



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

**Caracterização do viroma fecal do sauí-de-coleira,
Saguinus bicolor (Primates: Callitrichidae), de vida livre.**

Aline Ramos Souza

Manaus, Amazonas

Dezembro de 2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

**Caracterização do viroma fecal do sauím-de-coleira,
Saguinus bicolor (Primates: Callitrichidae), de vida livre.**

Discente: Aline Ramos Souza

Orientador: Dr. Marcelo Gordo (UFAM)

Coorientador: Dr. André Felipe Andrade dos Santos (UFRJ)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia, da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Zoologia.

Manaus, Amazonas

Dezembro de 2021

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S729c Souza, Aline Ramos
Caracterização do viroma fecal do sauí-de-coleira, *Saguinus bicolor* (Primates: Callitrichidae), de vida livre. / Aline Ramos Souza . 2021
127 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Marcelo Gordo
Coorientador: André Felipe Andrade dos Santos
Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Amazônia central. 2. Espécie ameaçada. 3. Primata neotropical. 4. Sequenciamento massivo. 5. Vírus. I. Gordo, Marcelo. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

AGRADECIMENTOS

Sou bastante grata a diversas pessoas, desde àquelas que contribuíram para a realização direta ou indireta deste trabalho, como às que me deram suporte pessoal e emocional para seguir na esperança de dias melhores. Aqui colocarei apenas um pequeno recorte das pessoas importantes.

Primeiramente, agradeço imensamente à minha família, aos meus pais (Rose e Clodomir) e aos meus irmãos (Gabriela e Gabriel), que mesmo na distância física sempre me deram forças.

Ao meu companheiro, Igor Roberto, que além de suporte pessoal, sempre me auxilia profissionalmente. Tenho muito orgulho de compartilhar a vida com ele. Agradeço também aos meus sogros (Nair e Fernando) que sempre nos apoiaram em nossas decisões.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia, incluindo todos os professores e o secretário Gildázio (Gil), por ser uma pessoa altamente prestativa com os alunos. E agradeço imensamente ao nosso querido coordenador, Prof. Marcelo Menin (*in memoriam*), que foi uma inspiração de profissional dedicado e competente.

Ao meu orientador, Professor Marcelo Gordo, uma pessoa bastante acessível e querida pelos seus orientandos. Sou grata por ter me dado a oportunidade de trabalhar com essa espécie incrível e por ter me inserido no Projeto Sauim-de-Coleira.

Agradeço ao meu coorientador, Professor André dos Santos, pela ideia do projeto e por todo o apoio financeiro para as atividades laboratoriais.

Agradeço imensamente à Professora Mirela D'arc pela total disponibilidade em passar seu conhecimento, pelo grande apoio nas atividades laboratoriais, de bioinformática e suporte na elaboração desta dissertação.

Às integrantes da banca examinadora da qualificação do meu projeto de mestrado, Dra. Alessandra Nava, Dra. Luciane de Souza e Dra. Izeni Pires. E aos integrantes da banca examinadora da minha dissertação, Dra. Izeni Pires e Dr. Alcides Pissinatti, que contribuíram para a correção e melhoria de alguns tópicos deste trabalho.

Aos amigos do Projeto Sauim-de-Coleira que desde o início me fizeram sentir em casa. Em especial aos que trabalharam para que as capturas e procedimentos com os sauins se realizassem da melhor forma: Aline Medeiros, Edson Rodrigues, Igor Pedrosa e Tainara Sobroza (sou grata a Tai também pela companhia compartilhada nas atividades de campo). E aos demais que sempre estiveram pelo projeto auxiliando no trabalho com os animais: Érica Vale, Breno Pires, Adna Gomes, Raiclícia Nayara e Jéssica Tavares.

Aos integrantes do Laboratório de Diversidade e Doenças Virais que foram receptivos e me deram suporte quando necessário nas semanas que estive lá, em especial à Thamires Miranda que me recebeu com super carinho em sua casa.

Às amigas de Manaus e Fortaleza, em especial as que foram mais presentes nos últimos anos: Amanda Picelli, Camila Ramos, Carol Bertsch, Cybelli Barbosa, Elane Conde, Renata Alexandre e Vanessa Noronha.

Aos amigos e casal mais prestativo dessa vida, Valéria Santos e Alexandre Almeida, que sempre me apoiaram de diversas formas, desde o auxílio de material de laboratório, como logístico para envio das amostras biológicas via aérea, como um apoio pessoal.

Agradeço bastante a todos os colaboradores locais que auxiliaram nas atividades de ceva de alguns grupos de sauins (Tarumã e Puraquequara). Aos responsáveis por liberar nossas atividades de campo no CIGS, Parque Estadual do Sumaúma e Reserva Adolpho Ducke, desta última também agradeço aos seguranças que sempre foram bastante solícitos com a equipe quando em campo.

À CAPES pela bolsa concedida para a realização de meu mestrado.

Agradeço ao Projeto Universal da FAPEAM concedido ao Prof. Dr. Marcelo Gordo.

Agradeço aos sauins-de-coleira, animais tão resilientes que estão resistindo nessa selva de pedras chamada Manaus.

RESUMO

As perturbações antropogênicas em ambientes naturais estão levando a diversas alterações na ecologia global das doenças, com ênfase para aquelas de origem viral. O estudo dos vírus que ocorrem na fauna selvagem é de suma importância, pois diversas doenças de interesse para a saúde pública são de origem zoonótica, sendo os primatas reservatórios de uma gama desses vírus. Com o advento de novas tecnologias, como o sequenciamento massivo (HTS – do inglês *high throughput sequencing*), os viromas de diversas espécies de animais selvagens estão sendo caracterizados, entretanto, ainda são escassos os trabalhos neste contexto de primatas selvagens brasileiros. O sauí-de-coleira (*Saguinus bicolor*), primata Criticamente Ameaçado e endêmico do Amazonas, possui populações inseridas em uma área com crescente urbanização e intensa fragmentação florestal, além de habitar áreas sobrepostas com outras espécies de primatas, como o mico-de-cheiro (*Saimiri sciureus*). Diante disto, é importante conhecer a composição da microbiota viral desses animais, como uma estratégia de vigilância precoce importante no contexto da saúde única e da conservação das espécies. Os objetivos deste trabalho foram: (a) Investigar o viroma fecal de *Saguinus bicolor* de fragmentos florestais de Manaus; (b) Comparar a riqueza e diversidade do viroma de um grupo de *Saguinus bicolor* e de um grupo de *Saimiri sciureus*, inseridos no mesmo fragmento florestal. Realizada a coleta de conteúdo fecal de nove grupos de saúins-de-coleira de vida livre de fragmentos de Manaus, as amostras de cada grupo foram reunidas para compor um *pool*, seguido pelo sequenciamento massivo e utilização de dois métodos de bioinformática (BLASTx e Kraken) para a caracterização do viroma a nível de famílias virais, com ênfase em vírus de importância para mamíferos. Os dados gerados pelo Kraken foram utilizados para normalização. Os métodos de bioinformática apresentaram grande divergência, sendo o Kraken a ferramenta que identificou em nível de famílias virais a maior diversidade de vírus, inclusive daqueles de importância para mamíferos (29 famílias dos dados brutos), enquanto o BLASTx identificou apenas cinco famílias. Os dados gerados pelo Kraken mostraram que muitas das comunidades virais foram distintas entre os grupos, sugerindo que a composição do viroma desses animais pode estar relacionada com diversas variáveis, desde individuais até ambientais. No capítulo seguinte, foi feita a coleta de esfregaços retais e amostras fecais de um grupo de *Saguinus bicolor* e de um grupo de *Saimiri sciureus*, seguido pelo sequenciamento massivo e caracterização do viroma a nível de famílias de vírus de importância para mamíferos. O grupo de saúins-

de-coleira apresentou maior riqueza de famílias virais de importância para mamíferos, apresentando após normalização dos dados um total de 18 famílias, enquanto os micos-de-cheiro apresentaram 16 famílias, com compartilhamento de 12 famílias virais para ambos os grupos. O material fecal mostrou maior riqueza quando comparado aos esfregaços retais. Os viromas dos grupos de primatas estudados mostraram que esses animais podem abrigar uma grande variedade de famílias virais de importância para infecções de mamíferos. Diante disso, é necessário realizar o aprofundamento das pesquisas nessas famílias virais para verificar se os vírus que estão ocorrendo nesses animais são de importância patogênica para a conservação da espécie e para a saúde pública.

Palavras-chave: Amazônia central. Espécie ameaçada. Primata neotropical. Sequenciamento massivo. Vírus.

ABSTRACT

Anthropogenic disturbances in natural environments are leading to several changes in the global ecology of diseases, with emphasis on those of viral origin. The study of viruses in wild fauna is of paramount importance. Several viral diseases of public health concern have zoonotic origin, and primates are important reservoirs. With the advent of new technologies such as massive sequencing (HTS - high throughput sequencing), viromes of several species of wild animals are being characterized, however, there are still few works with wild Brazilian primates. The pied tamarin (*Saguinus bicolor*), is a Critically Endangered primate endemic to the Amazon, occurring in small forest fragments with intense urbanization and habitat loss. It also occurs in syntopy with other primate species, such as the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). In this view, it is important to know the composition of the viral microbiota of these animals, as an important early surveillance strategy in the context of unique health and species conservation. The goals of this study are: (a) To investigate the fecal virome of *Saguinus bicolor* from forest fragments in the city of Manaus, central Amazon; (b) To compare the virome richness and diversity of a group of *Saguinus bicolor* and a group of *Saimiri sciureus*, inserted in the same forest fragment. After collecting the fecal content of nine groups of free-living pied tamarins from Manaus, samples from each group were pooled, followed by massive sequencing and the use of two bioinformatics methods (BLASTx and Kraken) for characterization of the virome at the level of viral families, with emphasis on viruses of importance to mammals. The data generated by Kraken was used for normalization. The bioinformatics methods showed great divergence. Kraken identified the greatest diversity of viruses at the level of viral families, including those of importance to mammals (29 families from the raw data), while BLASTx identified only five families. The data generated by Kraken showed that many of the viral communities were distinct between groups, suggesting that the virome composition of these animals may be related to several variables, from individual to environmental. In the next chapter, rectal smears and fecal samples were collected from a group of *Saguinus bicolor* and a group of *Saimiri sciureus*, followed by massive sequencing and characterization of the virome at the level of virus families of importance to mammals. The group of pied tamarins showed a greater richness of viral families of mammals' importance., presenting, after normalization of the data, a total of 18 families, while the squirrel monkey had 16 families. 12 viral families were shared with both species. Fecal material showed greater richness when compared to rectal in

the squirrel monkey. The viromes of the two primate species showed a wide variety of viral families of importance for mammalian infections. Further research on these viral families are necessary to verify whether the viruses that are occurring in these animals are of pathogenic importance for the conservation of the species and for public health.

Keywords: Central Amazon. Endangered species. Neotropical primate. Massive sequencing. Viruses.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Mapa de Manaus com os pontos de amostragem dos grupos de *Saguinus bicolor*..... 74
- Figura 2.** Abundância total padronizada do viroma no agrupamento de famílias virais associadas a mamíferos, bactérias e outros vírus (plantas, fungos, invertebrados e outros vertebrados) (A) do agrupamento de todos os grupos examinados e (B) separada por grupo examinado..... 75
- Figura 3.** (A) Valores normalizados da família viral *Poxviridae*, que representou a mais abundante em todos os grupos examinados. (B) Abundância dos outros vírus associados a infecções de mamíferos gerados..... 76
- Figura 4.** Cluster de similaridade de Jaccard dos grupos de *Saguinus bicolor*, considerando a composição das comunidades de famílias virais..... 77

CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Riqueza de famílias virais de importância para mamíferos presentes nos grupos de saim-de-coleira (*Saguinus bicolor*) e mico-de-cheiro (*Saimiri sciureus*) de acordo com o método de coleta..... 121
- Figura 2.** Abundância normalizada das famílias virais de importância para mamíferos nos grupos de saim-de-coleira (*Saguinus bicolor*) e mico-de-cheiro (*Saimiri sciureus*) de acordo com o método de coleta..... 122

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Informações gerais sobre os grupos de <i>S. bicolor</i> trabalhados, com data de coleta, tamanho do grupo e coordenadas em graus decimais.....	69
Tabela 2. Descrição por grupo dos resultados do sequenciamento massivo e das leituras filtradas reconhecidas para vírus nas ferramentas BLASTx e Kraken.....	70
Tabela 3. Valores de abundância relativa normalizado dos vírus associados a infecções de mamíferos gerados na análise pelo Kraken.....	71
Tabela 4. Valores de riqueza e diversidade dos vírus de mamíferos dos grupos de <i>S. bicolor</i>	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitros
°C	Graus Celsius
AM	Amazonas
DIE's	Doenças Infecciosas Emergentes
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAc	DNA complementar
dsDNA	DNA de fita dupla
EUA	Estados Unidos da América
g	Gramma
h	Hora
HTS	Sequenciamento Massivo
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IUCN	União Internacional para a Conservação da Natureza
LDDV	Laboratório de Diversidade e Doenças Virais
min	Minuto
mL	Mililitros
MMA	Ministério do Meio Ambiente
RNA	Ácido Ribonucleico
RPM	Rotações por minuto
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PN	Primatas Neotropicais
PVM	Primatas do Velho Mundo
SARS-CoV	Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus
Seg	Segundo
SSC	Comissão de Sobrevivência de Espécies
U	Unidade
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	14
REFERÊNCIAS.....	22
OBJETIVOS.....	31
CAPÍTULO 1.....	32
1. INTRODUÇÃO.....	34
2. MÉTODOS.....	37
2.1. Aspectos éticos.....	37
2.2. Áreas de estudo.....	37
2.3. Coleta das amostras.....	37
2.4. Preparação das amostras.....	39
2.5. Extração dos ácidos nucleicos.....	40
2.6. Preparação das bibliotecas.....	41
2.7. Bioinformáticas.....	41
2.8. Abundância e diversidade viral.....	43
3. RESULTADOS.....	44
3.1. Visão geral dos dados de sequência.....	44
3.1.1. BLATx.....	45
3.1.2. Kraken.....	45
3.2. Diversidade e abundância de vírus de mamíferos.....	46
3.3. Variação na diversidade viral e efeitos da distância geográfica.....	47
4. DISCUSSÃO.....	48
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57
6. AGRADECIMENTOS.....	57
7. REFERÊNCIAS.....	59
TABELAS.....	69
FIGURAS.....	73
INFORMAÇÕES SUPLEMENTARES.....	78
CAPÍTULO 2.....	110
REFERÊNCIAS.....	117
FIGURAS.....	120
INFORMAÇÕES SUPLEMENTARES.....	123
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	127

INTRODUÇÃO GERAL

Cerca de 26% das espécies de mamíferos selvagens catalogadas e avaliadas até o momento estão inseridas em alguma categoria de ameaça de extinção (IUCN, 2021). Esse cenário é impulsionado por diversos fatores, desde a perda de habitat à disseminação de novos patógenos (CHAPMAN *et al.*, 2005; GILLESPIE *et al.*, 2008; PONGSIRI *et al.*, 2009; MATHEWS, 2009). Nas últimas décadas, várias pesquisas vêm demonstrando que as doenças infecciosas estão surgindo em altas taxas na fauna selvagem (SMITH; SAX; LAFFERTY, 2006; JOHNSON *et al.*, 2020). Esse aumento pode estar ligado às pressões antropogênicas de um mundo em urbanização, crescimento geral da população, conversão de terra para práticas agrícolas, desmatamento, dentre outros fatores (COOK; KARESH, 2008; SUZÁN *et al.*, 2008; DEVAUX *et al.*, 2019). O conjunto dessas perturbações nos ambientes naturais está levando a diversas alterações, inclusive na ecologia global de muitas doenças (PONGSIRI *et al.*, 2009; MOLINA *et al.*, 2019).

