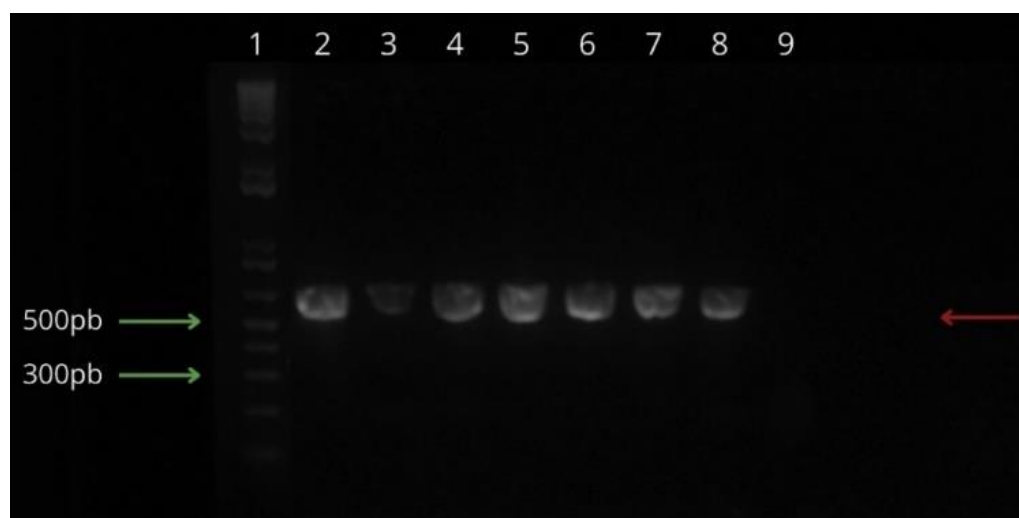


IMAGE 2. Electrophoresis in 1.5% agarose gel of PCR for a mtDNA fragment of *Cacajao calvus*

ssp.. Column 1: Ladder 1Kb Plus (ABM® Opti-DNA Markers); Column 2 to 8: *Cacajao calvus* ssp. specimens; Column 9: Negative control. The green arrows indicate the molecular weight values and the red arrow indicates the amplicons' size (560 bp).

TABLE 2. Values obtained in the BLAST tool with sanger sequencing referring to CacajaoID.

SPECIMENS	QUERY COVER	E-VALUE	% IDENTITY	SUBSPECIES	REFERENCE SEQUENCE
1	100%	0.0	95.24	<i>C.c. ucayalii</i>	OM328913.1
2	100%	4e-121	91.21	<i>C.c. ucayalii</i>	OM328913.1
3	100%	0.0	98.18	<i>C. c. novaesi</i>	NC_064156.1
4	100%	0.0	98.71	<i>C.c. ucayalii</i>	NC_064162.1
5	100%	0.0	93.84	<i>C.c. ucayalii</i>	NC_064162.1
6	100%	0.0	95.39	<i>C.c. ucayalii</i>	OM328913.1
7	100%	0.0	98.43	<i>C. c. novaesi</i>	NC_064156.1

All samples showed 100% coverage when compared to NCBI reference sequences. The e-value concerns the statistical value (probability) that will indicate whether the alignment is real or was obtained at random by the database, resulting in a false positive. That is, the closer to zero the e-value obtained, the lower the chances of the result presented being casual. All specimens presented an e-value equal to or close to zero, which is seen as a satisfactory probabilistic result.

All specimens obtained an identity percentage higher than 90%, representing a high similarity between the sequences obtained by sequencing and the reference sequences present in NCBI's database. With these values, we can observe that among the seven specimens analyzed, two of them (Specimens 3 and 7) presented greater similarity with sequences of the subspecies *Cacajao calvus novaesi*, while the others (Specimens 1, 2, 4, 5, and 6) presented greater similarity with sequences belonging to the subspecies *Cacajao calvus ucayalii*. The polymorphic sites observed in the comparison between the reference sequence NC_064162.1 (*C. c. ucayalii*) from the

NCBI's database and the animals in this study were identified and described in Appendix 2.

The PCR result aiming to amplify a ~8,670pb fragment is shown in Image 3. With this, it was possible to advance to the MinION sequencing and compare the results using the BLAST tool (Table 3).



IMAGE 3. Electrophoresis in 0.8% agarose gel of PCR for a mtDNA fragment of *Cacajao calvus* ssp.. The amplified fragments for specimen 3 are available in columns 5 and 7.

TABLE 3. Values obtained in blast tool with MinION sequencing.					
SPECIMENS	QUERY COVER	E-VALUE	% IDENTITY	SUBSPECIES	REFERENCE SEQUENCE
3	100%	0.0	99.97	<i>C. c. novaesi</i>	NC_064156.1

The obtained results for the sample sequenced by the nanopore technique showed an identical result to the sample of the same specimen submitted to Sanger sequencing. The sample presented 100% coverage when compared to NCBI reference sequences. The e-value for this sequencing was equal to zero. The percentage of identity was higher reaching 99.97%. Again, the Specimen 3 sequence showed greater similarity with sequences of the subspecies *Cacajao calvus novaesi*.

DISCUSSION

Molecular biology techniques have demonstrated their importance by being a tool that allows correct and safe species identification. In the case of individuals directed for biodiversity conservation programs, these tools become even more essential. In such programs, there is a need to form a pure breeding group. In this study,

animals intended for *ex situ* reproduction of Peruvian-red-uakari were analyzed. Despite efforts to keep this subspecies' wild population stable, the unavailability of an accessible technique for correct identification led to the formation of a group with individuals of different subspecies.

DNA barcoding is one of the most widespread methods for species identification. This method employs short standardized regions that are maintained to be identical by selection within a taxon, but varying between taxa (Hebert et al., 2003). Two of the most commonly used genes in this type of analysis are cytochrome b (cytB) and cytochrome c oxidase (COX). During our study, both genes were analyzed for the four subspecies described. The analysis presented high conservation among the subspecies that, therefore, did not allow differentiation at the subspecies taxonomic level. To achieve this precision, the designed primers targeted the mtDNA D-loop region. This region is consistent for intraspecific phylogenetic analyses, being applied for decades in molecular biology (Brown; Beckenbach; Smith, 1993), due to the genetic variation that occurs in their hypervariable sequences.

Although *in situ* conservation represents the most effective way to protect endangered species, it is clear that not all species can be efficiently preserved in their natural habitats. Under human care breeding programs should aim at the creation and conservation of healthy and self-sustaining captive populations that are as similar as possible to their wild counterparts, both in behavioral and genetically terms (Frankham, 2008; Silva et al., 2010; Ralls & Ballou, 1986; Robert, 2009).

The coat color patterns are consistent and considered a diagnostic method for differentiation between the *Cacajao calvus* subspecies. However, due to the origin uncertainty of these animals' victims of trafficking, the color patterns proved insufficient in the subspecies' correct identification. All animals were sent to the rescue

center based on phenotypic data, all of which were classified as *C. c. ucayalii*. However, specimens 3 and 7 were identified as *C. c. novaesi*.

Widely, but irregularly distributed throughout the Western Amazon, each subspecies has different priorities in terms of research and conservation measures, especially regarding habitat loss due to deforestation and anthropogenic climate change (Silva et al., 2022). The Bald-uakari is considered a flag species in Brazil and Peru. Created as a result of a strong alliance between the local population and conservationists, the Tamshiyacu Tahuayo Communal Reserve (RCTT) was the first protected area known to contain Peruvian Red Uakari. The reserve is situated near Iquitos and covers an area of 322.500ha (Newing & Bodmer, 2003).

