

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Centro de Pesquisa em Virologia
Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica

**Estudo eco-epidemiológico de arboviroses em
primatas não humanos no Estado de São Paulo**

Leonardo La Serra

Ribeirão Preto- SP

2023

LEONARDO LA SERRA

**Estudo eco-epidemiológico de arboviroses em primatas não humanos
no Estado de São Paulo**

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de concentração: Clínica Médica –
Investigação Biomédica

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes
Figueiredo.**

Co orientador: Dr. Gilberto Sabino - Santos.

Ribeirão Preto

2023

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO DE PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha Catalográfica

Serviço de Documentação
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Leonardo La Serra

Estudo eco-epidemiológico de arboviroses em primatas não humanos no Estado de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023

156 f.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.
Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica. Área de concentração: Investigação Biomédica

1. Arbovírus 2. primatas não-humanos 3. Zika vírus 4. Dengue vírus 5. vírus da Encefalite de Saint Louis 6. vírus da Febre amarela 7. Mayaro vírus 8. Chikungunya vírus

Folha de Aprovação

Leonardo La Serra

Estudo eco-epidemiológico de arboviroses em primatas não humanos no Estado de São Paulo

Prof. Dr.: Luiz Tadeu Moraes Figueiredo

Instituição: Faculdade de Medicina – Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr. (a): __ Ricardo Luiz Moro de Sousa _____

Instituição: ____ FZEA - USP _____ Assinatura: _____

Julgamento: ____ APROVADO _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr. (a): __ Rodrigo de Carvalho Santana _____

Instituição: ____ FMRP- USP _____ Assinatura: _____

Julgamento: ____ APROVADO _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr. (a): __ Mirela D'arc Ferreira da Costa _____

Instituição: ____ UFRJ _____ Assinatura: _____

Julgamento: ____ APROVADO _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico essa tese à minha família. O alicerce moral e emocional da minha vida.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, que de diversas maneiras me ajudou a trilhar esse caminho tortuoso da pós graduação sem nunca me abandonar.

Agradeço ao meu orientador, pela ter aberto as portas e acreditado no trabalho aqui exposto.

Agradeço ao meu coorientador e parceiro de jornada, Dr. Gilberto Sabino dos Santos Jr., pela parceria, ensinamentos, amizade, e por ter sido a voz que me fez apaixonar pelo cerne desse projeto e me incentivar a olhar com mais entusiasmo e menos autocrítica exagerada ao nosso trabalho. Ao meu amigo, Rafael Cazarotti, pela parceria, auxílio nos campos e no laboratório, além das palavras de encorajamento e tutoria fitness.

Agradeço a todos os meus amigos de laboratório, Danilo Machado de Melo, Angélica Silva, Felipe Carvalho, Victória Thomazelli Garcia, Ana Beatriz dos Anjos Souza, Larissa Bueno, Aline Tolardo e Marília Farignoli, pelo aprendizado amizade e parceria nos momentos difíceis e nas conquistas. A todos os colegas do Centro de Pesquisa em Virologia que direta e indiretamente me auxiliaram na realização desse trabalho e pelos momentos de descontração na sala de alunos e na mesa do bar.

Agradeço aos responsáveis pelos zoológicos que nos ajudaram com a parceria e ao Centro de Controle de Zoonoses, sem eles esse trabalho estaria incompleto. E também a todas as pessoas que durante as campanhas de campo nos auxiliaram nas coletas. Todos esses essenciais para a realização desse trabalho.

Agradeço ao Émerson (secretário do programa de Clínica Médica), pela ajuda e boa vontade sempre que requisitado.

Agradeço à FAPESP (processo nº: 2016/25763-5) e ao CNPQ (processo nº: 141878/2017-7) pelo financiamento. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço também à especialista em laboratório Msc. Soraya Jabur Badra, pelo auxílio com aos experimentos de bancada, manutenção de cultura celular, organização e administração de laboratório, mas acima de tudo ao cuidado quase materno com todos os pesquisadores do laboratório.

Agradeço à minha família, que mesmo sem compreender completamente minha paixão pela ciência, me apoiou e me incentivou durante todo meu trajeto acadêmico e estiveram comigo me dando forças quando eu mais precisei.

RESUMO

La Serra, L. **Estudo eco-epidemiológico de arboviroses em primatas não humanos no Estado de São Paulo**. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2023.

As viroses transmitidas por artrópodes (arboviroses) causam epidemias de importantes doenças humanas representando graves problemas de saúde pública em países tropicais e subtropicais. Vírus das famílias *Togaviridae* (Mayaro e Chikungunya) e *Flaviviridae* (Dengue, Zika, febre amarela e SLEV) tem sido encontrado nos últimos anos no Brasil como emergentes ou reemergentes. Animais selvagens tem sido identificados por estarem infectados com esses arbovírus, incluindo primatas não humanos (PNH). Nesse contexto, foram objetivos dessa Tese: (i) detectar e identificar arbovírus em amostras de sangue, saliva, fezes e urina de PNH de vida livre, em cativeiro ou encontrados mortos, na Região Nordeste e Noroeste do Estado de São Paulo por *semi-nested multiplex* RT-PCR; (ii) verificar infecção ativa dos arbovírus encontrados nas amostras biológicas dos animais através de isolamento viral quando possível, (iii) e caracterizar o genoma através de sequenciamento nucleotídico, análises filogenéticas e epidemiologia molecular dos vírus detectados (iv) e, avaliar os aspectos ecológicos ligados à detecção de arbovírus em PNH detectando zonas de risco para infecção pelos arbovírus estudados na Região Nordeste e na Noroeste do Estado de São Paulo. Encontramos evidência de uma cocirculação silenciosa de diversos arbovírus *Flavivirus* de interesse para a saúde pública em PNH coletados em zonas urbanas. Os flavivírus DENV1, DENV2 e DENV3, YFV, ZIKV e SLEV foram encontrados infectando PNH da região Nordeste e Noroeste do estado de São Paulo; foi observada a infecção inédita por SLEV em primata *Saguinus midas*; SLEV e ZIKV foram encontrados em amostras de saliva e *swab* retal dos PNH, mostrando um risco para uma possível transmissão não vetorial dos vírus, o que precisa ser comprovada em futuros estudos; coinfeções de SLEV e ZIKV, assim como ZIKV e DENV3 foram observadas nos PNH. Foi possível verificar que a cidade de Ribeirão Preto é uma zona de risco para arboviroses, particularmente na região central e nas cercanias do Bosque Zoológico. Futuros estudos são necessários para verificar a presença de ciclos mantenedores dos *Flavivirus* DENV, SLEV e ZIKV entre os PNH, vetores e os seres humanos.

Palavras chave: Arbovírus, primatas não-humanos, Zika vírus, Dengue vírus, vírus da Encefalite de Saint Louis, vírus da Febre amarela, Mayaro vírus, Chikungunya vírus

ABSTRACT

La Serra, L. **Eco-epidemiological study of arboviruses in non-human primates in the State of São Paulo**. Doctoral thesis. Graduate Program in Internal Medicine - School of Medicine of Ribeirão Preto, 2023.

Viruses transmitted by arthropods (arboviruses) cause epidemics of important human diseases representing serious public health problems in tropical and subtropical countries. Viruses from the families *Togaviridae* (Mayaro and Chikungunya) and *Flaviviridae* (Dengue, Zika, yellow fever and SLEV) have been found in recent years in Brazil as emerging or reemerging diseases. Wild animals have been identified to be infected with these arboviruses, including non-human primates (NHP). In this context, the objectives of this thesis were: (i) to detect and identify arboviruses in blood, saliva, feces and urine samples of free range NHP, in captivity or found dead, in the Northeast and Northwest of the State of São Paulo using *semi-nested multiplex* RT-PCR; (ii) verify active infection of the arboviruses found in biological samples of the animals through viral isolation when possible, (iii) and genomic characterization through nucleotide sequencing, phylogenetic analyzes and molecular epidemiology of the detected viruses; (iv) to evaluate the ecological aspects related to the detection of arboviruses in PNH, detecting risk areas for infection by the studied arboviruses in the Northeast and Northwest regions of the State of São Paulo. We found evidence of a silent co-circulation of several *Flavivirus* arboviruses of interest to public health in PNH collected in urban areas. *Flaviviruses* DENV1, DENV2 and DENV3, YFV, ZIKV and SLEV were found to infect PNH in the Northeast and Northwest regions of the state of São Paulo; the unprecedented infection by SLEV was observed in the primate *Saguinus midas*; SLEV and ZIKV were found in samples of saliva and rectal swabs from HNP, showing a risk for a possible non-vector transmission of the virus, which needs to be proven in future studies; co-infections of SLEV and ZIKV, as well as ZIKV and DENV3 were observed in PNH. It was possible to verify that the city of Ribeirão Preto is a risk zone for arboviruses, particularly in the central region and in the surroundings of Bosque Zoológico. Future studies are needed to verify the presence of maintenance cycles of flaviviruses DENV, SLEV and ZIKV among PNH, vectors and humans.

Keywords: Arboviruses, non-human primates, Zika virus, Dengue virus, Saint Louis Encephalitis virus, Yellow Fever virus, Mayaro virus, Chikungunya virus

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição global de gênero de mosquitos de importância sanitária.....	16
Figura 2 - Distribuição dos casos de Dengue, Chikungunya e Zika por ano na região das Américas entre 2009 e 2021.	18
Figura 3 - Mecanismos de transmissão de arboviroses.....	19
Figura 4 - Etapas do processo de <i>spillover</i>	20
Figura 5 - Locais de coleta de PNH na região nordeste do estado de São Paulo..... Erro! Indicador não definido.	
Figura 6 - Ensaio de imunofluorescência indireta..... Erro! Indicador não definido.	
Figura 7 - Seleção do modelo adequado de clusters utilizando a técnica de componentes principais.....	51
Figura 8 - Razão de prevalência de infecção por Flavivirus entre PNH coletados e infectados na região nordeste do estado de São Paulo	54
Figura 9 - Seleção do modelo adequado de clusters para os PNH da cidade de Ribeirão Preto..	55
Figura 10 - Razão de prevalência de infecção por Flavivirus entre PNH coletados e infectados na cidade de Ribeirão Preto	56
Figura 11 - Mapa de Kernel mostrando a geolocalização e densidade dos casos de PNH positivos na cidade de Ribeirão Preto.	58
Figura 12 - Cladograma de máxima verossimilhança do gênero Flavivirus para DENV3.....	59
Figura 13 - Cladograma de máxima verossimilhança do gênero Flavivirus para SLEV	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição das amostras de PNH coletadas e analisadas para arboviroses.	Erro! Indicador não definido.
Tabela 2 - Primers para RT-qPCR de Chikungunya.	Erro! Indicador não definido.
Tabela 3 - Primers para RT-qPCR de Mayaro	Erro! Indicador não definido.
Tabela 4 - Oligonucleotídeos usados para sequenciamento por Sanger	41
Tabela 5 - Comparação entre sexo e idade dos PNH coletados e PNH positivos por estação.	46
Tabela 6 - Distribuição do número de espécies de indivíduos coletados de acordo com sexo e idade	45
Tabela 7 - Arbovírus identificados por espécies de PNH analisadas.	47
Tabela 8 - Amostras de PNH positivos por PCR para família Flaviviridae e sequenciados.	Erro! Indicador não definido.
Tabela 9 - Análise de clusters das variáveis alométricas.	51
Tabela 10 - Variáveis descritivas entre PNH infectados e não infectados utilizados na análise de clusters.....	52
Tabela 12 - Análise de clusters das variáveis alométricas para a cidade de Ribeirão Preto.	54
Tabela 13 - Variáveis descritivas entre PNH infectados e não infectados utilizados na análise de clusters para a cidade de Ribeirão Preto.....	56

LISTA DE SIGLAS

BR – Brasil

BZMRP – Bosque Zoológico Municipal de Ribeirão Preto

CO – Centro Oeste

Ct – Cycle Threshold

CHIKV – Vírus Chikungunya

DENV – Vírus da Dengue

dNTP - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

GABA - Ácido gama-aminobutírico

IgG – Imunoglobulina G

Kb – Kilobases

Km – Quilômetros

N – Norte

n – Número

nm – Nanômetros

mm – Milímetro

MAYV – vírus Mayaro

NCBI – National Center for Biotechnology Information

ORF – Open Reading Frame

OROV – Vírus Oropouche

PCR – Reação de Cadeia de Polimerase

PNH – Primatas não humanos

RNA – Ácido Ribonucleico

RNAi - Ácido Ribonucleico de interferência

ROCV – vírus Rocio

RT – Transcriptase Reversa

SE - Sudeste

SLEV – Vírus da Encefalite de Saint Louis

TT – Trinidad e Tobago

USA – Estados Unidos da América

UTR – *Untranslated Region*

WNV – Vírus do Oeste do Nilo

YFV – Vírus da Febre Amarela

ZIKV – Vírus Zika

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Panorama das Arboviroses e eventos de transmissão tipo <i>spillover</i>	18
1.2	Primatas não humanos e arboviroses	23
1.3	Flavivirus de importância no Brasil.....	25
1.4	Alphavirus de importância no Brasil	30
2	OBJETIVOS	34
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1	Locais de Estudo.....	35
3.2	Captura de Primatas	36
3.3	Análise de amostras	37
3.4	RT-PCR para Flavivirus	38
3.5	RT-qPCR em tempo real para os Alphavirus Mayaro e Chikungunya.....	38
3.6	Triagem sorológica para Mayaro e Chikungunya.....	40
3.7	Isolamento Viral	40
3.8	Teste de imunofluorescência (IFA)	41
3.9	Sequenciamento por método de Sanger.....	41
3.10	Análise filogenética	42
3.11	Análises Estatísticas.....	43
4	RESULTADOS	44
4.1	Diversidade e distribuição de espécies	44
4.2	Pesquisa de arbovírus	46
4.2.1	Pesquisa de Flavivirus por <i>semi-nested multiplex</i> RT-PCR	46
4.2.2	Isolamento viral	48
4.2.3	Sequenciamentos nucleotídicos dos 33 amplicons de Flavivirus	49
4.2.4	Triagem molecular de Mayaro e Chikungunya por RT-qPCR em tempo real.....	49
4.2.5	Triagem sorológica de Mayaro e Chikungunya por ELISA indireto utilizando antígenos E2 recombinantes.....	49
4.2.6	Análise eco-epidemiológica.....	50
4.2.7	Mapeamento de zonas de risco (heat map).....	57
4.2.8	Análise de genomas dos Flavivirus oriundos de PNH.....	58
5	DISCUSSÃO	62
6	CONCLUSÃO	74
7	Referências	75
8	ANEXOS	87
8.1	ANEXO A – Estágio de vida de primatas não humanos de acordo com espécie e peso corporal.....	87
8.2	ANEXO B – Espécies de PNH infectados por município e análise de necropsia.	88

8.3	ANEXO C – Análise descritiva dos dados eco-epidemiológicos	91
8.4	ANEXO D – Caracterização da análise de clusters	95
8.5	ANEXO E – Relação das variáveis de interesse com a infecção viral em primatas não humanos.....	96
8.6	ANEXO F – Relação dos primatas não humanos coletados e infectados por região de coleta.....	97
8.7	ANEXO G - Relação dos primatas não humanos coletados e infectados da cidade de Ribeirão Preto Relação das variáveis de interesse com a infecção pelo vírus (de forma geral).....	98
8.8	ANEXO H – Artigos provenientes do estudo	99
8.9	ANEXO I – Impacto do estudo na mídia	100

1 INTRODUÇÃO

A disseminação global de zoonoses virais representa uma ameaça à saúde humana (FIGUEIREDO, 2007). Nos últimos anos, a emergência e reemergência de vírus zoonóticos pouco conhecidos, ou até então negligenciados, tem se tornado foco de estudo e apreensão global. A pandemia recente de SARS-CoV-2 (Síndrome Respiratória Aguda Grave do Corona vírus 2) reacendeu a necessidade da comunidade científica e de saúde pública em voltar atenção para a vigilância de zoonoses virais emergentes, principalmente no paradigma da abordagem “*One Health*” (SIRONI; INGLESE; LAVAZZA, 2022). Nesse contexto, resumidamente, deve-se prezar pela sustentabilidade da ação antrópica em ecossistemas de risco e suas faunas, prevenindo assim os eventos de *spillover* de zoonoses (SIRONI; INGLESE; LAVAZZA, 2022). Dentre as doenças humanas de grande interesse para saúde pública mais de 75% são causadas por patógenos de origem zoonótica (JONES et al., 2008). Com representatividade significativa nesse cenário estão as arboviroses, dentre as quais antigos conhecidos, porém ainda de grande importância para saúde pública global. A distribuição dessas arboviroses está intimamente ligada a dispersão dos vetores (VIGLIETTA et al., 2021) (Figura 1). No Brasil, em especial, são encontrados os vírus da Dengue (DENV), vírus da Febre Amarela (YFV) e mais recentemente popularizados, os vírus Zika (ZIKV), Chikungunya (CHIKV), Mayaro (MAYV) e Oropouche (OROV) (FIGUEIREDO, 2015, 2019).

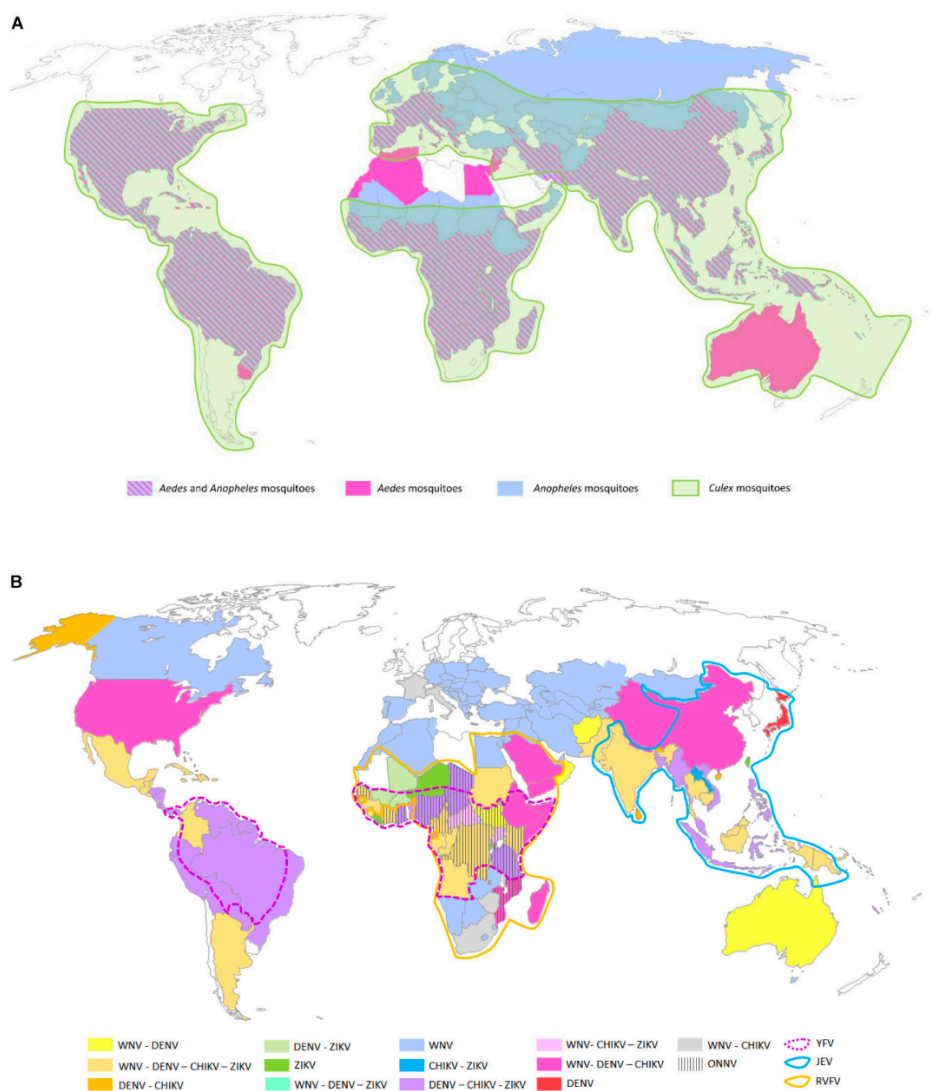


Figura 2 - Distribuição global de gênero de mosquitos de importância sanitária (A) e as principais arboviroses transmitidas pelos três principais gêneros de mosquitos (B). Adaptado: (VIGLIETTA et al., 2021).

A Organização Pan Americana de Saúde (PAHO) relata o agravamento no número de casos de DENV, CHIKV e ZIKV nas Américas entre 2009 e 2021 (Figura 2). Nessa série histórica, fica clara a predominância dos casos de DENV, acumulando o total de mais de 1.267.151 casos, 77% dos casos no Brasil, e 437 mortes em 2021. No mesmo período, mais de 137.025 casos de CHIKV foram detectados, 96,8% dos casos no Brasil, com 12 mortes registradas. Os números de casos de ZIKV nesse período totalizaram 21.019 casos, cerca de 83% destes no Brasil, com 5 mortes relatadas em 2021 (PAN AMERICAN HEALTH

ORGANIZATION, 2022). O impacto dos recentes surtos de YFV entre 2016 e 2019 chamaram atenção pela magnitude e expansão territorial, provavelmente consequência da baixa cobertura vacinal (CUNHA et al., 2020a; LACERDA et al., 2021). Cerca de 2.251 casos humanos com 772 mortes foram relatados no período. Um número 2,82 vezes maior do que aqueles ocorridos nos últimos 36 anos. Além disso, os mais atingidos durante o surto de febre amarela foram os primatas não humanos (PNH), com 15.000 casos conhecidos (SILVA et al., 2020). Sendo uma enzootia em PNH, esses animais tem sido usados como sentinelas, informando a circulação de YFV em regiões endêmicas, permitindo as medidas profiláticas e de contenção da transmissão do vírus para o homem. A descoberta do ZIKV na África também tem sido detectado em PNH (CHANG et al., 2016). No ano de 2016, foi estimado um gasto de cerca de 2.4 bilhões de reais com manejo de arboviroses no Brasil. Cerca de R\$ 1.4 bilhões somente em controle de vetores e um intrincado programa de implementação e qualificação profissional de agentes de combate a endemias (TEICH; ARINELLI; FAHHAM, 2017). Sendo assim estima-se que 65% do valor inicial (cerca de R\$ 1,0 bilhão) seja usado no combate a arboviroses. Outros 471 milhões de reais em investimento em custos médicos diretos no diagnósticos para DENV, CHIKV e ZIKV, além de tratamentos em humanos e R\$ 374 milhões em custos indiretos como afastamentos do trabalho (TEICH; ARINELLI; FAHHAM, 2017). Contudo, o monitoramento de epizootias em PNH é somente efetuada para YFV, embora existam evidências de que os PNH são reservatórios de diversas outras zoonoses virais (GIBB et al., 2020; PANDIT et al., 2018).

Portanto, a ampliação do monitoramento de outros vírus zoonóticos, com destaque para arboviroses em PNH, se faz necessária e com grande importância epidemiológica, embora venha sendo negligenciada.

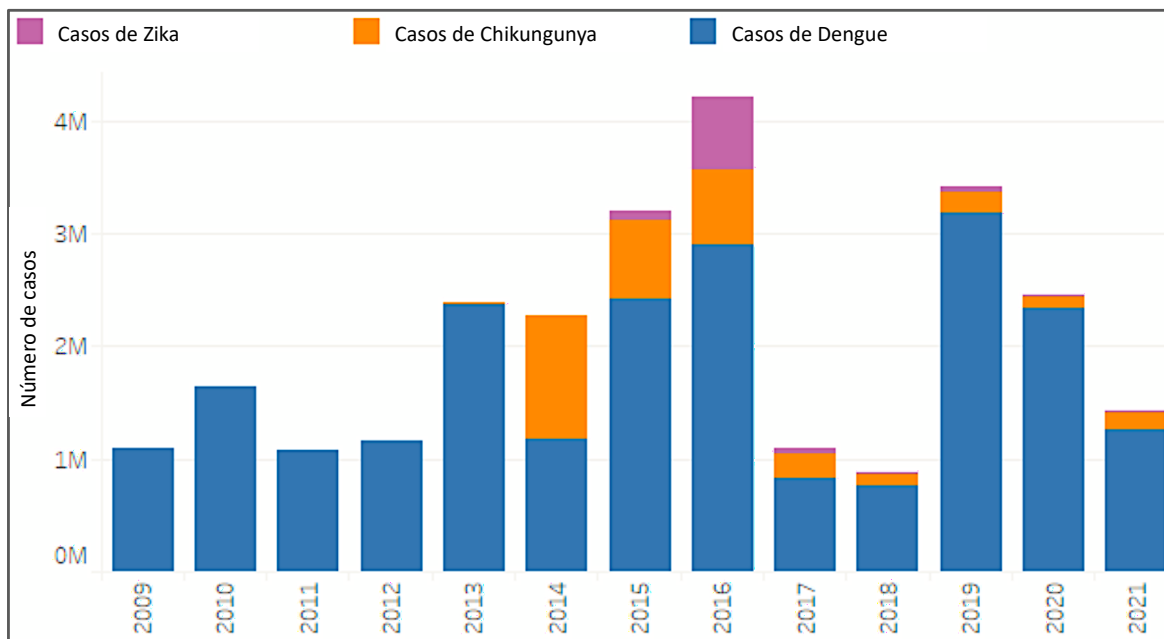


Figura 2 - Distribuição dos casos de Dengue, Chikungunya e Zika por ano nas Américas, entre 2009 e 2021. Adaptado: (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2022).