A modificação nas características da paisagem e fragmentação dos habitats contribui diretamente no aumento da frequência do contato entre as populações de animais selvagens, humanos e animais domésticos, aumentando assim o potencial de transmissão interespecífica de patógenos (PATZ *et al.*, 2004; CHAPMAN *et al.*, 2005; GILLESPIE; CHAPMAN, 2008; KEESING *et al.*, 2010; SUZÁN *et al.*, 2008; MARSH *et al.*, 2013; CAMPOS, 2016). Essas alterações são um grande problema para a saúde pública, uma vez que os animais selvagens podem servir como reservatórios ou hospedeiros intermediários de patógenos de importância zoonótica (MARSH *et al.*, 2013).

Dentre os patógenos zoonóticos de maior importância, se encontram os vírus (do latim *virus*, “veneno”), que são membros de uma classe única de agentes infecciosos que contém o ácido nucleico inserido em uma matriz proteica que forma o capsídeo e que dependem de células vivas para replicação (QUINN *et al.*, 2005), sendo as entidades biológicas mais abundantes na Terra (GUERRERO-LATORRE *et al.*, 2018). Esses agentes também são um dos principais causadores de surtos de doenças na vida selvagem e daquelas de importância para a saúde humana, constituindo 25,4% das doenças infecciosas emergentes (DIEs) (JONES *et al.*, 2008; PETERSEN *et al.*, 2018), ou seja, doenças recentemente identificadas na população humana, recém-introduzidas, recém-evoluídas ou que mudaram recentemente e rapidamente em termos de incidência, expansão geográfica, hospedeiro ou vetor (CAVALCANTE, 2019). Os eventos de DIEs são dominados por

zoonoses (60,3%), sendo a sua maioria (71,8%) originários na vida selvagem (JONES *et al.*, 2008; MATHEWS, 2009; FIELD, 2009). Como exemplo temos os surtos ocasionados pelos vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês *human immunodeficiency virus*) (PEETERS; JUNG; AYOUBA, 2013), Ebola (SAÉZ *et al.*, 2015), hantavírus (JIANG *et al.*, 2017), vírus Nipah (FIELD *et al.*, 2001), vírus do Nilo Ocidental (LANCIOTTI *et al.*, 1999), vírus da influenza aviária (DE JONG *et al.*, 1997), zika vírus (VENTETR, 2018), os coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV, do inglês *severe acute respiratory syndrome coronavirus*) (PEIRIS; GUAN; YUEN, 2004), da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS, do inglês *middle east respiratory syndrome*) (CHAN *et al.*, 2015) e, atualmente, da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2) (ZHOU *et al.*, 2020; XIAO *et al.*, 2020). É importante salientar que esses surtos ocasionados pelas DIES destacam a importância das mudanças demográficas, viagens, comércio globais e alterações climáticas como possíveis motivadores para a sua emergência (PETERSEN *et al.*, 2018).

Dentre a grande diversidade viral, os vírus de RNA se destacam, sendo mais perigosos por apresentarem taxas altas de substituição de nucleotídeos, baixa capacidade de correção de erros e grande capacidade de adaptação a novos hospedeiros, incluindo aos humanos (JONES *et al.*, 2008). É o caso da recente pandemia ocasionada pelo coronavírus, SARS-CoV-2, agente que causa a COVID-19 (do inglês, *Coronavirus Disease 2019*). Os primeiros casos dessa doença foram registrados em dezembro de 2019 em Wuhan, na China (ZHU *et al.*, 2020), e se expandiu para todo o mundo, provocando desafios críticos em diversos setores sociais, da saúde pública, da pesquisa científica, da comunidade médica e da economia, sendo considerada pela Organização Mundial de Saúde como uma doença emergente de interesse internacional (FAUCI; LANE; REDFIELD, 2020; LAPPAN *et al.*, 2020; WACHARAPLUESADEE *et al.*, 2021). O SARS-CoV-2 aparentemente teve sucesso em fazer sua transição de animais para humanos no mercado de frutos do mar de Wuhan (VELAVAN; MEYER, 2020), porém sua origem ainda permanece não resolvida (WACHARAPLUESADEE *et al.*, 2021), sendo os morcegos-ferradura (gênero *Rhinolophus*) os prováveis hospedeiros naturais (ZHOU *et al.*, 2020; STOUT *et al.*, 2020). Os pangolins-malaios (*Manis javanica*) e outras espécies animais negociados nos mercados de animais vivos (LAM *et al.*, 2020; ZHANG; WU; ZHANG, 2020, XIAO *et al.*, 2020) foram implicados como possíveis hospedeiros intermediários da

transmissão viral, entretanto, ainda não existe um consenso científico sobre isso (STOUT *et al.*, 2020).

Essa atual pandemia nos mostra que o conhecimento dos patógenos infecciosos emergentes e reemergentes é um grande desafio, e há a necessidade de vigilância constante e pesquisa robusta para compreender a biologia de novos organismos (FAUCI; LANE; REDFIELD, 2020). Segundo Carroll *et al.* (2018), a nossa capacidade de mitigar o surgimento de doenças é prejudicada pela nossa falta de compreensão da diversidade e ecologia das ameaças virais e dos fatores que levam ao seu surgimento. Por conta disso, as pesquisas de infecções virais na fauna selvagem são de suma importância, sendo a vigilância ativa indispensável na prevenção do surgimento de doenças, pois, assim, pode-se identificar áreas de risco antes que elas se tornem uma ameaça à saúde humana e animal (NAVA *et al.*, 2017). Além disso, permite aprimorar nossa compreensão da ecologia viral e dos mecanismos de surgimento de doenças, fornecendo informações que poderão reduzir a morbidade e a mortalidade, acelerando o reconhecimento e a intervenção (ANTHONY *et al.*, 2013). Por exemplo, com informações sobre os patógenos de diferentes espécies hospedeiras, o esforço poderia se concentrar na amostragem de indivíduos de espécies mais centrais para vírus com taxas de mutação mais altas, como vírus de RNA, que têm maior potencial de propagação para humanos e outros animais selvagens e domésticos (GÓMEZ; NUNN; VERDÚ, 2013).

Essas pesquisas são de suma importância no contexto de saúde única, que é definido pela *One Health High Level Expert Panel* (OHHLEP) como “uma abordagem integrada e unificadora que visa equilibrar e otimizar de forma sustentável a saúde de pessoas, animais e ecossistemas, reconhecendo que a saúde dos seres humanos, animais domésticos e selvagens, plantas e o meio ambiente mais amplo (incluindo ecossistemas) estão intimamente ligados e interdependentes” (WHO, 2021).

Apesar dos avanços notáveis alcançados no campo da epidemiologia, patogênese e controle de doenças virais, a emergência de novas doenças em populações animais e humanas em menor escala temporal acarreta novos desafios para a pesquisa desses organismos (QUINN *et al.*, 2005). Além disso, a caracterização dos eventos de transmissão de patógenos de animais selvagens para humanos ainda é um importante desafio científico dificultado pelas limitações de detecção de patógenos em espécies selvagens (JOHNSON *et al.*, 2020), tanto pelas técnicas diagnósticas tradicionais, como pela dificuldade em acessar esses animais em seu habitat natural.

O uso de métodos diagnósticos como o isolamento viral, apesar de muito importante para a história da virologia, pode ser limitado, não gerando resultados satisfatórios, pois são diversos os vírus que não crescem em culturas por conta da ausência de linhagens celulares suscetíveis (GE *et al.*, 2012). Com o desenvolvimento de novas tecnologias moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*), o número de vírus reconhecidos aumentou. Porém, para a sua utilização, é necessário conhecimento prévio da sequência viral a fim de realizar o desenho dos oligonucleotídeos para realização da técnica, o que limita principalmente a descoberta de novos vírus (VIRGIN; WHERRY; AHMED, 2009; VICTORIA *et al.*, 2009; CAVALCANTE, 2019).

Novos métodos, entretanto, conseguem identificar uma maior quantidade de vírus, ou toda a coleção viral de uma amostra, chamado viroma (VIRGIN; TODD, 2011). Do ponto de vista clínico, o viroma pode ser definido como a soma de todos os vírus existentes nos tecidos do hospedeiro ou o componente viral do microbioma, não sendo necessário que os vírus estejam causando infecções agudas, persistentes ou latentes (LECUIT; ELOIT, 2013; VIRGIN, 2014; MOREIRA, 2016). O desenvolvimento do protocolo para a caracterização do viroma só foi possível devido ao estabelecimento do sequenciamento de nova geração (NGS – do inglês *next generation sequencing*) ou sequenciamento massivo (HTS – do inglês *high throughput sequencing*), que permitiu o sequenciamento de um grande volume de pares de bases nucleicos, aumentando a escala das análises genômicas, sequenciando e genotipando milhares de regiões e genomas de interesse em um único passo, sem a necessidade do conhecimento prévio da sequência (CAVALCANTE, 2019; CHRISTOFF, 2017; PAIM *et al.*, 2019). Esse método tem a capacidade de captar comunidades virais em um grande número de amostras, sem expectativas anteriores sobre quais táxons serão detectados, podendo identificar desde vírus conhecidos a novos que ainda não foram identificados (LECUIT; ELOIT, 2013; VIRGIN, 2014; BERGNER *et al.*, 2019).

Prevê-se que com o uso da técnica de HTS, o conhecimento da diversidade genética viral presente em diferentes ambientes (RASTROJO; ALCAMÍ, *et al.*, 2017; GUERRERO-LATORRE *et al.*, 2018) e nas espécies hospedeiras, o número de agentes não caracterizados anteriormente reconhecidos, inclusive nos animais silvestres, cresça rapidamente à medida que o uso dessa tecnologia se expanda (MANSFIELD; SASSEVILLE; WESTMORELAND, 2014; LOJKIĆ *et al.*, 2016). Sendo assim, o uso de amplificação independente de sequência de ácidos nucleicos virais para metagenômica

viral tem a capacidade de detectar com sensibilidade táxons que não são especificamente direcionados e/ou não foram previamente descritos, mostrando assim um potencial de mudar os entendimentos anteriores da diversidade e distribuição da comunidade viral com base apenas em sorologia e PCR (VICTORIA *et al.*, 2009; BERGNER *et al.*, 2019).

Dentro deste contexto, podemos destacar pesquisas virais em três grupos de mamíferos (morcegos, roedores e primatas), que são fontes notórias de infecções da maioria dos vírus zoonóticos, correspondendo a 75,8% dos vírus conhecidos até o momento (JOHNSON *et al.*, 2020). Possivelmente, isso se deve à grande diversidade de espécies desses grupos e de suas características ecológicas, como os tamanhos de suas colônias que facilitam a manutenção das cadeias de transmissão viral (DELWART *et al.*, 2012; JOHNSON *et al.*, 2020). Por serem filogeneticamente mais relacionados aos humanos, os primatas não humanos ao compartilharem diversas doenças com seus “parentes próximos” tornam essa transferência cruzada de patógenos mais preocupante do que com outros mamíferos e animais domésticos (ANDRADE, 2002; CHAPMAM *et al.*, 2005; KÖNDGEN *et al.*, 2008; GÓMEZ; NUNN; VERDÚ, 2012; MARSH *et al.*, 2013; DAVOUST; LEVASSEUR; MEDIANNIKOV, 2018; ESTES; WONG; BRENCHLEY, 2018; DEVAUX *et al.*, 2019). Acredita-se que eles sejam frequentemente responsáveis pelo surgimento de novas infecções humanas e, nesse contexto, o estudo de populações de primatas selvagens pode conter importantes informações desde origem à evolução de patógenos e processos de transmissões naturais de doenças, informações essas que podem beneficiar o conhecimento e as ações para a saúde pública (ESTRADA *et al.*, 2017; DAVOUST; LEVASSEUR; MEDIANNIKOV, 2018).

Os primatas representam o terceiro grupo de mamíferos com maior riqueza de espécies, depois apenas dos morcegos e roedores, e ocorrem em 91 países da região Neotropical, África e Ásia. Entretanto, 65% das espécies são encontradas em apenas quatro países - Brasil, Madagascar, Indonésia e República Democrática do Congo (ESTRADA *et al.*, 2017; ESTRADA *et al.*, 2018; ESTRADA; GARBER; CHAUDHARY, 2020). As espécies de primatas se dividem em duas parvordens: Catarrhini (Primatas do Velho Mundo - PVM, que ocorrem na África e Ásia) e Platyrrhini (Primatas Neotropicais - PN, que ocorrem nas Américas). O Brasil é o país que abriga maior diversidade de PN e, nos últimos anos, o número de descoberta de novas espécies vem aumentando (RYLANDS; MITTERMEIER; SILVA, 2012; COSTA-ARAÚJO *et al.*, 2021). Contudo, este é o terceiro país do mundo com maior número de espécies de primatas ameaçadas e em declínio (ESTRADA *et al.*, 2018), muitas das quais endêmicas do país.

Nos PN, diversos vírus já foram registrados, alguns exemplos são: herpesvírus (CASAGRANDE *et al.*, 2014), papilomavírus (SILVESTRE *et al.*, 2016; D'ARC *et al.*, 2020), poxvírus (ABRAHÃO *et al.*, 2010), vírus da raiva (FAVORETTO *et al.*, 2001), espumavírus (MUNIZ *et al.*, 2013), arbovírus (BATISTA *et al.*, 2013) como vírus da febre amarela (DIEZ *et al.*, 2019), vírus da febre Mayaro (THOISY *et al.*, 2003), vírus da febre de Ilhéus (THOISY *et al.*, 2003), zika vírus (TERZIAN *et al.*, 2018; FAVORETTO *et al.*, 2019), dentre outros. Apesar de seu papel como reservatórios de muitos desses patógenos, a maioria deles de importância para a saúde pública, os PN podem também ser suscetíveis às infecções compartilhadas com os humanos, desenvolvendo desde doença clínica à fatal. Como nas infecções por *herpesvírus humano 1* (HHV-1, do inglês *human herpesvirus type 1*) que levou à óbito diversos saguis selvagens e cativos (*Callithrix* spp.) (BRUNO *et al.*, 1997; LONGA *et al.*, 2011; CASAGRANDE *et al.*, 2014) e nas infecções pelo vírus da febre amarela (YFV), que nos surtos ocorridos nos últimos anos (2008/2009 e 2016/2018), principalmente nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, ocasionou óbitos de humanos e de diversos primatas, inclusive algumas espécies já ameaçadas de extinção (ALMEIDA *et al.*, 2012; DIEZ *et al.*, 2019; STRIER *et al.*, 2019; ABREU *et al.*, 2020).

As pesquisas virais nos animais selvagens da fauna brasileira estão em ascensão e, com o advento das tecnologias de HTS, os viromas de várias espécies estão sendo caracterizados (WEBER *et al.*, 2020; CANOVA *et al.*, 2021), inclusive de primatas cativos e selvagens, identificando até novas variantes virais (ULLMANN, 2014; MOREIRA, 2016; LIMA, 2016; MUNIZ *et al.*, 2018; D'ARC *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2020). Contudo, no que diz respeito à pesquisa de PN de vida livre na Amazônia brasileira, trabalhos nesta temática ainda são escassos. Nessa região, algumas espécies de PN, inclusive de calitriquídeos, têm seu habitat invadido pela urbanização, submetendo-os a sérios riscos sanitários. Dentre estes riscos estão as doenças infecciosas, muitas dessas associadas ao contato direto ou indireto com fontes de infecção humana e de animais domésticos (COSTA, 2014). Esses agentes infecciosos podem representar riscos significativos para a conservação de populações de PN, muitos dos quais já estão ameaçados devido, principalmente, à perda de habitat. Porém, outros fatores como caça, comércio ilegal e disseminação de espécies invasoras também são pressões que podem impactar essas populações (CHAPMAN *et al.*, 2005; ESTRADA; GARBER; CHAUDHARY, 2020).