The presence of *Cacajao calvus ucayalii* became part of the justification for the creation of three new protected areas in Peru, the Sierra del Divisor Reserved Zone, The Black Lake Conservation Concession, and the Grande Yavarí Reserve. Community conservation work aims to reduce Peruvian-red-uakari hunting in this area and is conducted by the Wildlife Conservation Society (WCS-Peru) and Durrell Institute for Conservation and Ecology on the Yavari and Yavari-Mirin rivers in Peru.

The biodiversity conservation program reported here is part of a range of actions aimed at the stability of *C. c. ucayalii*. However, without genetic data and specimens' correct identification for *ex situ* reproduction, the program tends to fail with its objective. We have as an example the Asian Lion (*Panthera leo persica*) case where several of the program founding animals were later identified as African and Asian lions' hybrids, resulting at the end of the program, after substantial resources were spent (Frankham et al., 2010).

The particularities present in the Bald-uakaris' physical and behavioral characteristics make them an exponent member of the Peruvian and Brazilian fauna.

The growing challenges to the Amazonian biodiversity make it essential to develop conservation projects that enable tangible actions for these primates. The union between researchers and conservationists is the key to these actions being carried out efficiently and with promising results.

The presence of pure specimens in biodiversity conservation breeding programs is essential to their success. Here we present a STS marker based on the d-loop region of *Cacajao calvus* ssp. mtDNA. This marker proved, in practice, to be efficient in identifying individuals of the subspecies *C. c. ucayalii* and *C. c. novaesi*. Based on the NCBI's database reference sequences and BLAST tool, the designed set of primers also presents usability for the subspecies *C. c. rubicundus* and *C. c. calvus*. These data represent a meaningful advance for feasible action elaboration to species and subspecies conservation. Due to human activities' constant growth in the Amazon, the under-study species' habitat continues to be threatened and fragmented. As a result, we note the decline of their wild populations, which represents continued progress on the extinction risk scale. Studies such as this are the basis for individuals' correct identification of *ex situ* reproduction, enabling these programs' continuity and obtaining promising results for free-living specimens' conservation.

ACKNOWLEDGMENT

The authors acknowledge Re:Wild's Primate Action Fund and the Margot Marsh Foundation for the grant support provided to this study. The authors acknowledge the *Pilpintuwasi* Rescue Center for allowing the elaboration of this study within its premises. The authors acknowledge funding from CNPq to the Brazilian National Institute of Science and Technology - INCT-Mar COI (Process 400551/2014-4) and for supporting A.O.S.L. (312363/2018-4).

REFERENCES

- Alvarado, J. L., Rivas, M. A., Fernández, V., & Peralta, M. a. C. (2017). Mamíferos y aves silvestres usados por los pobladores de la cuenca del río Abujao (Ucayali, Perú). *Revista Peruana De Biología*, 24(3), 263–272. <https://doi.org/10.15381/rpb.v24i3.13907>
- Aquino, R., Alvarez, J. D. R., & Mulanovich, A. (2013). Diversidad y estado de conservación de primates en las Sierras de Contamana, Amazonía peruana. *Revista Peruana De Biología*, 12(3), 427–434. <https://doi.org/10.15381/rpb.v12i3.2417>
- Boubli, J.P., Shanee, S., Aquino, R., Calouro, A.M. & Cornejo, F.M. (2020). Cacajao calvus ssp. ucayalii. *IUCN Red List of Threatened Species*. <https://doi.org/10.2305/iucn.uk.2021-1.rlts.t3420a191697379.en>
- Bowler, M. *et al.* (2013) Annual variation in breeding success and changes in population density of Cacajao calvus ucayalii in the Lago Preto Conservation Concession, Peru. In: L. Veiga. **Evolutionary Biology and Conservation of Titis, Sakis and Uakaris (Cambridge Studies in Biological and Evolutionary Anthropology)** (pp. 173-178). Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Brook, B. W., Sodhi, N. S., & Bradshaw, C. J. A. (2008). Synergies among extinction drivers under global change. *Trends in Ecology and Evolution*, 23(8), 453–460. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.03.011>
- Brown, J. H., Beckenbach, A. T., & Smith, M. S. (1993). Intraspecific DNA sequence variation of the mitochondrial control region of white sturgeon (Acipenser transmontanus). *Molecular Biology and Evolution*. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040007>
- Butler, R., & Laurance, W. F. (2009). Is Oil Palm the Next Emerging Threat to the Amazon? *Tropical Conservation Science*, 2(1), 1–10. <https://doi.org/10.1177/194008290900200102>
- Calouro, A.. **Avaliação do risco de extinção de Cacajao calvus ucayalii (Thomas, 1928) no Brasil.** 2015. Disponível em: https://www.icmbio.gov.br/portal_antigo/component/content/article.html?id=7285:mamiferos-cacajao-calvus-ucayalii-Uakari. Accessed: 24 sep. 2021.
- Campebell, R. C., Peiró, J. R., Rosa, P. C. S., Valadão, C. a. A., & Bechara, G. H. (2007). Endotoxemia por lipopolissacarídeo de Escherichia coli, em equinos: efeitos de antiinflamatórios nas concentrações sérica e peritoneal do fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa). *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia*, 59(4), 837–843. <https://doi.org/10.1590/s0102-09352007000400003>
- Cubas, Z.S., Silva, J. C. R., & Catão-Dias, J. L. (2014). *Tratado de animais selvagens: medicina veterinária. vol. 1.*
- Frankham, R. (2008). Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. *Molecular Ecology*, 17(1), 325–333. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2007.03399.x>

Frankham, R., Ballou, J. D., & Briscoe, D. A. (2010). *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press.

Gilpin, M.E.; Soulé, M.E.. (1986). Minimum viable populations: processes of species extinction. In: M.E. Soulé; B.A. Wilcox. **Conservation Biology**: an evolutionary-ecological perspective (pp. 14-34). Sunderland, UK: Sinauer.

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1512), 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>

Hershkovitz, P. (1987). Uacaries, new world monkeys of the genus Cacajao (Cebidae, Platyrrhini): A preliminary taxonomic review with the description of a new subspecies. *American Journal of Primatology*, 12(1), 1–53. <https://doi.org/10.1002/ajp.1350120102>

Heymann, E. W., & Aquino, R. (2010). Peruvian Red Uakaris (Cacajao calvus ucayalii) Are Not Flooded-Forest Specialists. *International Journal of Primatology*. <https://doi.org/10.1007/s10764-010-9425-3>

Jorge, M.L.S.P.; Velazco, P.M. (2006). Mammals. In: C. Vriesendorp *et al.* **Perú, Sierra del Divisor. Rapid Biological Inventories Report 17** (pp. 196-204). Chicago, USA: The Field Museum.

McNeely, J. A., & Resources, I. U. F. C. O. N. a. N. (1990). *Conserving the World's Biological Diversity*. International Union for Conservation of Nature and Natural.