1.1 Panorama das Arboviroses e eventos de transmissão tipo *spillover*

Por definição arbovírus (*arthropod borne virus*) são vírus cujo ciclo de transmissão depende da participação de um vetor artrópode, como mosquito e carrapato (MELTZER, 2012). A dinâmica de transmissão das arboviroses, assim como a de outras zoonoses virais, é complexa e leva em consideração diversos fatores ecológicos e intrínsecos aos próprios hospedeiros e vetores (LORENZ et al., 2017a; MARINHO et al., 2022; OLIVEIRA; BAHIA; VALE, 2020; VIGLIETTA et al., 2021). Didaticamente, podem-se nomear três formas de transmissão associadas a arboviroses. Existe o ciclo enzoótico ou silvestre, em que a transmissão é direta, o vetor transmite o patógeno de um reservatório silvestre aos seres humanos, em geral, produzindo casos de infecção esporádicos ou pequenos surtos; também, deve-se lembrar o ciclo urbano, em que o vetor, servindo como um reservatório, propicia a transmissão do vírus diretamente ao ser humano. Considera-se também, um ciclo enzoótico doméstico, onde animais domesticados, geralmente usados na pecuária pelos seres humanos (bovinos, suínos, caprinos entre outros) servem com reservatórios ou amplificadores, transmitindo o vírus ao vetor que o transmite ao ser

humano. Independente do ciclo de transmissão, os fatores comuns na equação de emergência de arboviroses são a presença do vetor e a de um reservatório silvestre (Figura 3) (WEAVER et al., 2018). Ainda, como mecanismo não usual, descreveu-se uma transmissão sexual para ZIKV (TURMEL et al., 2016).

A transmissão do hospedeiro/reservatório natural para o homem, por um vetor de transmissão ou não, é denominado *spillover* ou transmissão interespecífica. Apesar dos ciclos de transmissão aparentarem um processo intermediado principalmente pela presença de um vetor, o evento de *spillover* é altamente complexo e envolve diversos fatores associados como a distribuição, quantidade e densidade do patógeno no ambiente (pressão do patógeno), a presença do reservatório, e a densidade populacional e dinâmica ecológica dos mesmos.

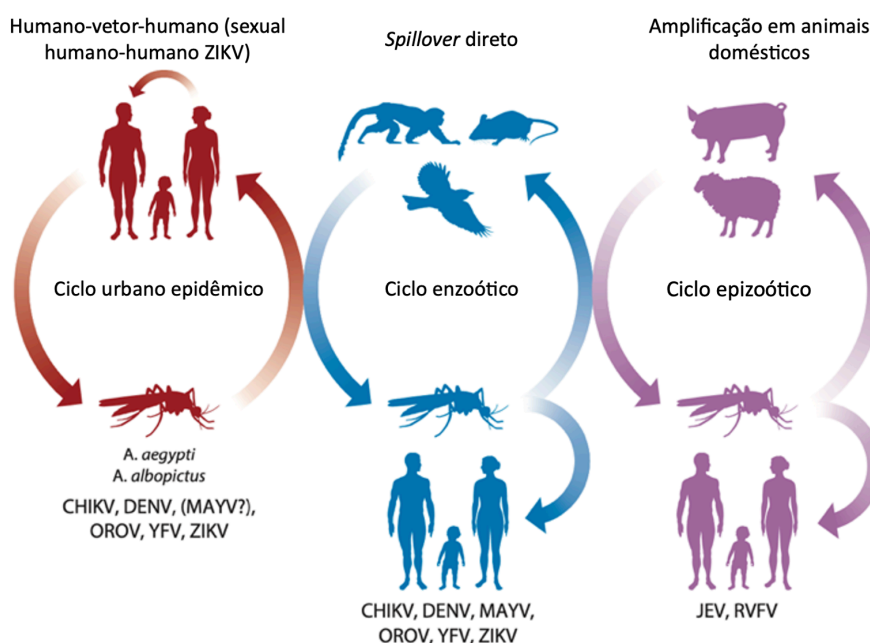


Figura 3 - Mecanismos de transmissão de arboviroses. Adaptado: Weaver et al., 2018.

Outro fator importante está ligado à liberação e sobrevivência do patógeno no meio ambiente, que está intimamente associado à via de liberação, presença de vetor, formas de contato, ecologia e a própria biologia do patógeno na natureza. Somam-se a esses fatores as rotas de transmissão e exposição humana a esses patógenos. Finalmente, uma

vez em contato com o hospedeiro outro fator importante no sucesso de transmissão é a susceptibilidade do hospedeiro à infecção. Nesse caso, estamos falando de barreiras imunológicas e fisiológicas do hospedeiro natural ou final, como o humano, para ocorrer uma infecção bem sucedida (PLOWRIGHT et al., 2017) (Figura 4A). Todas essas questões citadas podem funcionar como barreiras a serem transpostas pelos patógenos zoonóticos para encontrarem e infectarem o homem. Transpor as barreiras implica que as condições ideais para esses patógenos estejam incomumente “alinhadas” em determinado momento e por essa razão tais eventos são raros (Figura 4B). Dentre fatores ambientais e ecológicos envolvidos no *spillover* de arboviroses se destacam o comportamento e a densidade populacional do hospedeiro natural e do vetor além de outros fatores ligados à manutenção do vetor na natureza.

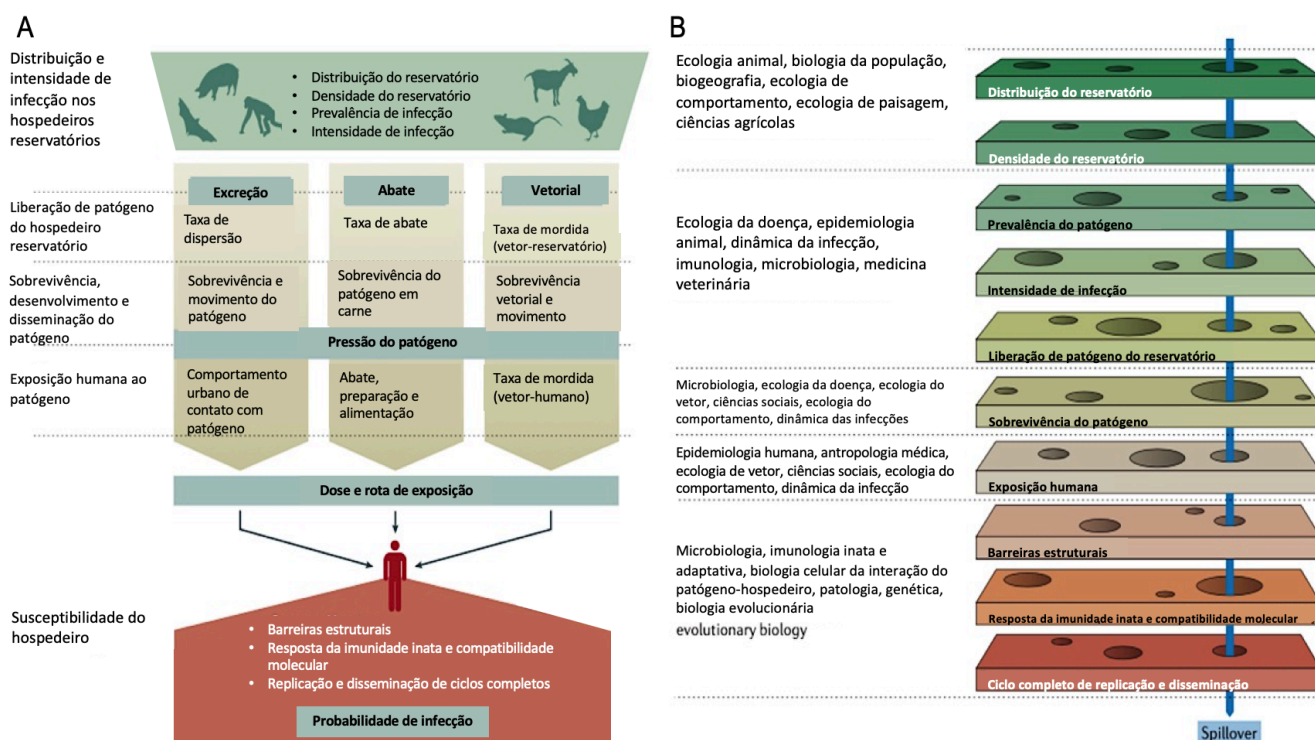


Figura 4 - Etapas do processo de *spillover*. A imagem ilustra as etapas desde a distribuição dos reservatórios, densidade populacional, liberação do patógeno no meio ambiente, sobrevivência na natureza, até a exposição e a susceptibilidade humana à infecção. Adaptado PLOWRIGHT et al., 2017.

Nos vetores de arboviroses, a infecção e conseqüentemente, a transmissão está ligada a fatores como a sua resposta imune na ingestão do arbovírus e às condições ambientais

favoráveis à sobrevivência e proliferação. A presença de RNAs de interferência (RNAi), resposta imune ligada a sinalização JAK-STAT, ativação de receptores tipo *Toll* e a via de Imd (via da imunodeficiência) são fatores antimicrobianos ativados no intestino do vetor, capazes de impedir a infecção viral (WU et al., 2019). Além disso, a ingestão de componentes provenientes do sangue do hospedeiro é capaz de modular a resposta do vetor ao arbovírus. Por exemplo, a ingestão de IgM e IgG, lipoproteínas de baixa densidade do hospedeiro, reduzem a infecção por arbovírus. Por outro lado, a ingestão de grandes quantidades da proteína NS-1 (proteína não estrutural) pelo mosquito favorece a infecção por *Flavivirus* (OLMO et al., 2023; VIGLIETTA et al., 2021; WU et al., 2019). A digestão de sangue do hospedeiro pelo mosquito favorece a produção de ácido gama-aminobutírico (GABA), que por sua vez favorece a replicação viral no intestino do vetor (WU et al., 2019). A coinfeção viral nos vetores também demonstrou influenciar na transmissão de arboviroses, como no caso da coinfeção por vírus específicos de inseto aumentando a capacidade de transmissão de DENV e ZIKV em modelos animais (OLMO et al., 2023).

Fatores ambientais são de grande importância na transmissão de zoonoses, dentre eles a temperatura se destaca para as arboviroses (LORENZ et al., 2017b). A sobrevivência larval e do mosquito adulto, a procura por hospedeiros e a sua resposta imunológica são influenciados de diferentes maneiras por variações na temperatura ambiental. Nas regiões tropicais, temperaturas mais elevadas favorecem a proliferação do vetor, diminuindo a latência larval, acelerando o desenvolvimento e diminuindo o período de incubação extrínseco (período entre a infecção do vetor e aquele em que ele passa a transmitir o vírus) (BELLONE; FAILLOUX, 2020; KRAMER, 2016; OLIVEIRA; BAHIA; VALE, 2020; VIGLIETTA et al., 2021). A dependência do vetor à temperatura ambiental confere um caráter sazonal à maioria das arboviroses. Porém, temperaturas extremas podem influenciar a capacidade vetorial de transmissão para arbovírus. No caso do DENV e

CHIKV, *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, respectivamente, mostraram maior taxa transmissão desses vírus quando em baixas temperaturas (18°C) (BELLONE; FAILLOUX, 2020). Enquanto para ZIKV e vírus do West do Nilo (WNV), o aumento de temperatura aumentou a taxa de transmissão (30°C) (BELLONE; FAILLOUX, 2020; VIGLIETTA et al., 2021). Além disso, estudos de predição já demonstraram risco no aumento de casos de vírus como MAYV, OROV, Rocio (ROCV) e o vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV) relacionado a aumento constante de temperatura, que por sua vez, pode levar à expansão de áreas de distribuição dos vetores (LORENZ et al., 2017b).

A precipitação e desmatamento são outros fatores relevantes na transmissão de arboviroses, pois, assim como a temperatura, estão intimamente ligados à proliferação de vetores e sua distribuição entre biomas e áreas de vegetação fragmentada (BOGOCH et al., 2016; LORENZ et al., 2017b; TABACHNICK, 2016). Para arboviroses como DENV e ZIKV, a alta precipitação e temperatura, aliadas a alta taxa de desmatamento foram fatores importantes no aumento de casos por esses vírus entre 2000 e 2019 no norte do Brasil (ALI et al., 2017; LEE et al., 2021; MARINHO et al., 2022). O desmatamento acelerado se mostrou um fator importante na incidência de casos de ZIKV, DENV e CHIKV no nordeste brasileiro (MARINHO et al., 2022). Além disso, condições socioeconômicas desfavoráveis podem influir positivamente na incidência de casos de arbovirose, pois podem estar associadas a baixa cobertura sanitária, condições precárias de moradia e difícil acesso ao sistema de saúde, como no caso do DENV na Amazônia (KALBUS et al., 2021). A exposição de animais domésticos, como no caso de equinos expostos a WNV, vírus Ilhéus (ILHV) e SLEV, foi destacada para animais que residiam nas cercanias de áreas de pecuária extensiva, caracterizando como o uso do solo pode aumentar susceptibilidade dos hospedeiros amplificadores na natureza a arboviroses (PAUVOLID-CORRÊA et al., 2014a).

1.2 Primatas não humanos e arboviroses

A associação de PNH com zoonoses de interesse em saúde pública está ligada a similaridade entre patógenos que afetam PNH e seres humanos, sua proximidade e aspectos da genética e similaridade da resposta imunológica para patógenos compartilhados (CARRILLO-BILBAO; MARTIN-SOLANO; SAEGERMAN, 2021; ESTES; WONG; BRENCHLEY, 2018; ILLIA et al., 2022; NARAT et al., 2017; WOLFE, 1998). Fatores comportamentais como hábitos diurnos, a convivência em bandos e permanência nas copas de árvores favorecem a exposição de PNH a diversos tipos de vetores (ROCHA; SVOBODA; GOMES, 2014). Estudos com modelos preditivos para reservatórios naturais de zoonoses virais emergentes revelaram uma maior probabilidade do *spillover* de patógenos de origem em PNH quando comparados a roedores e aves, devido à proximidade genética (SINGH; WARD; DHAND, 2022; WALKER et al., 2018). Estudos de susceptibilidade a infecções por arbovírus e candidatos vacinais foram feitos utilizando PNH do velho mundo, pela sua maior proximidade genética com seres humanos (SINGH; WARD; DHAND, 2022). Portanto, a participação de PNH neotropicais na dinâmica de infecção de arboviroses ainda é pouco compreendida e estudada. Ainda assim, estudos preditivos destacam a alta probabilidade de famílias de PNH neotropicais participarem na dinâmica de infecção por diversos arbovírus. Os PNH neotropicais são divididos em 5 grandes famílias: *Callithrichidae*, *Cebidae*, *Aotidae*, *Pitheciidae* e *Atelidae*, totalizando 110 espécies e 205 subespécies. Ao menos 36 dessas espécies são endêmicas do Brasil e todas elas consideradas vulneráveis pela Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies Silvestres Ameaçadas de Extinção (CULOT et al., 2019; SANTOS et al., 2020). Estudos recentes de predição destacam uma alta probabilidade de PNH neotropicais, principalmente da família *Atelidae*, como por exemplo *Ateles* sp.(Macaco-Aranha), *Allouata* sp.(Bugio),

Brachyteles sp.(Muriqui), de albergarem *Flavivirus* em relação às demais famílias de primatas. Devido a alta incidência de mosquitos e carrapatos, além de maior probabilidade de aves e mamíferos da mesma região apresentaram infecção por *Flavivirus* (PANDIT et al., 2018). Também, vírus do gênero *Alphavirus* (MAYV e CHIKV) já foram descritos infectando PNH neotropicais no Brasil e América do Sul, em *Atelidae* nas espécies *Ateles marginatus*, *Sapajus* spp., *Callithrix* spp., *Alouatta seniculus*, *Saimiri sciureus*, *Saguinus midas*, (BATISTA et al., 2013; CARRILLO-BILBAO; MARTIN-SOLANO; SAEGERMAN, 2021; DE THOISY et al., 2003; MOREIRA-SOTO et al., 2018). Estudos com *Flavivirus* de maior interesse para a saúde pública mostraram a participação de PNH no ciclo silvático de transmissão de DENV, ao menos na África e Ásia, CHIKV e ZIKV, na África. Porém são necessários estudos conclusivos nas Américas, incluindo o Brasil (VALENTINE; MURDOCK; KELLY, 2019). No Brasil, além de DENV, outros arbovírus como YFV, ZIKV, MAYV, CHIKV e OROV já foram descritos em PNH (FIGUEIREDO, 2019; SACCHETTO et al., 2020; VALENTINE; MURDOCK; KELLY, 2019; VASCONCELOS; CALISHER, 2016). Estudo ecológico para YFV na América Latina mostrou que a probabilidade da ocorrência de casos em seres humanos numa dada região era dobrado na presença de diferentes famílias de PNH susceptíveis (HAMRICK et al., 2017). Estudos predizendo surtos de YFV alertam para a falta de dados referentes à prevalência de infecção e a vigilância de outras arboviroses em PNH, o que permitiria prever e viabilizar mais rapidamente respostas de saúde pública para essas outras arboviroses (CHILDS et al., 2019).

As arboviroses emergentes e reemergentes tem se tornado grande foco de estudo e interesse na saúde pública, em especial os arbovírus da família *Togaviridae* gênero *Alphavirus* (MAYV, CHIKV), e da família *Flaviviridae* gênero *Flavivirus* (YFV, DENV e ZIKV). Observou-se a emergência do ZIKV no Brasil, a reemergência da YFV silvestre e ainda outras arboviroses de impacto pouco conhecido, mas com crescente número de

casos, como as dos vírus Oeste do Nilo (WNV), SLEV, MAYV e CHIKV. Tais arboviroses, necessitam melhor entendimento sobre dinâmica na natureza para identificar epizootias e surtos.

1.3 Flavivirus de importância no Brasil

A família *Flaviviridae* é composta por quatro gêneros virais, os *Pestivirus*, *Hepacivirus*, *Pegivirus* e os *Flavivirus*. Quanto à sua estrutura genômica, os *Flavivirus* são envelopados e esféricos de 40-60nm de diâmetro, com RNA de fita simples e polaridade positiva, de 9 a 11kb (SIMMONDS et al., 2017). O genoma viral codifica uma poliproteína com uma única ORF de leitura (*Open Reading Frame*), que por sua vez codifica 3 proteínas estruturais (envelope [E], capsídeo [C] e pré-M [prM]), e 7 proteínas não estruturais (NS) (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). O RNA viral é flanqueado por duas regiões não traduzíveis (UTRs, Untranslated Regions), que são estruturas complexas formadoras de estruturas secundárias e que coordenam a tradução, replicação e regulação de resposta imune do hospedeiro (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005; PIERSON; DIAMOND, 2020). A proteína C é responsável pelo empacotamento e formação do nucleocapsídeo viral. A glicoproteína prM é clivada no processo de maturação viral, originando a proteína de membrana (M). Por sua vez, a glicoproteína E é responsável pela ligação de receptores celulares, montagem e fusão celular. E possui epítomos altamente imunogênicos, elicitando a resposta imunológica do hospedeiro, sendo responsável pela caracterização de *Flavivirus* em grupos sorológicos (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005). Entre as proteínas não estruturais, a NS1 é a de maior destaque entre os *Flavivirus*, expressa na membrana celular ou secretada, é altamente imunogênica e responsável pela evasão viral do sistema imune bem como ativação do complemento (BLAHOVE; CARTER, 2021; CHONG et al., 2019; GUZMAN et al., 2016). As demais proteínas NS podem funcionar como: cofatores de

enzimas virais e podem estar ligadas ao neurotropismo viral (NS2A e NS2B); formadoras de complexos de replicação e agir como protease viral (NS3); formadoras de “fábricas virais” e supressoras da sinalização para interferon (NS4); e responsáveis pela replicação viral e supressão de diferentes respostas imunes do hospedeiro (NS5) (BLAHOVE; CARTER, 2021; CHONG et al., 2019; GUZMAN et al., 2016).

Os *Flavivirus* incluem mais de 53 espécies virais, sendo 40 delas patogênicas para o homem e outros animais, responsáveis por inúmeros casos de doença emergentes e reemergentes no caso do DENV, ZIKV, YFV e ROCV no Brasil (FIGUEIREDO, 2000; GOULD et al., 2017; SIMMONDS et al., 2017). Os *Flavivirus* tem mais de 120.000 anos e seus vetores, mosquitos e carrapatos, foram definidos a 40.000 anos (PETTERSSON; FIZ-PALACIOS, 2014). Os *Flavivirus* teriam origem Africana, com diversas introduções posteriores reconhecidas no continente Europeu, Asiático e nas Américas por pássaros migratórios, roedores e mais recentemente por migrações humanas, como o comércio de pessoas escravizadas entre os séculos XVI e XIX (HOLBROOK, 2017; MOUREAU et al., 2015). Quanto aos vetores, os *Flavivirus* podem ser divididos em dois grupos; os transmitidos pelo mosquito *Culex* ssp. (complexo do vírus da Encefalite Japonesa - JEV), que são geralmente neurotrópicos e os transmitidos por *Aedes* ssp., associados a doenças humanas hemorrágicas ou viscerotrópicas. Os *Flavivirus* de carrapatos estão associados a doença neurológica e em menor proporção a sintomas hemorrágicos (HOLBROOK, 2017; PETTERSSON; FIZ-PALACIOS, 2014).

O DENV é o mais importante e também o mais estudado *Flavivirus* conhecido, com 100 milhões de infecções anualmente e 40 mil mortes, em cerca de 115 países (ZENG et al., 2021). A febre do dengue é uma doença aguda que cursa com *rash* cutâneo, artralgia, mialgia e plaquetopenia, podendo progredir em alguns casos para doença hemorrágica, levando ao choque e morte (GUZMAN et al., 2016). O ZIKV é outro *Flavivirus* que adquiriu notoriedade, desde que emergiu em meados de 2014, adquirindo mutações que

agravaram sua patogenicidade. Tais mutações foram relacionadas às proteínas prM, NS1, NS3, NS5 e 3'-UTR (PIERSON; DIAMOND, 2020; PROENCA-MODENA et al., 2018; ROSSI et al., 2018; YUAN et al., 2017) consideradas importantes para a capacidade neuroinvasiva e evasora do sistema imunológico pelo vírus. ZIKV produz sintomas similares aos da infecção por DENV, porém, se descobriu no Brasil que o vírus causa uma síndrome congênita que produz microcefalia em recém nascidos. O vírus infecta células neuronais progenitoras do embrião e também causa a síndrome neurológica da paralisia flácida de Guillain-Barré. Até recentemente a linhagem Asiática do ZIKV predominava no Brasil, contudo a linhagem Africana foi identificada em PNH e vetores no Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro. Os PNH identificados com a linhagem Africana mostraram sinais histopatológicos compatíveis a Síndrome Congênita de ZIKV (CGZ) em neonatos (RODRIGUES DE ALMEIDA et al., 2019), porém pouco se sabe sobre possíveis implicações desses achados num possível novo surto da doença (DE MATOS et al., 2021; RODRIGUES DE ALMEIDA et al., 2019). Também, descobriu-se que o ZIKV pode ser transmitido horizontalmente (mãe para filho) (NUNES et al., 2016) e sexualmente, com material genético perdurando por cerca de seis meses no sêmen (TURMEL et al., 2016). Outro *Flavivirus* de grande importância sanitária para o Brasil é o YFV, introduzido no país durante o comércio escravo, juntamente com seu vetor inicial o *Aedes aegypti*. Tanto o vetor quanto o vírus se adaptaram com sucesso às condições climáticas e grande diversidade de PNH e novos vetores. Adaptou-se a um ciclo silvático bem estabelecido em PNH (*Cebidae*, *Aotidae* e *Callitrichidae*) transmitido por mosquitos *Haemagogus* spp. e *Sabethes* spp. (FIGUEIREDO, 2000; SILVA et al., 2020). Ocorreram diversos surtos com transmissão urbana de febre amarela na costa nordeste, sudeste e interior de vários estados brasileiros. A transmissão urbana da febre amarela só cessou após 1937, com o surgimento da vacina de vírus atenuado 17DD, com um último caso em 1942 na região Amazônica (FIGUEIREDO, 2000). Desde então, surtos de origem

silvestre tem ocorrido relacionados a invasão humana de regiões de mata tendo interação, ou não, com PNH. Os surtos mais recentes de YFV no Brasil foram os mais graves das últimas décadas. Os primeiros casos se originaram no estado de Minas Gerais, de cepa YFV de origem na região Norte ou Centro-Oeste, que já circulava entre PNH meses antes dos primeiros casos humanos (FARIA et al., 2018). Logo depois a febre amarela se espalhou por corredores florestais e estradas com ajuda de PNH, mosquitos e pela ação humana atingindo os estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Bahia, Espírito Santo, Paraná e Santa Catarina entre 2015 e 2019 (LACERDA et al., 2021). A febre amarela é considerada viscerotrópica, produzindo cefaleia, mialgia, artralgia, vômito, icterícia e podendo levar a febre hemorrágica, falência de órgãos. O comprometimento hepático pode ser grave em seres humanos e em alguns PNH como da espécie *Alouatta caraya* (DE AZEVEDO FERNANDES et al., 2021). A letalidade humana da infecção grave por YFV é maior que 40% no Brasil (SILVA et al., 2020) e em algumas espécies de PNH pode chegar a mais de 60% (DE AZEVEDO FERNANDES et al., 2021). Os surtos de febre amarela de 2015 a 2019 produziram mais de 3000 casos humanos com cerca de 330 mortes e também mais de 15000 epizootias entre PNH das famílias *Cebidae*, *Callitrichidae* e *Cebidae* (CUNHA et al., 2019, 2020a; LACERDA et al., 2021; SILVA et al., 2020). A participação de PNH, *Callithrix* spp. em região urbana, além da presença do vírus em mosquitos *Aedes* durante os surtos, chamam atenção para uma possível reurbanização da febre amarela, transmitida pelo mosquito urbano antropofílico *Aedes aegypti* (CUNHA et al., 2020a, 2020b; SILVA et al., 2020). Fatores como o aumento na precipitação, e principalmente a baixa cobertura vacinal nas populações das regiões acometidas influenciaram na gravidade dos surtos recentes de febre amarela (CHILDS et al., 2019; LACERDA et al., 2021). Também, mutações encontradas em NS3 e NS5 (responsáveis pelo complexo de replicação), na cepa YFV circulante nos surtos recentes, devem ter tido impactos a serem investigados no *fitness* viral (BONALDO et al., 2017).