O sauim-de-coleira (*Saguinus bicolor*) é uma espécie de calitriquídeo categorizada como Criticamente Ameaçada de Extinção pelo Livro Vermelho da Fauna Brasileira

(VIDAL; GORDO; RÖHE, 2018) e pela *Red List* da *International Union for Conservation of Nature* (GORDO *et al.*, 2021) e considerado como um dos 25 primatas mais ameaçados do mundo pelo Grupo de Especialistas em Primatas da SSC da IUCN (GORDO *et al.*, 2019). É uma das espécies de primatas da Amazônia que possui uma das menores áreas de distribuição geográfica, ocorrendo apenas em parte dos municípios de Manaus, Rio Preto da Eva e Itacoatiara, cobrindo uma área inferior a 7.500Km² (RÖHE, 2006; JERUSALINSKY *et al.*, 2017). O principal fator preocupante para o sauí-de-coleira é a perda de habitat, pois em Manaus a expansão urbana e agrícola está seguindo intensamente em áreas de ocorrência da espécie (RÖHE, 2006). Inclusive, populações de sauí-de-coleira de fragmentos florestais de Manaus estão sofrendo por perda de variabilidade genética ocasionada pela fragmentação ambiental (FARIAS *et al.*, 2015). Essa perda de diversidade genética pode aumentar potencialmente a suscetibilidade a doenças infecciosas (CHAPMAN *et al.*, 2005).

Contudo, os trabalhos relacionados à ocorrência de agentes infecciosos nessa espécie ainda são escassos, principalmente para os animais de vida livre. As pesquisas realizadas registraram a ocorrência de *Trypanosoma* spp. (MAIA DA SILVA *et al.*, 2008), *Plasmodium* spp. (SILVA *et al.*, 2019), helmintos gastrointestinais (GOMES, 2019) e alguns agentes virais específicos (SOLORIO, 2015).

Em relação a trabalhos com vírus, Solorio (2015) realizou uma pesquisa de levantamento de alguns agentes infecciosos em grupos de sauí-de-coleira selvagens, realizando análises moleculares específicas para alguns vírus (Rotavírus A; Hantavírus, Coronavírus; Flavivírus; Enterovírus; Influenza A; Adenovírus; Metapneumovírus; Vírus Sincicial Respiratório Humano; Parainfluenza 1, 2, 3 e 4; Vírus do Oeste do Nilo). Porém, segundo Anthony *et al.* (2013), o uso apenas de PCR pode ser insuficiente pois: (1) limita a vigilância e a descoberta de vírus nos alvos de ensaios; (2) as variações na concentração do vírus também podem influenciar a probabilidade de detecção; (3) o conjunto de tecidos analisados pode limitar o diagnóstico da diversidade viral.

Como muitas populações de sauí-de-coleira estão inseridas em uma área com crescente urbanização e intensa fragmentação florestal, é importante conhecer o espectro dos agentes etiológicos presentes nessas populações para tentar entender seus efeitos na saúde e possíveis prejuízos à conservação da espécie (MANSFIELD; SASSEVILLE; WESTMORELAND, 2014). Segundo Estrada *et al.* (2017), os primatas em florestas degradadas podem mostrar uma maior prevalência de parasitas e patógenos e o estudo desses animais em seu ambiente natural também pode nos auxiliar a ter uma melhor

compreensão sobre a relação entre biodiversidade e as doenças infecciosas (PONGSIRI *et al.*, 2009; DAVOUST; LEVASSEUR; MEDIANNIKOV, 2018; LAPPAN *et al.*, 2020). Além disso, a integração melhorada da capacitação e abordagem sistemática à vigilância de doenças na vida selvagem são fundamentais para a conservação das espécies ameaçadas de extinção (GROGAN *et al.*, 2014). Portanto, o presente trabalho visa realizar a primeira caracterização do viroma fecal da espécie, investigando a riqueza e diversidade em grupos de diferentes fragmentos florestais urbanos da cidade de Manaus, na Amazônia Central brasileira, como uma estratégia de vigilância precoce e importante no contexto da saúde única e da conservação.

REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, J. S. *et al.* Vaccinia virus infection in monkeys, Brazilian Amazon. **Emerging infectious diseases**, 16 (6), 976, 2010. doi: [10.3201/eid1606.091187](https://doi.org/10.3201/eid1606.091187)
- ABREU, F. V. *et al.* Survey on non-human primates and mosquitoes does not provide evidences of spillover/spillback between the urban and sylvatic cycles of yellow fever and Zika viruses following severe outbreaks in southeast Brazil. **Viruses**, v. 12, n. 4, p. 364, 2020. doi: [10.3390/v12040364](https://doi.org/10.3390/v12040364)
- ALMEIDA, M. A. *et al.* Yellow fever outbreak affecting *Alouatta* populations in southern Brazil (Rio Grande do Sul State), 2008–2009. **Am J Primatol**, v. 74, n. 1, p. 68-76, 2012. doi: [10.1002/ajp.21010](https://doi.org/10.1002/ajp.21010)
- ANDRADE, A. Principais doenças de primatas não-humanos CAP 20. In: ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S., orgs. **Animais de Laboratório: criação e experimentação** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, p. 388, 2002. Disponível em SciELO Books.
- ANTHONY, S. J. *et al.* A strategy to estimate unknown viral diversity in mammals. **MBio**, v. 4, n. 5, p. e00598-13, 2013. doi: [10.1128/mBio.00598-13](https://doi.org/10.1128/mBio.00598-13)
- 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. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 46, p. 684-690, 2013. doi: [10.1590/0037-8682-0181-2013](https://doi.org/10.1590/0037-8682-0181-2013)
- BERGNER, L. M. *et al.* Using non invasive metagenomics to characterize viral communities from wildlife. **Mol Ecol Resour**, v. 19, n. 1, p. 128-143, 2019. doi: [10.1111/1755-0998.12946](https://doi.org/10.1111/1755-0998.12946)
- BRUNO, S. F. *et al.* Herpesvirus infections in free living Black tufted marmosets (*Callithrix penicillata*, E. Geoffroyi 1812) at the State Park of Serra da Tiririca, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil. **Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift**, v. 110, n. 11-12, p. 427-430, 1997.
- CAMPOS, S. P. **Ecologia de viroses emergentes: relações entre pequenos mamíferos hospedeiros e seus habitat**. 2016. 71f. Dissertação (Mestrado em Ecologia, Conservação e Manejo de Vida Silvestre) - Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, 2016.
- CANOVA, R. *et al.* Spleen and lung virome analysis of South American fur seals (*Arctocephalus australis*) collected on the Southern Brazilian coast. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 92, p. 104862, 2021. doi: [10.1016/j.meegid.2021.104862](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104862)
- CARROLL, D. *et al.* The global virome project. **Science**, 359 (6378), 872-874. 2018. doi: [10.1126/science.aap7463](https://doi.org/10.1126/science.aap7463)
- CASAGRANDE, R. A. *et al.* Fatal Human herpesvirus 1 (HHV-1) infection in captive marmosets (*Callithrix jacchus* and *Callithrix penicillata*) in Brazil: clinical and

pathological characterization. **Pesq. Vet. Bras.** 34, n. 11, 2014. doi: [10.1590/S0100-736X2014001100013](https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014001100013)

CAVALCANTE, L. T. **Caracterização molecular de vírus negligenciados e seu impacto na saúde de felinos domésticos e selvagens.** 2019. 118f. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2019.

CHAN, J. F. W. *et al.* Middle East respiratory syndrome coronavirus: another zoonotic betacoronavirus causing SARS-like disease. **Clinical microbiology reviews**, v. 28, n. 2, p. 465-522, 2015. doi: [10.1128/CMR.00102-14](https://doi.org/10.1128/CMR.00102-14)

CHAPMAN, C. A.; GILLESPIE, T. R.; GOLDBERG, T. L. Primates and the ecology of their infectious diseases: how will anthropogenic change affect host-parasite interactions?. **Evol. Anthropol.**, v. 14, n. 4, p. 134-144, 2005.

CHRISTOFF, A. P. Genômica e sequenciamento de nova geração (Cap 2) In: TURCHETTO-ZOLET, A. C. et al. (Eds.). **Marcadores moleculares na era genômica: metodologias e aplicações.** Ribeirão Preto: [s.n.]. p. 21-50. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/206114/001056131.pdf?sequence=1>
Acesso em: 25 jan. 2021

COOK, R. A.; KARESH, W. B. Emerging diseases at the interface of people, domestic animals, and wildlife. In: FOWLER, M. E.; MILLER, R.E. **Zoo and Wild Animal Medicine**, 6 ed. 2008.

COSTA, A. M. Desafios para conservação da fauna amazônica. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária.** (2) 2ª edição. Editora Roca. São Paulo, p. 2372-2381, 2014.

COSTA-ARAÚJO, R. *et al.* An integrative analysis uncovers a new, pseudo-cryptic species of Amazonian marmoset (Primates: Callitrichidae: Mico) from the arc of deforestation. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2021. doi: [10.1038/s41598-021-93943-w](https://doi.org/10.1038/s41598-021-93943-w)

D'ARC, M. *et al.* The characterization of two novel neotropical primate papillomaviruses supports the ancient within-species diversity model. **Virus Evol.**, v. 6, n. 1, p. veaa036, 2020. doi: [10.1093/ve/veaa036](https://doi.org/10.1093/ve/veaa036)

DAVOUST, B.; LEVASSEUR, A.; MEDIANNIKOV, O. Studies of nonhuman primates: key sources of data on zoonoses and microbiota. **New Microbes New Infect.**, v. 26, p. S104-S108, 2018. doi: [10.1016/j.nmni.2018.08.014](https://doi.org/10.1016/j.nmni.2018.08.014)

DE JONG, J. C. de *et al.* A pandemic warning?. **Nature**, v. 389, n. 6651, p. 554-554, 1997. doi: [10.1038/39218](https://doi.org/10.1038/39218)

DELWART, E. Animal virus discovery: improving animal health, understanding zoonoses, and opportunities for vaccine development. **Curr. Opin. Virol.**, v. 2, n. 3, p. 344-352, 2012. doi: [10.1016/j.coviro.2012.02.012](https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.02.012)

DEVAUX, C. A. *et al.* Infectious disease risk across the growing human-non human primate interface: A review of the evidence. **Front. public health.**, v. 7, p. 305, 2019. doi: [10.3389/fpubh.2019.00305](https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00305)

DIETZ, J. M. *et al.* Yellow fever in Brazil threatens successful recovery of endangered golden lion tamarins. **Sci. Rep.**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2019. doi: [10.1038/s41598-019-49199-6](https://doi.org/10.1038/s41598-019-49199-6)

ESTES, J. D.; WONG, S. W.; BRENCHLEY, J. M. Nonhuman primate models of human viral infections. **Nat Rev Immunol**, v. 18, n. 6, p. 390-404, 2018. doi: [10.1038/s41577-018-0005-7](https://doi.org/10.1038/s41577-018-0005-7)

ESTRADA, A. *et al.* Impending extinction crisis of the world's primates: Why primates matter. **Sci. Adv.**, v. 3, n. 1, p. e1600946, 2017. doi: [10.1126/sciadv.1600946](https://doi.org/10.1126/sciadv.1600946)

ESTRADA, A. *et al.* Primates in peril: the significance of Brazil, Madagascar, Indonesia and the Democratic Republic of the Congo for global primate conservation. **PeerJ**, v. 6, p. e4869, 2018. doi: [10.7717/peerj.4869](https://doi.org/10.7717/peerj.4869)

ESTRADA, A.; GARBER, P. A.; CHAUDHARY, A. Current and future trends in socio-economic, demographic and governance factors affecting global primate conservation. **PeerJ**, v. 8, p. e9816, 2020. doi: [10.7717/peerj.9816](https://doi.org/10.7717/peerj.9816)

FARIAS, I. P.; SANTOS, W. G.; GORDO, M.; HRBEK, T. 2015. Effects of forest fragmentation on genetic diversity of the Critically Endangered primate, the pied tamarin (*Saguinus bicolor*): Implications for conservation. **J. Hered.**, v. 106, n. S1, p. 512-521, 2015. doi: [10.1093/jhered/esv048](https://doi.org/10.1093/jhered/esv048)

FAUCI, A. S.; LANE, H. C.; REDFIELD, R. R. COVID-19—navigating the uncharted. 2020. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejme2002387>

FAVORETTO, S. R. *et al.* Rabies in marmosets (*Callithrix jacchus*), Ceará, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 7, n. 6, p. 1062, 2001. doi: [10.3201/eid0706.010630](https://doi.org/10.3201/eid0706.010630)

FAVORETTO, S. R. *et al.* Zika Virus in peridomestic neotropical primates, Northeast Brazil. **Ecohealth**, v. 16, n. 1, p. 61-69, 2019. doi: [10.1007/s10393-019-01394-7](https://doi.org/10.1007/s10393-019-01394-7)

FIELD, H. E. Bats and emerging zoonoses: henipaviruses and SARS. **Zoonoses Public Health**, v. 56, n. 6-7, p. 278-284, 2009. doi: [10.1111/j.1863-2378.2008.01218.x](https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01218.x)

FIELD, H. E. *et al.* The natural history of Hendra and Nipah viruses. **Microbes and infection**, v. 3, n. 4, p. 307-314, 2001. doi: [10.1016/S1286-4579\(01\)01384-3](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01384-3)

GE, X. *et al.* Metagenomic analysis of viruses from bat fecal samples reveals many novel viruses in insectivorous bats in China. **J. Virol.**, v. 86, n. 8, p. 4620-4630, 2012. doi: [10.1128/JVI.06671-11](https://doi.org/10.1128/JVI.06671-11)

GILLESPIE, T. R.; CHAPMAN, C. A. Forest fragmentation, the decline of an endangered primate, and changes in host-parasite interactions relative to an unfragmented forest. **American Journal of Primatology**, v. 70, n. 3, 2008. doi: [10.1002/ajp.20475](https://doi.org/10.1002/ajp.20475)

GILLESPIE, T.R.; NUNN, C. L.; LEENDERTZ, F. H. Integrative approaches to the study of primate infectious disease: implications for biodiversity conservation and global health. **Am. J. Phys. Anthropol.**, v. 137, n. S47, p. 53-69, 2008. doi: [10.1002/ajpa.20949](https://doi.org/10.1002/ajpa.20949)

GOMES, A. W. M. **Parasitos helmintos intestinais em *Saguinus bicolor* (Spix, 1823) (Primates, Callitrichidae)**. 2019. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Universidade Federal do Amazonas, Brasil, 2019.

GÓMEZ, J. M.; NUNN, C. L.; VERDÚ, M. Centrality in primate–parasite networks reveals the potential for the transmission of emerging infectious diseases to humans. **Proc Natl Acad Sci, USA**, v. 110, n. 19, p. 7738-7741, 2013. doi: [10.1073/pnas.1220716110](https://doi.org/10.1073/pnas.1220716110)

GORDO, M. *et al.* PIED TAMARIN. In: SCHWITZER, C. *et al.* (eds.) **Primates in Peril: The World's 25 Most Endangered Primates 2018–2020**. IUCN SSC Primate Specialist Group, International Primatological Society, Global Wildlife Conservation, and Bristol Zoological Society, Washington, DC. 130pp, 2019.

GORDO, M. *et al.* *Saguinus bicolor* (amended version of 2019 assessment). The IUCN Red List of Threatened Species 2021: e.T40644A192551696, 2021. doi: [10.2305/IUCN.UK.2021-1.RLTS.T40644A192551696.en](https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2021-1.RLTS.T40644A192551696.en).