Newing, H. S., & Bodmer, R. E. (2003). Collaborative Wildlife Management And Adaptation to Change: The Tamshiyacu Tahuayo Communal Reserve, Peru. *Nomadic Peoples*. <https://doi.org/10.3167/082279403782088859>

Peres, C. A. (1997). Primate community structure at twenty western Amazonian flooded and unflooded forests. *Journal of Tropical Ecology*, 13(3), 381–405. <https://doi.org/10.1017/s0266467400010580>

Ralls, K., & Ballou, J. D. (1986). Captive breeding programs for populations with a small number of founders. *Trends in Ecology and Evolution*, 1(1), 19–22. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(86\)90062-5](https://doi.org/10.1016/0169-5347(86)90062-5)

Robert, A. (2009). Captive breeding genetics and reintroduction success. *Biological Conservation*, 142(12), 2915–2922. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2009.07.016>

Shaffer, M. L. (1981). Minimum Population Sizes for Species Conservation. *BioScience*, 31(2), 131–134. <https://doi.org/10.2307/1308256>

Silva Junior, J.S.; Figueiredo-Ready, W.M.B; FERRARI, S.F. (2013) Taxonomy and geographic distribution of the Pitheciidae. In: L.M. Veiga *et al.* **Evolutionary Biology and Conservation of Titis, Sakis and Uacaris** (pp. 31-42). Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Silva, A. G., Lalonde, D. R., Quse, V., Shoemaker, A. H., & Russello, M. A. (2010). Genetic Approaches Refine Ex Situ Lowland Tapir (Tapirus terrestris) Conservation. *Journal of Heredity*, 101(5), 581–590. <https://doi.org/10.1093/jhered/esq055>

Silva, F. S. D., Amaral, J. H. L. D., Roos, C., Bowler, M., Rohe, F., Sampaio, R. a. C., Janiak, M. C., Bertuol, F., Santana, M. I. S., De Souza Silva Júnior, J., Rylands, A. B., Gubili, C., Hrbek, T., McDevitt, A. D., & Boubli, J. P. (2022). Molecular phylogeny and systematics of bald uakaris, genus *Cacajao* Lesson, 1840 (Primates: Pitheciidae), with the description of a new species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 107509. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2022.107509>

Silva, F., Lemos, L. P., Ravetta, A. L., Rohe, F., Sampaio, R., Franco, C., Santos, P., Santana, M. I. S., Amaral, J. V. D., Endo, W., Haugaasen, T., Peres, C. A., & Boubli, J. P. (2021). On the geographic distribution of the bald uakaris (*Cacajao calvus* ssp.) in Brazilian Amazonia. *Primate Conservation*.

Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., & Leunissen, J. a. M. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*, 35(Web Server), W71–W74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm306>

Vermeer, J., Tello-Alvarado, J. C., Del Castillo, J. a. G., & Bóveda-Penalba, A. J. (2013). A New Population of Red Uakaris (*Cacajao Calvus*ssp.) in the Mountains of North-Eastern Peru. *Neotropical Primates*, 20(1), 12–17. <https://doi.org/10.1896/044.020.0103>

Vijay, V., Reid, C. D., Finer, M., Jenkins, C. N., & Pimm, S. L. (2018). Deforestation risks posed by oil palm expansion in the Peruvian Amazon. *Environmental Research Letters*, 13(11), 114010. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/aae540>

CAPÍTULO III: TRABALHO CIENTIFICO

Trabalho a ser enviado para a Zoonoses and Public Health

Normas disponíveis em

<https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/18632378/homepage/ForAuthors.html>

***Leishmania* spp and *Trypanossoma cruzi* in specimens of *Cacajao calvus* spp. kept in semifreedom, Iquitos, Peru.**

Leishmania spp e *Trypanossoma cruzi* em espécimes de *Cacajao calvus* spp. mantidos em semiliberdade, Iquitos, Peru.

Pedro Paulo de Oliveira Nogueira¹; Larissa Pereira Rodrigues¹;
Lígia Souza Lima Silveira da Mota¹

¹ Department of Chemistry and Biological Sciences, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP).

ABSTRACT

Due to their arboreal habits and folivorous-fruitful feeding, non-human primates are highly vulnerable to the destruction, fragmentation and degradation of their habitat. Such changes may be responsible for the appearance of infectious zoonosis with unfavorable results to human-animal health and the environment. The Bald-uakaris are endemic to the western Amazon region and are divided into four subspecies: *C. calvus calvus*, *C. c. rubicundus*, *C. c. ucayalii* and *C. c. novaesi*. Peruvian-red-uakari (*Cacajao calvus ucayalii*) is present in Brazilian and Peruvian fauna and is classified as Vulnerable on the extinction risk scale. Studies have shown that their habitat areas are among the regions at risk of deforestation for palm oil plantation in the short and long term. This project aims to investigate the role of uakaris in the *Leishmania* spp. and *T. cruzi* cycle. The study was carried out using DNA extracted from blood samples obtained from 7 animals that were victims of trafficking and which are at "Pilpintuwasi" Rescue Center, Iquitos, Peru. Polymerase chain reactions (PCRs) using specific primers for the verification of the presence of the pathogens studied were performed. The results showed a negative diagnosis for the presence of agents causing leishmaniasis and Chagas disease.

Keywords: Peruvian-red-uakari; leishmaniasis; chagas disease; trypanosomatids.

INTRODUCTION

Human activities fragmented forests near urban centers and attracted a market for agricultural products, even with the inaccessibility of the Amazon region. Vijay et al. (2018) demonstrated that *Cacajao calvus ucayalii* habitat areas are among the areas at deforestation risk, for palm oil planting, in the long and short term.

Due to their arboreal habits and folivorous-fruitful feeding, non-human primates (NHP) are highly vulnerable to habitat destruction, fragmentation, and degradation (Challenger et al., 2009; Estrada et al., 2003). The consequence of this process is the increased opportunity for contact between humans, domestic animals, and wild animals (Deem et al., 2001; Jansen et al., 2018; McCallum & Dobson, 2002; Ostfeld & Keesing, 2000). Such changes may be responsible for infectious zoonosis appearance with negative results on human-animal health and the environment (Sleeman et al., 2019). A study by Patz et al. (2000) demonstrated that habitat fragmentation can increase or decrease the prevalence of diseases within a host species, depending on the specific biology of the host-parasite relationship.

The Bald-uakaris are endemic to the western Amazon region, being present in Brazilian and Peruvian fauna (Silva et al., 2021). Four subspecies were described by Hershkovitz (1987): *C. calvus calvus*, *C. c. rubicundus*, *C. c. ucayalii*, and *C. c. novaesi*. The Bald-uakari is listed as vulnerable by IUCN and its population is decreasing (Boubli et al., 2020). The species' main threats are deforestation, road network expansion, and hunting (Calouro, 2015).

Regarding their diet, noted its role in ecosystem maintenance and importance for seed dispersal. Expanding to social aspects, Alvarado et al. (2017) demonstrated the relationship between mammals and birds with native peoples of the Abujao River region, Peru. In this study, the presence of *Cacajao calvus* in subsistence activities was observed.

NHP can act as sentinels for epidemiological studies since they can be reservoirs for human pathogens (Wolfe et al., 1998). These studies tend to provide critical information for understanding the epidemiology, transmission dynamics, and risk related to emerging anthroponosis. Close contact between these mammals and humans can result in risks of transmission in urban and rural environments, possibly leading to emerging zoonoses. Communities in the Amazon often hunt wild animals for subsistence and may inadvertently introduce infectious parasites into new areas (Aysanoa et al., 2017).

There is a variety of *Trypanosoma* species, but only a few pose a serious challenge to public and economic health. The genera *Trypanosoma* and *Leishmania* are the best known of this family and cause several diseases, in which the mechanisms of parasitic-host-environment interaction are complex and lack studies (Cooper et al., 2017).

In 2020, 39.705 cases of CL were reported to the Pan American Health Organization (PAHO) by 17 endemic countries, and about 3.400 new cases of VL (PAHO/WHO, 2021). Due to the large dispersion of sandflies in the Americas, the research and survey of possible disease reservoirs become essential. Especially in the case of animals that are victims of trafficking, as they may have had contact with different diseases.