De fato, a dinâmica epidemiológica dos surtos de YFV mostrou de forma contundente a participação dos PNH. Outro arbovírus que tem causado surtos esporádicos no Brasil é o SLEV. Este vírus, originalmente descrito em surto nos Estados Unidos, em 1933, transmitido por *Culex* entre aves migratórias e seres humanos, encontra-se amplamente disseminado nas Américas. A doença por SLEV causa febre aguda além de encefalite, que tem letalidade de 5% a 20%, principalmente em idosos nos Estados Unidos (REISEN, 2003). No Brasil, o vírus foi identificado no vetor *Sabethes belisarioi* em Belém, região norte, em 1960, e nos vetores *Culex declarator* e *Culex coronator*. Posteriormente, o SLEV foi identificado e isolado de roedores sentinelas e selvagens, pássaros e PNH na região amazônica (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1998). O vírus foi isolado pela primeira vez em 2005 de um paciente clinicamente diagnosticado com DENV no estado de São Paulo (ROCCO et al., 2005), e o primeiro e mais importante surto aconteceu entre 2007 e 2011 concomitante a uma epidemia de DENV3, em São José do Rio Preto (MONDINI et al., 2007a; TERZIAN et al., 2011). A emergência do vírus durante surtos de outras arboviroses chama atenção para o fato de que estes arbovírus podem ocorrer simultaneamente, o que é pouco estudado quanto ao quadro clínico de pacientes e epidemiologia. Evidências de SLEV em PNH baseiam-se em estudos sorológicos esporádicos em diversas regiões brasileiras, em espécies de *Atelidae*, *Callitrichidae* e *Cebidae* (ALMEIDA et al., 2019).

Entre os *Flavivirus* emergentes de destaque no Brasil estão o ROCV e o ILHV, responsáveis por pequenos surtos esporádicos e casos isolados identificados durante surtos de outros arbovírus. A transmissão desses vírus dá-se por mosquitos *Sabethes* spp. e *Culex* spp., *Psorophora ferox* e *Aedes scapularis* e seus animais-reservatório pode ser aves, preguiças, PNH e roedores. A infecção de seres humanos, além dos sintomas como febre aguda e mialgia, pode acometer o sistema nervoso, causando encefalites e deixando sequelas graves (FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014; FIGUEIREDO, 2000; MILHIM

et al., 2020; PIERSON; DIAMOND, 2020; SAIVISH et al., 2020; TERZIAN et al., 2011).

1.4 Alphavírus de importância no Brasil

A família Togaviridae foi recentemente atualizada e atualmente é composta por um único gênero, o *Alphavirus*. Quanto à estrutura genômica, os *Alphavirus* são envelopados e esféricos de 65-70nm de diâmetro, com RNA de fita simples e polaridade positiva, entre 10 e 12kb (CHEN et al., 2018). O genoma viral codifica duas poliproteínas (ORFs) divididas por uma região intergênica, a primeira codificando uma ORF no sentido 5' - 3' e que codifica quatro proteínas NS (NSP) (NSP1, NSP2, NSP3 e NSP4), envolvidas na transcrição e replicação viral. A segunda ORF codifica seis proteínas estruturais (capsídeo [C], proteínas de envelope [E1, E2 e E3], 6K e TF) a partir de um RNA subgenômico. O genoma viral é flanqueado por duas UTRs e diferentemente dos *Flavivirus*, possui cauda poli-A na extremidade 3'. Entre as proteínas não estruturais, a NSP1 tem ação iniciadora na síntese do RNA de polaridade negativa (molde para geração de RNA subgenômico), está envolvida no *cap* do genoma viral e no ancoramento do complexo replicativo na membrana plasmática da célula hospedeira. A NSP2 tem diversas funções enzimáticas, sendo protease para diversas proteínas NS virais, helicase, promotora do RNA subgenômico. A NSP3 está envolvida na replicação viral pelo recrutamento de componentes celulares e inibição de estresse celular nesse processo. O papel da RNA polimerase dependente de RNA (RdRP) é exercida pela NSP4, essencial no complexo replicativo, e um estudo sugere sua relação com a poliadenilação do genoma viral (CUNHA et al., 2020c; DE OLIVEIRA MOTA et al., 2015; RUPP et al., 2015). As proteínas estruturais de envelope E1 e E2 estão ligadas à fusão e entrada viral, ligando-se aos receptores da célula hospedeira. A proteína E3 atua sinalizando a entrada das poliproteínas no retículo da célula hospedeira, além de promover maturação de E1 e E2.

Por sua vez a proteína 6K, aparentemente, promove a maturação de glicoproteínas, montagem dos seus *spikes* e age como viroporina, facilitando o brotamento da partícula viral (CUNHA et al., 2020c; DE OLIVEIRA MOTA et al., 2015; VOSS et al., 2010). A proteína TF tem 6K atua estabilizando E1 e E2 e também inibe o sistema imune do hospedeiro via interferon do tipo 1 (HOLMES et al., 2020). A proteína C origina o nucleocapsídeo que empacota o genoma viral. Ao brotar da membrana plasmática, a partícula viral pode incluir pequenas quantidades de fragmentos proteicos de 6K associados à membrana (DE OLIVEIRA MOTA et al., 2015; HOLMES et al., 2020).

Os *Alphavirus* incluem mais de 30 espécies reconhecidas e em sua maioria são patogênicos aos hospedeiros infectados. A descoberta de *Alphavirus* infectando peixes e mamíferos aquáticos deu uma nova perspectiva com uma origem aquática desse gênero (FORRESTER et al., 2012; RUPP et al., 2015; TSETSARKIN et al., 2011a). Os *Alphavirus*, ao infectarem o homem, podem causar encefalite como a do vírus da Encefalite Equina Venezuelana (VEEV) e a do vírus da Encefalite Equina Oriental (EEEV). Outros *Alphavirus* são artritogênicos como o CHIKV e o MAYV (LOPES MARQUES et al., 2020) que estão entre os *Alphavirus* de maior importância no Brasil. MAYV foi primeiramente detectado em Trinidad, em 1954 e desde então, sua presença vem sendo notificada pelo Caribe e América Latina (CELONE et al., 2021). No Brasil, MAYV foi isolado de mineradores, em 1955, no Pará (MAROJA; CAUSEY, 1957), mas seu surto de maior relevância aconteceu em Belterra, no mesmo estado, em 1978, com 55 casos confirmados (LEDUC; PINHEIRO; TRAVASSOS DA ROSA, 1981). A maior parte dos surtos conhecidos de MAYV ocorreram na região norte e centro-oeste do país (ESPOSITO; FONSECA, 2017). Estudos de sua filogenia identificaram três genótipos ligados à distribuição geográfica viral: genótipo L (limitado a região norte e central do Brasil), genótipo D (disseminado na região Pan-Amazônica da América do Sul e Caribe)

e genótipo N (específico do Peru) (DE PAULA SILVEIRA-LACERDA et al., 2021; PEZZI et al., 2019). MAYV já foi encontrado em diversos animais silvestres como PNH (CELONE et al., 2021; MOREIRA-SOTO et al., 2018). Quanto a roedores, marsupiais e aves, a grande heterogeneidade das metodologias aplicadas nos estudos não permite concluir sobre o real papel desses animais na transmissão viral (CELONE et al., 2021). No Brasil, diversos gêneros de PNH seriam prováveis participantes no ciclo silvestre do MAYV: *Alouatta sp.*, *Callithrix sp.*, *Saguinus sp.*, *Sapajus sp.*, *Saimiri sp.* e *Aotus sp.*, (CELONE et al., 2021). Quanto ao vetor silvático transmissor do MAYV, o mosquito *Haemagogus janthinomys*, é igual ao da febre amarela. Também, MAYV já foi encontrado em vetores como o *Culex sp.*, *Sabethes sp.*, *Psorophora sp.*, e *Aedes sp.* (CAICEDO et al., 2021; DE OLIVEIRA MOTA et al., 2015). A presença de MAYV em *Aedes sp.* causa preocupação quanto ao risco de urbanização desta virose, visto o comportamento periurbano desses mosquitos, como é o caso dos 17 pacientes coinfectedados com DENV/MAYV na região urbana de Goiânia descritos em 2017 e 2018 (DE PAULA SILVEIRA-LACERDA et al., 2021) e os 6 pacientes coinfectedados com MAYV/CHIKV em Tocantins (DOS SANTOS SOUZA MARINHO et al., 2022).

CHIKV, amplamente distribuído mundialmente, é o representante mais recente e mais importante para a saúde pública entre os *Alphavirus* no Brasil. Assim como o MAYV o CHIKV é causador de doença aguda febril com artrite, mialgia, náuseas e fadiga, e 3 a 25% dos casos podem ser assintomáticos (BETTIS et al., 2022). O vírus originou-se na África há cerca de 500 anos. Primeiramente isolado na Tanzânia, em 1952, CHIKV causou surtos na África e Ásia nas cinco décadas posteriores. O nome Chikungunya, relaciona-se aos sintomas acometendo articulações: “aqueles que se dobram”, na língua suaíli (BETTIS et al., 2022; DE LIMA CAVALCANTI et al., 2022). A filogênese do CHIKV identificou três linhagens enzoóticas principais: Leste/Central/ Sul Africana (do inglês: ECSA), Oeste Africana e linhagem Asiática (SILVA; DERMODY, 2017;

TSETSARKIN et al., 2011a). Também, sabe-se que a propagação das diferentes linhagens de CHIKV ao redor do mundo acompanha-se de adaptações genômicas que favoreceram sua adaptação aos vetores *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (TSETSARKIN et al., 2007, 2011b, 2014). Mutações na proteína E1/E2 favorecem maior disseminação do vírus em *Aedes albopictus* e conseqüentemente em regiões onde este mosquito está presente de forma endêmica (TSETSARKIN et al., 2007). No Brasil, 2 cepas do vírus foram introduzidas em dois eventos independentes: a cepa Asiática em 2013, no Amapá, proveniente da Guiné Francesa, e a cepa ECSA em 2014 na Bahia, proveniente de Angola (FIGUEIREDO, 2017; NUNES et al., 2015). No entanto, o vírus já se espalhou pelas regiões norte, nordeste, centro-oeste e sudeste (FIGUEIREDO, 2015). Até a semana epidemiológica 43 de 2022 (final de Outubro), o país registrou 169.574 casos prováveis de CHIKV, um aumento de 81,9% em relação a 2021 e de 32,2% em relação a 2019, com a região nordeste do país agregando os maiores registros da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022). Ainda, estudos preditivos sugerem que entre 2022 e 2023 epidemias de CHIKV se intensifiquem no nordeste e sudeste do Brasil, triplicando os casos notificados (YAKOB, 2022). Quanto aos PNH, CHIKV foi isolado de diversas espécies do Velho Mundo (*Cercopithecus aethiops tantalus*, *Erythrocebus patas*, *Papio papio*, *Chlorocebus sabaues* e *Macaca fascicularis*) (ALTHOUSE et al., 2018; LABADIE et al., 2010; MOREIRA-SOTO et al., 2018; SUHANA et al., 2019). Na Malásia, a ocorrência de um ciclo silvático do CHIKV sugere um evento de *spillback*, o vírus teria sido transmitido do homem para PNH (EVANS et al., 2022; SUHANA et al., 2019). No entanto, evidências da circulação de CHIKV em PNH, na África e nas Américas, ainda são escassas (HAKIM et al., 2022; VALENTINE et al., 2020). No Brasil, evidências sorológicas sugerem que PNH da família *Atelidae* (*Ateles marginatus*), *Callitrichidae* (*Callithrix jacchus*) e *Cebidae* (*Sapajus flavius*, *Sapajus* sp., *Sapajus robustus* e *Sapajus xanthosternos*), foram infectados por CHIKV, porém os dados não são suficientes para

provar um ciclo silvestre estabelecido (MOREIRA-SOTO et al., 2018). Ainda assim, infecções experimentais em mosquitos brasileiros, *Haemagogos cocelaenus* e *Aedes terrens*, evidenciaram capacidade de transmissão do CHIKV (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA; FAILLOUX, 2017). Ampliam-se assim as chances de silvaticização do CHIKV.

As informações acima mostram claramente a necessidade de uma vigilância ativa de infecções por *Flavivirus* e *Alphavirus* em PNH neotropicais no Brasil. Esta vigilância elucidaria aspectos de uma eventual interação ecológica estabelecendo ciclos silváticos destes vírus na Região Nordeste e Noroeste do estado de São Paulo, Brasil.

2 OBJETIVOS

São objetivos dessa Tese:

- i. Detectar arbovírus em amostras de sangue, saliva, fezes e urina de PNHs na Região Nordeste e Noroeste do Estado de São Paulo por *semi-nested multiplex* RT-PCR e RT-qPCR;
- ii. Verificar infecção ativa por arbovírus em amostras biológicas dos primatas não humanos por isolamento viral;
- iii. Caracterizar por sequenciamento nucleotídico genes dos vírus detectados e verificar a relação filogenética destes com cepas previamente conhecidas;
- iv. Identificar possíveis características ecológicas ligadas a detecção de arbovirose em PNH;
- v. Determinar possíveis zonas de risco para infecção pelos arbovírus estudados na Região Nordeste e na Noroeste do Estado de São Paulo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Locais de Estudo

Nas Regiões Nordeste e Noroeste do Estado de São Paulo, foram estudados materiais clínicos de 301 PNH, durante os anos de 2017 e 2020. Para tanto, além das capturas em meio silvestre efetuadas nas regiões de mata das cidades de Barrinha (n = 9) e Cravinhos (n = 6), foram feitas coletas de PNH nos jardins zoológicos de Catanduva (n = 16), São Carlos (n = 7), São José do Rio Preto (n = 7), Bosque Zoológico Municipal Dr. Fábio de Sá Barreto (n = 26) em Ribeirão Preto (BZMRP) e Sertãozinho (n = 1). Ainda, em Ribeirão Preto, numa parceria com o Departamento de Vigilância em Saúde foram obtidas amostras provenientes da necropsia de PNH encontrados mortos na região (n = 229). Laudos de necrópsia foram fornecidos descrevendo as condições físicas dos animais no momento da coleta. Os locais onde foram coletados materiais clínicos dos PNH são mostrados na Figura 5.

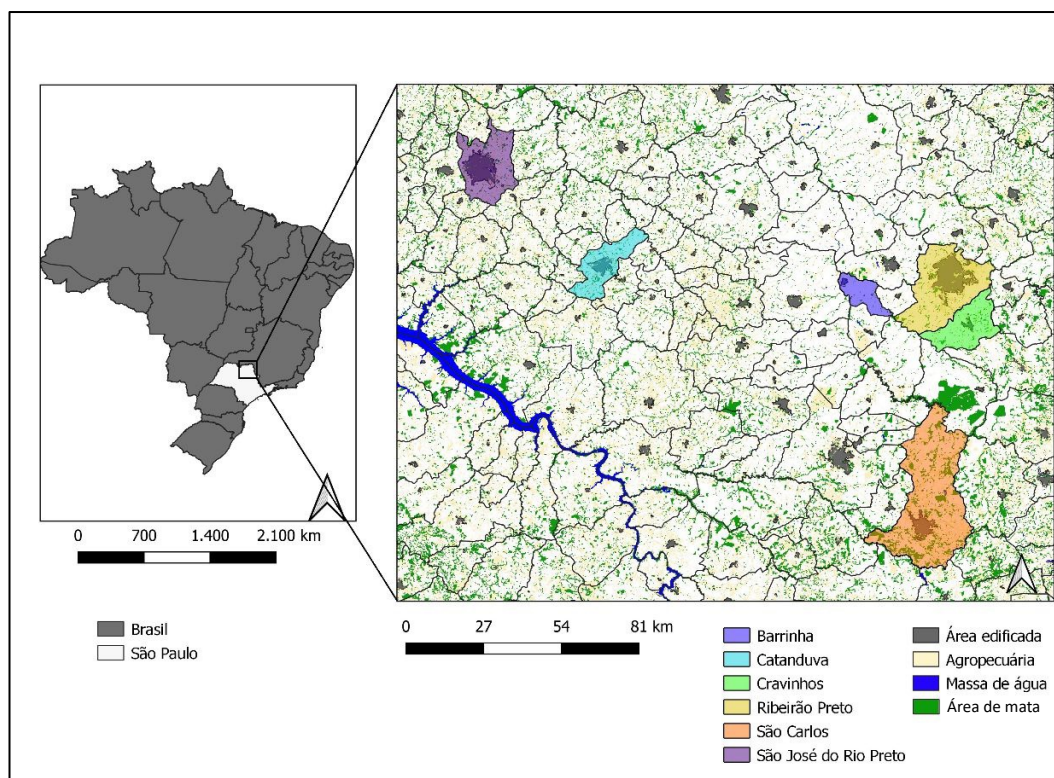


Figura 5 - Locais onde foram coletados materiais clínicos de PNH, na região nordeste e norte do estado de São Paulo.

3.2 Captura de Primatas

Para captura de primatas foram utilizadas armadilhas do tipo Tomahawk (para pequenos e médios primatas) que eram dispostas em árvores (com conexão entre si) dispostas em um transecto de 1km distando 20 metros umas das outras (para tanto havendo a necessidade de abertura de trilhas ou picadas dentro da mata). As armadilhas eram cevadas por 4 a 6 dias sendo armadas por 3 noites consecutivas. Dessa forma, os animais capturados foram anestesiados com uma combinação de ketamina e midazolam em doses específicas para cada espécie e isoflurano (MILLS et al., 1995). As amostras de sangue foram coletadas da veia caudal ou femoral dos PNH, utilizando instrumentos limpos e esterilizados para cada animal. As amostras de *swab* oral e retal foram armazenadas em criotubos em meio de preservação (75% Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 15% Glicerol e 10% soro fetal bovino) em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados a -70°C no Laboratório de Virologia, no Centro de Pesquisa em Virologia (CPV). Após a coleta das amostras, os PNH foram monitorados até a completa recuperação pós-anestésica e, em seguida, devolvidos aos locais de captura. Estas campanhas de capturas de PNH ocorreram entre abril de 2017 e outubro de 2018, cobrindo a estação seca e a chuvosa na região.

Os animais tiveram sexo determinado pela morfologia da genitália (masculino: presença de pênis; feminino: presença de vagina) e as suas idades foram inferidas com base na massa corporal e em caracteres sexuais secundários (presença de testículos no escroto, para machos; e membrana da vagina perfurada, para fêmeas), o que permitiu diferenciá-los em 3 classes (juvenis, subadultos e adultos) (ALTHOUSE et al., 2018; CULOT et al., 2019; DOS REIS et al., 2015) (ANEXO A).

Todos os animais foram manipulados seguindo regras de biossegurança e cuidado animal estabelecidos por Mills e colaboradores (1995), Brower e colaboradores (BROWER;

ZAR, 1998) e de acordo com as leis de proteção da vida selvagem e dos regulamentos preconizados pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (Ministério do Meio Ambiente), sob a licença n. 19838-6 (SISBIO)s.

3.3 Análise de amostras

Foram analisadas 1169 amostras clínicas de 301 PNH e a depender da origem desses primatas foram colhidas amostras de sangue, swab retal e oral, urina, além de órgãos incluindo fígado, glândula salivar e cérebro. No total, foram coletadas 225 amostras de sangue, 206 de fígado, 209 de glândulas salivares, 95 *swabs* orais, 137 amostras de cérebros, 289 *swabs* retais e 8 amostras de urina, mostrados na Tabela 1. Para detecção de *Flavivirus*, as amostras de sangue foram analisadas por *semi-nested multiplex* RT-PCR e em sua falta, foram utilizadas amostras de tecidos de fígado, além de swab oral e retal. Para a detecção de *Alphavirus*, somente amostras de sangue foram utilizadas em análises por RT-qPCR e teste sorológico ELISA. Havendo PNH com amostras positivas para *Flavivirus* e *Alphavirus*, seus órgãos eram analisados.

Tabela 1 – Exames para pesquisa de *Flavivirus* (RT-PCR) e *Alphavirus* (RT-PCR e teste sorológico) realizados nas amostras de PNH.

Número de PNH	Tipo de amostras coletadas								Total de amostras
	Sangue	Fígado	Glândula salivar	Swab oral	Cérebro	Swab retal	Urina		
301	225	206	209	95	137	289	8	1169	
<i>Semi-nested multiplex RT-PCR Flavivirus</i>	248	225	28	28	47	9	164	5	506
RT-qPCR <i>Alphavirus</i>	203	203	-	-	-	-	-	-	203
Sorologia <i>Alphavirus</i>	209	209	-	-	-	-	-	-	209
Análise eco-epidemiológica	194	-	-	-	-	-	-	-	194

PNH = primatas não humanos

3.4 RT-PCR para Flavivirus

Dos 301 PNH estudados, 248 tiveram amostras clínicas testadas para identificar *Flavivirus* (DENV 1-4, YFV, ZIKV, WNV, SLEV e ROCV) por *semi-nested multiplex RT-PCR*, segundo Bronzoni e colaboradores (BRONZONI et al., 2005). Portanto, dos 248 PNH foram testadas 506 amostras, sendo delas 225 de sangue, 28 de fígado, 47 de swab oral, 9 de cérebro, 164 de swab retal, 28 de glândula salivar e 5 amostras de urina, como mostra a Tabela 1.

3.5 RT-qPCR em tempo real para os Alphavirus Mayaro e Chikungunya

Um total de 203 amostras de sangue foram testadas por RT-qPCR para identificar MAYV e CHIKV (Tabela 1) segundo Esposito e Waggoner (ESPOSITO; DA FONSECA, 2017;

WAGGONER et al., 2018). Nesta RT-qPCR, utilizou-se o kit *QuantiNovatm Probe* PCR (Qiagen, USA). Os *primers* utilizados estão listados nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Primers para RT-qPCR de CHIKV, na região codificadora da proteína do capsídeo.

PRIMERS		POSIÇÃO
FORWARD	GACAATGCGCGCGGTACC	7711 - 7728
REVERSE	TGTTGTTTTGTGGCGCCT	7782 - 7799
SONDA	GCCACG CAGGAATCGGAAGAATAAGAAGC	7738 - 7766

Tabela 3 - Primers para RT-qPCR de MAYV, na região codificadora da proteína NS1.

PRIMERS		POSIÇÃO
FORWARD	AAGCTCTTCTCTGCATTGC	51-70
REVERSE 1	TGCTGGAAACGCTCTCTGTA	141-160
REVERSE 2	TGCTGGAAATGCTCTTTGTA	
SONDA	GCCGAGAGCCCCTTTTAAAATCAC	116-140

As reações foram padronizadas para o kit *QuantiNova Probe* (Qiagen®, Ref. 208354). Curvas de calibração foram testadas para verificar a eficiência da padronização. Estas curvas foram geradas por diluições seriadas de RNA transcrito de MAYV (cepa Be Ar 20290) e CHIKV (cepa S27-African) (10^{-7} a 10^{-1}). Os parâmetros de otimização para MAYV incluíram percentuais de eficiência de 86,6, coeficiente de correlação (R²) de >99 e *slope* de - 3,69; para CHIKV o percentual de eficiência foi de 93,9, coeficiente de correlação (R²) de >99 e *slope* de - 3,45. Os resultados obtidos para os testes de ambos os vírus foram considerados satisfatórios. Amostras foram consideradas positivas quando apresentavam amplificação acima do *threshold* ΔR_n de 0.024672 para MAYV e Ct (*threshold* de ciclo) menor que 39; e para CHIKV, *threshold* ΔR_n de 0.007597 e Ct menor que 36.

3.6 Triagem sorológica para Mayaro e Chikungunya

Utilizando um ELISA indireto descrito por Fumagalli (FUMAGALLI et al., 2018, 2019), foram testadas 209 amostras séricas de PNH pesquisando por anticorpos contra MAYV e CHIKV, como mostra a Tabela 1. Resumidamente, amostras séricas foram diluídas 1/100 e aplicadas a placas de 96 poços previamente sensibilizadas com proteína recombinante de envelope (E2) para MAYV (rE2-MAYV ELISA) ou CHIKV (rE2-MAYV ELISA), em duplicatas. Anticorpos anti-IgG de primata conjugados à peroxidase (Sigma, Brasil) foram adicionados às microplacas. Após lavagens seriadas usando solução tampão salina acrescida de Tween[®] (Sigma-Aldrich, Ref. P2287), os poços foram revelados com substrato ABTS (KPL, USA). Ao final de incubação de 15 minutos a 37°C, as placas foram lidas em espectrofotômetro Titertek Multiscan MMC/340 Microplate Reader a uma densidade ótica (DO) de 405nm. As amostras foram testadas em duplicata. Utilizou-se como controles positivos soros hiperimunes policlonais de camundongos anti-MAYV e anti-CHIKV e seus respectivos conjugados anti-murinos com peroxidase. O *cut-off* do teste foi calculado pela média da DO dos controles negativos (amostras de primatas previamente testados por ELISA e negativas para MAYV e CHIKV) acrescida de três desvios padrões.

3.7 Isolamento Viral

Tentativas de isolamento viral foram realizadas em amostras clínicas que tiveram fragmento genômico de *Flavivirus* (*semi-nested multiplex* RT-PCR) ou *Alphavirus* amplificado (RT-qPCR). Utilizaram-se células de *Aedes albopictus* (C6/36 – CRL-1660), utilizando metodologia descrita por Bonaldo e colaboradores (BONALDO et al., 2016). Para tanto, as amostras foram previamente filtradas em poros de 0,22 µm de diâmetro para a eliminação de bactérias e tiveram 200 µL inoculados em monocamadas de células de C6/36, em três passagens cegas, para incremento do título viral. Posteriormente foram

realizadas reações de imunofluorescência indireta do sobrenadante da 3^o passagem cega, em placas de 24 poços com lamínulas circulares de 13mm, contendo células C6/36 ou de rim de macaco verde africano (VERO-CCL-81).