GROGAN, L. F. *et al.* Surveillance for emerging biodiversity diseases of wildlife. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 5, p. e1004015, 2014. doi: [10.1371/journal.ppat.1004015](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004015)

GUERRERO-LATORRE, L. *et al.* Quito's virome: Metagenomic analysis of viral diversity in urban streams of Ecuador's capital city. **Sci. Total Environ.**, v. 645, p. 1334-1343, 2018. doi: [10.1016/j.scitotenv.2018.07.213](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.213)

IUCN, 2021. The IUCN Red List of Threatened Species. Versão 2021-3. <<https://www.iucnredlist.org>>

JERUSALINSKY, L. Processo de elaboração, monitoria e avaliação do Plano de Ação Nacional para a conservação do Sauim-de-coleira. In: Brasil, 2017. **Plano de ação nacional para a conservação do sauim-de-coleira**. ICMBio/MMA.

JIANG, H. *et al.* Hantavirus infection: a global zoonotic challenge. **Virologica Sinica**, v. 32, n. 1, p. 32-43, 2017. doi: [10.1007/s12250-016-3899-x](https://doi.org/10.1007/s12250-016-3899-x)

JOHNSON, C. K. *et al.* Global shifts in mammalian population trends reveal key predictors of virus spillover risk. **Proc. R. Soc. B**, v. 287, n. 1924, p. 20192736, 2020. doi: [10.1098/rspb.2019.2736](https://doi.org/10.1098/rspb.2019.2736)

JONES, K. E. *et al.* Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, v. 451, n. 7181, p. 990-993, 2008. doi: [10.1038/nature06536](https://doi.org/10.1038/nature06536)

KEESING, F. *et al.* Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. **Nature**, v. 468, n. 7324, p. 647-652, 2010. doi: [10.1038/nature09575](https://doi.org/10.1038/nature09575)

KÖNDGEN, S. *et al.* Pandemic human viruses cause decline of endangered great apes. **Current Biology**, v. 18, n. 4, p. 260-264, 2008. doi: [10.1016/j.cub.2008.01.012](https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.01.012)

LAM, T. T. *et al.* Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. **Nature**, v. 583, n. 7815, p. 282-285, 2020. doi: [10.1038/s41586-020-2169-0](https://doi.org/10.1038/s41586-020-2169-0)

LANCIOTTI, R. S. *et al.* Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. **Science**, v. 286, n. 5448, p. 2333-2337, 1999. doi: [10.1126/science.286.5448.2333](https://doi.org/10.1126/science.286.5448.2333)

LAPPAN, S. *et al.* The human–primate interface in the New Normal: Challenges and opportunities for primatologists in the COVID-19 era and beyond. **Am J Primatol**, v. 82, n. 8, p. e23176, 2020. doi: [10.1002/ajp.23176](https://doi.org/10.1002/ajp.23176)

LECUIT, M.; ELOIT, M. The human virome: new tools and concepts. **Trends Microbiol**, v. 21, n. 10, p. 510-515, 2013. doi: [10.1016/j.tim.2013.07.001](https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.07.001)

LIMA, C. P. **Caracterização genômica, por pirosequenciamento, de um possível novo vírus encontrado em *Saguinus fuscicollis wedelli* criado em cativeiro no Centro Nacional de Primatas**. 2016. 88f. Tese (Doutorado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) – Universidade do Pará, Brasil, 2016.

LOJKIĆ, I. *et al.* Faecal virome of red foxes from peri-urban areas. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 45, p. 10-15, 2016. [10.1016/j.cimid.2016.01.005](https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.01.005)

LONGA, C. S. *et al.* Human herpesvirus 1 in wild marmosets, Brazil, 2008. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 7, p. 1308, 2011. doi: [10.3201/eid1707.100333](https://doi.org/10.3201/eid1707.100333)

MAIA DA SILVA, F. *et al.* Infection rates and genotypes of *Trypanosoma rangeli* and *T. cruzi* infecting free-ranging *Saguinus bicolor* (Callitrichidae), a critically endangered primate of the Amazon Rainforest. **Acta tropica**, v. 107, n. 2, p. 168-173, 2008. doi: [10.1016/j.actatropica.2008.05.015](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.05.015)

MANSFIELD, K. G.; SASSEVILLE, V. G.; WESTMORELAND, S. V. Molecular localization techniques in the diagnosis and characterization of nonhuman primate infectious diseases. **Vet. Pathol.**, v. 51, n. 1, p. 110-126, 2014. doi: [10.1177/0300985813509386](https://doi.org/10.1177/0300985813509386)

MARSH, L.K., *et al.* Primates in fragments 10 years later: once and future goals. In: MARSH, L. K. CHAPMAN, C. A. (eds.), *Primates in fragments* (pp. 505-525). **Springer**, New York, 2013.

MATHEWS, F. Zoonoses in wildlife: integrating ecology into management. **Adv. Parasitol.**, v. 68, p. 185-209, 2009. doi: [10.1016/S0065-308X\(08\)00608-8](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)00608-8)

MOLINA, C. V. *et al.* Leptospira spp., rotavirus, norovirus, and hepatitis E virus surveillance in a wild invasive golden-headed lion tamarin (*Leontopithecus chrysomelas*; Kuhl, 1820) population from an urban park in Niterói, Rio de Janeiro, Brazil. **Am J Primatol**, v. 81, n. 3, p. e22961, 2019. doi: [10.1002/ajp.22961](https://doi.org/10.1002/ajp.22961)

MOREIRA, D. R. **Análise de viromas em *Alouatta caraya* e *Saimiri collinsi* mantidos em cativeiro no Centro Nacional de Primatas, Ananindeua, Pará**. 2016. 66f.

Dissertação (Mestrado em Virologia) - Instituto Evandro Chagas, Programa de Pós-Graduação em Virologia, Ananindeua, 2016.

MUNIZ, C. P. *et al.* Identification and characterization of highly divergent simian foamy viruses in a wide range of new world primates from Brazil. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e67568, 2013. doi: [10.1371/journal.pone.0067568](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067568)

MUNIZ, C. P. *et al.* First complete genome sequence of a simian foamy virus infecting the neotropical primate brachytelesarachnoides. **Microbiol. Resour. Announc.**, v. 7, n. 2, p. e00839-18, 2018. doi: [10.1128/MRA.00839-18](https://doi.org/10.1128/MRA.00839-18)

NAVA, A. *et al.* The impact of global environmental changes on infectious disease emergence with a focus on risks for Brazil. **ILAR J.**, v. 58, n. 3, p. 393-400, 2017. doi: [10.1093/ilar/ilx034](https://doi.org/10.1093/ilar/ilx034)

PAIM, W. P. *et al.* Characterization of the viral genomes present in commercial batches of horse serum obtained by high-throughput sequencing. **Biologicals**, v. 61, p. 1-7, 2019. doi: [10.1016/j.biologicals.2019.08.005](https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2019.08.005)

PATZ, J. A. *et al.* Unhealthy landscapes: policy recommendations on land use change and infectious disease emergence. **Environ. Health Perspect.**, v. 112, n. 10, p. 1092-1098, 2004. doi: [10.1289/ehp.6877](https://doi.org/10.1289/ehp.6877)

PEETERS, M.; JUNG, M.; AYOUBA, A.. The origin and molecular epidemiology of HIV. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 11, n. 9, p. 885-896, 2013. doi: [10.1586/14787210.2013.825443](https://doi.org/10.1586/14787210.2013.825443)

PEIRIS, J. S. M.; GUAN, Y.; YUEN, K. Y. Severe acute respiratory syndrome. **Nature medicine**, v. 10, n. 12, p. S88-S97, 2004. doi: [10.1038/nm1143](https://doi.org/10.1038/nm1143)

PETERSEN, E. *et al.* Emerging infections—an increasingly important topic: review by the emerging infections task force. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 24, n. 4, p. 369-375, 2018. doi: [10.1016/j.cmi.2017.10.035](https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.10.035)

PONGSIRI, M. J. *et al.* Biodiversity loss affects global disease ecology. **Bioscience**, v. 59, n. 11, p. 945-954, 2009. doi: [10.1525/bio.2009.59.11.6](https://doi.org/10.1525/bio.2009.59.11.6)

QUINN, P.J. *et al.* Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. Porto Alegre: **Artmed**, p.346-355. 2005.

RASTROJO, A.; ALCAMI, A. Aquatic viral metagenomics: Lights and shadows. **Virus Res.**, v. 239, p. 87-96, 2017. doi: [10.1016/j.virusres.2016.11.021](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.11.021)

RÖHE, F. **Área de contato entre as distribuições geográficas de *Saguinus midas* e *Saguinus bicolor*: a importância de interações e fatores ecológicos.** 2006 p. 57-61. 82fls. Dissertação (Mestrado em Biologia Tropical e Recursos Naturais) – INPA/UFAM, Brasil, 2006.

RYLANDS, A. B.; MITTERMEIER, R. A.; SILVA JR, J. S. Neotropical primates: taxonomy and recently described species and subspecies. **Int. Zoo Yearb.**, v. 46, n. 1, p. 11-24, 2012. doi: [10.1111/j.1748-1090.2011.00152.x](https://doi.org/10.1111/j.1748-1090.2011.00152.x)

SANTOS, R. N. *et al.* Viral diversity in oral cavity from *Sapajus nigritus* by metagenomic analyses. **Braz. J. Microbiol.** Brazil, Vol. 51, no. 4, p. 1941-1951, 2020. doi: [10.1007/s42770-020-00350-w](https://doi.org/10.1007/s42770-020-00350-w)

SAÉZ, A. M. *et al.* Investigating the zoonotic origin of the West African Ebola epidemic. **EMBO Mol Med** 7: 17–23. 2015. doi: [10.15252/emmm.201404792](https://doi.org/10.15252/emmm.201404792)

SILVA, T.R. *et al.* *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infection in Neotropical primates in the western Amazon, Brazil. **Zoonoses Public Health**, v. 66, n. 7, p. 798-804, 2019. doi: [10.1111/zph.12626](https://doi.org/10.1111/zph.12626)

SILVESTRE, R. V. D. *et al.* First New World primate papillomavirus identification in the Atlantic Forest, Brazil: *Alouatta guariba papillomavirus 1*. **Genome announcements**, v. 4, n. 4, p. e00725-16, 2016. doi: [10.1128/genomeA.00725-16](https://doi.org/10.1128/genomeA.00725-16)

SMITH, K. F.; SAX, D. F.; LAFFERTY, K. D. Evidence for the role of infectious disease in species extinction and endangerment. **Conserv. Biol.**, v. 20, n. 5, p. 1349-1357, 2006. doi: [10.1111/j.1523-1739.2006.00524.x](https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2006.00524.x)

SOIORIO, M.R. **Levantamento de agentes infecciosos nas sub-populações de Sauim-de-coleira (*Saguinus bicolor*) na cidade de Manaus, Estado do Amazonas.** 2015. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Brasil, 2015.

STOUT, A. E. *et al.* Coronaviruses in cats and other companion animals: Where does SARS-CoV-2/COVID-19 fit?. **Vet. Microbiol.**, v. 247, p. 108777, 2020. doi: [10.1016/j.vetmic.2020.108777](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108777)

STRIER, K. B. *et al.* Status of the northern muriqui (*Brachyteles hypoxanthus*) in the time of yellow fever. **Primates**, v. 60, n. 1, p. 21-28, 2019. doi: [10.1007/s10329-018-0701-8](https://doi.org/10.1007/s10329-018-0701-8)

SUZÁN, G. *et al.* The effect of habitat fragmentation and species diversity loss on hantavirus prevalence in Panama. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1149, n. 1, p. 80-83, 2008. doi: [10.1196/annals.1428.063](https://doi.org/10.1196/annals.1428.063)

TERZIAN, A. C. *et al.* Evidence of natural Zika virus infection in neotropical non-human primates in Brazil. **Sci. Rep**, v. 8, n. 1, p. 1-15, 2018. doi: [10.1038/s41598-018-34423-6](https://doi.org/10.1038/s41598-018-34423-6)

THOISY, B. *et al.* Mayaro virus in wild mammals, French Guiana. **Emerg. Infect.**, v. 9, n. 10, p. 1326, 2003. doi: [10.3201/eid0910.030161](https://doi.org/10.3201/eid0910.030161)

ULLMANN, L. S. **Pesquisa de genomas virais em primatas não humanos do Novo Mundo por metagenômica.** 2014, 89p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, São Paulo, 2014.

VELAVAN, T. P.; MEYER, C. G. The COVID-19 epidemic. **Trop. Med. Int. Health.**, v. 25, n. 3, p. 278, 2020. doi: [10.1111/tmi.13383](https://doi.org/10.1111/tmi.13383)

VENTER, M. Assessing the zoonotic potential of arboviruses of African origin. **Current opinion in virology**, v. 28, p. 74-84, 2018. doi: [10.1016/j.coviro.2017.11.004](https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.11.004)

VERONA, C. E.; PISSINATTI, A. Primates: Primatas do Novo Mundo (Sagüi, macaco-prego, macaco-aranha, bugio), In: ZALMIR, C.S., SILVA, J.C.; CATÃO-DIAS, J.L. (Eds), **Tratado de Animais Selvagens: medicina veterinária**. Roca, São Paulo. 2006, p.358-377.

VICTORIA, J. G. *et al.* Metagenomic analyses of viruses in stool samples from children with acute flaccid paralysis. **J. Virol.**, v. 83, n. 9, p. 4642-4651, 2009. doi: [10.1128/JVI.02301-08](https://doi.org/10.1128/JVI.02301-08)

VIDAL, M. D.; GORDO, M.; ROHE, F. *Saguinus bicolor* (Spix, 1823). In: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. (Org.). **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume II Mamíferos**. 1ed. Brasília: ICMBio, v. 1, p. 244-249, 2018.

VIRGIN, H. W.; WHERRY, E. JOHN; AHMED, R. Redefining chronic viral infection. **Cell**, v. 138, n. 1, p. 30-50, 2009. doi: [10.1016/j.cell.2009.06.036](https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.036)

VIRGIN, H. W.; TODD, J. A. Metagenomics and personalized medicine. **Cell**, v. 147, n. 1, p. 44-56, 2011. doi: [10.1016/j.cell.2011.09.009](https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.009)

VIRGIN, H. W. The virome in mammalian physiology and disease. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 142-150, 2014. doi: [10.1016/j.cell.2014.02.032](https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.032)

WACHARAPLUESADEE, S. *et al.* Evidence for SARS-CoV-2 related coronaviruses circulating in bats and pangolins in Southeast Asia. **Nat. Commun.**, v. 12, n. 1, p. 1-9, 2021. doi: [10.1038/s41467-021-21768-2](https://doi.org/10.1038/s41467-021-21768-2)

WEBER, M. N. *et al.* Virome of crab-eating (*Cerdocyon thous*) and pampas foxes (*Lycalopex gymnocercus*) from southern Brazil and Uruguay. **Infect. Genet. Evol.**, v. 85, p. 104421, 2020. doi: [10.1016/j.meegid.2020.104421](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104421)

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Tripartit and UNEP support OHHLEP's definition of "One Health" – Joint Tripartite (FAO, OIE, WHO) and UNEP Statement** [On-line]. Geneva, Switzerland: WHO; 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/01-12-2021-tripartite-and-unep-support-ohhlep-s-definition-of-one-health>

XIAO, K. *et al.* Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from *Malayan pangolins*. **Nature**, v. 583, n. 7815, p. 286-289, 2020. doi: [10.1038/s41586-020-2313-x](https://doi.org/10.1038/s41586-020-2313-x)

ZHANG, T.; WU, Q.; ZHANG, Z. Probable pangolin origin of SARS-CoV-2 associated with the COVID-19 outbreak. **Current biology**, v. 30, n. 7, p. 1346-1351. e2, 2020. doi: [10.1016/j.cub.2020.03.022](https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.03.022)

ZHOU, P. *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 270-273, 2020. [10.1038/s41586-020-2012-7](https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7)

ZHU, N. *et al.* A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **N Engl J Med.**, v. 382, n. 8, 2020. doi:[10.1056/NEJMoa2001017](https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017)

1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar o viroma de grupos de *Saguinus bicolor* e *Saimiri sciureus* da Amazônia Central brasileira.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Capítulo 1:

- Descrever a riqueza e diversidade viral em grupos de *Saguinus bicolor* de diferentes fragmentos florestais urbanos;
- Testar a influência do número de amostras sequenciadas no *pool* e o tamanho do grupo sobre a diversidade viral;
- Testar se a composição viral dos grupos de *S. bicolor* tem relação com a proximidade geográfica entre eles.