Due to the diversity of vectors, reservoirs, and human activities, the Peruvian Amazon is an endemic area for leishmaniasis (Zorrilla et al., 2017). The interaction between this zoonosis and wild animals was the target of Roque & Jansen's (2014) study, which collected data on the occurrence of the disease in the Americas. In Peru, White-eared Opossum (*Didelphis albiventris*) and Mountain-mouse (*Phyllotis andinum*) were identified as potential reservoirs and hosts of the parasite, respectively (Llanos-

Cuentas et al., 1999). Furthermore, in countries bordering Peru, there is a wide range of animals associated with leishmaniasis (Roque & Jansen, 2014), including primates from the Brazilian Amazon region of the genus *Sapajus* (*Cebus apella*, *Cebus xanthosternos*), Chiropotes (*Chiropotes satanas*), Aotus (*Aotus nigriceps*), Pithecia (*Pithecia irrorata*), Saguinus (*Saguinus imperator*) and Ateles (*Ateles paniscus*). These data demonstrate the need to identify possible reservoirs and hosts.

Chagas Disease (CD) is considered the main parasitic disease in the Americas, affecting mainly people in rural environments and with low socioeconomic status (CDC, 2019; WHO, 2022). This neglected tropical disease is endemic in 21 Latin American countries, including Peru with 964 cases reported between 2000 and 2015 (WHO, 2022). However, these numbers are probably underestimated, as this disease is often asymptomatic. *Trypanosoma cruzi* is endemic in South and Central America, causing Chagas disease (American trypanosomiasis) in approximately 8-9 million infected individuals, and approximately 14,000 deaths per year (Hotez et al., 2008).

The consumption of blood from an infected animal, undercooked or raw meat represents a risk of transmission due to the presence of trypomastigote blood and amastigote tissue (Pereira et al. 2010; Rueda et al., 2014). These routes of infection should be more common in regions where wild animals are consumed or marketed in urban areas. The prevalence of *T. cruzi* and other trypanosomatids in mammals frequently hunted in the Peruvian Amazon was the target of research by Morales et al. (2017). The data obtained referred to four orders (Rodentia, Carnivora, Artiodactyla, and Edentata), and a prevalence of 38.3% of animals infected with trypanosomatids and 5.0% of *T. cruzi* infected animals were observed. The high prevalence of *T. cruzi* and other trypanosomatids in hunted wild mammals suggests a considerable wild reservoir of *T. cruzi* in remote Amazonian locations (Morales et al., 2017).

The CD is endemic throughout southern Peru, in the departments of Arequipa, Moquegua, Tacna, Ayacucho, and Apurímac. There are records of generalized infestations with the vector *Triatoma infestans* and active transmission of CD to humans in this area (Bowman et al., 2008; Cornejo & Carpio, 2003). In addition, the departments of Cajamarca, Amazonas, San Martín, and Ucayali also detected the prosperous presence of the vector *Panstrongylus herreri* (Conejo & Carpio, 2003). Some isolated cases of CD have been documented in Iquitos and the surrounding area (Cabrera et al., 2010). However, there is limited knowledge about the prevalence and epidemiology of *Trypanosoma cruzi* in northern Peru; the most significant resources were allocated to research and control efforts in the South (Alroy et al., 2015).

Studies conducted by Aysanoa et al. (2017) with NHP present in the Peruvian Amazon showed a prevalence of 90.9% of trypanosomatids in Pitheciidae, representing the family with the highest prevalence among those included in the study. The *T. cruzi* prevalence was 4.5% for the family. In both cases, the prevalence was higher for free-living animals compared to those kept under human care, suggesting that the transmission of these parasites in NHP occurs more actively in the wild cycle.

Using molecular biology tools, this study aimed to survey zoonoses of importance (*Leishmania* spp. and *T. cruzi*) for the Amazon region. And thus, the results obtained, provide aggregating information for the management and conservation actions of Bald-uakari populations in the medium and long term.

MATERIALS AND METHODS

The project has authorizations granted by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of the Veterinary Medicine and Animal Science Faculty of São Paulo State University (UNESP), Botucatu Campus, under protocol 0046/2021 of June 22, 2021, and by the Peruvian Government's National Forest and Wildlife Service

(SERFOR), under protocol No. D000319-2022-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS-DGSPFS of May 31, 2022.

The *Pilpintuwasi* Rescue Center is located in Iquitos, Department of Loreto Peru. According to the Department of Economic Studies (DEE) Loreto's subdivision, with eight provinces, 53 districts, and a population of 1.027.559 inhabitants, Loreto is the district with the largest Amazonian indigenous population in the country with 105.900 (DEE, 2021). Monetary poverty in the region was between 35,1 and 40,1% in 2013, with a decrease in 2017 between 33.3 and 36.8% (UNICEF, 2018). However, these figures remain above the national average.

Regarding the climate, Loreto has the characteristic of being hot, humid, and rainy. With an average annual temperature of 22°C and a maximum of 32°C, varying exceptionally to a minimum of 17°C on some days between June and July, and a maximum of 36°C between October and January (DEE, 2021). It has two well-defined seasons, one characterized by abundant rainfall and increased river level, and the other with less precipitation and decreased river level (GIA, 2019).

The rescue center has a reintroduction project for the *C. c. ucayalii* subspecies, where its target is the newborn from the animals under study here. Victims of trafficking, the 7 specimens collected (Table 1) fare in a semi-freedom situation, except for specimen 6 (alpha male) which, presents defensive behavior, and is kept enclosure, but with the possibility of interaction with the other group members.

TABLE 1. Information regarding gender, age (years), weight (kg) and subspecies of the sampled animals.

ANIMALS	SEX	AGE (years)	WEIGHT (kg)	SUBSPECIES
1	F	05	4.25	<i>C. c. ucayalii</i>
2	F	04	3.95	<i>C. c. ucayalii</i>
3	F	11	4.70	<i>C. c. novaesi</i>
4	F	07	3.90	<i>C. c. ucayalii</i>
5	F	03	3.70	<i>C. c. ucayalii</i>
6	M	09	4.20	<i>C. c. ucayalii</i>
7	M	01	3.30	<i>C. c. novaesi</i>

It was not possible to collect detailed data on their origin, however, according to the documents provided by the rescue center's management, specimens 1, 2, 3, 5, and 7 arrived at the center at a young age of less than 1 year of life. Specimens 4 and 6 arrived as adults at the Rescue Center, as they had previously been sent to another rescue center in the region.

The animals were chemically contained by intramuscular administration in the semimembranosus muscle. The anesthetics given were Midazolam 0,15mg/kg (Midanex®, AC Farma) associated with Dexmedetomidine 0,02mg/kg (Dexdomitor®, Zoetis). Subsequently, anesthetic reversal was performed with Atipemezolol 0,2mg/Kg (Antisedan®, Zoetis). Physiological parameters such as heart and respiratory rate, oxygen saturation, systolic pressure, diastolic and mean pressure, and temperature were measured throughout the procedure every 5 minutes, verifying the depth of sedation by observing and checking the eye and eyelid reflexes. The samples were obtained by venous puncture in the femoral vein (Cubas et al., 2014), with 21G x 1 1/2" mm needles and syringes with a capacity of 5.0 mL. The blood volume collected was packed in tubes containing 5% disodium salt of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and refrigerated for subsequent DNA extraction.

Aiming at the safety of the animals under study, we follow the measures established by Ministerial Resolution No. 0177-2020-MINAGRI of July 31, 2020, on

wildlife activities where it became necessary to establish protocols for the implementation of surveillance, prevention, and control measures of COVID-19 in the fauna activities formulated by SERFOR.

Molecular analyses

Molecular analyses were performed at the Animal Genetics Laboratory of the Department of Chemical and Biological Sciences of the Biosciences Institute of Botucatu (IBB), São Paulo State University (UNESP). After blood collection, the samples had their DNA extracted using the Cellco© Blood and Animal Cells DNA Preparation Kit following the protocol provided by the manufacturer. Quantitative and qualitative analyses were executed with a spectrophotometer (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer – Thermo Fisher Scientific). Evaluating the extraction's integrity by spectrophotometry, it was found that all DNA samples presented their values between 1.70 and 1.90, which reflects a good quality material without protein contamination, which allowed us to move forward with the analyses.