3.8 Teste de imunofluorescência (IFA)

A confirmação inicial do isolamento viral foi realizada por teste imunofluorescência indireta, onde células VERO infectadas foram cultivadas e fixadas em lamínulas de vidro de 13mm de diâmetro em placas de 24 poços. Posteriormente, foram confrontadas com anticorpos policlonais de fluido ascítico murino (estoque em laboratório). Em microscópio de fluorescência foi determinada a presença de vírus pela fluorescência de partículas virais no citoplasma celular.

3.9 Sequenciamento por método de Sanger

Os *amplicons* de amostras positivas por *semi-nested multiplex* RT-PCR para *Flavivirus* e RT-qPCR para *Alphavirus* foram sequenciados por método de Sanger (Genetic Analyzer 3500, Applied Biosystems), utilizando os *primers* descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Oligonucleotídeos usados para sequenciamento por método de Sanger.

ID	Sequência (5'–3')	Posição	<i>Amplicon</i>	Segmento	Família
FG1(+)	TCAAGGAACTCCACACATGAGATGTACT	8270 - 8297	958 nt	NS5	<i>Flaviviridae</i>
FG2 (-)	GTGTCCCATCCTGCTGTGTCATCAGCATAACA	9228–9258			
M2W (+)	YAGAGCDTTTTCGCAYSTRGCHW	568–597	434 nt	NS1	<i>Togaviridae</i>
CM3W (-)	ACATRAANKGNGTNGTRTCRAANCCDAYCC	164–186			

ID: Identificação; Nt: nucleotídeos

Para o sequenciamento de Sanger, utilizamos o kit ExoSap-IT (Affimetrix, Inc., EUA) para amostras de cDNA que apresentavam apenas uma banda específica coletada no gel de agarose, assim, removendo o excesso de *primers* e dNTPs. Para amostras com bandas

inespecíficas em gel foi usado o Gel Extraction kit (Qiagen, Alemanha). Após a quantificação de cDNA por espectrofotômetro (NanoDrop Lite, ThermoFisher) foram feitas as marcações fluorescentes dos amplicons gerados utilizando o kit BigDye terminator v3.1 (Biosystems) para o sequenciamento no Genetic Analyzer 3500, Applied Biosystems.

3.10 Análise filogenética

Os *amplicons* sequenciados foram comparados a sequências nucleotídicas disponíveis no GenBank do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) até 30 de Junho de 2022. Para *Flavivirus* foram selecionadas sequências de genoma completo e/ou da proteína NS5. Para a análise da sequência oriunda da amostra positiva para DENV3, utilizou-se uma sequência referência do vírus DENV1 (GenBank: NC_001477.1), DENV2 (GenBank: NC_001474.2) e DENV4 (GenBank: NC_002640.1) como *outgroups*. A seleção das sequências usadas para o alinhamento levou em consideração, inicialmente, a localidade e hospedeiro, quando esses dados estavam disponíveis e, posteriormente, foram selecionadas sequências com similaridades nucleotídicas no *software online Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTn).

Para os alinhamentos, foi utilizada a ferramenta MAFFT v7.490 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>) (KATO et al., 2002). Primeiro foram alinhados os genomas de referência de DENV entre si, utilizando os parâmetros de maior acurácia (--maxiterate 1000 --globalpair). Em seguida, foram adicionados genomas selecionados manualmente de DENV3 ao alinhamento utilizando a opção --add do MAFFT. Por fim, foram adicionados os nossos fragmentos gerados pelo método de Sanger utilizando a opção --add fragments do MAFFT. Neste alinhamento foram selecionadas regiões em que nosso fragmento se enquadrava, para a análise filogenética. A árvore filogenética estimada por máxima verossimilhança foi gerada com o *software*

IQ-TREE (versão 2.2.0). Para isso, o modelo de substituição utilizado foi escolhido automaticamente com módulo ModelFinder (KALYAANAMOORTHY et al., 2017) e o *bootstrap* dos ramos feito com o módulo UFBoot (1000 repetições) (HOANG et al., 2018), ambos presentes no IQ-TREE.

3.11 Análises Estatísticas

Dados eco-epidemiológicos, como sazonalidade, vegetação e alometria coletados durante os períodos de coleta dos PNH foram analisados para identificar fatores que poderiam interagir e influenciar na infecção dos PNH. Inicialmente, os dados consideraram frequências absolutas e percentuais (variáveis qualitativas) e por meio de medidas como média, desvio-padrão, mínimo, mediana e máximo (variáveis quantitativas). Para verificar a relação entre infecção por arbovírus e a ecologia intrínseca dos PNH, os dados alométricos, com base na massa, tamanho total, cauda, antebraço, pata com unha e orelha foram utilizados para a análise de *cluster*. Esta metodologia tem como objetivo dividir os elementos das amostras em grupos heterogêneos entre si e homogêneos no mesmo grupo, para as características de interesse. A medida de dissimilaridade aplicada foi a distância Euclidiana e após definir o número de *clusters* (utilizando a soma dos quadrados *intra-cluster*), ajustou-se pelo método não-hierárquico "*k-means*" que permite o agrupamento dos participantes com características mais próximas, uma vez que, neste método, é permitido que o participante mude de *cluster* de acordo com a homogeneidade dos grupos. Para analisar a relação entre variáveis com a infecção viral e, conseqüentemente, estimar as prevalências (RP) foi utilizado o modelo de regressão Poisson simples e múltiplo, com função de ligação logarítmica (SKOV et al., 1998). Todas as figuras apresentadas foram realizadas utilizando o programa R, versão 4.0.4 e as análises, através do programa SAS 9.4. Para todas as análises adotou-se um nível de significância de 5%.

O programa QGIS 3.26.0 foi utilizado na elaboração dos mapas de distribuição dos casos, bem como para os mapas de calor (densidade de Kernel). O Mapa de Kernel é uma alternativa para análise geográfica do comportamento de padrões. No mapa é plotado, através do método de interpolação, a intensidade pontual de determinado fenômeno em toda a região de estudo. Assim, temos uma visão geral da intensidade do processo em todas as regiões do mapa (SOUZA et al., 2013).

Os seguintes passos foram utilizados na elaboração do mapa de calor (*heat map*): determinação do raio de influência, escolha da função de kernel e classificação.

4 RESULTADOS

4.1 Diversidade e distribuição de espécies

Entre abril de 2017 e abril de 2020, coletaram-se 301 PNH na região nordeste e noroeste do estado de São Paulo (Tabela 1). Dentre os locais de coleta estão as cidades de Ribeirão Preto (n = 255), Catanduva (n = 16), Cravinhos (n = 6), Barrinha (n = 9), São Carlos (n = 7), São José do Rio Preto (n = 7) e Sertãozinho (n = 1). A Tabela 5 mostra os dados estratificados por estação, idade e sexo entre os indivíduos. A Tabela 6 mostra as amostras de PNH que foram testadas dentre os 301 PNH coletados. Nota-se a predominância de primatas da espécie *Callithrix penicillata* (n = 209, 84,3%) e *Alouatta caraya* (n = 12, 4,8%) entre os 248 PNH testados para *Flavivirus* e 209 PNH testados para *Alphavirus*. Entretanto, é necessário cautela na análise desses números, pois as coletas no presente estudo favoreceram os PNH de pequeno porte, por isso a baixa riqueza de espécies no estudo. A maior abundância de indivíduos analisados foi observada na estação seca (= 169 PNH na estação seca, n = 79 PNH na estação chuvosa) como mostra a Tabela 5. Com relação a sexo, verificou-se aproximadamente o mesmo número (n = 120 machos e n = 128 fêmeas) e os animais foram predominantemente adultos (n = 211 PNH) como mostram as Tabelas 5 e 6. Quando estratificados os PNH por estação de coleta verificou-

se maior número de fêmeas na estação seca em relação aos machos ($p = 0.04$, IC = 0.69 – 0.98), como mostra a Tabela 5. Quanto à idade dos PNH analisados, observou-se um maior número de adultos durante a estação seca em comparação à chuvosa ($p = <0.0001$, IC = 0.25– 0.055), como mostram as Tabelas 5 e 6. Não houve diferença significativa entre números de PNH infectados quanto ao sexo e idade, nas duas estações, como mostra a Tabela 5.

Tabela 5 - PNH positivos nos testes diagnósticos segundo seus sexos, idades e estação de coleta.

	Estação Seca (Abril a Setembro)		Estação chuvosa (Outubro a Março)		Positivo	Total	P valor **	IC (95%)	P valor ***	
	Positivo	Total	Positivo	Total						
Sexo										
	Machos	10	74	4	46	14	120	0.04	0.69 - 0,98	>0.999
	Fêmeas	12	95	4	33	16	128			
Idade*										
	Jovem	1	5	1	19	2	24			
	Subadulto	2	12	0	1	2	13	<0.0001	0.25 - 0.055	0.526
	Adulto	19	152	7	59	26	211			

*idade de acordo com massa específica para cada espécie e características secundárias externas, ** P valor comparação entre número de animais total por grupo (sexo e idade) entre as estações, *** P valor comparação do número de animais positivos por grupo (sexo e idade) por estação.

Tabela 6 - Número de espécies de PNH testados incluindo sexo, idade e testes diagnósticos realizados em suas amostras clínicas.

Gênero	Espécies	N (%)	Machos	Fêmeas	Jovens	Sub adultos	Adultos	M-N-RT-PCR <i>Flavivirus</i> /T estados (%)	RT-qPCR <i>Alphavirus</i> / Testados (%)
<i>Callithrix</i>	<i>penicillata</i>	209 (84.3)	106	103	20	9	180	18/209 (8.6)	0
	<i>jacchus</i>	1 (0.4)	0	1	0	0	1	0	0
	<i>geoffroyi</i>	1 (0.4)	1	0	0	0	1	0	0
<i>Alouatta</i>	<i>caraya</i>	12 (4.8)	4	8	2	2	8	4/12 (33.3)	0
	<i>guariba</i>	1 (0.4)	1	0	0	0	1	0	0
<i>Saguinus</i>	<i>midas</i>	4 (1.6)	1	3	0	0	4	2/4 (50)	0
<i>Saimiri</i>	<i>sciureus</i>	1 (0.4)	1	0	0	0	1	0	0
<i>Sapajus</i>	<i>apella</i>	10 (4.0)	3	7	0	0	10	6/19 (31.6)	0
	<i>libidinosus</i>	7 (2.8)	1	6	2	2	3	0	0
	sp.	2 (0.8)	2	0	0	0	2	0	0
Total		248	120	128	24	13	211	30/248 (12.1)	0/248

4.2 Pesquisa de arbovírus

4.2.1 Pesquisa de *Flavivirus* por semi-nested multiplex RT-PCR

Foram coletados materiais clínicos de 301 PNH e desses 248 foram testados por *semi-nested multiplex* RT-PCR para *Flavivirus*. Usando esta técnica, 33 amostras clínicas de sangue, swab retal ou swab oral, oriundas de 30 PNH, tiveram genoma de *Flavivirus* amplificado. Dentre os 33 *amplicons* obtidos, 11 tiveram seus nucleotídeos sequenciados

pelo método de Sanger, devido a qualidade dos *amplicons* gerados, utilizando os *primers* mostrados na Tabela 4. A identidade molecular dos produtos sequenciados, quando avaliados pela ferramenta Blast, foi de 25% a 98%. Espécies com amostras positivas, de *Sapajus apella* (DENV1, DENV2 e SLEV), *Callithrix penicillata* (DENV1, DENV3, SLEV, YFV e ZIKV), *Saguinus midas* (SLEV) e *Alouatta caraya* (SLEV e ZIKV), são mostradas na Tabela 7. Além disso dois *Alouatta caraya* apresentaram coinfeção para SLEV e ZIKV e um *Callithrix penicillata* apresentava coinfeção para ZIKV e DENV3. Os animais infectados tiveram seus laudos de necrópsia analisados visando a identificar sinais indicativos de alguma patologia ou infecção (ANEXO B).

Tabela 5 - Flavivirus identificados pelo amplicon segundo a espécie do PNH, incluindo dados sobre isolamento viral.

Vírus	N	Espécie	Amostra positiva	Amostra isolada
DENV 1	1	<i>Callithrix penicillata</i>	sangue	-
	1	<i>Sapajus apella</i>	sangue	sangue
DENV 2	1	<i>Sapajus apella</i>	sangue	-
DENV 3	2	<i>Callithrix penicillata</i>	sangue	-
YFV	1	<i>Callithrix penicillata</i>	sangue	-
SLEV	3	<i>Alouatta caraya</i>	sangue, gl. salivar, saliva, fezes	sangue, saliva
	7	<i>Callithrix penicillata</i>	sangue, saliva, fezes	sangue, saliva
	2	<i>Saguinus midas</i>	sangue, saliva	saliva
	4	<i>Sapajus apella</i>	sangue, saliva, fezes, urina	saliva, fezes
ZIKV	3	<i>Alouatta caraya</i>	saliva, gl. salivar, fezes	saliva
	8	<i>Callithrix penicillata</i>	sangue	sangue

N = número de indivíduos, DENV = vírus da dengue, SLEV = vírus da encefalite de Saint Louis, ZIKV = vírus Zika, YFV = vírus da febre amarela, Gl = glândula salivar

4.2.2 Isolamento viral

Foram isolados *Flavivirus* em 12 amostras previamente triadas (de 33 positivas) utilizando células VERO ou C6/36, com 3 passagens consecutivas. Os resultados dos isolamentos são mostrados na Tabela 7. A Figura 6 mostra a confirmação de isolamento de 3 amostras de SLEV provenientes de saliva de *Saguinus midas*, *Sapajus apella* e *Alouatta caraya*, confirmados por IFA.

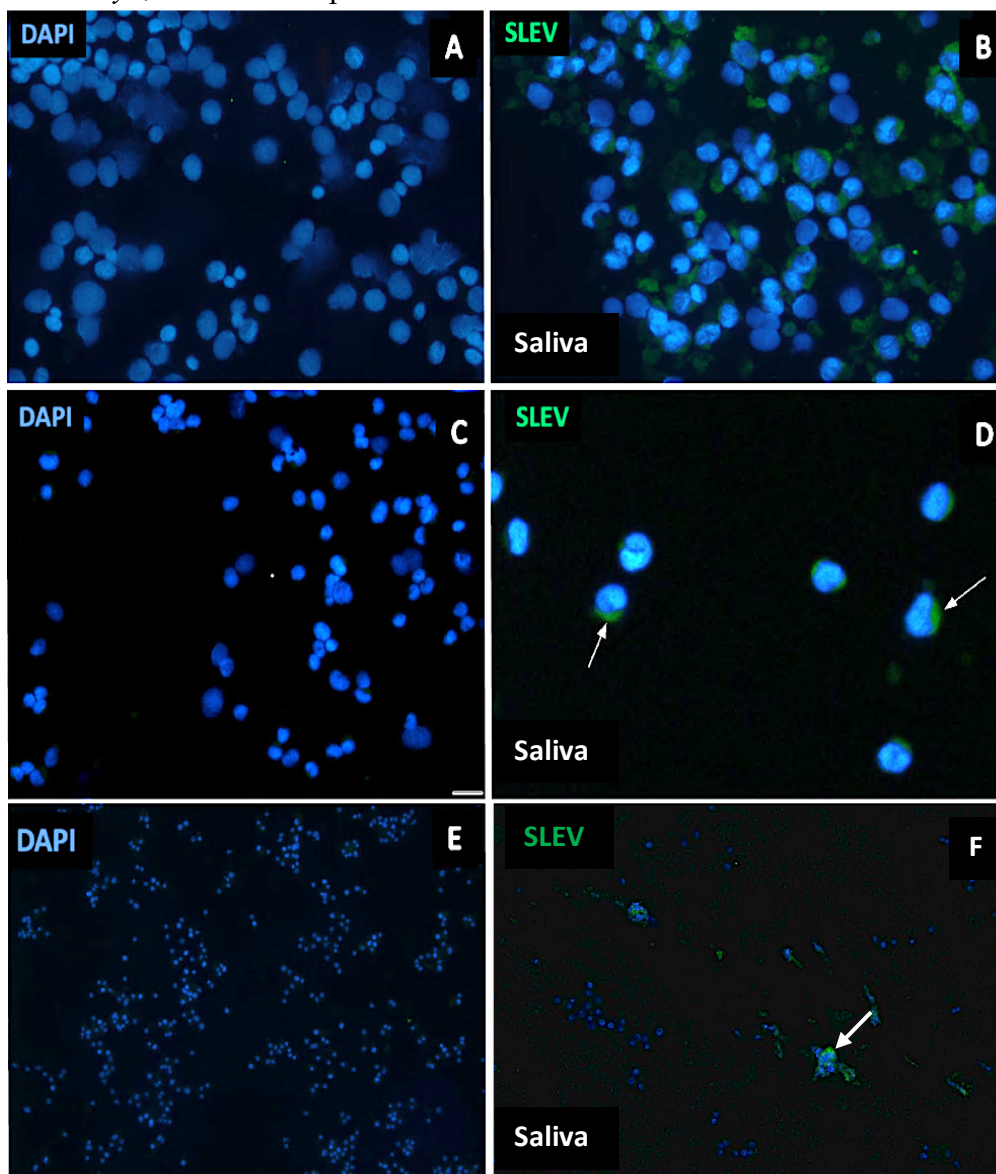


Figura 6 - Ensaio de imunofluorescência indireta em células VERO (A, B, C D) e C6/36 (E e F) infectadas com amostras de PNH e mostrando a marcação de proteínas virais (cor verde) por anticorpos policlonais para SLEV. Em B e D são células VERO e em F células C636, infectadas com saliva de *Saguinus midas* (B), *Alouatta caraya* (D) e de *Sapajus apella* (F). O núcleo celular é corado em azul. A, C e E são controles negativos. As células foram coletadas para IFA 5 ou 6 dias pós infecção.

4.2.3 Sequenciamentos nucleotídicos dos 33 amplicons de *Flavivirus*

Dos amplicons de *Flavivirus* obtidos pela *semi-nested multiplex* RT-PCR, 11 foram sequenciados pelo método de Sanger (Genetic Analyzer 3500, Applied Biosystems) como mostra a Tabela 8, utilizando os *primers* mostrados na Tabela 4.

Tabela 6 – *Flavivirus* encontrados infectando PNH segundo a espécie confirmada por sequenciamento nucleotídico de amplicons.

Vírus	N	Espécie	Amostra positiva	Número de bases utilizadas no sequenciamento
DENV 3	1	<i>Callithrix penicillata</i>	Sangue	387
SLEV	1	<i>Alouatta caraya</i>	Sangue, saliva	102
	4	<i>Callithrix penicillata</i>	Sangue, saliva e fezes	26, 55, 151, 173
	1	<i>Saguinus midas</i>	Saliva	133
	4	<i>Sapajus apela</i>	Sangue, saliva, urina	93, 98, 101, 113

N = número de indivíduos, DENV = vírus da dengue, SLEV = vírus da encefalite de Saint Louis.

4.2.4 Triagem molecular de *Mayaro* e *Chikungunya* por RT-qPCR em tempo real

Foram testadas 203 amostras de sangue dos PNH para MAYV e CHIKV por RT-qPCR utilizando os *primers* citados na Tabela 3. Não foi possível amplificar fragmentos de *Alphavirus* em nenhuma amostra testada (não apresentaram amplificação acima do Ct).

4.2.5 Triagem sorológica de *Mayaro* e *Chikungunya* por ELISA indireto utilizando antígenos E2 recombinantes

Utilizando o ELISA indireto com antígenos E2 recombinantes, das 209 amostras de sangue testadas, nenhuma mostrou-se positiva para MAYV ou CHIKV.

4.2.6 *Análise eco-epidemiológica*

Para as análises eco-epidemiológicas dos PNH, foram feitas as análises de 194 PNH com dados epidemiológicos completos (alometria, sazonalidade, sexo, idade, ferimentos, local de coleta, tipo de coleta, vegetação) dentre os 248 PNH com amostras testadas para *Flavivirus* e *Alphavirus*, como mostra a Tabela 1, e estão incluídas no ANEXO C. Para tanto, uma análise de *cluster* foi utilizada para melhor identificar características alométricas dos animais infectados com *Flavivirus* que poderiam estar relacionados à esta infecção. Ao final das análises, selecionou-se o modelo de *clusters* de $k=2$ como o mais apropriado pois nesse modelo não havia sobreposição de *clusters* e não aumentava o ganho na diferenciação dos demais grupos, como mostra a Figura 7. Os critérios para seleção das análises de *cluster* estão disponíveis no ANEXO D.

Ainda, importa verificar visualmente, no gráfico da Figura 7, a similaridade dos *clusters* de animais, segundo os dados padronizados e a técnica de componentes principais. Desta forma, observa-se a nitidamente a proximidade entre os animais nos seus *clusters*, dependendo de seus números. Percebe-se claramente em 3 *clusters* ou mais uma pequena sobreposição entre grupos. Observam-se 2 *clusters* separados entre si.

Considerando $k=2$ o número de *clusters* ideal e estimado o local de cada PNH em cada banco de dados, como indicado na Figura 7A, é possível verificar as características de aglomeração - Média (Desvio Padrão) e entender o que representa cada grupo, como mostra a Tabela 9.

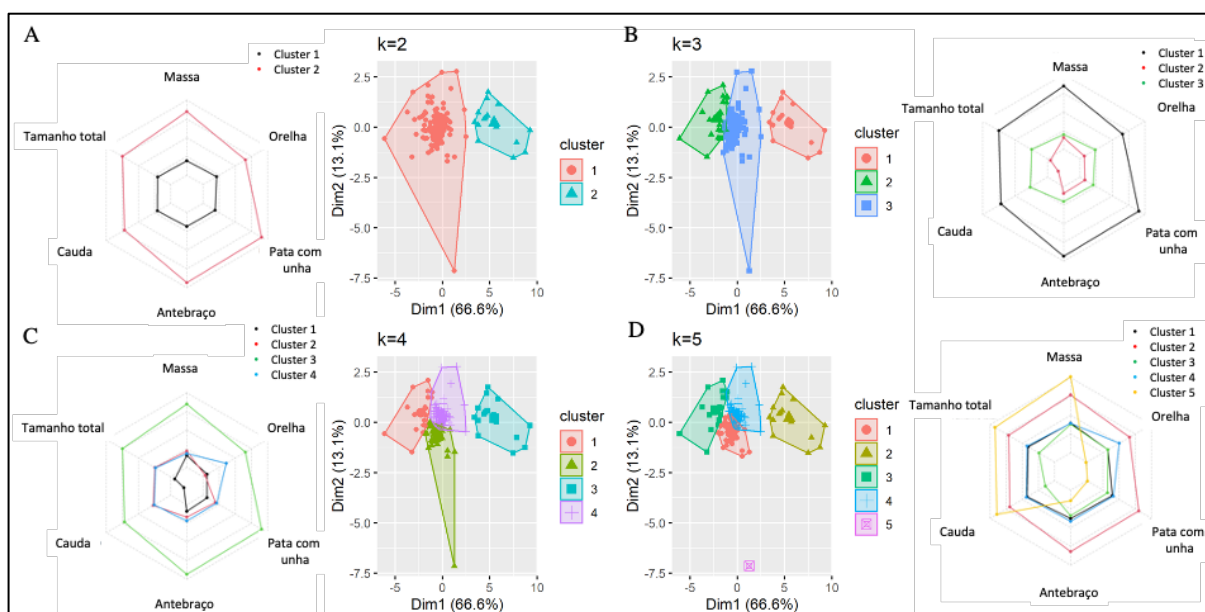


Figura 7 - Seleção do modelo adequado de *clusters* utilizando a técnica de componentes principais do pacote NbClust do programa R, que fornece 30 índices determinantes do número de clusters em um conjunto de dados. A maioria das regras apontou $k=2$ (A), como sendo o melhor número de cluster para classificação. $K=3$ (B), $K=4$ (C), $K=5$ (D).

Tabela 7 - Análise de clusters das variáveis alométricas dos PNH.

Variáveis	Cluster	
	1 n=177 Média (DP)	2 n=17 Média (DP)
Massa (g)	449,79 (635,61)	3.707,65 (1.961,24)
Tamanho total (mm)	520,12 (107,81)	866,71 (240,45)
Cauda (mm)	291,14 (73,91)	480,59 (89,56)
Antebraço (mm)	47,95 (13,1)	130,47 (25)
Pata com unha (mm)	63,12 (13,1)	131,29 (18,09)
Orelha (mm)	24,72 (7,45)	39,76 (5,12)

G= grama, mm= milímetro, DP: Desvio padrão, n= número

A distribuição das variáveis mostra que o cluster 2 é composto por animais com valores maiores de massa, tamanho total, cauda, antebraço, pata com unha e orelha. Também, observou-se maior porcentagem de PNH infectados com *Flavivirus* no *cluster 2* ($n=7$, [41,2%]) quando comparado aos do *cluster 1* ($n=16$, [9,0%]), porém não estatisticamente significativo, como mostra a Tabela 10. As variáveis, sexo, idade mostraram-se similares

e a presença de ferimentos mostrou-se em maior quantidade em animais não infectados, como mostra a Tabela 10.

Tabela 8 – Análise de *clusters* mostrando variáveis descritivas em PNH infectados e não infectados.

Variáveis	Arbovírus	
	Negativo (%)	Positivo (%)
Cluster		
1 (n=177)	161 (91,0)	16 (9,0)
2 (n=17)	10 (58,8)	7 (41,2)
Sexo		
Fêmea (n=97)	86 (88,7)	11 (11,3)
Macho (n=97)	85 (87,6)	12 (12,4)
Idade		
Adulto (n=168)	148 (88,1)	20 (11,9)
Jovem (n=16)	15 (93,7)	1 (6,3)
Subadulto (n=10)	8 (80)	2 (20)
Ferimentos		
Não (n=106)	93 (87,7)	13 (12,3)
Sim (n=88)	78 (88,6)	10 (11,4)
Espécie		
<i>Sapajus apella</i> (n=10)	4 (40)	6 (60)
<i>Alouatta caraya</i> (n=7)	4 (57,1)	3 (42,9)
<i>Callithrix geoffroyi</i> (n=1)	1 (100)	0 (0)
<i>Sapajus libidinosus</i> (n=4)	4 (100)	0 (0)
<i>Saguinus midas</i> (n=2)	2 (100)	0 (0)
<i>Callithrix penicillata</i> (n=167)	153 (91,6)	14 (8,4)
<i>Saimiri sciureus</i> (n=1)	1 (100)	0 (0)
<i>Sapajus sp.</i> (n=2)	2 (100)	0 (0)

N: número

Observamos o maior número de infectados com *Flavivirus* entre os indivíduos do gênero *Sapajus* (n=6, [60%]), seguidos pelos do gênero *Alouatta* (n= 3, [42%]) e os do gênero *Callithrix* (n=14, [8,4%]), como mostra a Tabela 10.