Capítulo 2:

- Descrever a riqueza e diversidade viral em um grupo de *Saimiri sciureus* oriundo de um fragmento florestal urbano;
- Comparar a riqueza e diversidade do viroma de um grupo de *Saguinus bicolor* e de um grupo de *Saimiri sciureus*, inseridos no mesmo fragmento florestal;
- Testar se há diferença na diversidade viral detectada entre os grupos a partir de técnicas distintas de coleta.

Capítulo 1

Souza, AR, D'arc, M., Santos, AFA, Gordo, M. Diversidade do viroma fecal de grupos de *Saguinus bicolor*: um primata criticamente ameaçado de extinção da Amazônia brasileira.

Manuscrito em preparação para *American Journal of Primatology*.

Research Paper

Diversidade do viroma fecal de grupos de *Saguinus bicolor*: um primata criticamente ameaçado de extinção da Amazônia brasileira.

Aline Ramos Souza^{1,2*}, Mirela D'arc³, André Felipe Andrade dos Santos³ & Marcelo Gordo^{1,2}.

¹Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Departamento de Biologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, CEP 69077-000, Amazonas, Brasil.

²Projeto Sauim-de-Coleira, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Av. General Rodrigo Otávio Jordão Ramos, 3000, Japiim, 69077-000, Manaus, AM, Brasil.

³Laboratório de Diversidade e Doenças Virais, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Carlos Chagas Filho, CEP 21941-902, Rio de Janeiro, Brasil.

*E-mail para correspondência: alineramos.sza@gmail.com

RESUMO

Os vírus são agentes causadores das principais doenças emergentes e pandemias das últimas décadas, sendo a grande maioria delas de origem zoonótica. Dentro deste contexto, a pesquisa do viroma através do uso do sequenciamento massivo (HTS) vem expandindo o conhecimento dos vírus presentes no ambiente e em diversas espécies animais. Apesar do crescente esforço para conhecer os vírus que ocorrem nos animais silvestres os estudos sobre os agentes virais presentes em populações de primatas neotropicais de vida livre ainda são bastante escassos. Nosso estudo teve como objetivo investigar o viroma fecal, em nível de famílias virais, de saúns-de-coleira de fragmentos florestais de Manaus com uso de HTS, usando dois métodos distintos de análise de bioinformática (BLASTx e Kraken). Também avaliamos se a diversidade viral das famílias virais de importância para mamíferos estaria relacionada com o tamanho do grupo, com o número de amostras por *pool* e se a composição viral dos grupos analisados teria relação com a proximidade geográfica entre eles. Nossos resultados mostraram que ambos os métodos de bioinformática apresentaram grande divergência, sendo o Kraken a ferramenta que identificou em nível de famílias virais a maior diversidade e abundância. Dentre as famílias virais de importância para mamíferos que apresentaram resultados mais expressivos no número de leituras foram a *Poxviridae*, *Herpesviridae* e *Retroviridae*, presentes em todos os grupos trabalhados. Nosso estudo não mostrou relação da riqueza e diversidade viral com o número de amostras por *pool* ou com o tamanho do grupo. Muitas das comunidades virais foram distintas entre os grupos de saúns-de-coleira, sugerindo que a composição do viroma desses animais pode estar relacionada com diversas variáveis, desde individuais até ambientais. O aprofundamento das pesquisas nas famílias virais identificadas em nosso trabalho será essencial para verificar se os vírus que estão ocorrendo nesses animais são de importância patogênica para a conservação da espécie e para a saúde pública.

Palavras-chave

Sequenciamento massivo, Metagenômica, Primata Neotropical, Callitrichidae.

1. INTRODUÇÃO

Os vírus são um dos principais agentes responsáveis pelo aumento das doenças infecciosas e os maiores causadores das doenças emergentes nas últimas décadas (Morand & Figuié, 2018), incluindo as pandemias, sendo a maioria destas de origem animal (Carroll et al., 2018, Mollentze & Streicker, 2020; Shivaprakash et al., 2021). Diante disto, a vigilância epidemiológica da fauna nativa é fundamental para se reconhecer os patógenos que podem ser possíveis ameaças, identificando precocemente os agentes infecciosos de importância que estão em reservatórios silvestres ou que ainda são desconhecidos (Keita et

al., 2014). Essa necessidade de monitorar os patógenos que afetam os humanos, a conservação da vida selvagem e a relação com o meio ambiente, tornaram-se cada vez mais importantes dentro do conceito de Saúde Única (Bueno et al., 2017; Shan et al., 2011).

A pesquisa do viroma é um dos métodos diagnósticos que vem sendo bastante utilizado nos últimos anos, pois proporciona amplo conhecimento sobre os vírus que ocorrem desde em um organismo específico até em um ecossistema (Tangherlini et al., 2016). O desenvolvimento desta técnica só foi possível com o advento de novas tecnologias metagenômicas como o sequenciamento massivo (HTS - do inglês *High-Throughput Sequencing*), ferramenta que explora e analisa toda a coleção viral de uma amostra, conseguindo identificar desde vírus já conhecidos como novos ainda não descritos (Lojkić et al., 2016). A utilização desta técnica está expandindo nosso conhecimento sobre a riqueza, diversidade e distribuição de vírus na natureza (Fancello et al., 2013; Santos et al., 2020; Kutnjak et al., 2021). Além disso, este é considerado um método imparcial, já que não requer conhecimento prévio sobre os vírus ou suas sequências de ácidos nucleicos que podem estar presentes (Canova et al., 2021). Neste processo é importante a escolha de ferramentas de bioinformática confiáveis que forneçam avaliações precisas das informações taxonômicas virais para uma melhor avaliação da diversidade viral (Tangherlini et al., 2016; Kutnjak et al., 2021)

Apesar do crescente esforço para conhecer os vírus que ocorrem nos animais silvestres (Anthony et al., 2013; Carroll et al., 2018), inclusive espécies da fauna brasileira (Weber et al., 2020; Canova et al. 2021), os estudos sobre os agentes virais presentes em populações de primatas amazônicos de vida livre ainda são bastante escassos. Este é um fato preocupante, pois várias espécies possuem uma área de distribuição restrita e vêm sofrendo com a perda de habitat, o que levou algumas a serem classificadas em algum

nível de ameaçada de extinção. Um exemplo disso é o sauim-de-coleira (*Saguinus bicolor*), um primata endêmico da Amazônia brasileira e classificado como criticamente em perigo (Vidal et al., 2018; Gordo et al., 2019). Trata-se de um dos primatas amazônicos que apresenta uma das menores áreas de distribuição, que é compreendida por parte da região metropolitana de Manaus (Gordo et al., 2013). Esta região está em profundo processo de urbanização, evento este que está levando à intensa perda e fragmentação de área dessa espécie (Gordo et al., 2019).

Sabe-se que o desmatamento e as alterações antrópicas em paisagens fragmentadas podem ter implicações na distribuição de muitos microorganismos e estar associados ao aumento dos níveis de doenças infecciosas, fatores estes que podem ser críticos para a saúde das populações humanas, de animais domésticos e selvagens (Patz et al., 2004; Marsh et al., 2013; Nunn & Gillespie, 2016; Estrada et al., 2017). Neste cenário, aumenta-se a importância e relevância de um melhor reconhecimento e monitoramento do estado de saúde da fauna silvestre, com ênfase para os primatas não humanos (Rondón et al., 2017; Guimarães et al., 2020). Pois, além deste grupo de animais ter um grande número de espécies classificadas em alguma categoria de ameaça de extinção (Estrada et al., 2017), sua proximidade filogenética com os humanos pode acarretar no aumento do risco da disseminação de agentes infecciosos de ambas as partes (Cooper & Nunn, 2013), já que eles são importantes reservatórios de patógenos zoonóticos (Shivaprakash et al., 2021).

Devido a isso, nosso estudo teve como objetivo investigar o viroma fecal, em nível de famílias virais, de sauins-de-coleira de fragmentos florestais urbanos com uso de sequenciamento massivo, testando dois métodos distintos de análise de bioinformática. Além disso, foi avaliado se a diversidade viral estaria relacionada com o tamanho do grupo e com o número de amostras por *pool*; e se a composição viral dos grupos teria relação com a proximidade geográfica entre eles.

2. MÉTODOS

2.1. Aspectos éticos

O projeto aderiu aos requisitos legais do país apresentando autorização para execução através do número 73263-1 do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO – IBAMA) e o número de protocolo 002/2020_CEUA/UFAM aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal do Amazonas. Também aderiu aos Princípios da *American Society of Primatologists* (ASP) para o tratamento ético de primatas não humanos e seguiu o Código de Melhores Práticas para Primatologia de Campo da *American Society of Primatologists* (Riley et al., 2014).

2.2. Áreas de estudo

O estudo foi realizado entre junho de 2019 a novembro de 2020, em três fragmentos florestais urbanos e três periurbanos localizados no município de Manaus, Amazonas, Brasil (Fig. 1). As áreas investigadas são fragmentos florestais que apresentam cobertura vegetal característica de mata tropical úmida, correspondendo a florestas primárias e secundárias em diferentes estágios sucessionais (capoeiras) inseridos em uma matriz urbana (Gordo, 2012) e uma borda de floresta primária em fronteira com um bairro da cidade, correspondente a um grande fragmento periurbano (Reserva Ducke). As coordenadas das localizações onde foram realizadas as coletas encontram-se na Tabela 1.

2.3. Coleta das amostras

Para a captura dos grupos de sauím-de-coleira (*Saguinus bicolor*) foram utilizadas armadilhas galvanizadas do tipo *Tomahawk* (modelo ZT973 – 450x210x210mm, e modelo ZT974 – 700x400x400mm, dobráveis com estribo, pedal). Após capturados, foi realizada a sedação individual com a administração do dissociativo cloridrato de cetamina na dose de 20mg/kg, via intramuscular, com o intuito de minimizar o estresse durante os

procedimentos. Inicialmente, realizou-se a sexagem, estimativa de idade (determinada usando caracteres da arcada dentária e/ou reprodutivos), pesagem, biometria e avaliação clínica geral. Os animais também receberam identificação digital por meio de aplicação de *microchip* por via subcutânea para identificação individual em possíveis capturas futuras pelo Projeto Sauim-de-Coleira da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Todos os dados foram apontados em fichas individuais e realizado o registro fotográfico de cada indivíduo.

No total foram capturados nove grupos de *Saguinus bicolor* de vida livre (Tabela 1), com grupos variando de quatro a treze indivíduos (informações adicionais presentes no material suplementar S1). Destes, foram coletadas fezes do máximo de animais possíveis por grupo, variando de dois a doze indivíduos. Essas amostras foram coletadas individualmente a partir da defecação, sem estímulos químicos ou mecânicos, podendo ocorrer desde a captura até a finalização dos procedimentos. Cada armadilha e o local sobre o qual foi colocada cada uma, durante e após a captura, foram previamente individualizados e higienizados, e o local foi coberto por um papel tipo *kraft* limpo, para aproveitamento das fezes liberadas durante todo o processo de captura e procedimentos. As fezes foram armazenadas em tubo Falcon contendo a solução aquosa reagente de armazenamento e estabilização de ácidos nucleicos, o RNAlater (Life Technologies, Thermo Fisher, Califórnia, EUA). Os animais foram liberados no mesmo local de captura no dia seguinte, logo no início da manhã, cerca de 12 horas após a realização dos procedimentos.

Todo o material biológico foi mantido congelado a -20 °C no Projeto Sauim-de-Coleira (Manaus, AM) e posteriormente encaminhado em caixa de isopor, acondicionado em gelo seco e transportado por via aérea para o Laboratório de Diversidade e Doenças Virais (LDDV) do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio de Janeiro

(UFRJ), onde foram realizadas as análises laboratoriais. O protocolo utilizado para sequenciamento foi estabelecido pelo LDDV/UFRJ (D'arc et al., 2020).

2.4. Preparação das amostras

As amostras de fezes foram organizadas por grupo, formando no total nove conjuntos de amostras denominados de “*pools*”, o sequenciamento das amostras organizadas em *pools* permite um melhor aproveitamento quanto ao custo-benefício do experimento. Além disso, para nivelamento numérico dos indivíduos sequenciados dentro dos *pools* que seriam futuramente comparados, foram selecionadas amostras de no máximo oito indivíduos para compor cada *pool*. Etapas de enriquecimento viral foram realizadas com o objetivo de maximizar o sequenciamento dos vírus. Resumidamente, o preparo das amostras iniciou-se com o descongelamento, seguido por homogeneização em vórtex. Para a ruptura de grandes partículas sólidas, realizou-se transferência de aproximadamente 1mL de amostra/RNA*later* para tubos contendo *beads* de lise (Lysing Matrix E; MPBio) e homogeneização via disruptor por 1min30seg, com intervalos a cada 30seg e incubação em banho de gelo por 1min para evitar o superaquecimento da amostra. Após a disruptura, as amostras foram centrifugadas a 6.000g/10min a 4°C e o sobrenadante foi transferido para um tubo de 1,5mL estéril. Uma alíquota de 150µL de cada amostra do mesmo *pool* foi reunida no corpo de uma seringa estéril acoplada a um filtro Millipore (Millex-HV – 0,45µm – SLHV0135L; Merck) e seu conteúdo foi filtrado em um novo tubo de 1,5mL estéril. Uma etapa de separação do componente viral por gradiente de sacarose foi realizada adicionando-se 200µL de sacarose 20% em um novo tubo de 1,5mL estéril e 500µL do material filtrado, com cuidado para não misturar com a sacarose, seguida por centrifugação a 35.000g/1h30min a 4°C. Cerca de 500µL do sobrenadante foi descartado, preservando aproximadamente 200µL do material, correspondente à porção que contém as partículas virais.

Para a realização da digestão de ácidos nucleicos, com finalidade de reduzir a quantidade de material genético contaminante, foi realizado tratamento enzimático com o uso dos seguintes reagentes: 4U RNase-FreeDnase (Promega, Wisconsin – EUA), 6U Baseline Zero Dnase (Epicenter, Wisconsin EUA), 10µg Rnase A (Ambion, Califórnia EUA) e 3U Benzonase (Sigma, Missouri EUA), 25µL de 10x Baseline-Zero Buffer (Epicenter, Wisconsin, EUA). Essa mistura de enzimas foi adicionada em cada *pool* das amostras, com volume final de 40µL e foi incubada por 1h30min a 37°C sob agitação de 300rpm. Seguida por centrifugação rápida para remoção de gotículas presas na tampa e adição de 2µL da solução de inativação 10x Baseline-Zero Stop Solution; a amostra foi centrifugada e incubada novamente por 10min a 65°C. Após a segunda incubação, a solução foi centrifugada 10.000g/2min à temperatura ambiente. Aproximadamente 200µL do sobrenadante foi armazenado em tubo de 1,5mL estéril e utilizado na extração de ácidos nucleicos, certificando que o agente inativador não foi transferido junto.