For the presence detection of *Leishmania* spp. DNA fragments in the animals under study samples, specific primers of the genes encoding 70kD thermal shock proteins DNA segments (HSP70) of *Leishmania* HSP70F (5' AGGTGAAGGCGACGAACGAACG 3') and HSP70R (5' CGCTTGTCATCTTTGCGTC 3') (Folgueira et al., 2007) were used, which amplify a sequence of approximately 330 bp.

Polymerase Chain Reactions (PCRs) were performed in triplicate in an Eppendorf® Mastercycler Nexus X2 thermocycler® with a final volume of 50µL, containing: 20µL of 2.0x Taq DNA Polymerase Master Mix (Class Five PCR Master Mix), 0,5µL of each primer, 1µL of genomic DNA (50ng/µL) and 28µL of ultrapure water. The thermal program used was: initial denaturation at 94°C for 5 minutes, followed by 40 cycles at 94°C for 1 minute, 59°C for 1 minute, 72°C for 1 minute, and

final extension at 72°C for 10 minutes. Each assay was composed of 10ng of *L. (Leishmania) amazonenses* (MHOM/BR/71973/M2269); *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/2002/LPC-RPV); *L. (L.) major* (MHOM/IL/1980/FRIEDLIN) and *L. (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) DNA as positive controls, in addition to ultrapure water as the negative control.

The same volume and concentration patterns used to detect *Leishmania* spp. were used to detect the *T. cruzi* DNA presence. Each assay comprised 10ng of DNA extracted from *in vitro* cultivation of the CL Brener strain of *T. cruzi* and ultrapure water as the negative control.

The set of primers used was 121 (5' AAAATAATGTACGGGKGAGATGCATGA 3') and 122 (5' GGTTCGATTGGGGTTGGGTATata 3') (Virreira et al., 2003) that amplify a sequence of 330 bp of the protozoan kinetoplast DNA (kDNA). The PCRs were done in triplicate and following the thermal profile: initial denaturation at 94°C for 5 minutes, followed by 33 cycles at 94°C for 1 minute, 59°C for 1 minute, 72°C for 1 minute, and final extension at 72°C for 10 minutes.

The primer sets sensitivity used for *Leishmania* spp. and *T. cruzi* detection was estimated by the evaluation of DNA amplification extracted from both protozoa. The samples were diluted in series in the DNA solution (Table 2) (Virreira et al., 2003) and PCRs were made in duplicates with the same volumes, concentrations, and thermal profiles mentioned above.

TABLE 2. Primer sets sensitivity evaluation in pathogens detection in different dilutions.

DILUTIONS	A	B	C	D	E	F	G
Amount of DNA by dilution (ng)	1	0.1	0.01	0.001	0.0001	0.00001	0.000001

RESULTS

The sensitivity tests performed with the selected primers showed amplifications of the desired fragment until the dilution of 0.001ng of DNA for *Leishmania braziliensis* (Figure 1). For *T. cruzi*, the set of primers showed even more sensitive amplification of the desired fragment until dilution of 0.000001ng (Figure 2).

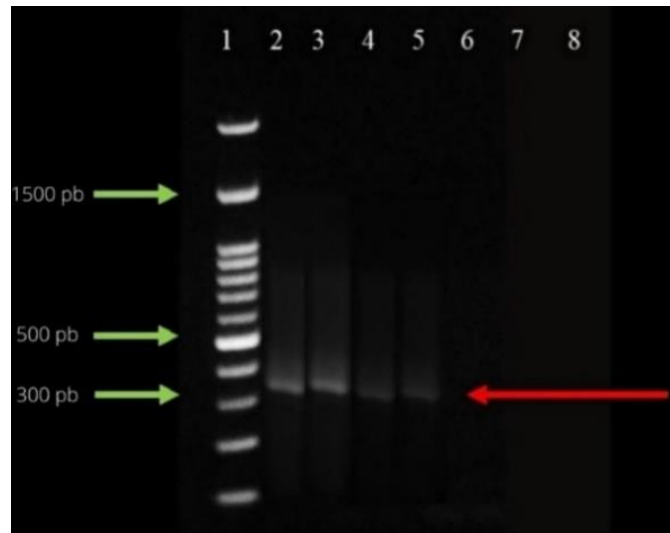


FIGURE 1. Electrophoresis in agarose gel at 1,5% of PCR for a fragment of the HSP70 gene at different concentrations of *Leishmania (Viannia) braziliensis* DNA. Column 1: Ladder 1Kb Plus (ABM® Opti-DNA Markers); Columns 2 to 7: DNA sample of *L. (V.) braziliensis* at concentrations of 1; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001; 0,00001; 0,00001 ng respectively. The green arrows indicate the molecular weight values and the red arrow indicates the amplicons size (330 bp).

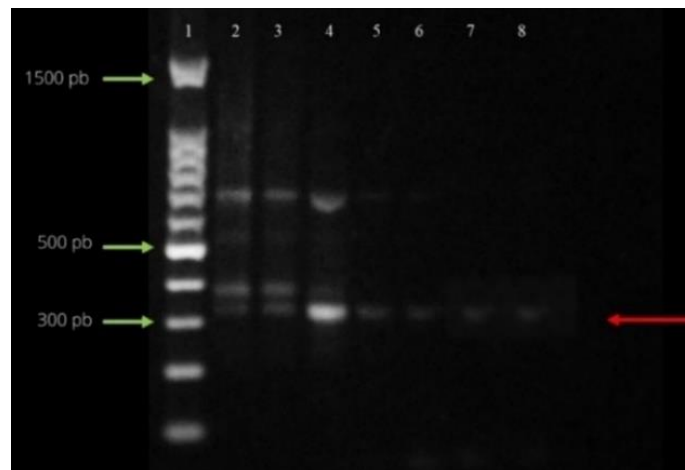


FIGURE 2. Electrophoresis in agarose gel at 1.5% of PCR for a kDNA fragment of *Trypanosoma cruzi* at different DNA concentrations of this protozoan. Column 1: Ladder 1Kb Plus (ABM® Opti-DNA Markers); Columns 2 to 7: DNA sample of *T. cruzi* at concentrations of 1; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001; 0,00001; 0,00001 ng respectively. The green arrows indicate the molecular weight values and the red arrow indicates the amplicons size (330 bp).

All blood samples were diagnosed negatively for leishmaniasis (Figure 3) and Chagas disease (Figure 4) causative agent presence.

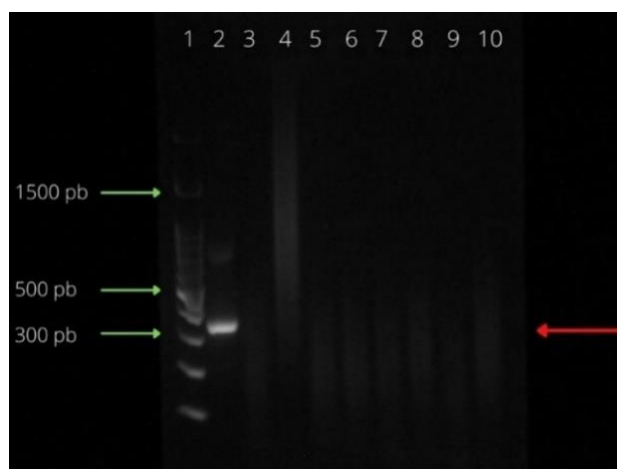


FIGURE 3. Electrophoresis in agarose gel at 1,5% of PCR for a fragment of the HSP70 gene. Column 1: Ladder 1Kb Plus (ABM® Opti-DNA Markers); Column 2: positive control of *Leishmania amazonensis*; Column 3 to 9: Sample of the specimens under study (1 to 7 respectively); Column 10: Negative control. The green arrows indicate the molecular weight values and the red arrow indicates the amplicons size (330 bp).