As prevalências das variáveis de interesse, como presença de ferimentos, sexo, idade, espécies e dados alométricos (inseridos na variável *cluster*) permitiu análises de significância estatística. Sendo assim, os PNH do *cluster* 1 apresentaram maior ocorrência de infecção pelos *Flavivirus* que os do *cluster* 2 (n=194) ($p<0.01$) (ANEXO E). As

análises foram efetuadas levando em consideração todos os PNH com dados completos ($n = 194$). No entanto, quando o modelo foi ajustado para incluir nas análises os dados das espécies de PNH infectadas com *Flavivirus*, o que reduziu o número amostral analisado ($n=184$ PNH), nota-se que a variável *cluster* se torna variável confundidora e perde significância estatística. Ademais, é possível verificar que somente a variável espécie apresenta diferença estatística ($p<0.01$) (ANEXO E). Sendo assim, quando comparadas as diferentes espécies de animais infectados entre si é possível verificar que PNH da espécie *Sapajus apella* tiveram 90,49% maior ocorrência de infecção por *Flavivirus* do que os *Callithrix penicillata*, conforme mostrado na Figura 8. O mesmo acontece para indivíduos da espécie *Alouatta caraya*, com 93,78% maior prevalência de PNH infectados por *Flavivirus* do que indivíduos da espécie *Callithrix penicillata*, como mostra a Figura 8 (ANEXO E). Sexo, idade, características alométricas e ferimentos (*clusters* 1 e 2) se mostraram variáveis confundidoras, sem relevância estatística na prevalência de infecção por *Flavivirus* PNH analisados como mostra a Figura 8.

A cidade de Ribeirão Preto teve o maior número de PNH coletados ($n = 255$ PNH) (ANEXO F) e também maior número de PNH infectados por *Flavivirus* entre todos os sítios coletados, 14 (ANEXO F). Fazendo análises de regressão para os dados coletados na cidade de Ribeirão Preto e seguindo os critérios anteriores (ANEXO C e D), foram analisados 149 PNH sobre os quais se tinha informações completas. A análise de *cluster* mostrou resultados similares aos dados globais, agregando os PNH em dois *clusters*, como mostram a Tabela 11 e a Figura 9. O *cluster* 2 é composto por animais com valores maiores de massa, tamanho total, cauda, antebraço, pata com unha e orelha, comparados ao *cluster* 1.

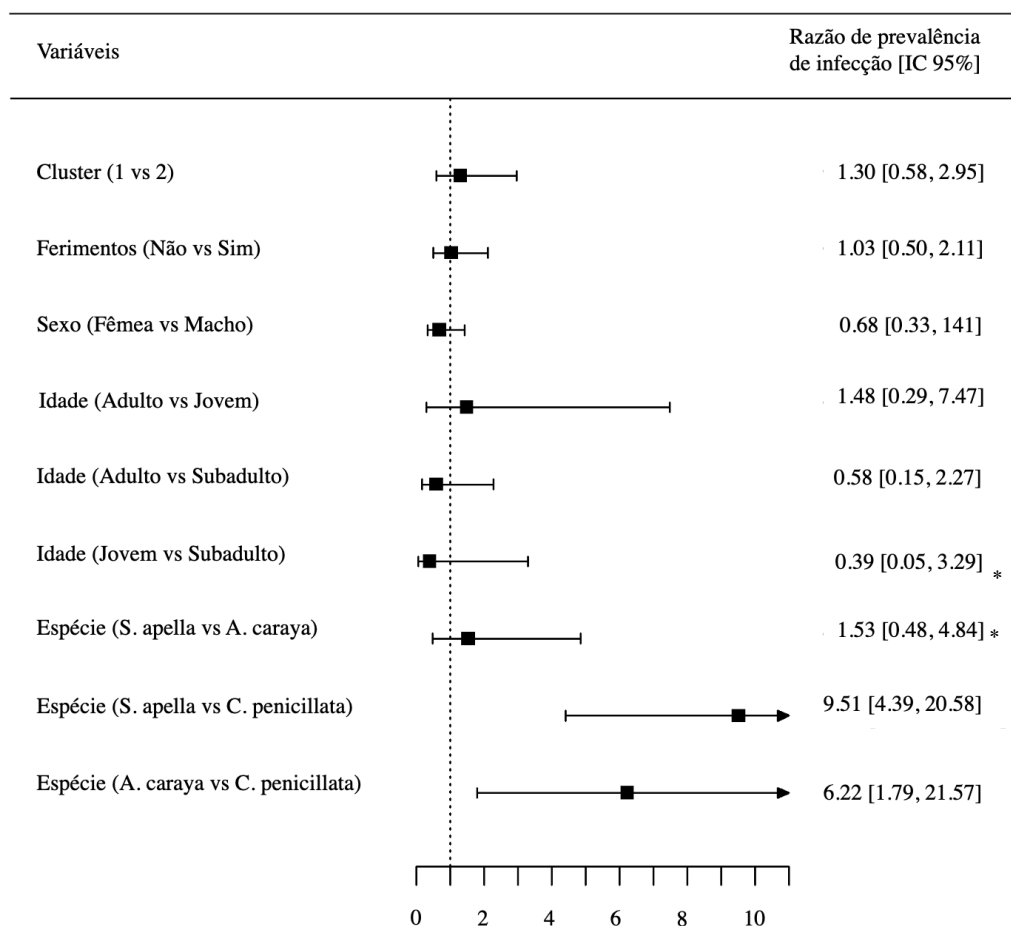


Figura 8 – Prevalência da infecção por *Flavivirus* nos PNH analisados nas regiões Nordeste e Noroeste do Estado de São Paulo segundo características alométricas, clínicas (ferimento), sexo, idade e espécies. IC = intervalo de confiança, VS = versus, *S. apella* = *Sapajus apella*, *A. caraya* = *Alouatta caraya*, *C. penicillata* = *Callithrix penicillata*. Comparando *Sapajus apella* com *Alouatta caraya*, *Sapajus apella* com *Callithrix penicillata* e *Alouatta caraya* com *Callithrix penicillata*. * = $p < 0.05$.

Tabela 9 - Variáveis alométricas para PNH na cidade de Ribeirão Preto segundo clusters.

Variável	Cluster	
	1 (n=27)	2 (n=122)
Massa	247,96 (129,28)	423,15 (485,06)
Tamanho total	387,78 (119,5)	538,75 (38,29)
Cauda	176,63 (89,23)	311,08 (25,27)
Antebraço	38,78 (11,46)	49,27 (9,73)
Pata com unha	51,81 (16,38)	64,57 (5,03)
Orelha	20,74 (5,63)	24,37 (5,56)

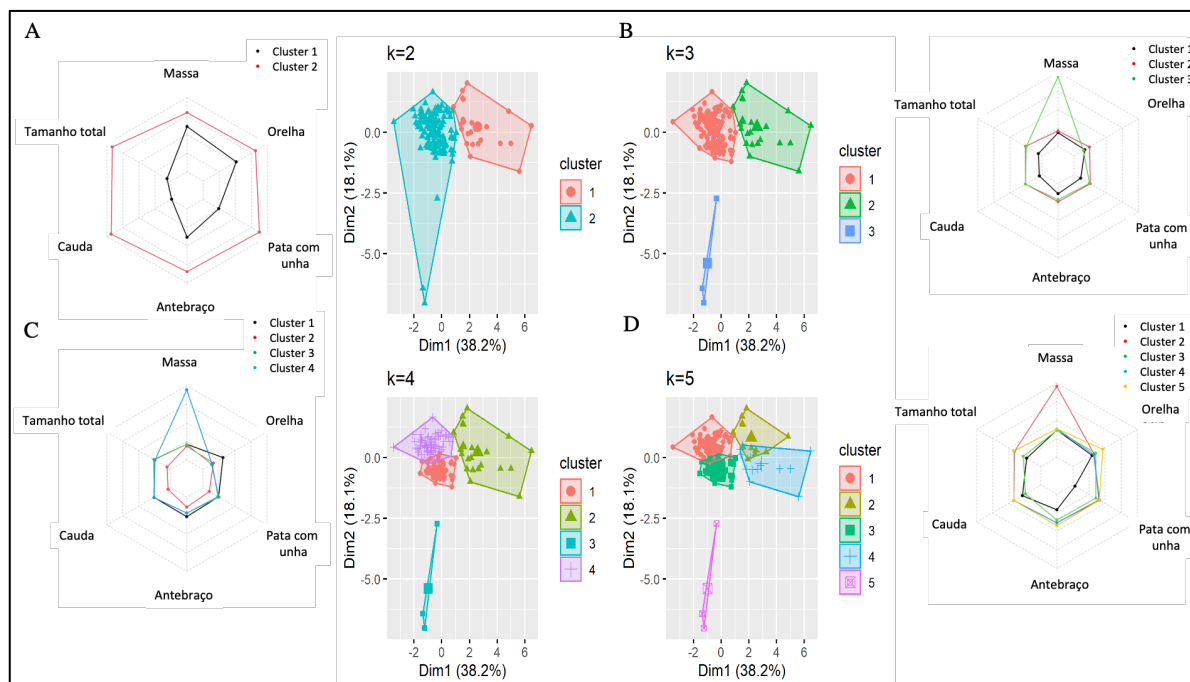


Figura 9 - Seleção do modelo adequado de *clusters* para os PNH da cidade de Ribeirão Preto, utilizando a técnica de componentes principais no pacote NbClust do programa R. A maioria das regras apontou $k=2$ (A), como sendo o melhor número de *cluster* para classificação. $K=3$ (B), $K=4$ (C), $K=5$ (D).

Dentre os *clusters* identificados houve maior número de PNH infectados com *Flavivirus* no cluster 2, (9 [7,38%]) quando comparado ao *cluster* 1, (1, [3,7%]), como mostra a Tabela 13. Variáveis como sexo, idade e presença de ferimentos apresentaram números similares entre si e em maior quantidade para os indivíduos não infectados quando comparados aos infectados, como mostra a Tabela 12.

Não foram contabilizados os indivíduos “Jovens” dentro da variável “Idade” por falta de informações completas, como mostra a Figura 10. Além disso, os PNH infectados com *Flavivirus* em Ribeirão Preto são apenas da espécie *Callithrix penicillata*. Quanto à prevalência de infecção dos PNH infectados na cidade de Ribeirão Preto as características analisadas não foram significantes, como mostra a Figura 10 (ANEXO G).

Tabela 12 – Comparando variáveis descritivas entre PNH infectados com *Flavivirus* e não infectados utilizados por análise de clusters, na cidade de Ribeirão Preto.

Variável	Arbovírus	
	Negativo (%)	Positivo (%)
Cluster		
1 (n=27)	26 (96,3)	1 (3,7)
2 (n=122)	113 (92,62)	9 (7,38)
Sexo		
Fêmea (n=73)	69 (94,52)	4 (5,48)
Macho (n=76)	70 (92,11)	6 (7,89)
Idade		
Adulto (n=129)	120 (93,02)	9 (6,98)
Jovem (n=14)	14 (100)	0 (0)
Subadulto (n=6)	5 (83,33)	1 (16,67)
Ferimentos		
Não (n=74)	69 (93,24)	5 (6,76)
Sim (n=75)	70 (93,33)	5 (6,67)

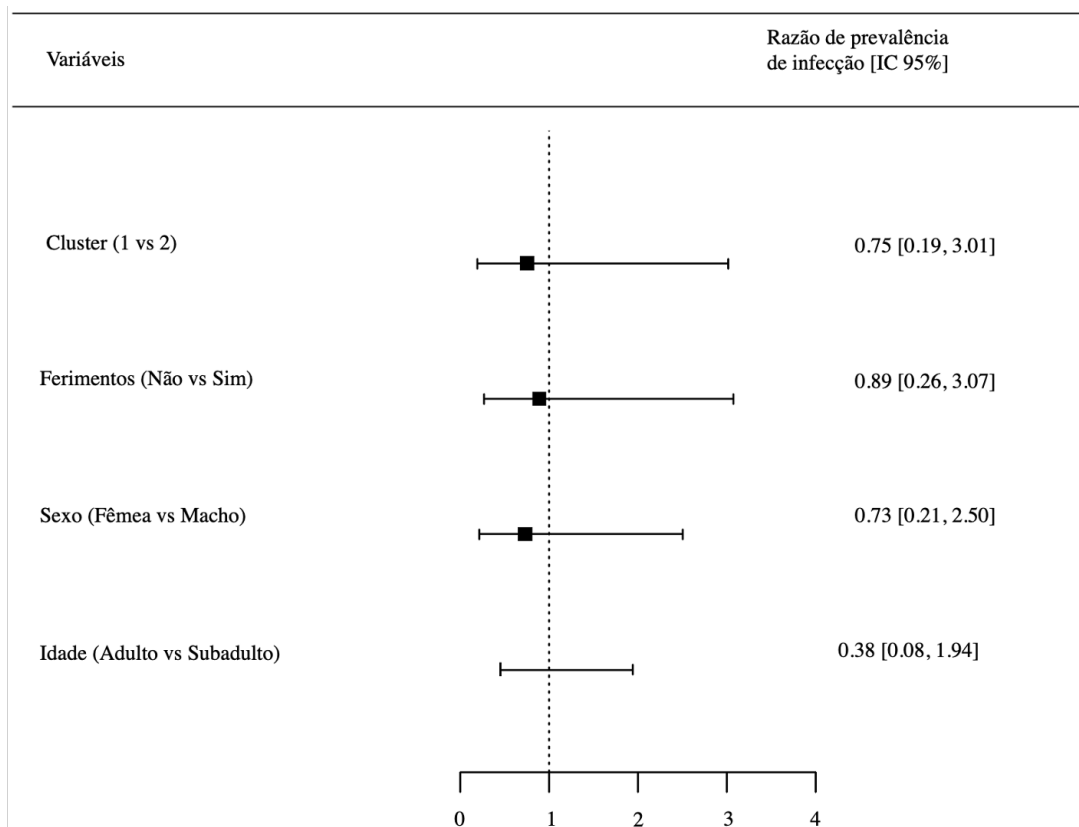


Figura 10 - Prevalência da infecção por *Flavivirus* nos PNH analisados em Ribeirão Preto de acordo com características alométricas, comportamentais (ferimentos), sexo e idade. IC = intervalo de confiança.

4.2.7 Mapeamento de zonas de risco (*heat map*)

A utilização de *heat maps* é uma ferramenta útil em estudos epidemiológicos, pois identifica zonas com maior densidade de determinado evento (*hot spots*), tais como casos de infecções virais, o que pode ser de grande valia para tomada de decisões no enfoque de ações mitigadoras. A cidade de Ribeirão Preto foi utilizada como melhor modelo na confecção do mapa, uma vez que possuía o maior número de PNH coletados infectados com *Flavivirus* e com dados completos de localização entre os sítios de coleta. Com o mapa de *Kernel* foi possível verificar que na cidade de Ribeirão Preto a maior incidência de PNH infectados ocorreu na divisa entre as regiões central, norte e leste da cidade, como mostra a Figura 11. Na região norte, os casos se concentraram próximos ao BZMRP. Na região central, região leste e demais regiões, os PNH infectados estavam localizados em parques ou áreas verdes urbanas. Com 255 PNH coletados e 14 infectados com *Flavivirus* (ANEXO F), Ribeirão Preto concentrou 46% ($n = 14$ PNH infectados na cidade de Ribeirão Preto, para $n = 30$ PNH infectados no estudo) dos PNH infectados na região de maior densidade, como mostra a Figura 11.

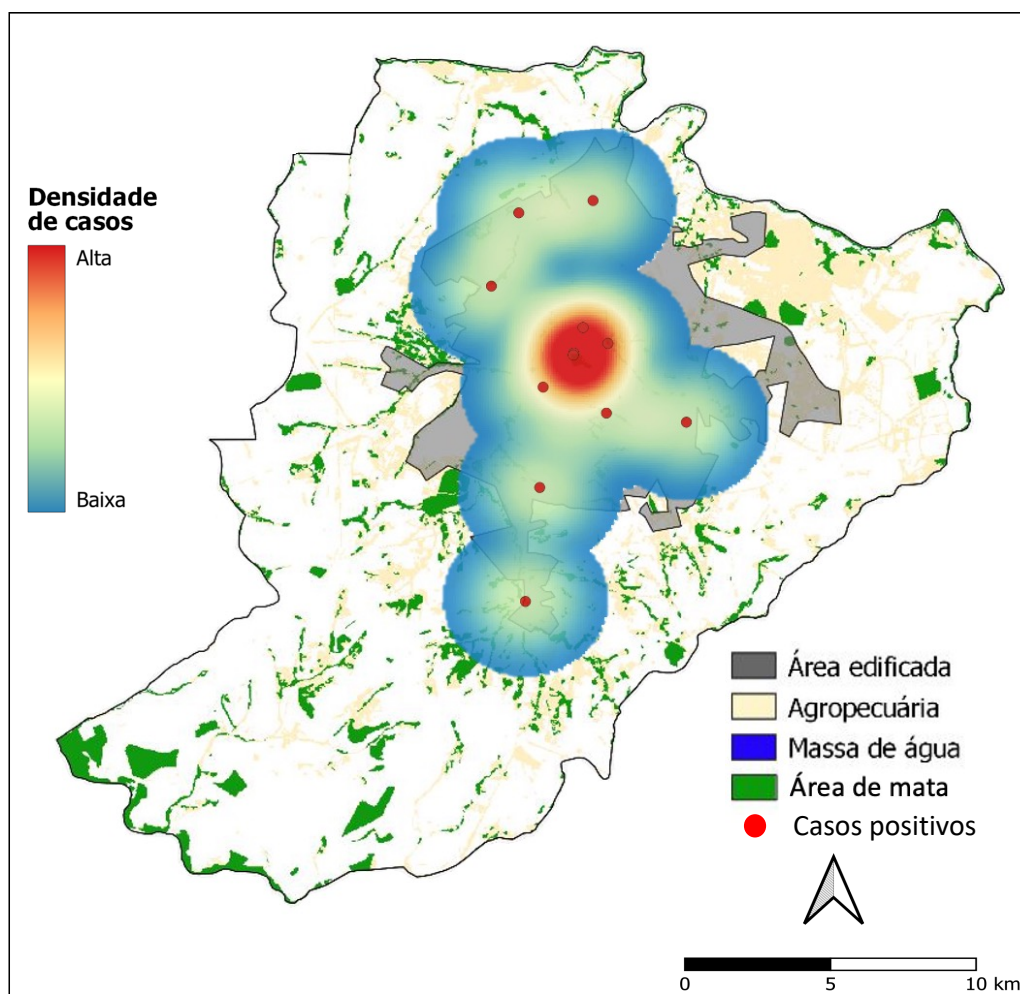


Figura 11 - Mapa de Kernel mostrando a localização e densidade dos PNH infectados com *Flavivirus* (círculos vermelhos) na cidade de Ribeirão Preto.

4.2.8 *Análise de filogenética dos Flavivirus oriundos de PNH*

Onze amostras clínicas dos PNH tiveram os fragmentos genômicos de *Flavivirus* sequenciados, como mostrado na Tabela 8. Árvores filogenéticas foram construídas incluindo sequências completas e parciais da proteína NS5 de DENV3 e SLEV, tendo sido manualmente editadas. A sequência NS5 de estudo para DENV3 alinhou-se com sequências da região de sudeste do Brasil, além de sequências provenientes da cidade de Ribeirão Preto entre 2006 e 2009 isoladas de pacientes, como mostra a Figura 12. Uma sequência proveniente desse estudo, oriunda de *Callithrix penicillata* capturado em 2018, em Ribeirão Preto (GenBank, OQ032518) foi incluída na árvore.

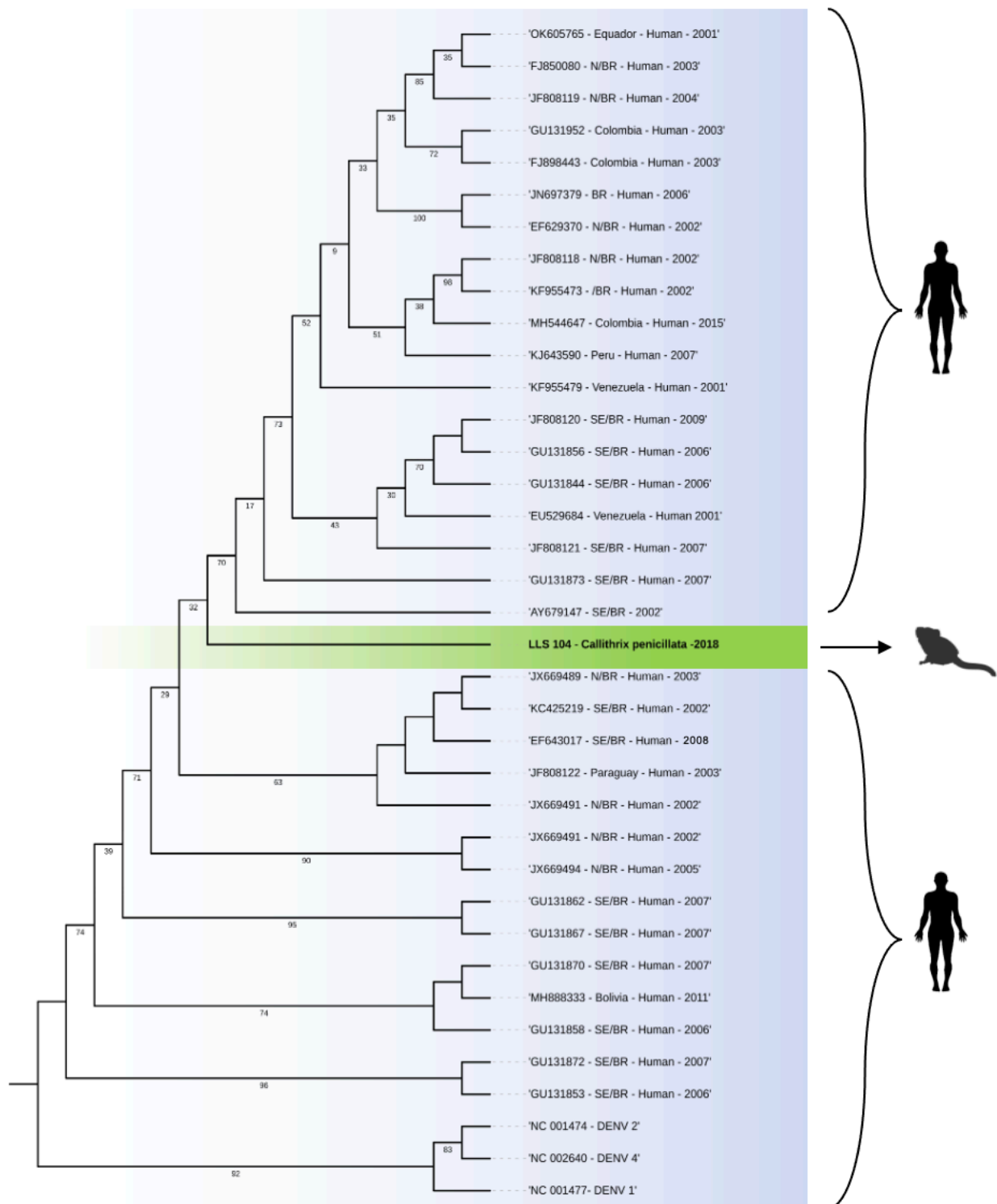


Figura 12 - Cladograma de máxima verossimilhança do gênero *Flavivirus* para DENV3 baseada no segmento NS5. Os valores de *bootstrap* são indicados nos ramos. O cladograma foi inferida com o modelo de substituição nucleotídica TN+F+I para todos os segmentos. O vírus caracterizado no estudo está em negrito. As setas indicam as sequências referentes a região de Ribeirão Preto em diferentes épocas. Foram usadas as sequências *outgroup* referências para DENV1, DENV2 e DENV4. Sequência depositada no Genbank OQ032518.

Vale ressaltar que as sequências disponíveis como o critério de localização e ano no banco de dados são, em sua maioria, provenientes de casos humanos.

O cladograma para os PNH infectados com SLEV seguiu os mesmos procedimentos da análise anterior. Embora com maior número de amostras positivas, estas tiveram fragmentos genômicos recuperados menores do que para DENV3. Além do tamanho reduzido, o alinhamento com o gene da proteína NS5 gerou sequências fragmentadas, o que prejudicou uma análise filogenética de maior acurácia, visto o baixo suporte dos *bootstraps*, mostrados na Figura 13. As sequências analisadas no presente estudo se agruparam em diversos clados monofiléticos com sequências de SLEV de surtos conhecidos. Isso pode ser devido ao fato de ter sido usado o gene da região conservada NS5, o que favorece a diferenciação das sequências entre espécies de *Flavivirus*, porém a baixa resolução torna difícil a diferenciação das mesmas entre genótipos de SLEV. Nota-se que as amostras LLS 23 e LLS 51, do presente estudo, formaram um grupo monofilético com sequência recente (2008) isolada em Ribeirão Preto e amostras inicialmente isoladas nos primeiros surtos em Belém, região norte do Brasil. A amostra LLS 55, do presente estudo, está mais relacionada com sequências provenientes da região de São José do Rio Preto, a noroeste do estado de São Paulo, próxima a Ribeirão Preto. As demais sequências do presente estudo (LLS 131, LLS 149, LLS 153, LLS 155, LLS 156, LLS 157 e LLS 159) formaram grupos monofiléticos distintos entre sequências correspondentes a surtos iniciais na região norte do país e sequências da América do Norte. As sequências geradas foram depositadas no GenBank (número de acesso: LLS 23: OQ290696, LLS 51: OQ290697, LLS 55: OQ290698, LLS 131: OQ290699, LLS 149: OQ290700, LLS 153: OQ290701, LLS 155: OQ290702, LLS 156: OQ290703, LLS 157: OQ290704, LLS 159: OQ290705).