2.5. Extração dos ácidos nucleicos

Após o enriquecimento viral, os ácidos nucleicos foram extraídos, utilizando kit próprio, o *QIAamp MinElute Virus Spin Kit* (QIAGEN, Hilden German) (Kohl et al., 2015). Para tanto, foram seguidas as instruções do fabricante com pequenas modificações no protocolo para melhor aproveitamento das análises, como: i) a não utilização do tampão *Carrier RNA* no *Buffer AL*; ii) ressuspensão da protease com o *Buffer AVE*, não com o de *Protease Resuspension Buffer*; iii) não foi realizada a etapa de lavagem com o *AWI*; iv) o material foi eluído em 20µL de água ultrapura.

Em seguida, o material foi submetido à síntese de DNA complementar (DNAC), utilizando o *Kit Superscript III First Strand Synthesis Supermix* (LifeTech; Thermo Fisher Scientific; Massachusetts, EUA). A síntese da segunda fita de DNAC foi realizada com a

KlenowFragment 3'-5' *exo* (New England Biolabs Inc Massachusetts, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

2.6. Preparação das bibliotecas

O material extraído foi submetido a uma etapa de purificação e concentração, utilizando o Kit *Agencourt AMPure XP* (cat # A63881; BeckmanCoulter - New Jersey, EUA), seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante. Para a quantificação do DNA de fita dupla (dsDNA) purificado, utilizamos o *QuBit dsDNA HS Assay Kit* (cat # Q32851; Thermo Fisher Scientific Massachusetts, EUA). A biblioteca foi montada usando o *Nextera XT DNA Library Preparation Kit* (Illumina - Califórnia, EUA). Uma nova etapa de purificação foi realizada, acrescida de seleção de fragmento, usando o mesmo kit citado anteriormente. A quantificação da biblioteca também foi feita no *QuBit dsDNA HS Assay Kit* (LifeTech) e para a determinação do tamanho da biblioteca foi utilizado o *NEBNext® Library Quant Kit* (NEB).

O mix de bibliotecas foi montado de forma equimolar e o sequenciamento massivo foi realizado duas vezes, inicialmente usando 8pM no cartucho MiSeq V2 300-cycle (Illumina), e um segundo momento usando 12pM no cartucho MiSeq V3 500-cycle (Illumina).

2.7. Bioinformática

Os arquivos FastQ gerados foram introduzidos em uma *pipeline* desenvolvida pelo LDDV (D'arc et al., 2020), que inicia com um filtro de qualidade no qual removerá sequências com qualidade menor que 30 *phred score* (Q) e tamanho menor que 50 pares de bases. Em seguida, foi feita a filtragem do genoma dos hospedeiros usando como referência sequências dos genomas de todos os PN depositadas na plataforma Ensembl.org (*Saimiri boliviensis boliviensis* – GCA_000235385.1; *Callithrix jacchus* –

GCA_002754865.1; *Aotus nancymaae* – GCA_000952055.2; *Cebus capucinu simitator* - GCA_001604975.1). As sequências mapeadas foram descartadas e as não mapeadas foram usadas na ferramenta BLASTx contra um banco de dados interno de vírus de vertebrados, e posteriormente, foi realizada uma segunda rodada no BLASTx NR utilizando agora todas as sequências do banco de dados do GenBank para confirmar a proveniência do vírus. Após essa última busca por similaridade, com o resultado gerado pelo segundo BLASTx foi utilizado o *software* MEGAN v.X (Huson et al., 2007) e as leituras virais foram manualmente analisadas.

A ferramenta BLAST é amplamente utilizada por todos os segmentos da genética molecular, incluindo em trabalhos com viroma, pois permite a busca por similaridade de sequência, alinhando novas leituras com sequências conhecidas. Porém, caso a espécie fonte esteja faltando no banco de dados a sua precisão pode cair drasticamente (Brady & Salzberg, 2009). Para resolver esse problema, surgiram ferramentas que aprimoraram algoritmos de pesquisa para aumentar a tratabilidade de classificações de milhões de leituras, como é o caso do Kraken (Wood & Salzberg, 2014; Rose et al., 2016), que é um *software* de classificação rápida de sequência que utiliza um algoritmo de mapeamento interno de *k-mer* para ancestral comum mais baixo, consultando bancos de dados do NCBI RefSeq (abril de 2021) (Wood & Salzberg, 2014). Dessa forma, também analisamos os arquivos FastQ na ferramenta Kraken 1.0, sendo os *k-mers* específicos de clados de vírus consultados. Os resultados das análises gerados no Kraken foram visualizados no *software* Krona (Ondov et al., 2011) que gerou os gráficos *html* interativos para resultados de classificação hierárquica (Shen et al., 2021). Assim, foi executado o Kraken em conjunto com o BLASTx a fim de classificar as leituras que não foram identificadas por algum deles.

2.8. Abundância e diversidade viral

Os dados gerados pelo Kraken foram utilizados para as análises estatísticas, por apresentar uma maior diversidade de famílias virais identificadas nas bibliotecas. Foi feita a classificação usando dados do hospedeiro da *International Committee on Taxonomy of Viruses* - ICTV (abril de 2021) e para nosso estudo utilizamos apenas os dados gerados dos vírus associados a infecções de mamíferos.

Foi realizada uma análise para verificar a composição, riqueza e diversidade viral de todos os nove grupos capturados. A riqueza do viroma e a diversidade alfa (Riqueza normalizada e Shannon efetivo) foram calculadas para cada biblioteca no nível da família de vírus (relacionados a mamíferos) usando conjuntos de *scripts* Rhea modificados (Lagkouvardos et al., 2017; Geoghegan et al., 2021), utilizando o R v3.4.0 integrado ao RStudio v1.0.143. Em nosso trabalho, para visualizações e comparações estatísticas entre as amostras, utilizamos como valor de diversidade alfa o Shannon efetivo, de acordo com as recomendações de Lagkouvardos et al. (2017). O *script* Rhea realizou a normalização dos dados, pois como o sequenciamento geralmente resulta em um número diferente de sequências por amostras, esse procedimento é necessário para alinhar as contagens de leitura antes da análise, realizado por um procedimento denominado rarefação (Lagkouvardos et al., 2017).

Para testar se a composição do viroma dos grupos do mesmo fragmento florestal ou mais próximos geograficamente são mais relacionados do que grupos mais distantes, foi realizado uma análise de Cluster de similaridade de Jaccard (Jaccard, 1912), considerando presença e ausência, e o teste de Mantel (Mantel, 1967), testando apenas os vírus de mamíferos, através do pacote Vegan (Oksanen et al., 2020). Para verificar se há relação entre a diversidade viral com o tamanho do grupo, e com o número de amostras de animais

no *pool*, tanto para todos os vírus como para vírus de importância para mamíferos, realizamos um teste de relação linear.

3. RESULTADOS

3.1. Visão geral dos dados de sequência

O sequenciamento massivo gerou no agrupamento dos dois sequenciamentos das nove bibliotecas um total de 27.740.940 leituras brutas que foram analisadas em duas ferramentas distintas (Tabela 2). Os dados resultantes mostraram grande divergência, sendo o Kraken a ferramenta que identificou em nível de famílias virais a maior diversidade e abundância, seguida pelo BLASTx. No geral, as famílias virais encontradas corresponderam a uma grande variedade de vírus capazes de infectar uma gama de hospedeiros, desde bactérias, arqueas, algas, fungos, plantas, invertebrados a vertebrados.

No BLASTx, após filtragem de qualidade, tamanho e genoma do hospedeiro, recuperamos 13.083.367 leituras (65,5%), que passaram por mais duas filtrações que identificou como leituras para vírus um total de 5.378 (0,04%). Enquanto que no Kraken os dados gerados pelo sequenciamento, após processamento de qualidade e tamanho, recuperaram 10.638.127 leituras sequenciadas e, após filtragem específica para vírus, identificou 70.762 leituras (0,66%).

A partir das análises em ambas as ferramentas, verificamos que a família viral *Coronaviridae* foi bastante abundante, com número de leituras brutas de 3.820 (70% das leituras) no BLASTx e 4.022 (6,06% das leituras) no Kraken, neste último sendo detectada em todos os grupos de animais trabalhados. Porém, esse número correspondia em quase sua totalidade ao vírus SARS-CoV-2 (do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus type 2*), tendo alta homologia identificada em ambas as plataformas. Por estarmos em pandemia ativa e o laboratório onde foram realizadas as análises laboratoriais estar trabalhando com o diagnóstico de SARS-CoV-2, acreditamos fortemente em um

sequenciamento não específico devido a contaminação ambiental das bibliotecas por este vírus, inclusive pelo fato de algumas das amostras terem sido coletadas antes da pandemia em Manaus. Isso foi corroborado por Sacchetto et al. (2021) que ao analisar os mesmos 26 saúns correspondentes a quatro dos nove grupos aqui estudados, com amostras de sangue coletadas durante a pandemia de COVID-19, não encontraram evidências da presença de SARS-CoV-2. Por conta disso, realizamos a retirada desta família viral na apresentação subsequente dos dados e análises estatísticas. Vide o material suplementar S2 para melhor explanação sobre a putativa contaminação ambiental por SARS-CoV-2.

3.1.1. BLASTx

Com a retirada de todas as leituras para *Coronaviridae* restaram 1.575 leituras (29,3%), correspondendo a 16 famílias virais. O número de leituras para cada *pool* sequenciado variou de 42 a 424 leituras (Tabela 2). Identificamos sequências de cinco famílias virais associadas a hospedeiros vertebrados (74%), bem como outras famílias que infectam bactérias (24%), plantas (1%) e sem classificação (1%) (material suplementar S3). As famílias virais de importância para vertebrados foram: *Adenoviridae*, *Herpesviridae*, *Papillomaviridae*, *Poxviridae* e *Retroviridae*. Destas, *Herpesviridae* foi a que apresentou maior abundância de leituras (1.026; 65%), presente em cinco dos grupos analisados. Para bacteriófagos, a família viral com maior número de leituras foi a *Siphoviridae*, com 158 leituras (10%), presente em todos os grupos.

3.1.2. Kraken

No total foram identificadas 95 famílias virais, após a retirada de *Coronaviridae*. As famílias com importância para infecções de mamíferos apresentaram 37.290 leituras (59,8%) de um total de 29 famílias virais; quatro famílias de importância para outros vertebrados (peixes, anfíbios e aves) e 62 famílias virais correspondentes principalmente a bactérias, plantas, fungos e invertebrados (material suplementar S4-S5) também compõem

a diversidade viral encontrada utilizando-se esta ferramenta. As famílias virais de interesse para mamíferos que apresentaram resultados mais expressivos no número de leituras foram a *Poxviridae* (29.285; 47%), *Herpesviridae* (3.975; 6,37%) e *Retroviridae* (3.298; 5,3%). Essas famílias estavam presentes em todos os grupos trabalhados.

3.2. Diversidade e abundância de vírus de mamíferos

Inicialmente realizou-se a normalização dos dados gerados pelo Kraken utilizando a *pipeline* Rhea (Lagkouvardos et al., 2017), a fim de remover viés devido aos diferentes tamanhos das amostras. Após normalização, a riqueza reduziu de 95 para 71 famílias virais para todos os vírus (material suplementar S6), e daquelas famílias virais de importância para mamíferos foi de 29 para 22 famílias virais (Tabela 3; material suplementar S7). Com relação à abundância, os vírus de mamíferos representaram 62% dos viomas, enquanto os vírus bacteriófagos corresponderam a 35% (com maior representatividade de *Siphoviridae* e *Myoviridae*). Os outros vírus representaram apenas 3% (Fig. 2).

Para as análises estatísticas foi utilizado apenas os valores atribuídos às 22 famílias de vírus associados a hospedeiros mamíferos. Focamos as análises apenas nesses vírus, pois provavelmente estavam infectando diretamente os grupos de saúns-de-coleira amostrados, em vez de estarem associados ao ambiente, dieta ou parasitas co-infectando (Geoghegan et al., 2021). Destas famílias virais, sete corresponderam a vírus de DNA, enquanto 15 corresponderam a vírus de RNA.

Em todos os grupos de saúns-de-coleira, a família viral encontrada em maior abundância foi a *Poxviridae* (79% dos vírus de mamíferos encontrados), seguida por *Herpesviridae* (9%), *Retroviridae* (8%) e *Adenoviridae* (1%). Outras famílias virais encontradas em menor abundância foram *Phenuiviridae*, *Picornaviridae*, *Reoviridae*, *Polyomaviridae*, *Flaviviridae*, *Caliciviridae*, *Circoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Tobamiviridae*, *Parvoviridae*, *Papillomaviridae*, *Peribunyaviridae*, *Arenaviridae*, *Picobirnaviridae*,

Hantaviridae, *Paramyxoviridae*, *Orthomyxoviridae* e *Arteriviridae* (totalizando 3%) (Fig. 3).

3.3. Variação na diversidade viral entre grupos e efeitos da distância geográfica

A riqueza normalizada dos grupos variou de seis a 17 famílias virais, correspondentes aos grupos SUMS e CIGS, respectivamente. A diversidade alfa variou de 3,77 a 1,16, dos grupos CIGS e JQ, respectivamente (Tabela 4; material suplementar S8). As informações sobre valores de riqueza e diversidades de todos os grupos encontram-se no material suplementar S9.

A curva de rarefação gerada pela *pipeline* Rhea mostrou que apenas quatro dos grupos trabalhados atingiram a estabilização (MUSA, SUMN, SUMS e VV). Os demais grupos apresentaram uma curva de amostragem da diversidade ainda em crescimento (CIGS, FCA, JQ, PQ e TA), sendo o grupo CIGS o que possui a curva menos estável (material suplementar S10).

As análises de regressão linear indicaram que não há relação significativa entre a diversidade viral com o tamanho do grupo ($N=9$; $R^2=0,168$; $p=0,273$), nem com o número de animais por *pool* ($N=9$; $R^2=0,219$; $p=0,205$) (material suplementar S11). A riqueza normalizada de famílias virais também não apresentou relação significativa com o número de animais por grupo ($N=9$; $R^2=0,0$; $p=0,989$) e nem com o número de animais por *pool* ($N=9$; $R^2=0,141$; $p=0,319$) (material suplementar S12).

Através da análise de cluster, não foi encontrado um padrão de agrupamento entre os grupos dos fragmentos florestais mais próximos, nem mesmo dentro do mesmo fragmento, com exceção dos grupos JQ e VV, do fragmento florestal da UFAM. Entretanto o grupo FCA, presente no mesmo fragmento, mostrou pouca similaridade com os demais grupos desse fragmento, agrupando-se com o grupo PQ, em um fragmento bem distante. De forma semelhante, os dois grupos vizinhos dentro do Parque Sumaúma (SUMN e

SUMS) tiveram maior similaridade com grupos de outros fragmentos florestais distantes do que entre si (Fig. 4) (a matriz de Jaccard encontra-se no material suplementar S13). Através do teste de Mantel ($r= 0.2099$, $p=0.2594$), também não foi verificada a influência da distância entre os grupos e a diversidade viral.

4. DISCUSSÃO

As pesquisas realizadas sobre os vírus em *Saguinus bicolor* na natureza estavam restritas à utilização de técnicas de PCR, buscando vírus específicos na espécie (Solorio, 2015). Apesar desses resultados, o conhecimento do viroma do sauim-de-coleira ainda era desconhecido, havendo uma grande lacuna sobre a diversidade viral desses animais. Neste estudo foi utilizada de forma inédita o sequenciamento massivo seguido por análise de metagenômica para descrever o viroma fecal do primata sauim-de-coleira.