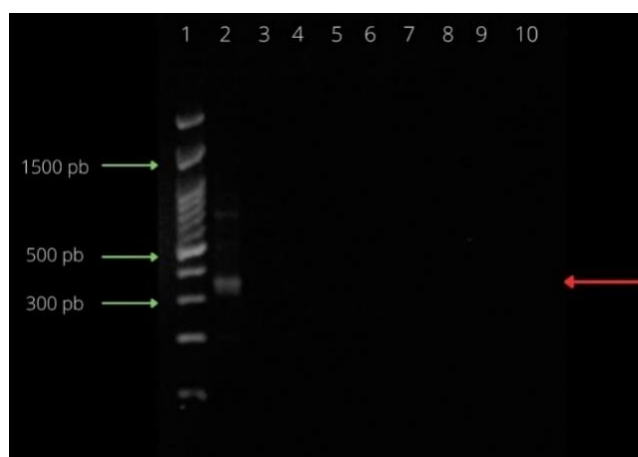


FIGURE 4. Electrophoresis in agarose gel at 1,5% of PCR for a kDNA fragment of *Trypanosoma cruzi*. Column 1: Ladder 1Kb Plus (ABM® Opti-DNA Markers); Column 2: positive control of *T. cruzi*; Column 3 to 9: Sample of the specimens under study (1 to 7 respectively); Column 10: Negative control. The green arrows indicate the molecular weight values and the red arrow indicates the amplicons size (330 bp).

DISCUSSION

In the present study, Bald-uakari specimens were tested for *Leishmania* spp and *Trypanosoma cruzi* presence. The results did not demonstrate the DNA presence from the target parasites and, despite the presence of these parasites in the studied region, all specimens were diagnosed as negative. The applied methodology was based on previous studies and considered important PCR diagnosis aspects (type, volume, and

conservation of samples, DNA extraction method, primers, reagents, and thermal profile). The reliability of molecular diagnostic results, for both *Leishmania* spp. and *T. cruzi*, is highlighted given the detection sensitivity to the DNA presence from protozoa observed in dilution tests.

NHPs are naturally infected by *Leishmania*, but doubts remain regarding how their symptoms are presented and may be similar to those of infected dogs and humans. Studies have shown that NHPs are among the animals that function as natural hosts or reservoirs of *Leishmania* (Roque & Jansen, 2014). NHPs should be studied during epidemiological surveys to evidence natural infections and transmission potential (Santos & Oliveira, 2020).

In endemic leishmaniasis regions, is necessary to improve disease control based on the fauna's conservation either free-living or under human care (Lombardi et al., 2014). In Brazil, several reports demonstrated positive cases of NHPs under human care, including animals born in these conditions (Guiraldi et al., 2022; Lombardi et al., 2014; Malta et al., 2010; Reis et al., 2020). These results emphasize the need for vector control actions in risk regions.

Although our study obtained negative results for all tested specimens, it is decisive to increase research that takes into account the human-environment-animal interface. The literature is still scarce in the reports of the leishmaniasis occurrence in NHP and even more scarce if we focus on the Bald-uakari. It is important to control different vectors and consider asymptomatic transmission as a disease control relevant factor (Guiraldi et al., 2022).

The wild animals trade to exotic pet markets results in close contact between humans and NHPs, providing new opportunities for disease emergence (Wolfe et al., 1998). This activity is associated with the victims' well-being violation, resulting in the

impairment of their immune system, which in turn, tends to be more susceptible to disease manifestation. Godoy & Matushima's (2010) conducted a study evaluating birds that were illegal trafficking victims. The obtained data showed that most birds analyzed died due to infection, especially by opportunistic pathogens that depend on their host's high degree of immunosuppression.

The Amazon Basin, inhabited by 30 million people, is the largest tropical biome in which coexist animal reservoirs and multiple *Trypanosoma cruzi* triatomine vector species, representing a high threat to human populations (Coura & Junqueira, 2012). With this, we must question whether there is the Bald-uakari's resistance to the target parasites, or vector selectivity due to the broad biodiversity present in the region.

Despite the negative results, studies conducted in the Iquitos region, Department of Loreto, demonstrate that although uncommon, Chagas disease is present and asymptomatic cases have already been detected (Ramos-Rincón et al., 2020). Even in regions with few human cases, positive animals for *T. cruzi* are reported in the region of Ucayali (6 cases since 2004) and Amazonas (13 cases) (MINSA, 2015). This could represent the introduction of *T. cruzi* by NHPs in new areas. Furthermore, future vector transmission cannot be ruled out, since Peru has at least 19 triatomines species (9 genera), which are present in different regions of the country, including the Department of Loreto (Chávez, 2013; Náquira & Cabrera, 2009).

As NHPs can act as reservoirs for this parasite, their caregivers run the accidental infection risk, not only by infected needles inoculation but also by mucous membranes exposure to contaminated fluids and skin lesions during the infected animals handling (Hofflin et al. 1987; Kinoshita-Yanaga et al. 2009; Kirchhoff, 2011; Ndao et al., 2000; Pereira et al. 2010; Strait et al., 2012).

Subsistence hunting in the Amazon region is a traditional source of food for rural populations, and primates represent a significant meat source in the region (Puertas & Bodmer, 2004; Bowler et al., 2014; Mayor et al., 2015). In these environments, the carcasses are handled with unprotected hands, in addition to the consumption of raw or undercooked meat. In these cases, pseudocysts and blood-shaped trypomastigotes in hunted animals may represent a high infection risk (Pereira et al., 2009).

The literature demonstrates the NHPs' importance of *Leishmania* spp. and *T. cruzi* transmission cycles. The primers sensitivity tests performed emphasize the reliability of the results. Both demonstrated the ability to identify DNA fragments in tiny concentrations. Despite the negative results obtained, attention to these animals should remain active. Projects elaboration aiming at the identification of these zoonoses in free-living animals is highlighted. The application of methods that analyze the transmission cycles involving triatomine species, the presence of the agent in these vectors, and evaluation of infection in free-living and under human care animals, will serve to identify disease transmission hotspots. Such investigation allows a better understanding of crucial zoonoses' epidemiological aspects in the Amazon.

ACKNOWLEDGMENT

The authors acknowledge Re:Wild's Primate Action Fund and the Margot Marsh Foundation for the grant support provided to this study. The authors acknowledge the “Pilpintuwasi” Rescue Center for allowing the elaboration of this study within its premises.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