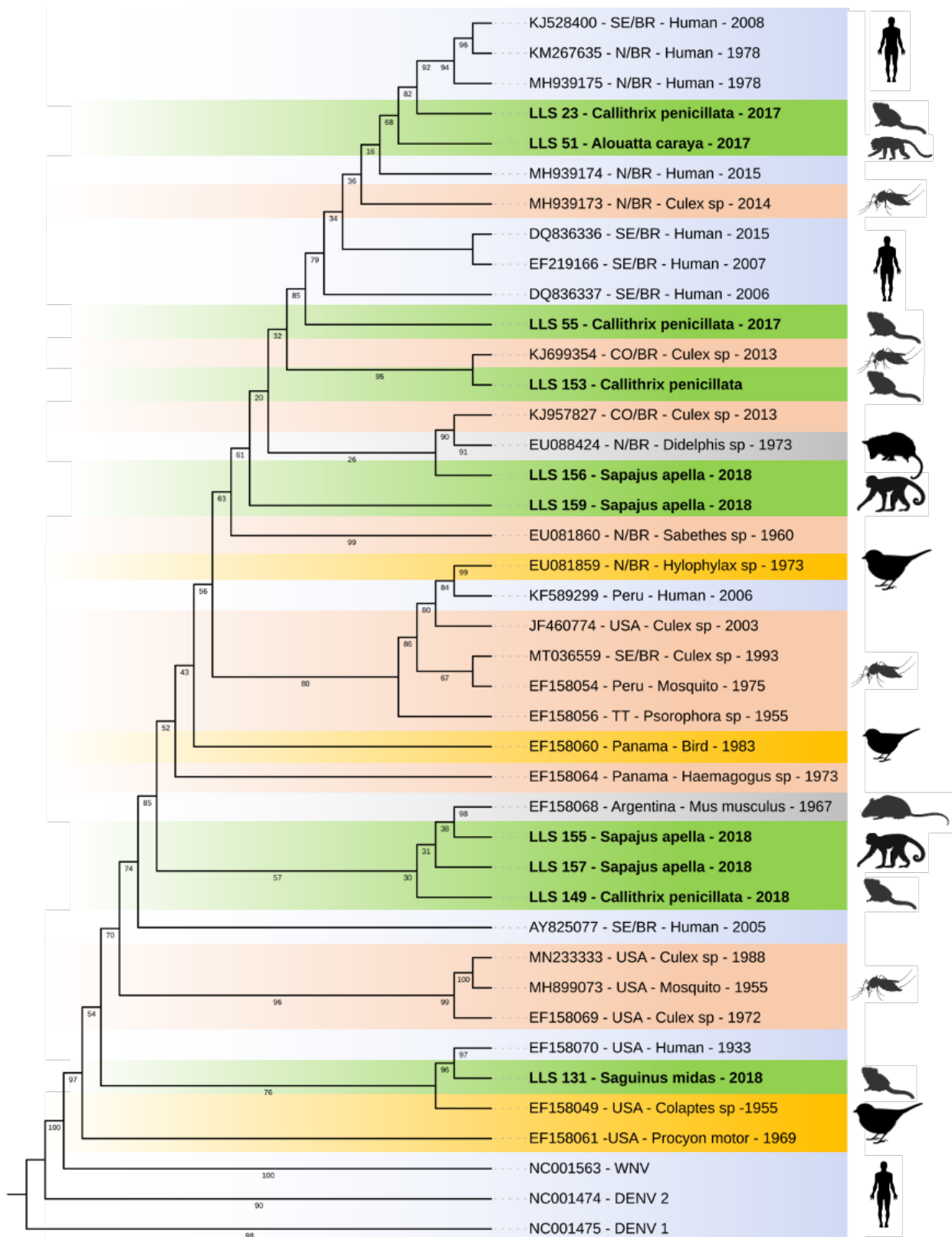


Figura 13 - Cladograma de máxima verossimilhança do gênero *Flavivirus* para SLEV baseada no segmento NS5. Os valores de *bootstrap* são indicados nos ramos. A árvore foi inferida com o modelo de substituição nucleotídica TIM2+F+I para todos os segmentos. Os vírus caracterizados no estudo estão em negrito. Foram usadas seqüências *outgroup* referências para DENV1, DENV2 e WNV. Seqüências depositadas no Genbank OQ290696, OQ290697, OQ290698, OQ290699, OQ290700, OQ290701, OQ290702, OQ290703, OQ290704, OQ290705.

5 DISCUSSÃO

Este trabalho mostra a prospecção de arbovírus dos gêneros *Flavivirus* (*Flaviviridae*) e *Alphavirus* (*Togaviridae*) em PNH neotropicais. Foram encontrados animais infectados com *Flavivirus* e estes PNH foram analisados considerando suas características alométricas e suas interações com aspectos da ecologia da região Nordeste e Noroeste do estado de São Paulo. No total, foram encontrados genomas de *Flavivirus* em amostras clínicas de 30 animais. Dentre esses PNH infectados, foram detectados em 33 amostras os vírus SLEV (n=16), ZIKV (n=11), DENV1 (n=2), DENV3 (n=2), DENV2 (n=1) e YFV (n=1), como mostra a Tabela 7. O maior número de animais infectados foi observado entre as espécies *Callithrix penicillata* (n=18, 60%), seguidos por *Sapajus apella* (n=6, 20%), *Alouatta caraya* (n=4, 13 %) e *Saguinus midas* (n=2, 6.6%). O maior número de infecções por *Flavivirus* na espécie *Callithrix* pode estar relacionado ao fato de estes animais serem considerados mamíferos invasores, introduzidos na região sudeste neotropical há aproximadamente 20 a 30 anos (MALUKIEWICZ et al., 2020a); e estarem amplamente distribuídos em áreas ecótonos de Mata Atlântica e Cerrado, biomas que compõe a região de estudo (CULOT et al., 2019; MALUKIEWICZ et al., 2020b). Dessa forma, ocupam nichos até então comuns para outras espécies naturais. Além disso, essa espécie encontra-se altamente adaptada a regiões urbanizadas e fragmentos de mata (MALUKIEWICZ et al., 2020b), que compõem a região de estudo. A detecção nessa população de PNH de *Flavivirus* importados nas Américas e basicamente mantidos em ciclos urbanos envolvendo seres humanos (ZIKV e DENV 1, 2 e 3), todos transmitidos por *Aedes aegypti*, sugere-se a ocorrência de *spillback* (transmissão interespecífica de doença humana para animal) destes vírus. Porém para confirmar esta evidência é necessário um estudo eco-epidemiológico por longo período envolvendo coletas não

somente de PNH, mas de vetores e seres humanos buscando entender a interface entre o homem e esses animais.

Nesse trabalho, uma das limitações foi a estratégia escolhida para a triagem molecular de *Flavivirus* através da *semi-nested multiplex* RT-PCR que é bastante laboriosa e pode produzir reações cruzadas. Desta forma, as amostras positivas foram re-testadas e outras metodologias de identificação viral incluindo o isolamento viral foram utilizadas. Entretanto, apesar do número considerável de amostras positivas por PCR, não foi possível isolar a maioria dos vírus encontrados, o que pode estar associado à carga viral insuficiente degradado por más condições de conservação das amostras provenientes de animais mortos a alguns dias e expostos ao intemperismo da região. Não foi possível o sequenciamento de nova geração para melhor caracterização dos vírus isolados e de amostras positivas. Porém, a confirmação por Sanger foi suficiente para identificar vários dos *Flavivirus* encontrados.

YFV foi encontrado infectando um *Callithrix penicillata* proveniente de região urbana da cidade de São Carlos. Esse achado corrobora estudos sobre epizootias de YFV, inclusive com surtos para os humanos, na região de São Carlos. Durante o surto de febre amarela, entre 2016 e 2019, observou-se grande positividade de infectados entre o gênero *Callithrix* em comparação a outras espécies estudadas, com cerca de 9% dos PNH positivos (HILL et al., 2020; MARES-GUIA et al., 2020; SILVA et al., 2020). Apesar de fatal para espécies como *Alouatta* ssp., na qual não observamos animais infectados no presente estudo, a patogenicidade de YFV difere entre os PNH (CUNHA et al., 2019; DE AZEVEDO FERNANDES et al., 2021; VALENTINE; MURDOCK; KELLY, 2019). O gênero *Callithrix*, aparentemente, apresenta menor susceptibilidade a infecção por YFV, com baixa mortalidade, além de menor viremia, quando comparados a outros PNH. Em estudo recente, ainda que não considerando hospedeiros amplificadores da febre amarela, (CUNHA et al., 2020a; DE AZEVEDO FERNANDES et al., 2021), a presença de

indivíduos do gênero *Callithrix* infectados em regiões urbanas em que existe o *Aedes aegypti*, vetor altamente competente, chamou atenção para o risco de que um ciclo urbano possa ser restabelecido e causar epidemias (ALIAGA-SAMANEZ et al., 2022; CUNHA et al., 2020a; DE AZEVEDO FERNANDES et al., 2021; MARES-GUIA et al., 2020). Pode-se sugerir que, na região de estudo, o YFV se mantém em centro urbano em ciclo silvático (CUNHA et al., 2020a). Entretanto, os indivíduos da espécie *Callithrix penicillata* analisados são advindos de coleta passiva pelo Centro de Controle de Zoonoses de Ribeirão Preto, em que os animais foram encontrados mortos e, portanto, não houve um monitoramento ativo das comunidades de PNH locais. Ademais, por não termos sido capazes de isolar o YFV infectante do indivíduo da espécie *Callithrix*, não pudemos caracterizar se a cepa encontrada pertence ao novo clado 1E, que circulou na região norte do estado de São Paulo, nos surtos de 2016 a 2019 (MIR et al., 2017). Os YFV 1E apresentam maior infectividade em células de mamíferos, o que seria um agravante para o estabelecimento de surtos mais graves no futuro (FURTADO et al., 2022). Portanto, um monitoramento para YFV seria melhor favorecido se acrescido do monitoramento genético das cepas circulantes visando a uma melhor vigilância epidemiológica.

A participação de mamíferos neotropicais como roedores, marsupiais e morcegos na manutenção do DENV na natureza já é bem conhecida (DE THOISY et al., 2009; GWEE et al., 2021). No presente estudo, encontramos DENV1 infectando *Callithrix penicillata* e *Sapajus apella*, DENV2 em *Sapajus apella* e DENV3 em *Callithrix penicillata*, como mostra a Tabela 7. Ciclos silváticos de DENV envolvendo PNH já foram bem descritos na África e Ásia e já foram sugeridos nas Américas, particularmente no Panamá, Porto Rico e Argentina (VALENTINE; MURDOCK; KELLY, 2019). Contudo, são poucas as evidências de PNH infectados com DENV em território brasileiro (VALENTINE; MURDOCK; KELLY, 2019). Acredita-se que PNH infectados com os diferentes tipos

de DENV não apresentariam sintomatologia similar à doença humana (ESTES; WONG; BRENCHLEY, 2018), o que, é diferente da febre amarela. Entretanto, seria importante identificar primatas com DENV em um cenário de vigilância epidemiológica. Em nosso estudo, encontramos 5 PNH, das espécies *Callithrix penicillata* e *Sapajus apella*, infectados com DENV1, DENV2 e DENV3. Contudo, o relatório de necrópsia de um *Callithrix penicillata* infectado com DENV1 evidenciou comprometimento de órgãos internos do animal. Acreditamos que a manutenção do vírus na natureza em nosso meio e a concepção de um reservatório natural, como é o caso da espécie *Callithrix penicillata*, necessita ser melhor estudada.

No presente estudo, a época de capturas e coletas de amostras clínicas dos PNH (final de 2017 e primeiro semestre de 2018) coincide com a ocorrência de epidemias de DENV1 e DENV2 na região (FERNANDES BRITO et al., 2020), o que explicaria eventos de *spillover/spillback* com a infecção de animais por estes vírus. Entretanto, não foi possível verificar a origem desses surtos. Quanto ao DENV3, estudos sobre a sua origem nos anos de 2000-2009 no Brasil, sugerem sua circulação silenciosa, 1 a 3 anos antes dos primeiros surtos (ARAÚJO et al., 2012). O primeiro surto de DENV3 ocorreu no estado do Rio de Janeiro em 2000 e se tornou o sorotipo mais prevalente entre 2002 e 2006 (FARES et al., 2015; FIGUEIREDO, 2003). O vírus foi introduzido no estado de São Paulo em 2003 (MARTINEZ; DA SILVA, 2011), causando importante surto na cidade de São José do Rio Preto em 2006, próximo à região de estudo, com mais de 9000 casos (12% dos casos registrados no estado naquele ano) e cerca de 5900 casos na cidade de Ribeirão Preto (MONDINI et al., 2009; PRETO, 2017). Ainda, a cocirculação dos quatro tipos de DENV já foi relatada no Brasil (ANDRADE et al., 2016), Quanto aos PNH, nossos dados corroboram os de outros estudos brasileiros em diferentes regiões. Na região nordeste, entre 2006 e 2017, PNH das espécies *Leontopithecus chrysomelas*, *Sapajus xanthosternos* (CATENACCI et al., 2018a) e *Alouatta belzebul* (MOREIRA-SOTO et al., 2018) foram

encontrados com anticorpos neutralizantes para DENV1, DENV2 e DENV3. Em Pernambuco, entre 2015 e 2016, macacos pregos das espécies *Sapajus libidinosus* e *Sapajus flavius*, de vida livre e cativeiro, apresentaram anticorpos neutralizantes para todos os tipos de DENV (DE OLIVEIRA-FILHO et al., 2018). Ainda que escassos, esses estudos evidenciam um possível contato de PNH com os DENV. Entretanto, reações cruzadas de anticorpos com outros *Flavivirus* não podem ser completamente descartadas (PRIYAMVADA et al., 2016). No presente estudo, DENV3 foi isolado e teve parte de seu genoma sequenciado de um indivíduo da espécie *Callithrix penicillata* encontrado morto na zona urbana de Ribeirão Preto. A filogenia do DENV3 isolado mostra que o mesmo forma *cluster* com sequências provenientes da mesma região entre 2005 e 2007. Portanto, nossos resultados permitem inferir que DENV3 possa estar circulando silenciosamente na região entre PNH. Dessa forma, mesmo sabendo que os surtos humanos de DENV são urbanos, com a participação do vetor *Aedes aegypti* (GUZMAN et al., 2016), nossos resultados chamam atenção para a infecção de PNH periurbanos ou silvestres, o que sugere a ocorrência de ciclo silvestre silencioso, que precisa ser monitorado.

Alouatta caraya e *Callithrix penicillata*, 11 animais, estavam infectados com ZIKV no presente estudo. Dentre os *Alouatta*, ZIKV teve genoma identificado em amostras de saliva, glândula salivar e swab retal, e também, o vírus foi isolado em saliva. Esses resultados demonstram que esses PNH possuem uma infecção ativa do ZIKV. À necropsia, 1 animal apresentou sinais de doença hepática (aspectos morfológicos), porém ZIKV não foi detectado no fígado desses PNH. O vírus isolado em saliva poderia sugerir uma transmissão do ZIKV pela interação social desses PNH, quando praticam catação (*grooming*), brigas territoriais e cópula (NARAT et al., 2017). Entretanto, esta forma de transmissão, dispensando mosquito vetor, precisa ser comprovada, uma vez que a transmissão sexual de ZIKV entre seres humanos já foi demonstrado diferindo da

transmissão arboviral clássica via vetores artrópodes (TURMEL et al., 2016). Desde a chegada da linhagem Asiática de ZIKV no Brasil em 2013/2014 (FARIA et al., 2016), houve referência de *spillback* do vírus em PNH *Callithrix jacchus* e *Sapajus libidinosus* (FAVORETTO et al., 2019). Também, confirmou-se a susceptibilidade experimental dos PNH *Saimiri* spp. e *Aotus* spp. ao ZIKV (VANCHIERE et al., 2018). Todos estes dados sugerem possível ciclo silvestre em território nacional. Isto, inclusive, pode ser reforçado pelos relatos de ZIKV em um grande número de mamíferos, répteis e aves (GALVÃO BUENO et al., 2016; PAUVOLID-CORRÊA et al., 2019). Na verdade, é uma incógnita como estes ciclos silváticos ocorreriam diante da vasta biodiversidade e das condições ambientais brasileiras favoráveis para a manutenção de um ciclo silvático (ALI et al., 2017; ALTHOUSE et al., 2016). Ainda, concordam com nossos resultados, estudos das regiões norte e nordeste, entre 2006 e 2017, que identificaram anticorpos contra ZIKV nas espécies *Callithrix* spp., *Sapajus* spp., e *Leontopithecus chrysomelas* (CATENACCI et al., 2018a; DE OLIVEIRA-FILHO et al., 2018; MOREIRA-SOTO et al., 2018). Tais estudos são fortes indicativos da presença do ZIKV em região periurbana e silvestre. Também, corrobora nosso trabalho, estudo recente na região sudeste brasileira detectando genoma de ZIKV em indivíduos do gênero *Callithrix* spp. e de *Sapajus* spp., bem como em *Ae. aegypti* (TERZIAN et al., 2018). Queremos ressaltar que o presente estudo é o primeiro a identificar a possível participação da espécie *Alouatta caraya* na manutenção de ZIKV na natureza (HAISI et al., 2022). Assim, estudos evidenciando a infecção por ZIKV em PNH no Brasil tem sido feitos principalmente na região norte e nordeste do país, onde houveram as graves epidemias humanas (NETTO et al., 2017). Por outro lado, como as regiões sul e sudeste foram as menos afetadas pelo ZIKV, isto torna a população dessas regiões vulneráveis a futuros surtos (LOWE et al., 2018). Como agravante, nessas regiões foi identificada, entre 2016 e 2018, a circulação da cepa Africana do ZIKV em *Alouatta guariba* e no vetor *Aedes albopictus* (DE MATOS et al., 2021). Contudo, as

implicações dessa cepa para produzir surtos com a participação de PNH neotropicais ainda são desconhecidas. Trabalhos mostram maior patogenicidade e letalidade ligados a cepa Africana de ZIKV com base em estudos *in vivo* e *in vitro* (DE MATOS et al., 2021). Em suma, no presente estudo, a infecção por ZIKV em 11 PNH oriundos de zona urbana mostra a necessidade do monitoramento de epizootias além dos casos humanos na região. A infecção por SLEV foi encontrada, com base em amostras clínicas, de 16 PNH. Entretanto, à necropsia, não foram encontrados sinais compatíveis com lesões em órgãos que fossem sugestivas a uma possível infecção viral. Uma proporção de 75% (12/16) destes animais foi proveniente de zoológicos e em sua maioria, eram *Callithrix penicillata*, *Sapajus apella*, *Alouatta caraya* e *Saguinus midas*. Esses resultados corroboram os de outros estudos com PNH em diferentes estados. Evidências de infecções por SLEV em PNH das espécies *Alouatta caraya*, *Sapajus nigritus*, e *Sapajus cay* foram observadas no Paraná, em 2004 e 2005 (SVOBODA et al., 2014); na Bahia, em *Leontopithecus chrysomelas*, entre 2006 e 2014 (CATENACCI et al., 2018b); em diferentes espécies de *Sapajus* sp., em Pernambuco, Piauí, Alagoas, Paraíba e Rio Grande do Norte, entre 2008 e 2010 (LAROQUE et al., 2014); Mato Grosso do Sul, entre 2010 e 2013 (BATISTA et al., 2013); no Rio Grande do Sul em PNH da espécie *Alouatta caraya*, entre 2016 e 2019 (ALMEIDA et al., 2019). Além disso, no presente estudo observamos um PNH da espécie *Callithrix penicillata* coinfectado com SLEV e DENV3. No entanto, não foi possível distinguir quadro compatível com infecção viral no laudo de necropsia. Resultado similar foi observado durante o primeiro surto de SLEV em seres humanos descrito no Brasil concomitante à epidemia de DENV3. A paciente de São José do Rio Preto apresentava sintomas febris e leves fenômenos hemorrágicos mas sem acometimento neurológico (MONDINI et al., 2007b). São vetores transmissores de SLEV os mosquitos *Culex* sp., sobre os quais, estudos recentes mostraram serem competentes para a transmissão de DENV na cidade de São Paulo, além do *Aedes aegypti* (BARRIO-

NUEVO et al., 2020). Contudo, a exposição a ambos os vetores não poder ser descartada no caso mencionado. Por outro lado, pouco se sabe sobre a competência para transmissão do SLEV pelo *Aedes aegypti* (MONDINI et al., 2007a). Sobre o SLEV, tem sido amplamente estudado em equinos e bubalinos, devido a suas infecções com acometimento neurológico e sua importância econômica (CASSEB et al., 2014; CHALHOUB et al., 2022; COSTA et al., 2019; PAUVOLID-CORRÊA et al., 2014b; ROSA et al., 2013; SVOBODA et al., 2014). SLEV tem sido descrito no Brasil a causar casos humanos esporádicos (MONDINI et al., 2007a; TERZIAN et al., 2011). Ressaltamos também, que o presente estudo em PNH *Alouatta caraya*, é o primeiro a notificar uma coinfeção entre SLEV e ZIKV e também, para *Callithrix penicillata* coinfectado com ZIKV e DENV3, porém não foram descritos sinais de doença nas suas necrópsias. Os PNH coletados não apresentavam sinais externos de infecção (KUNO et al., 2017), como letargia, caquexia, alta ou baixa temperatura corporal. Nossos dados sugerem que a coinfeção por *Flavivirus* em PNH não é rara e necessita ser melhor estudada. Ainda, no presente trabalho, SLEV foi isolado de amostra clínica de *Saguinus midas*, como mostra a Tabela 7. Esse animal era proveniente de cativeiro e tem seu *habitat* natural na região Nordeste do Amazonas (RYLANDS; MITTERMEIER, 2009), corroborando a conhecida susceptibilidade ao SLEV entre PNH daquela região. Foi observada evidência de infecção sistêmica por SLEV nos PNH, sendo identificados não somente em sangue, mas em amostras de saliva, glândula salivar, urina e swab retal, como mostra a Tabela 7. Como já sugerido para os casos de ZIKV em PNH desse estudo, o SLEV presente em saliva e swab retal desses animais facilitaria a transmissão não vetorial do vírus entre os animais pelas interações sociais, como catação (*grooming*), brigas territoriais e cópula (NARAT et al., 2017), em um mesmo recinto. Porém, mais estudos são necessários para validar essa hipótese. Além disso, nosso estudo mostrou evidências que SLEV pode estar sendo mantido em PNH como reservatórios naturais, uma vez que

neles verificou-se infecção sistêmica sem comprometimento neurológico aparente. Futuros estudos são necessários para comprovar se PNH são reservatórios naturais de SLEV.

O número de animais infectados com *Flavivirus* patogênicos para o homem nos PNH do presente estudo, inclusive em animais encontrados no meio urbano, evidencia a necessidade de um monitoramento constante para arbovírus visando compreender a participação desses animais no ciclo natural destes patógenos e em centros urbanos, levando a surtos humanos.

Como o acrônimo para arbovírus indica, os vírus dessa classe de patógenos dependem de um vetor artrópode, em sua maioria mosquitos para transmissão bem sucedida, portanto fatores ligados à capacidade de dispersão e sobrevivência do vetor vão necessariamente influenciar na transmissão dos arbovírus. A temperatura e precipitação são fatores preponderantes, além da ocupação do solo, desmatamento e o transporte de indivíduos infectados de uma região a outra (BOGOCH et al., 2016; LORENZ et al., 2017b; TABACHNICK, 2016). No presente estudo, foram obtidos dados sazonais dos PNH para verificar se estes seriam fatores discriminatórios nas infecções arbovídicas. No Brasil, as características sazonais que prevalecem no período seco (Abril a Setembro) incluem temperaturas mais amenas e baixa precipitação, em comparação ao período chuvoso (Outubro a Março) de temperaturas elevadas e maior precipitação. Porém, a quantidade de PNH infectados com *Flavivirus* não mostrou diferença significativa entre as 2 estações sazonais. Nos anos de estudo, 2017-2019, as médias anuais de temperatura se mantiveram estáveis entre 19° e 20°C, e a precipitação, entre 98 e 97 mm (INMET, 2021). Estudos recentes mostraram haver uma maior eficiência de transmissão de DENV, ZIKV e CHIKV entre 18°C e 34°C (BELLONE; FAILLOUX, 2020), portanto as médias anuais da região de estudo correspondem a um cenário ótimo para a transmissão desses vírus.

No presente estudo, a maior quantidade de PNH estudados ocorreu na estação seca e os animais eram, na maioria, fêmeas adultas.