Apesar de ainda ser menos aplicada do que a PCR, a metagenômica aplicada ao estudo do viroma permite a captura de uma grande diversidade de vírus. Esse método virtualmente possibilita o acesso a todas as sequências dos ácidos nucleicos virais presentes em uma determinada amostra biológica, proporcionando a expansão do nosso conhecimento sobre a diversidade e distribuição viral e possibilita também a descoberta de variantes relacionadas a vírus conhecidos e até os ainda não descritos (Fanello et al., 2013; Anthony et al., 2013; Geoghegan et al., 2021; Salmier et al., 2017; Santos et al., 2020).

Neste estudo foram utilizadas duas ferramentas distintas em conjunto para analisar os dados gerados pelo sequenciamento, gerando resultados ainda mais relevantes para maximizar a sensibilidade das análises (Wood & Salzberg, 2014). Das ferramentas utilizadas, o Kraken permitiu a classificação de uma maior diversidade de famílias virais gerais e daquelas de importância para mamíferos. Apesar de ser um método recente, essa

ferramenta vem sendo utilizada com bastante eficiência em trabalhos para análise dos dados sequenciais de viromas tanto de humanos como de outros animais (Chen et al., 2018; Han et al., 2018; Park & Kim, 2020; Nantel-Fortier et al., 2021; Shen et al., 2021), tendo ótima precisão possibilitada pelo alto e ainda crescente número de genomas microbianos sequenciados no seu banco de dados (Wood & Salzberg, 2014). Evidenciando que a escolha das ferramentas bioinformáticas para a análise de metagenomas virais podem influenciar fortemente a visão da diversidade viral (Tangherlini et al., 2016).

A utilização das fezes para determinar a presença de patógenos tem apresentado dados confiáveis nas pesquisas com primatas selvagens (Davoust et al., 2018), sendo comumente utilizadas na caracterização de viroma de diversas espécies por apresentar uma maior diversidade viral (Bodewes et al., 2013; Lojkić et al., 2016; Salmier et al., 2017) quando comparado a outras amostras (Xiao et al., 2020). Para algumas espécies de animais, inclusive de primatas de maior porte, as fezes já foram utilizadas sem necessidade de captura, pois como trata-se de amostras não invasivas, pode-se ter uma maior facilidade de coleta no ambiente, abrindo também novas possibilidades na pesquisa de epidemiologia molecular e na análise evolutiva de doenças infecciosas (D'arc et al., 2018; Davoust et al., 2018).

Geralmente a dominância do viroma fecal é constituída pelos vírus bacteriófagos (D'arc et al., 2018; Chen et al., 2019; Zhao et al., 2019; Sawaswong et al., 2019; Campbell et al., 2020). Em estudos comparativos dos viromas das fezes de macacos verdes (*Clorocebus sabeus*), babuíños (*Papio papio*) e bugios (*Alouatta macconnelli*) foi revelado que a heterogeneidade dos viromas foi dominado por vírus bacteriófagos para babuíños e bugios, ao contrário dos viromas de macacos verdes, que continha maioria correspondente a uma família viral eucarionte (Davoust et al., 2018), assim como no caso do viroma fecal de *Saguinus bicolor* que apresentou nos dois métodos utilizados uma

dominância por vírus de eucariontes, com altos valores de leituras de vírus de mamíferos que corresponderam principalmente a família *Poxviridae* no Kraken e *Herpesviridae* no BLASTx.

A família *Poxviridae* compreende vírus envelopados de DNA capazes de infectar uma variedade de hospedeiros invertebrados e vertebrados e podem ser patógenos importantes de alto impacto para a saúde pública (Kroon et al., 2011; Wanzeller et al., 2017; Abrahão et al., 2009; Oliveira et al., 2017). No Brasil, já foram registrados poxvírus em uma gama de espécies tanto da fauna doméstica como na silvestre, detectando desde anticorpos de vírus já conhecidos como na identificação de novas espécies (Fonseca, 1998; Trindade et al., 2007; Kroon et al., 2011; Peres et al., 2013; Barbosa et al., 2014; Peres et al., 2016; Dutra et al., 2017; Miranda et al., 2017; Hora et al., 2021). A infecção patogênica de poxvírus em PN no Brasil ainda é desconhecida. Apesar de já ter sido encontrado uma alta prevalência de ortopoxvírus em *Sapajus apella* e *Allouata caraya*, no leste da Amazônia (Abrahão et al., 2010), não foi possível verificar a relação entre a prevalência e o surgimento de infecções patogênicas nos animais, além de infecções zoonóticas. Porém, em calitriquídeos cativos mantidos na Europa e EUA, há relatos de surtos desses vírus com alta morbidade e mortalidade (Mätz-Rensing et al., 2006). Apesar da família *Poxviridae* corresponder a maior abundância na composição do viroma dos grupos de *Saguinus bicolor* do nosso trabalho, correspondendo a 79% dos vírus de mamíferos, não podemos afirmar que todos esses vírus encontrados sejam patogênicos para os primatas, sendo necessário identificar em nível de espécie. Em outros trabalhos de caracterização de viroma de primatas do gênero *Sapajus* no Brasil foi encontrado poxvírus compondo a microbiota oral dos animais (Santos et al., 2020) e fecal (Moreira, 2016). Em primatas cativos já foram identificadas sequências genéticas muito semelhantes com um poxvírus identificado inicialmente em um roedor amazônico, o BeAn 58058 (BAV) (Fonseca et al.,

1998) e que ainda não foi atribuído a um gênero dentro da família (Wanzeller et al., 2017; D'arc 2021, comunicação pessoal). Alguns pesquisadores sugerem que os roedores e marsupiais, podem ser reservatórios de poxvírus importantes (Abrahão et al., 2009; Oliveira et al., 2017; Miranda et al., 2017) e como esses animais possuem vasta distribuição nas nossas áreas trabalhadas (Malcolm, 1991) com altos registros deles nas plataformas de capturas dos sauins-de-coleira, podemos acreditar que eles podem ser potenciais transmissores desses vírus para os primatas.

Outra família viral que apresentou grande composição do viroma observado nas ferramentas analisadas, foi a *Herpesviridae*, vírus de DNA de fita dupla. Em relação a essa família viral, sabe-se que eles têm potencial patogênico limitado após a infecção primária de seus hospedeiros naturais, geralmente não causam infecções graves em animais saudáveis, sendo a maioria dessas infecções assintomáticas (Fleckenstein & Ensser, 2007; Aswad & Katzourakis, 2014; Eberle & Jones-Engel, 2017). Embora a maioria das infecções cruzadas de espécies sejam provavelmente abortivas (ou seja, o vírus não pode completar seu ciclo replicativo para produzir uma infecção ativa ou latente ou causar doença clínica), alguns herpesvírus podem produzir infecções graves ou letais quando transmitidos a uma espécie hospedeira não natural (Eberle & Jones-Engel, 2017). Os primatas são naturalmente infectados com vários herpesvírus (Eberle & Jones-Engel, 2017), porém apenas o *herpesvírus macacino 1* (vírus B) que ocorre naturalmente em macacos asiáticos do gênero *Macaca* é conhecido por ser patogênico para humanos (Huemer et al., 2002; Huff & Barry, 2003; Eberle & Jones-Engel, 2017). Os humanos são o hospedeiro original do *herpesvírus humano 1* (HHV-1), sendo este vírus já registrado causando infecção fatal em *Callithrix jacchus* em cativeiro (Huemer et al., 2002; Mätz-Rensing et al., 2003; Casagrande et al., 2014) e em vida livre (Bruno et al., 1997; Longa et al., 2011). Pelas análises do Kraken, essa família viral estava presente em todos os grupos

e pelo BLASTx foi identificada em cinco grupos. Em nosso estudo, a maioria dos sauíns-de-coleira estavam clinicamente saudáveis, porém alguns apresentavam verrugas únicas na face (um macho do grupo VV), na região genital (uma fêmea do grupo FCA, um macho do grupo JQ e um macho do grupo VV) e úlcera única na mucosa oral (uma fêmea do grupo TA), esta última observada em outros trabalhos de primatas com sintomatologia e diagnosticado para herpesvírus (Longa et al., 2011), o que talvez possa ser um indicativo dessa patologia nesses animais. Porém, não podemos descartar que essas úlceras podem ser decorrentes de infecção por outro vírus, como o papilomavírus, ou até mesmo outro agente etiológico não viral. A família *Papillomaviridae* também foi encontrada em quatro grupos, porém com menor abundância, vírus esses que já foram identificados em outros primatas e recentemente descritas novas cepas no Brasil (Silvestre et al., 2016; D'arc et al., 2020).

As famílias *Retroviridae* e *Adenoviridae* também foram encontradas com ambas as ferramentas, no Kraken está compondo porcentagem significativa do viroma dos *S. bicolor*, presente em todos os grupos e em cinco grupos, respectivamente. Os retrovírus são vírus envelopados de RNA inteiramente restritos aos hospedeiros vertebrados e estão presentes na maioria das espécies de primatas (Keita et al., 2014), inclusive os PN. Esses vírus podem ser endógenos ou exógenos, sendo o espumavírus o único retrovírus exógeno conhecido por infectar PN (Santos et al., 2019), já identificado em uma gama de hospedeiros de primatas brasileiros cativos e de vida livre (Muniz et al., 2013; Muniz et al., 2015; Miranda et al., 2019). A família *Adenoviridae*, vírus DNA não-envelopado, também já foi isolada ou detectada em representantes de várias espécies de vertebrados (Harrach et al., 2019), inclusive em PN (Podgorski et al., 2018). Nos PN há relatos de ocorrência tanto em animais de vida livre, porém ainda pouco se sabe sobre alterações patológicas neles (Wevers et al., 2011), e em infecções em animais cativos, sem e com sintomatologias, como pneumonia e diarreia (Shroyer et al., 1979; Chen et al., 2011; Hall et al., 2012; Gál

et., 2013). Em trabalho de Duarte e colaboradores (2019) com espécies de mamíferos e aves selvagens no Brasil, essa família viral foi a que apresentou maior número de *contigs* virais obtidos.

Outras famílias virais de importância zoonótica presentes em alguns grupos de saúns-de-coleira, encontradas apenas no Kraken, foram as famílias *Reoviridae* e *Hantaviridae*, ambos vírus de RNA, que também foram encontradas em alguns indivíduos da espécie por Solorio (2015) com teste de PCR (18,75% indivíduos positivos para rotavírus tipo A e 9,3% para hantavírus) de indivíduos provenientes de fragmentos urbanos de Manaus e, como em nosso trabalho, nenhum animal apresentava sintomatologias compatíveis para nenhum dos vírus. Em relação aos rotavírus (Família *Reoviridae*) conhecemos poucos estudos que pesquisam o patógeno ou anticorpos contra esse vírus em PN (Souza et al., 2012; Molina et al., 2019). Porém sabe-se que esses são um dos agentes etiológicos mais importantes causadores de diarreia em humanos e que é capaz de infectar uma grande variedade de espécies animais (Pimentel & Costa, 2010) tendo sua transmissão oral-fecal, por água e alimentos contaminados. Sobre os hantavírus, infecções naturais de primatas em recintos ao ar livre na Alemanha já foram diagnosticadas (Mertens et al., 2011), porém não existem relatos da presença de hantavírus em PN de vida livre, além deste estudo anterior com saúns-de-coleira (Solorio, 2015). Entretanto, alguns hantavírus não tiveram ainda a sua patogenicidade determinada em animais, podendo ser apatogênicos (Rovid-Spickler, 2018). Os roedores são os principais reservatórios naturais de hantavírus (Laenen et al., 2019) e em experimento realizado por Suzán e colaboradores (2008) com esse vírus em roedores selvagens no Panamá, foi verificado que os reservatórios do vírus foram mais encontrados em habitats perturbados e de borda do que em áreas florestais mais preservadas, sugerindo que a perda e fragmentação de habitat e a diversidade de espécies estão alterando a dinâmica desta doença.

Os roedores e marsupiais podem servir como hospedeiros amplificadores de diversos patógenos (Miranda et al., 2017; Shivaprakash et al., 2021), como algumas famílias virais encontradas em nosso estudo. Esses pequenos mamíferos, em áreas fragmentadas e perturbadas, frequentemente aumentam sua abundância e mostram uma relativa falta de separação entre suas distribuições no espaço vertical (Lambert et al., 2006; Mendes-Oliveira et al., 2015). Cenário que pode estar aproximando esses animais aos grupos de primatas que trabalhamos, já que as áreas estudadas são caracterizadas pelo intenso impacto antrópico (Gordo et al., 2013).

Apesar de o sequenciamento de viromas fecais de animais selvagens vir revelando muitos vírus eucarióticos, para a maioria desses ainda é desconhecido o potencial patogênico, sendo uma tarefa desafiadora e um foco para futuras investigações clínicas e de patogênese (Sawaswon et al., 2019; Lecuit & Eloit, 2013). Fator este que apontamos em nosso estudo, pois apesar de termos registrado uma grande diversidade de famílias virais de interesse para infecções de mamíferos e os grupos de saúns trabalhados apresentavam-se aparentemente saudáveis no momento das capturas, para termos uma maior noção se os vírus aqui caracterizados são potenciais patogênicos será necessário realizarmos trabalhos futuros para identificação dos vírus em nível de espécie e de associação com desenvolvimento patogênico.

Nosso estudo não mostrou correlação da diversidade viral com o número de amostras por *pool*, demonstrando que as diferenças amostrais não afetaram os resultados. Também não houve relação da diversidade viral com o tamanho do grupo (número de indivíduos), resultado também observado pelo trabalho de Bergner e colaboradores (2020) com amostras de fezes de populações de morcegos. Neste contexto, ainda são poucos os estudos com primatas que relacionam o tamanho do grupo e o risco de transmissão de doenças, sendo importante ter uma visão menos simplista e começar a considerar outras

variáveis importantes, como as características do ambiente, o modo de transmissão do patógeno e os padrões reais de contato dentro dos grupos (Nunn & Altizer, 2006). Além disso, como estamos tratando a comunidade viral em nível de grupo, a compreensão dos fatores em nível individual (sexo, idade, status hierárquico, estado reprodutivo e estresse) pode fornecer um quadro mais completo dos determinantes da diversidade viral (Bergner et al., 2020).

A composição viral também não esteve relacionada com a proximidade espacial dos grupos trabalhados. Segundo Farias e colaboradores (2015) indivíduos de saúns-de-coleira de diferentes fragmentos florestais de Manaus representam geneticamente uma população panmítica, que não estão geneticamente estruturadas nos diferentes fragmentos florestais devido ao alto fluxo gênico que continuou ocorrendo ao longo do tempo, apesar do isolamento recente desses fragmentos. Essa pode ser uma das explicações para que essa composição do viroma dos grupos em nível de família viral não seja diferente nos grupos analisados na paisagem, entretanto a identificação dos vírus em nível de espécie deve ser avaliada no futuro para confirmar essa hipótese.

Dos grupos trabalhados, o CIGS foi o que apresentou maior riqueza e diversidade de famílias virais, apesar de este ser o grupo que apresentou menor número de amostras em sua composição. Acreditamos que esse grupo por estar inserido em um fragmento florestal ao lado de um zoológico, pode estar exposto a diversos patógenos pela probabilidade de maior contato direto ou indireto com primatas de outras espécies e outros animais silvestres cativos. O espectro de patógenos em animais em zoológicos, inclusive primatas, pode ser distinta das populações selvagens devido à diversas condições, como fatores estressores e exposição a outras espécies de animais não tipicamente encontradas em um ambiente natural, conseqüentemente ao possível contato com agentes infecciosos diversos (Bailey & Mansfield, 2010). Porém, será necessário avaliar outras variáveis para se ter uma

melhor compreensão dos possíveis fatores que levaram esse grupo a apresentar essa grande diversidade.