- Alroy, K. A., Huang, C., Gilman, R. H., Quispe-Machaca, V. R., Marks, M. A., Ancca-Juarez, J., Hillyard, M., Verastegui, M., Sanchez, G., Cabrera, L., Vidal, E., Billig, E., Cama, V., Náquira, C., Bern, C., & Levy, M. J. (2015). Prevalence and Transmission of *Trypanosoma cruzi* in People of Rural Communities of the High Jungle of Northern Peru. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(5), e0003779. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003779>
- Alvarado, J. L., Rivas, M. A., Fernández, V., & Peralta, M. a. C. (2017). Mamíferos y aves silvestres usados por los pobladores de la cuenca del río Abujao (Ucayali, Perú). *Revista Peruana De Biología*, 24(3), 263–272. <https://doi.org/10.15381/rpb.v24i3.13907>
- Aysanoa, E., Mayor, P., Mendoza, A. P., Zariquiey, C. M., Morales, E. A., Perez, J., Bowler, M., Ventocilla, J. A., González, C., Baldeviano, G. C., & Lescano, A. G. (2017). Molecular Epidemiology of Trypanosomatids and *Trypanosoma cruzi* in Primates from Peru. *Ecohealth*, 14(4), 732–742. <https://doi.org/10.1007/s10393-017-1271-8>
- Boubli, J.P., Shanee, S., Aquino, R., Calouro, A.M. & Cornejo, F.M. (2020). *Cacajao calvus* ssp.. *IUCN Red List of Threatened Species*. <https://doi.org/10.2305/iucn.uk.2021-1.rlts.t3420a191697379.en>
- Bowler, M., Anderson, M. L., Montes, D., Pérez, P. J., & Mayor, P. (2014). Refining Reproductive Parameters for Modelling Sustainability and Extinction in Hunted Primate Populations in the Amazon. *PLOS ONE*, 9(4), e93625. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093625>
- Bowman, N. M., Kawai, V., Levy, M. J., Del Carpio, J. G. C., Cabrera, L., Delgado, F., Malaga, F., Benzaquen, E. C., Pinedo, V. V., Steurer, F. J., Seitz, A. E., Gilman, R. H., & Bern, C. (2008). Chagas Disease Transmission in Periurban Communities of Arequipa, Peru. *Clinical Infectious Diseases*, 46(12), 1822–1828. <https://doi.org/10.1086/588299>
- Cabrera, R., Vega, S., Cáceres, A. G., Ramal, A. C., Álvarez, C. A., Ladera, P., Pinedo, R., & Chuquipiondo, G. (2010). Epidemiological investigation of an acute case of Chagas disease in an area of active transmission in Peruvian Amazon region. *Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo*, 52(5), 269–272. <https://doi.org/10.1590/s0036-46652010000500009>
- Calouro, A. (2015). **Avaliação do risco de extinção de *Cacajao calvus ucayalii* (Thomas, 1928) no Brasil.** 2015. Retrieved from: https://www.icmbio.gov.br/portal_antigo/component/content/article.html?id=7285:mamiferos-cacajao-calvus-ucayalii-Uakari.
- Center For Disease Control And Pevention. (2019) **Parasites - American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease).** 2019. Retrieved from: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/diagnosis.html>.
- Challenger, A.; Dirzo, R. (2009). *Factores de cambio y estado de la biodiversidad, en Capital natural de México.*(2nd ed.) México City: Conabio.

Chávez, J. C. (2013). Contribución al estudio de los triatominos del Perú: Distribución geográfica, nomenclatura y notas taxonómicas. *Anales De La Facultad De Medicina*, 67(1), 65. <https://doi.org/10.15381/anales.v67i1.1296>

Cooper, C., Clode, P. L., Peacock, C. S., & Thompson, R. (2017). Host-Parasite Relationships and Life Histories of Trypanosomes in Australia. *Elsevier EBooks*, 47–109. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.06.001>

Cornejo, J.G.; Carpio, D. (2003). **The Chagasic Endemic Situation in Peru**. 2003. Retrieved from: <http://www.fac.org.ar/tcvc/llave/c296/cornejo.PDF>.

Coura, J. R., & Junqueira, A. C. V. (2012). Risks of endemicity, morbidity and perspectives regarding the control of Chagas disease in the Amazon Region. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(2), 145–154. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762012000200001>

Cubas, Z.S.; Silva, J. C. R., & Catão-Dias, J. L. (2014). *Tratado de animais selvagens: medicina veterinária. vol. 1.*

Deem, S. L., Karesh, W. B., & Weisman, W. (2001). Putting Theory into Practice: Wildlife Health in Conservation. *Conservation Biology*, 15(5), 1224–1233. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2001.00336.x>

Departamento De Estudos Econômicos. (2021) **CARACTERIZAÇÃO DEL DEPARTAMENTO DE LORETO**. Retrieved from <https://www.bcrp.gob.pe/docs/Sucursales/Iquitos/loreto-caracterizacion.pdf>.

Estrada, A.; Mandujano, S.. (2003) Investigaciones con Alouatta y Ateles en México. In: Barrueta, T. *et al.* **Reconocimiento demográfico de Alouatta pigra y Ateles geoffroyi en la reserva El Tormento, Campeche, México**. Campeche: Neotropical Primates.

Folgueira, C., Cañavate, C., Chicharro, C., & Requena, J. (2007). Genomic organization and expression of the HSP70 locus in New and Old World Leishmania species. *Parasitology*, 134(03), 369. <https://doi.org/10.1017/s0031182006001570>

Fundo De Emergência Internacional Das Nações Unidas Para A Infância (2018). **Loreto**. Retrieved from: <https://www.unicef.org/peru/donde-estamos/loreto#:~:text=Cuenta%20con%20ocho%20provincias%20y,ling%C3%BC%C3%ADsticamente%2C%20con%2027%20lenguas%20originarias>.

Godoy, S. N., & Matushima, E. R. (2010). A survey of diseases in Passeriform birds obtained from illegal wildlife trade in São Paulo City, Brazil. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 24(3), 199–209. <https://doi.org/10.1647/2009-029.1>
Governança E Infraestrutura Da Amazônia (2019). **Loreto (Peru)**. Retrieved from: <https://giamazon.org/pt-br/mosaicos-focais/loreto-peru/>.

Guiraldi, L. M., Santos, W. C. D., Manzini, S., Taha, N. E. H. A., Aires, I. N., Ribeiro, E. V., Tokuda, M., De Medeiros, M. a. T., Richini-Pereira, V. B., & Lucheis, S. B. (2022). Identification of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* in captive primates from a zoo in Brazil. *American Journal of Primatology*. <https://doi.org/10.1002/ajp.23376>

- Hershkovitz, P. (1987). Uacaries, new world monkeys of the genus *Cacajao* (Cebidae, Platyrrhini): A preliminary taxonomic review with the description of a new subspecies. *American Journal of Primatology*, 12(1), 1–53. <https://doi.org/10.1002/ajp.1350120102>
- Hofflin, J. M., Sadler, R., Araujo, F. G., Page, W. H., & Remington, J. S. (1987). Laboratory-acquired Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(3), 437–440. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(87\)90162-3](https://doi.org/10.1016/0035-9203(87)90162-3)
- Hotez, P. J., Bottazzi, M. E., Franco-Paredes, C., Ault, S. K., & Periago, M. R. (2008). The Neglected Tropical Diseases of Latin America and the Caribbean: A Review of Disease Burden and Distribution and a Roadmap for Control and Elimination. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2(9), e300. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000300>
- Jansen, A. M., Xavier, S. C. D. C., & Roque, A. L. R. (2018). *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. *Parasites & Vectors*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3067-2>
- Kinoshita-Yanaga, A. T., De Ornelas Toledo, M. J., De Araújo, S. M., Vier, B. P., & Gomes, M. L. (2009). Accidental infection by *Trypanosoma cruzi* follow-up by the polymerase chain reaction: case report. *Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo*, 51(5), 295–298. <https://doi.org/10.1590/s0036-46652009000500011>
- Kirchhoff, L. V. (2011). Epidemiology of American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Elsevier EBooks*, 1–18. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-385863-4.00001-0>
- Llanos-Cuentas, E. A., Roncal, N., Villaseca, P., Paz, L., Ogusuku, E., Pérez, J., Cáceres, A. G., & Davies, C. (1999). Natural infections of *Leishmania peruviana* in animals in the Peruvian Andes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(1), 15–20. [https://doi.org/10.1016/s0035-9203\(99\)90163-3](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(99)90163-3)
- Lombardi, M. C., Turchetti, A. P., Tinoco, H. P., Pessanha, A. T., Soave, S. A., Malta, M. R., Paixão, T. A., & Santos, R. L. (2014). Diagnosis of *Leishmania infantum* infection by Polymerase Chain Reaction in wild mammals. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 34(12), 1243–1246. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2014001200017>
- Malta, M. R., Tinoco, H. P., Xavier, M. N., Vieira, R., Costa, É. A., & Santos, R. L. (2010). Naturally acquired visceral leishmaniasis in non-human primates in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 169(1–2), 193–197. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.12.016>
- Mayor, P., Pérez-Peña, P. E., Bowler, M., Puertas, P., Kirkland, M., & Bodmer, R. E. (2015). Effects of selective logging on large mammal populations in a remote indigenous territory in the northern Peruvian Amazon. *Ecology and Society*, 20(4). <https://doi.org/10.5751/es-08023-200436>
- McCallum, H., & Dobson, A. P. (2002). Disease, habitat fragmentation and conservation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 269(1504), 2041–2049. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2079>
- MINSA. (2015) **Sala Situacional Para El Análisis De Situacion De Salud**. Retrieved from:

http://www.dge.gob.pe/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=14&Itemid=121.