Buscamos identificar se a infecção por *Flavivirus* nos PNH estava relacionada com algum dado alométrico intrínseco, com a ecologia dos PNH, sexo, idade, assim como características comportamentais através de ferimentos. A presença de ferimentos não foi considerada determinante na infecção dos PNH, o que reforça uma transmissão vetorial dessas arboviroses na região de estudo. Esse é o primeiro estudo a levar em consideração a presença de ferimentos na relação da infecção por arboviroses. O sexo e idade foram fatores que não apresentaram relevância estatística na associação com status de infecção pelos PNH. O que indica que PNH de ambos sexos e idades podem estar sofrendo o mesmo tipo de exposição a mosquitos na área de estudo. Contudo, seria esperado que indivíduos adultos tivessem maior ocorrência de infecções por arbovírus pelo maior tempo de vida e portanto maior exposição a mosquitos infectados (DE AZEVEDO FERNANDES et al., 2021; MORALES et al., 2017). Verificou-se que indivíduos do gênero *Sapajus* apresentaram chance 90,49% maior de apresentar infecção por *Flavivirus* do que os do gênero *Callithrix*. O mesmo foi verificado para indivíduos da espécie *Alouatta caraya*, com chance 93,78% maior, quando comparada ao gênero *Callithrix*, como mostra a Figura 7. Nesse sentido, observou-se que PNH de médio e grande porte apresentaram maior probabilidade de estarem infectados por *Flavivirus* que os de pequeno porte, como os *Callithrix penicillata*. Vale ressaltar que a massa corporal não apresentou relevância significativa no presente estudo. Esses resultados contrastam com os de outros estudos sugerindo que PNH neotropicais de tamanho reduzido, com baixas taxas de reprodução e tempo de vida, teriam mais infecções e maior persistência viral (GUTHID et al., 2020). Ainda, modelos propondo o possível estabelecimento de ciclo silvestre para ZIKV sugerem que altas taxas de natalidade, características de PNH de pequeno porte, favoreceriam ciclos silvestres em PNH neotropicais (ALTHOUSE et al.,

2016). Entretanto, esses modelos necessitam ter seu real impacto confirmado. É importante notar que o número de indivíduos coletados divergiu entre as espécies de PNH e por isso os indivíduos da espécie *Callithrix penicillata* (n= 209) foram os que tiveram maior número de infectados (n= 18) quando comparados aos indivíduos *Alouatta caraya* (n= 12) e *Sapajus apella* (n= 10). Contudo, a baixa diversidade de indivíduos coletados mostrou uma maior proporção de PNH infectados entre as espécies *Saguinus midas* (2/4, 50%), *Alouatta caraya* (4/12, 33.3%), *Sapajus apella* (6/19, 31.6%) e *Callithrix penicillata* (18/209, 8.6%). Também, os indivíduos *Sapajus apella* infectados com *Flavivirus* eram provenientes de um único recinto de animais em cativeiro. No entanto, mesmo reconhecendo que a estrutura social desses PNH favorece a organização em grupos, inferimos que os resultados aqui encontrados mimetizam a transmissão comunitária natural.

Identificamos zonas de risco devido ao número de PNH infectados com *Flavivirus* em nosso estudo. Dentro os locais de coleta analisados, a cidade de Ribeirão Preto foi passível de ser zoneada, pelo número de animais coletados e infectados. Dessa forma, foi possível verificar que grande parte dos animais infectados se dispersaram muito próximos à região central, próximos ao BZMRP, como mostra a Figura 10. Esta região é amplamente arborizada e com registros frequentes da circulação de PNH. Apesar da proximidade dos PNH infectados no presente estudo com o BZMRP, não foi reportado nenhum PNH infectado residente no BZMRP durante o estudo, pois não há registros de vigilância epidemiológica para arbovírus nestes animais de cativeiro. Sendo assim, nossos resultados evidenciam a necessidade implementar triagem periódica para arbovírus em PNH de cativeiro para averiguar o estado de saúde do animal também evitar a transmissão destes patógenos para outros animais e seres humanos envolvidos na sua manutenção.

A identificação de *hot spots* é uma ferramenta que pode prever e mitigar os surtos de arboviroses. Este é o caso ocorrido em 2008-2009 no sul do país, quando a rápida

vacinação contra YFV num raio de 2 km da localização de PNH mortos com febre amarela preveniu a disseminação e um grande surto da doença (ALMEIDA et al., 2014). Importa ressaltar que dever-se-ia ampliar o espectro da vigilância e após serem estudados diversos arbovírus de interesse para saúde pública, e não somente YFV, os órgãos sanitários responsáveis poderiam tomar medidas setORIZADAS de controle prevenindo emergência de novos vírus.

Por fim, no presente estudo, foram identificados os *Flavivirus*, DENV1, DENV2 e DENV3, YFV, ZIKV e SLEV em 12% (30/248) nos PNH estudados, das espécies *Alouatta caraya*, *Sapajus apella* e *Callithrix penicillata*. Evidenciou-se, também, pela primeira vez, a infecção por SLEV em *Saguinus midas*. O estudo identificou SLEV e ZIKV infectando de forma concomitante, a saliva, glândulas salivares e swab retal de *Alouatta caraya*, *Callithrix penicillata*, *Sapajus apella* e *Saguinus midas*. O presente estudo suscitou a hipótese de que a presença desses vírus, isolados em saliva e swab retal poderia permitir transmissão, comunitária desses *Flavivirus* sem participação de mosquito vetor. Contudo, essa hipótese precisa ser confirmada.

Após encontrar circulação simultânea de diferentes *Flavivirus* em PNH, no ambiente urbano, foi possível fazer zoneamento de risco para esses vírus na cidade de Ribeirão Preto. Em suma, o estudo mostra que ocorre circulação de *Flavivirus* no Nordeste e no Noroeste do estado de São Paulo em PNH o que favorece a possibilidade de que surtos humanos possam surgir por *spillover* PNH-humanos ou *spillback* humanos-PNH e, portanto, o trabalho enfatiza a importância da ampliação da vigilância de *Flavivirus* e outros arbovírus em PNH, além da vigilância atual de epizootias para YFV.

6 CONCLUSÃO

- Existe uma cocirculação silenciosa de diversos *Flavivirus* de interesse para a saúde pública em PNH coletados em zonas urbanas do Estado de São Paulo;
- Os *Flavivirus* DENV1, DENV2 e DENV3, YFV, ZIKV e SLEV foram detectados em PNH infectados das regiões Nordeste e Noroeste do estado de São Paulo;
- Foi observada a infecção inédita por SLEV em *Saguinus midas* e ZIKV para *Alouatta caraya*
- SLEV e ZIKV foram encontrados em amostras de saliva e swab retal, sugerindo possível transmissão não vetorial dos vírus que precisa ser comprovada;
- Coinfecções por SLEV e ZIKV, e ZIKV e DENV3 foram observadas nos PNH.
- Dentre os PNH investigados, as espécies *Alouatta caraya* e *Sapajus apella* mostraram maior probabilidade de estarem infectados por *Flavivirus*.
- A região central e as cercanias do Bosque Zoológico da cidade de Ribeirão Preto são locais com maior risco de transmissão dos *Flavivirus* DENV, SLEV e ZIKV.

7 Referências

- ALI, S. et al. Environmental and Social Change Drive the Explosive Emergence of Zika Virus in the Americas. **Plos**, n. Fig 1, p. 1–16, 2017.
- ALIAGA-SAMANEZ, A. et al. Yellow fever surveillance suggests zoonotic and anthroponotic emergent potential. **Communications Biology**, v. 5, n. 1, p. 1–12, 2022.
- ALMEIDA, M. A. B. DE et al. Detection of antibodies against Icoaraci, Ilhéus, and Saint Louis Encephalitis arboviruses during yellow fever monitoring surveillance in non-human primates (*Alouatta caraya*) in southern Brazil. **Journal of Medical Primatology**, v. 48, n. 4, p. 211–217, 29 ago. 2019.
- ALMEIDA, M. A. B. et al. Surveillance for Yellow Fever Virus in Non-Human Primates in Southern Brazil, 2001-2011: A Tool for Prioritizing Human Populations for Vaccination. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 3, 2014.
- ALTHOUSE, B. M. et al. Potential for Zika Virus to Establish a Sylvatic Transmission Cycle in the Americas. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 12, p. 1–11, 2016.
- ALTHOUSE, B. M. et al. Role of monkeys in the sylvatic cycle of chikungunya virus in Senegal. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2018.
- ANDRADE, E. H. P. et al. Spatial-temporal co-circulation of dengue virus 1, 2, 3, and 4 associated with coinfection cases in a hyperendemic area of Brazil: A 4-week survey. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 5, p. 1080–1084, 2016.
- ARAÚJO, J. M. G. DE et al. Origin and Evolution of Dengue Virus Type 3 in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 9, p. 1–10, 2012.
- BARRIO-NUEVO, K. M. et al. Detection of Zika and dengue viruses in wild-caught mosquitoes collected during field surveillance in an environmental protection area in São Paulo, Brazil. **PLoS ONE**, v. 15, n. 10 October, p. 1–13, 2020.
- BATISTA, P. M. et al. Detection of arboviruses of public health interest in free-living New World primates (*Sapajus* spp.; *Alouatta caraya*) captured in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 6, p. 684–690, 2013.
- BELLONE, R.; FAILLOUX, A.-B. The Role of Temperature in Shaping Mosquito-Borne Viruses Transmission. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. September, p. 1–15, 25 set. 2020.
- BETTIS, A. A. et al. The global epidemiology of chikungunya from 1999 to 2020: A systematic literature review to inform the development and introduction of vaccines. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 1, p. 1–22, 2022.
- BLAHOVE, M. R.; CARTER, J. R. Flavivirus persistence in wildlife populations. **Viruses**, v. 13, n. 10, 2021.

- BOGOCH, I. I. et al. Anticipating the international spread of Zika virus from Brazil. **The Lancet**, v. 387, n. 10016, p. 335–336, 2016.
- BONALDO, M. C. et al. Isolation of Infective Zika Virus from Urine and Saliva of Patients in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 6, p. 1–17, 2016.
- BONALDO, M. C. et al. Genome analysis of yellow fever virus of the ongoing outbreak in Brazil reveals polymorphisms. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 6, p. 447–451, 2017.
- BRONZONI, R. V. D. M. et al. Duplex Reverse Transcription-PCR Followed by Nested PCR Assays for Detection and Identification of Brazilian Alphaviruses and Flaviviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 696–702, 1 fev. 2005.
- BROWER, J.; ZAR, J. **Field and Laboratory Methods for General Ecology**. 4. ed. New York, NY: McGraw–Hill, 1998.
- CAICEDO, E.-Y. et al. The epidemiology of Mayaro virus in the Americas: A systematic review and key parameter estimates for outbreak modelling. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 15, n. 6, p. e0009418, 3 jun. 2021.
- CARRILLO-BILBAO, G.; MARTIN-SOLANO, S.; SAEGERMAN, C. Zoonotic Blood-Borne Pathogens in Non-Human Primates in the Neotropical Region: A Systematic Review. **Pathogens**, v. 10, n. 8, p. 1009, 10 ago. 2021.
- CASSEB, A. R. et al. Seroprevalence of flaviviruses antibodies in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Brazilian Amazon. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 20, n. 1, p. 2–4, 2014.
- CATENACCI, L. S. et al. Surveillance of Arboviruses in Primates and Sloths in the Atlantic Forest, Bahia, Brazil. **EcoHealth**, v. 15, n. 4, p. 777–791, 2018a.
- CATENACCI, L. S. et al. Surveillance of Arboviruses in Primates and Sloths in the Atlantic Forest, Bahia, Brazil. **EcoHealth**, 2018b.
- CELONE, M. et al. A systematic review and meta-analysis of the potential non-human animal reservoirs and arthropod vectors of the Mayaro virus. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 12, p. e0010016, 13 dez. 2021.
- CHALHOUB, F. L. L. et al. Serological Evidence of Exposure to Saint Louis Encephalitis and West Nile Viruses in Horses of Rio de Janeiro, Brazil. **Viruses**, v. 14, n. 11, p. 2459, 2022.
- CHANG, C. et al. The Zika outbreak of the 21st century. **Journal of Autoimmunity**, v. 68, p. 1–13, 2016.
- CHEN, R. et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Togaviridae. **The Journal of general virology**, v. 99, n. 6, p. 761–762, 1 jun. 2018.
- CHILDS, M. L. et al. Mosquito and primate ecology predict human risk of yellow fever virus spillover in Brazil. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 374, n. 1782, p. 20180335, 30 set. 2019.

CHONG, H. Y. et al. Flavivirus infection—A review of immunopathogenesis, immunological response, and immunodiagnosis. **Virus Research**, v. 274, n. September, p. 197770, 2019.

COSTA, G. B. et al. Silent circulation of the saint louis encephalitis virus among humans and equids, Southeast Brazil. **Viruses**, v. 11, n. 11, p. 1–10, 2019.

CULOT, L. et al. ATLANTIC-PRIMATES: a dataset of communities and occurrences of primates in the Atlantic Forests of South America. **Ecology**, v. 100, n. 1, p. 1–149, 16 jan. 2019.

CUNHA, M. DOS P. et al. Origin of the São Paulo Yellow Fever epidemic of 2017–2018 revealed through molecular epidemiological analysis of fatal cases. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.

CUNHA, M. S. et al. Possible non-sylvatic transmission of yellow fever between non-human primates in São Paulo city, Brazil, 2017–2018. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–8, 2020a.

CUNHA, M. S. et al. Genomic evidence of yellow fever virus in *Aedes scapularis*, southeastern Brazil, 2016. **Acta Tropica**, v. 205, n. December 2019, p. 105390, 2020b.

CUNHA, M. S. et al. Chikungunya Virus: An Emergent Arbovirus to the South American Continent and a Continuous Threat to the World. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. June, 2020c.

DE AZEVEDO FERNANDES, N. C. C. et al. Differential yellow fever susceptibility in new world nonhuman primates, comparison with humans, and implications for surveillance. **Emerging Infectious Diseases**, v. 27, n. 1, p. 47–56, jan. 2021.

DE LIMA CAVALCANTI, T. Y. V. et al. A Review on Chikungunya Virus Epidemiology, Pathogenesis and Current Vaccine Development. **Viruses**, v. 14, n. 5, 2022.

DE MATOS, S. M. S. et al. Possible Emergence of Zika Virus of African Lineage in Brazil and the Risk for New Outbreaks. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, n. July, p. 1–5, 23 jul. 2021.

DE OLIVEIRA-FILHO, E. F. et al. Seroprevalence of selected flaviviruses in free-living and captive capuchin monkeys in the state of Pernambuco, Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, n. 4, p. 1094–1097, ago. 2018.

DE OLIVEIRA MOTA, M. T. et al. Mayaro virus: A neglected arbovirus of the Americas. **Future Virology**, v. 10, n. 9, p. 1109–1122, 2015.

DE PAULA SILVEIRA-LACERDA, E. et al. Molecular epidemiological investigation of Mayaro virus in febrile patients from Goiania City, 2017–2018. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 95, n. March, 2021.

DE THOISY, B. et al. Mayaro virus in wild mammals, French Guiana. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 10, p. 1326–1329, 2003.

DE THOISY, B. et al. Dengue infection in neotropical forest mammals. **Vector-Borne**

and Zoonotic Diseases, v. 9, n. 2, p. 157–170, 2009.

DOS REIS, N. R. et al. **Primatas do Brasil: guia de campo**. 1º ed. Rio de Janeiro: Technical Books, 2015.

DOS SANTOS SOUZA MARINHO, R. et al. Re-emergence of mayaro virus and coinfection with chikungunya during an outbreak in the state of Tocantins/Brazil. **BMC Research Notes**, v. 15, n. 1, p. 1–7, 2022.

ESPOSITO, D. L. A.; DA FONSECA, B. A. L. Sensitivity and detection of chikungunya viral genetic material using several PCR-based approaches. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 4, p. 465–469, 2017.

ESPOSITO, D. L. A.; FONSECA, B. A. L. DA. Will Mayaro virus be responsible for the next outbreak of an arthropod-borne virus in Brazil? **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 5, p. 540–544, 2017.

ESTES, J. D.; WONG, S. W.; BRENCHLEY, J. M. Nonhuman primate models of human viral infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 6, p. 390–404, 2018.

EVANS, T. S. et al. Sylvatic Transmission of Chikungunya Virus among Nonhuman Primates in Myanmar. **Emerging infectious diseases**, v. 28, n. 12, p. 2548–2551, 2022.

FARES, R. C. G. et al. Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

FARIA, N. R. et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science**, v. 352, n. 6283, p. 345–349, 2016.

FARIA, N. R. et al. Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. **Science (New York, N.Y.)**, v. 361, n. 6405, p. 894–899, 31 ago. 2018.

FAVORETTO, S. R. et al. Zika Virus in Peridomestic Neotropical Primates, Northeast Brazil. **EcoHealth**, 28 jan. 2019.

FERNANDES BRITO, A. et al. Lying in wait: the resurgence of dengue virus after the Zika epidemic in Brazil. **medRxiv**, v. 1, p. 2020.08.10.20172247, 2020.

FIGUEIREDO, M. L. G. DE; FIGUEIREDO, L. T. M. Review on Infections of the Central Nervous System by St. Louis Encephalitis, Rocio and West Nile Flaviviruses in Brazil, 2004-2014. **Advances in Microbiology**, v. 04, n. 13, p. 955–961, 2014.

FIGUEIREDO, L. T. M. The Brazilian flaviviruses. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 13, p. 1643–1649, 2000.

FIGUEIREDO, L. T. M. Dengue in Brazil: Past, present and future perspective. **Dengue Bulletin**, v. 27, n. 1, p. 25–33, 2003.

FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 224–229, 2007.

FIGUEIREDO, L. T. M. The recent arbovirus disease epidemic in Brazil. **Revista da**

Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 48, n. 3, p. 233–4, jun. 2015.

FIGUEIREDO, L. T. M. Large outbreaks of Chikungunya virus in Brazil reveal uncommon clinical features and fatalities. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 583–584, set. 2017.

FIGUEIREDO, L. T. M. Human Urban Arboviruses Can Infect Wild Animals and Jump to Sylvatic Maintenance Cycles in South America. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. JUL, p. 259, 17 jul. 2019.

FORRESTER, N. L. et al. Genome-Scale Phylogeny of the Alphavirus Genus Suggests a Marine Origin. **Journal of Virology**, v. 86, n. 5, p. 2729–2738, 2012.

FUMAGALLI, M. J. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant envelope protein 2 antigen for diagnosis of Chikungunya virus. **Virology Journal**, v. 15, n. 1, p. 1–7, 2018.

FUMAGALLI, M. J. et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies targeting recombinant envelope protein 2 of Mayaro virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 5, 2019.

FURTADO, N. D. et al. Biological Characterization of Yellow Fever Viruses Isolated From Non-human Primates in Brazil With Distinct Genomic Landscapes. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, n. February, p. 1–14, 2022.

GALVÃO BUENO, M. et al. Animals in the Zika virus life cycle: what to expect from megadiverse Latin American countries. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, p. 13, 2016.

GIBB, R. et al. Zoonotic host diversity increases in human-dominated ecosystems. **Nature**, v. 584, n. 7821, p. 398–402, 2020.

GOULD, E. et al. Emerging arboviruses: Why today? **One Health**, v. 4, n. June, p. 1–13, dez. 2017.

GUTHID, S. et al. Ecological processes underlying the emergence of novel enzootic cycles: Arboviruses in the neotropics as a case study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1–22, 2020.

GUZMAN, M. G. et al. Dengue infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 1–26, 2016.

GWEE, S. X. W. et al. Animals as potential reservoirs for dengue transmission: A systematic review. **One Health**, v. 12, p. 100216, 2021.

HAISI, A. et al. Lack of serological and molecular evidences of Zika virus circulation in non-human primates in three states from Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 117, n. 8, p. e220012, 2022.

HAKIM, M. S. et al. The origin and continuing adaptive evolution of chikungunya virus. **Archives of Virology**, n. 0123456789, 2022.

HAMRICK, P. N. et al. Geographic patterns and environmental factors associated with

- human yellow fever presence in the Americas. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 9, p. 1–27, 2017.
- HILL, S. C. et al. Genomic Surveillance of Yellow Fever Virus Epizootic in São Paulo, Brazil, 2016 - 2018. **PLoS pathogens**, v. 16, n. 8, p. e1008699, 7 ago. 2020.
- HOANG, D. T. et al. UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 2, p. 518–522, 1 fev. 2018.
- HOLBROOK, M. R. Historical perspectives on flavivirus research. **Viruses**, v. 9, n. 5, p. 1–19, 2017.
- HOLMES, A. C. et al. A molecular understanding of alphavirus entry. **PLoS Pathogens**, v. 16, n. 10, p. 1–20, 2020.
- ILLIA, G. et al. Parasites and Other Infectious Agents in Non - human Primates of Argentina. **Current Tropical Medicine Reports**, n. 0123456789, 2022.
- INMET. **Instituto Nacional de Meteorologia - INMET**. Disponível em: <<https://portal.inmet.gov.br/dadoshistoricos>>.
- JONES, K. E. et al. Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, v. 451, n. 7181, p. 990–3, 21 fev. 2008.
- KALBUS, A. et al. Exploring the influence of deforestation on dengue fever incidence in the Brazilian Amazonas state. **PLOS ONE**, v. 16, n. 1, p. e0242685, 7 jan. 2021.
- KALYAANAMOORTHY, S. et al. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. **Nature methods**, v. 14, n. 6, p. 587–589, 8 jun. 2017.
- KATOH, K. et al. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 14, p. 3059–66, 15 jul. 2002.
- KRAMER, L. D. Complexity of virus–vector interactions. **Current Opinion in Virology**, v. 21, p. 81–86, 2016.
- KUNO, G. et al. Vertebrate Reservoirs of Arboviruses: Myth, Synonym of Amplifier, or Reality? **Viruses**, v. 9, n. 7, p. 185, 13 jul. 2017.
- LABADIE, K. et al. Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 3, p. 894–906, 2010.
- LACERDA, A. B. et al. Diffusion of sylvatic yellow fever in the state of São Paulo, Brazil. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–11, 2021.
- LAROQUE, P. O. et al. Epidemiologic survey for arbovirus in Galician capuchin monkeys (*Cebus flavius*) free living in Paraíba and captive capuchin monkey (*Cebus libidinosus*) from Northeast Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 5, p. 462–468, 2014.
- LEDUC, J. W.; PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. An outbreak of

Mayaro virus disease in Belterra, Brazil. II. Epidemiology. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 30, n. 3, p. 682–8, maio 1981.

LEE, S. A. et al. The impact of climate suitability, urbanisation, and connectivity on the expansion of dengue in 21st century Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 12, p. e0009773, 9 dez. 2021.

LOPES MARQUES, C. D. et al. Arboviruses related with chronic musculoskeletal symptoms. **Best Practice and Research: Clinical Rheumatology**, n. xxxx, p. 101502, 2020.

LORENZ, C. et al. Impact of environmental factors on neglected emerging arboviral diseases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 9, p. 1–19, 2017a.

LORENZ, C. et al. Impact of environmental factors on neglected emerging arboviral diseases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 9, p. 1–19, 2017b.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; FAILLOUX, A. B. High risk for chikungunya virus to initiate an enzootic sylvatic cycle in the tropical Americas. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 6, p. 1–11, 2017.

LOWE, R. et al. The zika virus epidemic in Brazil: From discovery to future implications. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 1, 2018.

MALUKIEWICZ, J. et al. An Introduction to the Callithrix Genus and Overview of Recent Advances in Marmoset Research. **ILAR Journal**, v. 61, n. 2–3, p. 110–138, 2020a.

MALUKIEWICZ, J. et al. An Introduction to the Callithrix Genus and Overview of Recent Advances in Marmoset Research. **ILAR Journal**, v. 61, n. 2–3, p. 110–138, 31 dez. 2020b.

MARES-GUIA, M. A. M. D. M. et al. Yellow fever epizootics in non-human primates, Southeast and Northeast Brazil (2017 and 2018). **Parasites and Vectors**, v. 13, n. 1, p. 1–8, 2020.

MARINHO, R. DOS S. S. et al. Environmental Changes and the Impact on the Human Infections by Dengue, Chikungunya and Zika Viruses in Northern Brazil, 2010–2019. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 19, p. 12665, 3 out. 2022.

MAROJA, O. M.; CAUSEY, O. R. Mayaro Virus: A New Human Disease Agent. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 6, n. 6, p. 1017–1023, 1 nov. 1957.

MARTINEZ, E. Z.; DA SILVA, E. A. S. Predicting the number of cases of dengue infection in Ribeirão Preto, São Paulo State, Brazil, using a SARIMA model | Previsão do número de casos de dengue em Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, por um modelo SARIMA. **Cadernos de Saude Publica**, v. 27, n. 9, p. 1809–1818, 2011.

MELTZER, E. Arboviruses and Viral Hemorrhagic Fevers (VHF). **Infectious Disease**

Clinics of North America, v. 26, n. 2, p. 479–496, 2012.

MILHIM, B. H. G. A. et al. Fatal Outcome of Ilheus Virus in the Cerebrospinal Fluid of a Patient Diagnosed with Encephalitis. **Viruses**, v. 12, n. 9, p. 12–19, 2020.

MILLS, J. N. et al. Guidelines for Working with Rodents Potentially Infected with Hantavirus. **Journal of Mammalogy**, v. 76, n. 3, p. 716, ago. 1995.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim epidemiológico semana 43** Ministério da Saúde - **Boletim Epidemiológico**. [s.l: s.n.].

MIR, D. et al. Phylodynamics of Yellow Fever Virus in the Americas: New insights into the origin of the 2017 Brazilian outbreak. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017.

MONDINI, A. et al. Simultaneous infection by DENV-3 and SLEV in Brazil. **Journal of Clinical Virology**, v. 40, n. 1, p. 84–86, 2007a.

MONDINI, A. et al. Saint Louis encephalitis virus, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 13, n. 1, p. 176–8, 2007b.

MONDINI, A. et al. Spatio-temporal tracking and phylodynamics of an urban dengue 3 outbreak in São Paulo, Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 3, n. 5, 2009.

MORALES, M. A. et al. Detection of the mosquito-borne flaviviruses, West Nile, Dengue, Saint Louis Encephalitis, Ilheus, Bussuquara, and Yellow Fever in free-ranging black howlers (*Alouatta caraya*) of Northeastern Argentina. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, p. e0005351, 10 fev. 2017.

MOREIRA-SOTO, A. et al. Limited Evidence for Infection of Urban and Peri-urban Nonhuman Primates with Zika and Chikungunya Viruses in Brazil. **mSphere**, v. 3, n. 1, p. 1–10, 28 fev. 2018.

MOUREAU, G. et al. New insights into flavivirus evolution, taxonomy and biogeographic history, extended by analysis of canonical and alternative coding sequences e0117849. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, 2015.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 13–22, jan. 2005.