Morales, E. A., Mayor, P., Bowler, M., Aysanoa, E., Pérez-Velez, E. S., Perez, J., Ventocilla, J. A., Baldeviano, G. C., & Lescano, A. G. (2017). Prevalence of *Trypanosoma cruzi* and Other Trypanosomatids in Frequently-Hunted Wild Mammals from the Peruvian Amazon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 97(5), 1482–1485. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0028>

Náquira, C., & Cabrera, R. (2009). Breve reseña histórica de la enfermedad de chagas, a cien años de su descubrimiento y situación actual en el Perú. *DOAJ (DOAJ: Directory of Open Access Journals)*.

Ndao, M., Kelly, N., Normandin, D., MacLean, J. D., Whiteman, A., Kokoskin, E., Arevalo, I., & Ward, B. F. (2000). *Trypanosoma cruzi* infection of squirrel monkeys: comparison of blood smear examination, commercial enzyme-linked immunosorbent assay, and polymerase chain reaction analysis as screening tests for evaluation of monkey-related injuries. *Comparative Medicine*, 50(6), 658–665.

Ostfeld, R. S., & Keesing, F. (2000). Biodiversity series: The function of biodiversity in the ecology of vector-borne zoonotic diseases. *Canadian Journal of Zoology*, 78(12), 2061–2078. <https://doi.org/10.1139/z00-172>

Pan American Health Organization. (2021). Leishmanioses:: informe epidemiológico das américas. informe epidemiológico das Américas. 2021. N° 10. Retrieved from: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51742>.

Patz, J. A., Graczyk, T. K., Geller, N. M., & Vittor, A. Y. (2000). Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. *International Journal for Parasitology*, 30(12–13), 1395–1405. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(00\)00141-7](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(00)00141-7)

Pereira, K. S., Schmidt, F. L., Barbosa, R. A., Guaraldo, A. M. A., Franco, R. M. B., Dias, V. B., & Passos, L. C. S. (2010). Transmission of Chagas Disease (American Trypanosomiasis) by Food. *Elsevier EBooks*, 63–85. [https://doi.org/10.1016/s1043-4526\(10\)59003-x](https://doi.org/10.1016/s1043-4526(10)59003-x)

Pereira, K. S., Schmidt, F. L., Guaraldo, A. M. A., Franco, R. M. B., Dias, V. B., & Passos, L. C. S. (2009). Chagas' Disease as a Foodborne Illness. *Journal of Food Protection*, 72(2), 441–446. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-72.2.441>

Puertas, P.; Bodmer, R.E. (2004). Hunting effort as a tool for community-based wildlife management in Amazonia. In: Silvius, K.M.; Bodmer, R.E.; Fragoso, J.M. **People in Nature: wildlife conservation in south and central america**. New York: Columbia University Press.

Ramos-Rincón, J., Ortiz-Martínez, S., Vásquez-Chasnamote, M., Gamboa-Paredes, O., Pinedo-Cancino, V., Ramal-Asayag, C., Górgolas-Hernández-Mora, M., & Casapía-Morales, M. (2020). Chagas Disease in Pregnant Women in the Peruvian Amazon Basin. Cross-Sectional Study. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00556>

Reis, F., Minuzzi-Souza, T. T. C., Neiva, M., Timbó, R. V., De Moraes, I. a. C., De Lima, T. M., Hecht, M., Nitz, N., & Gurgel-Gonçalves, R. (2020). Trypanosomatid infections in captive wild mammals and potential vectors at the Brasilia Zoo, Federal District, Brazil. *Veterinary Medicine and Science*, 6(2), 248–256. <https://doi.org/10.1002/vms3.216>

Roque, A. L. R., & Jansen, A. M. (2014). Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *International Journal for Parasitology. Parasites and Wildlife*, 3(3), 251–262. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.08.004>

Rueda, K., Trujillo, J. H. A., Carranza, J. C., & Vallejo, G. A. (2014). Transmisión oral de *Trypanosoma cruzi*: un nuevo escenario epidemiológico de la enfermedad de Chagas en Colombia y otros países suramericanos. *Biomedica*, 34(4). <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i4.2204>

Santos, R. L., & Oliveira, A. (2020). Leishmaniasis in non-human primates: Clinical and pathological manifestations and potential as reservoirs. *Journal of Medical Primatology*, 49(1), 34–39. <https://doi.org/10.1111/jmp.12441>

Silva, F., Lemos, L. P., Ravetta, A. L., Rohe, F., Sampaio, R., Franco, C., Santos, P., Santana, M. I. S., Amaral, J. V. D., Endo, W., Haugaasen, T., Peres, C. A., & Boubli, J. P. (2021). On the geographic distribution of the bald uakaris (*Cacajao calvus* ssp.) in Brazilian Amazonia. *Primate Conservation*.

Sleeman, J. P., Richgels, K. L. D., White, C. M., & Stephen, C. (2019). Integration of wildlife and environmental health into a One Health approach. *Revue Scientifique Et Technique De L Office International Des Epizooties*, 38(1), 91–102. <https://doi.org/10.20506/rst.38.1.2944>

Strait, K.; Else, J.G.; Eberhard, M.L. (2012) Parasitic Diseases of Nonhuman Primates. In: Abee, C. *et al.* **Nonhuman Primates in Biomedical Research**. Boston: Academic Press.

Vijay, V., Reid, C. D., Finer, M., Jenkins, C. N., & Pimm, S. L. (2018). Deforestation risks posed by oil palm expansion in the Peruvian Amazon. *Environmental Research Letters*, 13(11), 114010. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/aae540>

Virreira, M., Torrico, F., Truyens, C., Alonso-Vega, C., Solano, M., Carlier, Y., & Svoboda, M. (2003). Comparison Of Polymerase Chain Reaction Methods For Reliable And Easy Detection Of Congenital *Trypanosoma Cruzi* Infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68(5), 574–582. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2003.68.574>

Wolfe, N. D., Escalante, A. A., Karesh, W. B., Kilbourn, A. M., Spielman, A., & Lal, A. A. (1998). Wild Primate Populations in Emerging Infectious Disease Research: The Missing Link? *Emerging Infectious Diseases*, 4(2), 149–158. <https://doi.org/10.3201/eid0402.980202>

World Health Organization. (2022) **Leishmaniasis**. Retrieved from: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.

Zorrilla, V. O., De Los Santos, M., Espada, L. J., Del Pilar Santos, R., Fernandez, R. M., Urquia, A., Stoops, C. A., Ballard, S., Lescano, A. G., Vásquez, G. M., & Valdivia, H. O. (2017). Distribution and identification of sand flies naturally infected with *Leishmania* from the Southeastern Peruvian Amazon. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(11), e0006029. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006029>