NARAT, V. et al. Rethinking Human-Nonhuman Primate Contact and Pathogenic Disease Spillover. **EcoHealth**, v. 14, n. 4, p. 840–850, 17 dez. 2017.

NETTO, E. M. et al. High Zika Virus Seroprevalence in Salvador, Northeastern Brazil Limits the Potential for Further Outbreaks. **mBio**, v. 8, n. 6, 14 nov. 2017.

NUNES, M. L. et al. Microcephaly and Zika virus: A clinical and epidemiological analysis of the current outbreak in Brazil. **Jornal de Pediatria**, v. 92, n. 3, p. 230–240, 2016.

NUNES, M. R. T. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, p. 102, 2015.

OLIVEIRA, J. H.; BAHIA, A. C.; VALE, P. F. How are arbovirus vectors able to tolerate infection? **Developmental and Comparative Immunology**, v. 103, n. August 2019, p. 103514, 2020.

OLMO, R. P. et al. Mosquito vector competence for dengue is modulated by insect-specific viruses. **Nature Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 135–149, 2023.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Epidemiological Update for Dengue, Chikungunya and Zika in 2021**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.paho.org/plisa>>.

PANDIT, P. S. et al. Predicting wildlife reservoirs and global vulnerability to zoonotic Flaviviruses. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 5425, 21 dez. 2018.

PAUVOLID-CORRÊA, A. et al. Serological Evidence of Widespread Circulation of West Nile Virus and Other Flaviviruses in Equines of the Pantanal, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 2, 2014a.

PAUVOLID-CORRÊA, A. et al. Serological Evidence of Widespread Circulation of West Nile Virus and Other Flaviviruses in Equines of the Pantanal, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 2, 2014b.

PAUVOLID-CORRÊA, A. et al. Zika Virus Surveillance at the Human – Animal Interface in West-central Brazil, 2017-2018. **Viruses**, p. 2017–2018, 2019.

PETTERSSON, J. H. O.; FIZ-PALACIOS, O. Dating the origin of the genus Flavivirus in the light of Beringian biogeography. **Journal of General Virology**, v. 95, n. PART 9, p. 1969–1982, 2014.

PEZZI, L. et al. GloPID-R report on chikungunya, o'nyong-nyong and Mayaro virus, part 3: Epidemiological distribution of Mayaro virus. **Antiviral Research**, v. 172, n. September, 2019.

PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. The continued threat of emerging flaviviruses. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 6, p. 796–812, 2020.

PLOWRIGHT, R. K. et al. Pathways to zoonotic spillover. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 8, p. 502–510, 2017.

PRETO, R. **Informe Epidemiológico da Dengue segundo mês de ocorrência, 2000 a 2017**. Ribeirão Preto: [s.n.]. Disponível em: <https://www.ribeiraopreto.sp.gov.br/files/ssaude/pdf/distrib-mes_ocorrencia.pdf>.

PRIYAMVADA, L. et al. Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 28, p. 7852–7, 2016.

PROENÇA-MODENA, J. L. et al. Zika virus: lessons learned in Brazil. **Microbes and Infection**, v. 20, n. 11–12, p. 661–669, 2018.

REIS NR DOS, PERACCHI AL, BATISTA CB, R. G. **Primatas do Brasil - Guia de Campo**. 1th. ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

- REISEN, W. K. Epidemiology of St. Louis encephalitis virus. In: **Advances in Virus Research**. [s.l.] Elsevier Inc., 2003. v. 61p. 139–183.
- ROCCO, I. M. et al. St. Louis encephalitis vírus: first isolation from a human in São Paulo state, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, n. 5, p. 281–285, out. 2005.
- ROCHA, T. C.; SVOBODA, W. K.; GOMES, E. C. The importance of investigation of arboviruses in public health: An overview and the role of non-human primates. **Visão Acadêmica**, v. 15, n. 2, p. 97–105, 22 out. 2014.
- RODRIGUES DE ALMEIDA, P. et al. Detection of a novel African-lineage-like Zika virus naturally infecting free-living neotropical primates in Southern Brazil. **BioRxiv**, p. 828871, 2019.
- ROSA, R. et al. Isolation of Saint Louis Encephalitis Virus from a Horse with Neurological Disease in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 11, 2013.
- ROSSI, S. L. et al. Did Zika Virus Mutate to Cause Severe Outbreaks? **Trends in Microbiology**, v. xx, p. 1–9, 2018.
- RUPP, J. C. et al. Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. **Journal of General Virology**, v. 96, n. 9, p. 2483–2500, 2015.
- RYLANDS, A. B.; MITTERMEIER, R. A. **South American Primates**. New York, NY: Springer New York, 2009.
- SACCHETTO, L. et al. Neighbor danger: Yellow fever virus epizootics in urban and urban-rural transition areas of Minas Gerais state, during 2017-2018 yellow fever outbreaks in Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 10, p. e0008658, 5 out. 2020.
- SAIVISH, M. V. et al. Detection of Rocio virus SPH 34675 during dengue epidemics, Brazil, 2011–2013. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 4, p. 797–799, 2020.
- SANTOS, D. O. DOS et al. Histopathologic Patterns and Susceptibility of Neotropical Primates Naturally Infected With Yellow Fever Virus. **Veterinary Pathology**, v. 57, n. 5, p. 681–686, 2020.
- SILVA, L. A.; DERMODY, T. S. Chikungunya virus: Epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 3, p. 737–749, 2017.
- SILVA, N. I. O. et al. Recent sylvatic yellow fever virus transmission in Brazil: The news from an old disease. **Virology Journal**, v. 17, n. 1, p. 1–12, 2020.
- SIMMONDS, P. et al. ICTV virus taxonomy profile: Flaviviridae. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 1, p. 2–3, 2017.
- SINGH, B. B.; WARD, M. P.; DHAND, N. K. Inherent virus characteristics and host range drive the zoonotic and emerging potential of viruses. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 69, n. 4, p. e799–e813, 10 jul. 2022.

SIRONI, V. A.; INGLESE, S.; LAVAZZA, A. The “One Health” approach in the face of Covid-19: how radical should it be? **Philosophy, Ethics, and Humanities in Medicine**, v. 17, n. 1, p. 1–10, 2022.

SKOV, T. et al. Prevalence proportion ratios: estimation and hypothesis testing. **International journal of epidemiology**, v. 27, n. 1, p. 91–5, 1 fev. 1998.

SOUZA, N. P. DE et al. **Aplicação do Estimador de Densidade kernel em Unidades de Conservação na Bacia do Rio São Francisco para análise de focos de desmatamento e focos de calor.**

SUHANA, O. et al. Insight into the origin of chikungunya virus in Malaysian non-human primates via sequence analysis. **Heliyon**, v. 5, n. 12, 2019.

SVOBODA, W. K. et al. Serological evidence for Saint Louis encephalitis virus in free-ranging New World monkeys and horses within the upper Parana River basin region, Southern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 3, p. 280–286, 2014.

TABACHNICK, W. J. Ecological effects on arbovirus-mosquito cycles of transmission. **Current Opinion in Virology**, v. 21, p. 124–131, 2016.

TEICH, V.; ARINELLI, R.; FAHHAM, L. Aedes aegypti e sociedade: o impacto econômico das arboviroses no Brasil. **Jornal Brasileiro de Economia da Saúde**, v. 9, n. 3, p. 267–276, dez. 2017.

TERZIAN, A. C. B. et al. Detection of Saint Louis encephalitis virus in Dengue-suspected cases during a dengue 3 outbreak. **Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 11, n. 3, p. 291–300, 2011.

TERZIAN, A. C. B. et al. Evidence of natural Zika virus infection in neotropical non-human primates in Brazil. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 16034, 30 out. 2018.

TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. et al. NTRODUCTION isolated in the Evandro Chagas Institute, including some described for the first time in the Brazilian Amazon region, their known hosts, and their pathology for man. **An Overview of Arbovirology in Brazil and Neighbouring Countries**, p. 19–31, 1998.

TSETSARKIN, K. A. et al. A single mutation in Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 12, p. 1895–1906, 2007.

TSETSARKIN, K. A. et al. Chikungunya virus: Evolution and genetic determinants of emergence. **Current Opinion in Virology**, v. 1, n. 4, p. 310–317, 2011a.

TSETSARKIN, K. A. et al. Chikungunya virus emergence is constrained in Asia by lineage-specific adaptive landscapes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 19, p. 7872–7877, 2011b.

TSETSARKIN, K. A. et al. Multi-peaked adaptive landscape for chikungunya virus evolution predicts continued fitness optimization in Aedes albopictus mosquitoes. **Nature Communications**, v. 5, n. May, p. 1–14, 2014.

TURMEL, J. M. et al. Late sexual transmission of Zika virus related to persistence in

- the semen. **The Lancet**, v. 387, n. 10037, p. 2501, 2016.
- VALENTINE, M. J. et al. No evidence for sylvatic cycles of chikungunya, dengue and Zika viruses in African green monkeys (*Chlorocebus aethiops sabaeus*) on St. Kitts, West Indies. **Parasites and Vectors**, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2020.
- VALENTINE, M. J.; MURDOCK, C. C.; KELLY, P. J. Sylvatic cycles of arboviruses in non-human primates. **Parasites and Vectors**, v. 12, n. 1, p. 1–18, 2019.
- VANCHIERE, J. A. et al. Experimental Zika Virus Infection of Neotropical Primates. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 98, n. 1, p. 173–177, 10 jan. 2018.
- VASCONCELOS, P. F. C.; CALISHER, C. H. Emergence of Human Arboviral Diseases in the Americas, 2000-2016. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 16, n. 5, p. 295–301, 2016.
- VIGLIETTA, M. et al. **Vector Specificity of Arbovirus Transmission** *Frontiers in Microbiology*, 2021.
- VOSS, J. E. et al. Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. **Nature**, v. 468, n. 7324, p. 709–712, 2010.
- WAGGONER, J. J. et al. Real-time RT-PCR for Mayaro virus detection in plasma and urine. **Journal of Clinical Virology**, v. 98, n. August 2017, p. 1–4, jan. 2018.
- WALKER, J. W. et al. Transmissibility of emerging viral zoonoses. **Plos One**, v. 13, n. 11, p. 1–12, 2018.
- WEAVER, S. C. et al. Annual Review of Medicine Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. n. August 2017, p. 1–14, 2018.
- WOLFE, N. Wild Primate Populations in Emerging Infectious Disease Research: The Missing Link? **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 2, p. 149–158, jun. 1998.
- WU, P. et al. Arbovirus lifecycle in mosquito: acquisition, propagation and transmission. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 21, p. e1, 13 mar. 2019.
- YAKOB, L. Predictable Chikungunya Infection Dynamics in Brazil. **Viruses**, v. 14, n. 9, 2022.
- YUAN, L. et al. A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. **Science**, v. 358, n. 6365, p. 933–936, 2017.
- ZENG, Z. et al. Global, regional, and national dengue burden from 1990 to 2017: A systematic analysis based on the global burden of disease study 2017. **EClinicalMedicine**, v. 32, p. 100712, 2021.

8 ANEXOS

8.1 ANEXO A – Estágio de vida de primatas não humanos de acordo com espécie e peso corporal

Espécies	Estágio de vida		
	Jovens (g)	SubAdultos (g)	Adultos (g)
<i>Callithrix penicillata</i>	≤ 120	121 a 199	≥ 200
<i>Callithrix jacchus</i>	≤ 200	201 a 319	≥ 320
<i>Saguinus midas</i>	≤ 200	201 a 320	≥ 321
<i>Saimiri sciureus</i>	≤ 300	301 a 500	≥ 501
<i>Sapajus spp.</i>	≤ 500	501 a 1500	≥ 1501
<i>Allouata caraya</i>	≤ 2000	2001 a 4999	≥ 5000

Referência: (REIS NR DOS, PERACCHI AL, BATISTA CB, 2015)

8.2 ANEXO B – Espécies de PNH infectados por município e análise de necrópsia.

Espécie	Município	Necrópsia (Avaliação Clínica: Aspectos Macroscópicos)	Vírus
<i>Callithrix penicillata</i>	Ribeirão Preto	Caquexia, macho adulto. Escoriações, fraturas e hemorragia intensa. Possível atropelamento.	SLEV
<i>Callithrix penicillata</i>	Ribeirão Preto	Estado corporal normal. Sem sinais de escoriações. Órgãos internos congestionados e grande volume de sangue. Possível envenenamento.	ZIKV
<i>Alouatta caraya</i>	Ribeirão Preto	Estado corporal normal. Sinais de escoriações e lesões. Possível choque elétrico.	SLEV/ZIKV
<i>Callithrix penicillata</i>	Ribeirão Preto	Estado corporal normal. Sem sinais de escoriações. Intensa hemorragia na cavidade abdominal.	DENV3
<i>Callithrix penicillata</i>	Ribeirão Preto	Estado corporal normal. Sinais de escoriações e lesões. Provável ataque de cão.	SLEV
<i>Callithrix penicillata</i>	Ribeirão Preto	Estado corporal normal. Sinais de escoriações e lesões. Órgãos internos normais. Morte a esclarecer.	ZIKV
<i>Callithrix penicillata</i>	Ribeirão Preto	Estado corporal normal. Fígado friável, esplenomegalia, cor amarronzada e manchas necróticas. Rins e pulmões diminuídos. Pulmões hipocreptantes com bordas necrosadas. Órgãos aderidos à parede e grande quantidade de tecido fibroso.	DENV1
<i>Callithrix penicillata</i>	Ribeirão Preto	Estado corporal normal. Sinais de escoriações e lesões. Órgãos internos normais. Morte por trauma no tórax.	ZIKV
<i>Callithrix penicillata</i>	Ribeirão Preto	Estado corporal normal. Sinais de escoriações e lesões. Hematoma no crânio. Órgãos internos normais. Morte por trauma no crânio.	ZIKV/DENV3

<i>Callithrix penicillata</i>	Ribeirão Preto	Estado corporal normal. Hematoma no crânio. Morte por ruptura de órgãos e esmagamento do crânio por atropelamento.	ZIKV
<i>Callithrix penicillata</i>	Ribeirão Preto	Estado corporal normal. Fígado e estômago congestos. Fígado com bordas necróticas e vesícula biliar vazia. Pulmões hemorrágicos e volume diminuídos.	ZIKV
<i>Callithrix penicillata</i>	São Carlos	NA	SLEV
<i>Callithrix penicillata</i>	São Carlos	NA	YFV
<i>Saguinus midas</i>	São Carlos	NA	SLEV
<i>Saguinus midas</i>	São Carlos	NA	SLEV
<i>Alouatta caraya</i>	Catanduva	NA	SLEV
<i>Alouatta caraya</i>	Catanduva	NA	SLEV/ZIKV
<i>Callithrix penicillata</i>	Catanduva	NA	SLEV
<i>Callithrix penicillata</i>	Catanduva	NA	SLEV
<i>Callithrix penicillata</i>	Catanduva	NA	SLEV
<i>Callithrix penicillata</i>	Catanduva	NA	SLEV
<i>Sapajus apella</i>	Catanduva	NA	DENV1
<i>Sapajus apella</i>	Catanduva	NA	SLEV
<i>Sapajus apella</i>	Catanduva	NA	SLEV
<i>Sapajus apella</i>	Catanduva	NA	SLEV
<i>Sapajus apella</i>	Catanduva	NA	DENV2
<i>Sapajus apella</i>	Catanduva	NA	SLEV
<i>Callithrix penicillata</i>	Ribeirão Preto	Caquexia, com lesões na cauda e cabeça. Morte por trauma por agressão.	ZIKV

Callithrix penicillata	Ribeirão Preto	Animal aparentemente saudável. Queimaduras severas. Morte por Choque elétrico.	ZIKV
Alouatta caraya	Ribeirão Preto	Estado corporal normal. Órgãos internos aspectos normais. Trauma craniano e queimaduras. Morte por traumatismo e queimaduras por fio de alta tensão e queda.	ZIKV

NA = não se aplica; DENV = vírus da dengue, SLEV = vírus da encefalite de Saint Louis, ZIKV = vírus Zika, YFV = vírus da febre amarela

8.3 ANEXO C – Análise descritiva dos dados eco-epidemiológicos

Descritivas		
Variável	Número de PNH	Percentual
<i>Ano</i>		
2017	84	33,87
2018	139	56,05
2019	15	6,05
2020	10	4,03
<i>Estação</i>		
chuvosa	79	31,85
seca	169	68,15
<i>Cidade</i>		
barrinha	9	3,63
catanduva	16	6,45
cravinhos	6	2,42
ribeirão	201	81,05
rio preto	7	2,82
sanca	7	2,82
sertão	2	0,81
<i>Vegetação</i>		
bush	209	84,27
ciliar	2	0,81
galeria	4	1,61
semidecídua	33	13,31
<i>Coleta</i>		
cativeiro	56	22,58
morto	177	71,37

toma Hawk	15	6,05
<u>Sexo</u>		
femea	128	51,61
macho	120	48,39
<u>Idade</u>		
adulto	211	85,08
jovem	24	9,68
sub	13	5,24
<u>Ferimentos</u>		
não	149	60,08
sim	99	39,92
<u>Espécie</u>		
<i>Sapajus apella</i>	10	4,03
<i>Alouatta caraya</i>	12	4,84
<i>Callithrix geoffroyi</i>	1	0,4
<i>Alouatta guariba</i>	1	0,4
<i>Callithrix jacchus</i>	1	0,4
<i>Sapajus libidinosus</i>	7	2,82
<i>Saguinus midas</i>	4	1,61
<i>Callithrix penicillata</i>	209	84,27
<i>Saimiri sciureus</i>	1	0,4
<i>Sapajus sp</i>	2	0,81
<u>Pcr flavi</u>		
Negativo	218	87,9
Positivo	30	12,1
<u>Dengue 1</u>		
Negativo	246	99,19

Positivo	2	0,81
<i>Dengue 2</i>		
Negativo	247	99,6
Positivo	1	0,4
<i>Dengue 3</i>		
Negativo	246	99,19
Positivo	2	0,81
<i>Dengue 4</i>		
Negativo	248	100
<i>YFV</i>		
Negativo	247	99,6
Positivo	1	0,4
<i>ZIKAV</i>		
Negativo	238	95,97
Positivo	10	4,03
<i>SLEV</i>		
Negativo	232	93,55
Positivo	16	6,45
<i>WNV</i>		
Negativo	248	100
<i>ILHEUS</i>		
Negativo	248	100
<i>ROC</i>		
Negativo	248	100

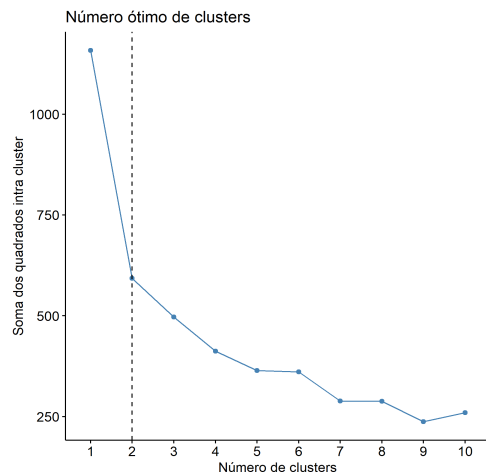
Variável	n	Média	Desvio-padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
Massa	246	723,65	1203,8	360	40	8340

Tamanho total	198	587,93	565,94	540	0	8200
Tamanho entre cauda e corpo	72	380,11	214,16	230	60	1000
Cauda	232	310,67	93,68	310	0	660
Antebraço	232	55,59	28,07	50	0	175
Pata com unha	230	71,59	39,49	65	0	540
Orelha	231	25,71	8,14	25	0	60

8.4 ANEXO D – Caracterização da análise de clusters

Especificamente para a análise de cluster, inicialmente os dados foram normalizados, uma vez que possuíam diferentes escalas de medidas.

Para determinar o número ótimo de clusters da classificação, usamos um gráfico da soma dos quadrados intragrupos, por número de clusters extraídos (obtido através da função `fviz_nbclust` do R). O número ótimo de clusters a ser usado está na curva ou no "cotovelo" do gráfico. Dessa forma, pelo gráfico abaixo é possível verificar que o número ótimo de clusters para a amostra é 2. Isto porque novos clusters acima de 2 possuem baixo ganho para aumentar a diferenciação dos demais.



Utilizamos o pacote `NbClust` do R, que fornece 30 índices que determinam o número de clusters em um conjunto de dados, a maioria das regras apontou $k=2$ como sendo o melhor número de cluster para classificação

8.5 ANEXO E – Relação das variáveis de interesse com a infecção viral em primatas não humanos

Fator	Bruto				Ajustado1 (n=194)				Ajustado2 (n=184)			
	Razão de prevalência	Intervalo de confiança (95%)	Valor-p		Razão de prevalência	Intervalo de confiança (95%)	Valor-p		Razão de prevalência	Intervalo de confiança (95%)	Valor-p	
Cluster (1 vs 2)	0,22	0,11	0,46	<0,01	0,22	0,10	0,47	<0,01	1,30	0,58	2,95	0,53
Ferimentos (Não vs Sim)	1,08	0,50	2,34	0,85	0,92	0,44	1,96	0,84	1,03	0,50	2,11	0,94
Sexo (Fêmea vs Macho)	0,92	0,43	1,98	0,82	0,79	0,37	1,68	0,54	0,68	0,33	1,41	0,30
Idade (Adulto vs Jovem)	1,90	0,27	13,28	0,52	1,76	0,32	9,49	0,51	1,48	0,29	7,47	0,63
Idade (Adulto vs Sub)	0,60	0,16	2,20	0,44	0,76	0,22	2,66	0,67	0,58	0,15	2,27	0,44
Idade (Jovem vs Sub)	0,31	0,03	3,01	0,31	0,43	0,06	3,33	0,42	0,39	0,05	3,29	0,39
apella vs caraya	1,80	0,70	4,64	0,22					1,53	0,48	4,84	0,47
apella vs penicillata	7,16	3,51	14,59	<0,01					9,51	4,39	20,58	<0,01
caraya vs penicillata	3,98	1,55	10,22	<0,01					6,22	1,79	21,57	<0,01

* Para analisar a espécie, foram excluídas todas as que não tiveram nenhuma infecção, para assim ser possível a estimação da razão de prevalência.

8.6 ANEXO F – Relação dos primatas não humanos coletados e infectados por região de coleta

Local de coleta	PNH coletados	PNH infectados
Ribeirão Preto	229	14
Ribeirão Preto (confinados)	26	0
São Carlos	7	4
Barrinha	9	0
Catanduva	16	12
São José do Rio Preto	7	0
Cravinhos	6	0
Sertãozinho	1	0
Total	301	30

8.7 ANEXO G - Relação dos primatas não humanos coletados e infectados da cidade de Ribeirão Preto Relação das variáveis de interesse com a infecção pelo vírus (de forma geral)

Variáveis	Bruto			Ajustado1 (n=135) *				
	Razão de prevalência	Intervalo de confiança (95%)		Valor-p	Razão de prevalência	Intervalo de confiança (95%)		Valor-p
<i>Cluster</i> (1 vs 2)	0,50	0,07	3,80	0,50	0,75	0,19	3,01	0,68
Ferimentos (Não vs Sim)	1,01	0,31	3,36	0,98	0,89	0,26	3,07	0,86
Sexo (Fêmea vs Macho)	0,69	0,20	2,36	0,56	0,73	0,21	2,50	0,62
Idade (Adulto vs Sub)	0,42	0,06	2,79	0,37	0,38	0,08	1,94	0,25

*Os dados com PNH de idade jovem foram excluídos, uma vez que esses animais não apresentaram infecção, não sendo possível a estimação da razão de prevalência.

8.8 ANEXO H – Artigos provenientes do estudo

CULOT, L. et al. ATLANTIC-PRIMATES: a dataset of communities and occurrences of primates in the Atlantic Forests of South America. **Ecology**, v. 100, n. 1, p. 1–149, 16 jan. 2019.

Rosa CA da, Ribeiro BR, Bejarano V, Puertas FH, Bocchiglieri A, Barbosa AL dos S, et al. NEOTROPICAL ALIEN MAMMALS: a data set of occurrence and abundance of alien mammals in the Neotropics. **Ecology**. 2020;101. doi:10.1002/ecy.3115.

8.9 ANEXO I – Impacto do estudo na mídia

1. Entrevista Jornal de São José do Rio preto.



2. Entrevista para G1 da região de São José do Rio Preto e Catanduva



Macacos do zoológico de Catanduva fazem parte de pesquisa da USP

Biólogos estão colhendo sangue dos animais para identificar o risco que a região noroeste paulista corre com a dengue, vírus da zika e principalmente a febre amarela.

Por G1 Rio Preto e Araçatuba
19/05/2018 19h31 · Atualizado há 4 anos



Macacos do zoológico de Catanduva participam de pesquisa da USP

3. Entrevista para a rádio CBN

QUARTA-FEIRA, 13 DE JUNHO DE 2018 ÀS 11:43

Pesquisa vai mapear circulação dos vírus zika, dengue e chikungunya

Estudo consiste em colher material biológico de macacos aparentemente saudáveis, mas que podem estar infectados. Zoológico de Rio Preto integra o projeto. Foto: Fabrício Spatti

 DURAÇÃO: 03:52



4. Entrevista para jornal Diário da Região

Diário da Região Gráfica da Região Classificados Diário+ Portal do Assinante Publicidade legal Edição Impressa

MENU BUSCAR DIÁRIO DA REGIÃO FALE CONOSCO ENTRAR ASSINAR

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO | QUINTA-FEIRA, 22 DE DEZEMBRO DE 2022

Cidades Política Economia Cultura Esportes Podcasts Diário Multi

USP pesquisa macacos no zoológico de Rio Preto

Equipe analisa amostras de sangue e saliva de macacos do zoo de Rio Preto, dentro do plano de ação para definir zonas de risco com maior circulação de arbovírus, entre eles os que transmitem zika e dengue

Tatiana Pires
Publicado em 12/06/2018 às 00:30
Atualizado em 08/07/2021 às 07:27