O. S. bicolor, como uma espécie típica de calitriquídeo, vem conseguindo sobreviver em áreas fragmentadas e com alto grau de perturbação (Gordo et al., 2013), entretanto este cenário pode ser favorável a uma maior transmissão de patógenos, inclusive de etiologia viral (Solorio, 2015; Balasubramaniam et al., 2020). Assim, a investigação em populações saudáveis pode fornecer um nível básico do conhecimento sobre os vírus que estão presentes em hospedeiros sadios, o que pode ajudar a compreender o papel de certos patógenos em caso de um surto de doenças infecciosas em animais selvagens (Bodewes et al., 2013). Além dos expostos, o conhecimento do viroma fecal de saúns-de-coleira de vida livre pode gerar informações importantes para elucidar sobre um dos principais problemas de doenças recorrentes, ainda de etiologia desconhecida, que afeta essa espécie e outros calitriquídeos mantidos em cativeiro, conhecida como síndrome do emagrecimento progressivo (SEP) que é acompanhada de diarreia crônica, anemia, atrofia muscular, alopecia e, muitas vezes, leva ao óbito dos animais (Ialeggio & Baker, 1995; Richards-Rios et al., 2021).

Neste contexto, os estudos sobre os agentes virais presentes em animais ameaçados de extinção podem proporcionar informações valiosas para uma melhor compreensão das ameaças potenciais à sua saúde e, assim, poder sustentar esforços essenciais para a sua conservação e para a prevenção, controle e monitoramento das doenças. Além disso, esses dados mais abrangentes sobre a composição viral presente nos animais selvagens, também poderá fornecer informações para subsidiar estratégias para, quando possível, evitar ou minimizar o impacto de potenciais doenças de origem da fauna, desenvolvendo políticas de saúde pública e animal (Bueno et al., 2017; Wu et al., 2018).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por ser o primeiro estudo que caracteriza o viroma populacional de uma espécie de primata amazônico de vida livre, esse estudo é bastante relevante pois mostra que esses animais podem abrigar uma grande diversidade de famílias virais. Muitas dessas comunidades virais foram distintas entre os grupos de saíuns-de-coleira, sugerindo que a composição do viroma desses animais pode estar relacionada com diversas variáveis, desde individuais até ambientais. Sendo, assim, importante salientar que será necessário trabalhos futuros com maior esforço amostral, com coleta de amostras biológicas de outros grupos inseridos em diferentes gradientes florestais para também poder inferir se a composição do viroma é decorrente de variáveis ecológicas ou fatores estocásticos.

O aprofundamento das pesquisas nas famílias virais identificadas em nosso trabalho será essencial para verificar se os vírus que estão ocorrendo nesses animais são de importância patogênica para a conservação da espécie e para a saúde pública.

6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos membros do Projeto Sauim-de-Coleira pelo total apoio nas atividades de campo e capturas, ao Projeto Hostzika e CREATE-NEO pela disponibilidade de EPIs e recursos financeiros para as capturas (UTMB - University of Texas Medical Branch e Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado). Também somos bastante gratos aos colaboradores que nos auxiliaram com a disponibilização do espaço para a realização das capturas de alguns grupos (TA, PQ, SUMN, SUMS, CIGS e MUSA). Ao Laboratório de Diversidade e Doenças Virais pelo apoio e parceria na aquisição do material de armazenamento das amostras e de todo o equipamento e material para a realização das análises laboratoriais. A FAPEAM/Universal 006/2019 pelo apoio financeiro concedido ao Prof. Dr. Marcelo Gordo. Agradecemos ao Igor Roberto pelo

auxílio nas análises dos dados do artigo e à Camila Julia Ramos pela produção do mapa. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão da bolsa de mestrado de Aline Ramos Souza, e ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia da Universidade Federal do Amazonas.

7. REFERÊNCIAS

- Abrahão, JS, Guedes, MI, Trindade, GS, Fonseca, FG, Campos, RK, Mota, BF, et al. & Kroon, EG (2009). One more piece in the VACV ecological puzzle: could peridomestic rodents be the link between wildlife and bovine vaccinia outbreaks in Brazil?. *PLoS one*, 4 (10), e7428. [10.1371/journal.pone.0007428](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007428)
- Abrahão, JS, Silva-Fernandes, AT, Lima, LS, Campos, RK, Guedes, MI, Cota, MM, Assis, F., Borges, I., Souza-Júnior, MF, Lobato, Z., Bonjardim, CA, Ferreira, PCP, Trindade, GS, & Kroon, EG (2010). Vaccinia virus infection in monkeys, Brazilian Amazon. *Emerging infectious diseases*, 16 (6), 976. [10.3201/eid1606.091187](https://doi.org/10.3201/eid1606.091187)
- Anthony, SJ, Epstein, JH, Murray, KA, Navarrete-Macias, I., Zambrana-Torrel, CM, Solovyov, A., Ojeda-Flores, R., Arrigo, NC, Islam, A., Khan, AS, Hosseini, P., Bogich, TL, Olival, KJ, Sanchez-Leon, MD, Karesh, WB, Goldstein, T., Luby, SP, Morse, SS, Mazet, JAK, Daszak, P., & Lipkin, WI (2013). A strategy to estimate unknown viral diversity in mammals. *MBio*, 4 (5), e00598-13. [10.1289/ehp.6877](https://doi.org/10.1289/ehp.6877)
- Aswad, A., & Katzourakis, A. (2014). The First Endogenous Herpesvirus, Identified in the Tarsier Genome, and Novel Sequences from Primate Rhadinoviruses and Lymphocryptoviruses. *PLoS Genet* 10 (6): e1004332. [10.1371/journal.pgen.1004332](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004332)
- Bailey, C., & Mansfield, K. (2010). Emerging and reemerging infectious diseases of nonhuman primates in the laboratory setting. *Veterinary pathology*, 47 (3), 462-481. [10.1177/0300985810363719](https://doi.org/10.1177/0300985810363719)
- Balasubramaniam, KN, Sueur, C., Huffman, MA, & MacIntosh, AJJ (2020) Primate Infectious Disease Ecology: Insights and Future Directions at the Human-Macaque Interface. In: Li JH., Sun L., & Kappeler P. (eds) *The Behavioral Ecology of the Tibetan Macaque*. Fascinating Life Sciences. Springer, Cham. [10.1007/978-3-030-27920-2_13](https://doi.org/10.1007/978-3-030-27920-2_13)
- Barbosa, AV, Medaglia, ML, Soares, HS, Quixabeira-Santos, JC, Gennari, SM, & Damaso, CR (2014). Presence of neutralizing antibodies to Orthopoxvirus in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in Brazil. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 8 (12), 1646-1649. [10.3855/jidc.5216](https://doi.org/10.3855/jidc.5216)
- Bergner, LM, Orton, RJ, Benavides, JA; Becker, DJ, Tello, C.; Biek, R., & Streicker, DG (2020). Demographic and environmental drivers of metagenomic viral diversity in vampire bats. *Molecular ecology*, 29 (1), 26-39. [10.1111/mec.15250](https://doi.org/10.1111/mec.15250)
- Bodewes, R., van der Giessen, J., Haagmans BL, Osterhaus, ADME, & Smits, SL (2013). Identification of multiple novel viruses, including a parvovirus and a hepevirus, in feces of red foxes. *Journal of virology*, 87 (13), 7758-7764. [10.1128/JVI.00568-13](https://doi.org/10.1128/JVI.00568-13)
- Brady, A., & Salzberg, SL (2009). Phymm and PhymmBL: metagenomic phylogenetic classification with interpolated Markov models. *Nature methods*, 6 (9), 673-676. [10.1038/nmeth.1358](https://doi.org/10.1038/nmeth.1358)
- Bruno, SF, Liebhold, MM, Matz-Rensing, K., Romão, MAP, Didier, A., Brandes, F., Bressan, ACS, & Kaup, FJ (1997). Herpesvirus infection in free-living black-tufted-ear marmoset (*Callithrix penicillata* E. Geoffroyi 1812) at the State Park of Serra da Tiririca,

Niterói, Rio de Janeiro, Brazil. *Berliner und Munchener Tierärztliche Wochenschrift*, 110(11-12), 427-430.

Bueno, MG, Catão-Dias, JL, de Oliveira Laroque, P., Vasconcellos, SA, Neto, JSF, Gennari, SM, ... Valença-Montenegro, MM (2017). Infectious Diseases in Free-Ranging Blonde Capuchins, *Sapajus flavius*, in Brazil. *International Journal of Primatology*, 38 (6), 1017-1031. [10.1007/s10764-017-9994-5](https://doi.org/10.1007/s10764-017-9994-5)

Campbell, SJ, Ashley, W., Gil-Fernandez, M., Newsome, TM, Di Giallonardo, F., Ortiz-Baez, A. S., ... Geoghegan, JL (2020). Red fox viromes in urban and rural landscapes. *Virus Evolution*, 6 (2), veaa065. [10.1093/ve/veaa065](https://doi.org/10.1093/ve/veaa065)

Canova, R., Budaszewski, RF, Weber, MN, da Silva, MS, Puhl, DE, Battisti, LO, Soares, JF, Wagner, PG, Varela, APM, Mayer, FQ, & Canal, CW (2021). Spleen and lung virome analysis of South American fur seals (*Arctocephalus australis*) collected on the southern Brazilian coast. *Infection, Genetics and Evolution*, 92, 104862. [10.1016/j.meegid.2021.104862](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104862)

Carroll, D., Daszak, P., Wolfe, ND, Gao, GF, Morel, CM, Morzaria, S., Pablos-Méndez, A., Tomori, O., & Mazet, JAK (2018) The global virome project. *Science*, 359(6378), 872-874. [10.1126/science.aap7463](https://doi.org/10.1126/science.aap7463)

Casagrande, RA, Pannuti, CS, Kanamura, C., Freire, W S, Grespan, A., & Matushima, ER (2014). Fatal Human herpesvirus 1 (HHV-1) infection in captive marmosets (*Callithrix jacchus* and *Callithrix penicillata*) in Brazil: clinical and pathological characterization. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 34 (11), 1109-1114. [10.1590/S0100-736X2014001100013](https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014001100013)

Chen, EC, Yagi, S., Kelly, KR, Mendoza, SP, Maninger, N., Rosenthal, A., Spinner, A., Bales, KL, Schnurr, DP, Lerche, NW, & Chiu, CY (2011). Cross-species transmission of a novel adenovirus associated with a fulminant pneumonia outbreak in a new world monkey colony. *PLoS pathogens*, 7 (7), e1002155. [10.1371/journal.ppat.1002155](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002155)

Chen, Q., Wang, L., Zheng, Y., Zhang, J., Guo, B., Yoon, KJ, Gauger, PC, Harmon, KM, Main, RG, & Li, G. (2018). Metagenomic analysis of the RNA fraction of the fecal virome indicates high diversity in pigs infected by porcine endemic diarrhea virus in the United States. *Virology journal*, 15 (1), 1-9. [10.1186/s12985-018-1001-z](https://doi.org/10.1186/s12985-018-1001-z)

Chen, L., Gu, W., Liu, C., Wang, W., Li, N., Chen, Y., Lu, C., Sun, X., Han, Y., Kuang, D., Tong, P., & Dai, J. (2019). Characteristics of the tree shrew gut virome. *PlosOne*, 14 (2), e0212774. [10.1371/journal.pone.0212774](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212774)

Cooper, N., & Nunn, CL (2013). Identifying future zoonotic disease threats: where are the gaps in our understanding of primate infectious diseases? *Evolution, medicine, and public health*, 2013 (1), 27-36. [10.1093/emph/eot001](https://doi.org/10.1093/emph/eot001)

D'arc, M., Furtado, C., Siqueira, JD, Seuánez, HN, Ayoub, A., Peeters, M., & Soares, MA (2018). Assessment of the gorilla gut virome in association with natural simian immunodeficiency virus infection. *Retrovirology*, 15 (1), 1-8. [10.1186/s12977-018-0402-9](https://doi.org/10.1186/s12977-018-0402-9)

D'arc, M., Moreira, FR, Dias, CA, Souza, AR, Seuánez, HN, Soares, MA, Tavares, MCH, & Santos, AF (2020). The characterization of two novel neotropical primate

papillomaviruses supports the ancient within-species diversity model. *Virus evolution*, 6 (1), veaa036. [10.1093/ve/veaa036](https://doi.org/10.1093/ve/veaa036)

Davoust, B., Levasseur, A., & Mediannikov, O. (2018). Studies of nonhuman primates: key sources of data on zoonoses and microbiota. *New microbes and new infections*, 26, S104-S108. [10.1016/j.nmni.2018.08.014](https://doi.org/10.1016/j.nmni.2018.08.014)

Duarte, AM, Silva, JMF, Brito, CR, Teixeira, DS, Melo, FL, Ribeiro, BM, Nagata T., & Campos, FS (2019). Faecal virome analysis of wild animals from Brazil. *Viruses*, 11 (9), 803. [10.3390/v11090803](https://doi.org/10.3390/v11090803)

Dutra, LAL, Almeida, GMF, Oliveira, GP, Abrahão, JS, Kroon, EG, & Trindade, GS (2017). Molecular evidence of Orthopoxvirus DNA in capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) stool samples. *Archives of virology*, 162(2), 439-448. [10.1007/s00705-016-3121-3](https://doi.org/10.1007/s00705-016-3121-3)

Eberle, R., & Jones-Engel, L. (2017). Understanding primate herpesviruses. *Journal of emerging diseases and virology*, 3 (1). [10.16966/2473-1846.127](https://doi.org/10.16966/2473-1846.127)

Estrada, A., Garber, PA, Rylands, AB, Roos, C., Fernandez-Duque, E., Di Fiore, A., ... Li, B. (2017). Impending extinction crisis of the world's primates: Why primates matter. *Science advances*, 3 (1), e1600946. [10.1126/sciadv.1600946](https://doi.org/10.1126/sciadv.1600946).

Farias, I. P., Santos, W. G., Gordo, M., & Hrbek, T. (2015). Effects of forest fragmentation on genetic diversity of the Critically Endangered primate, the pied tamarin (*Saguinus bicolor*): Implications for conservation. *Journal of Heredity*, 106 (S1), 512-521. [/10.1093/jhered/esv048](https://doi.org/10.1093/jhered/esv048)

Fancello, L., Trape, S., Robert, C., Boyer, M., Popgeorgiev, N., Raoult, D., & Desnues, C (2013). Viruses in the desert: a metagenomic survey of viral communities in four perennial ponds of the Mauritanian Sahara. *The ISME journal*, 7 (2), 359-369. [10.1038/ismej.2012.101](https://doi.org/10.1038/ismej.2012.101)

Fleckenstein, B., & Ensser A. (2007). Gammaherpesviruses of New World primates. (Chapter 60) In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, Yamanishi K, editors. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge University Press.

Fonseca, FG, Lanna, MC, Campos, MA, Kitajima, EW, Peres, JN, Golgher, RR, Ferreira, PC, & Kroon, EG (1998). Morphological and molecular characterization of the poxvirus BeAn 58058. *Archives of virology*, 143 (6), 1171-1186. [10.1007/s007050050365](https://doi.org/10.1007/s007050050365)

Gál, J., Hornyák, Á., Mándoki, M., Bakonyi, T., Balka, G., Szeredi, L., Marosán, M., Ludányi, T., Forgách, P., Sós, E., Demeter, Z., & Farkas, S. L. (2013). Novel mastadenovirus infection and clinical disease in a pygmy marmoset (*Callithrix [Cebuella] pygmaea*). *Veterinary microbiology*, 167 (3-4), 695-699. [10.1016/j.vetmic.2013.08.008](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.08.008)

Geoghegan, JL, Di Giallonardo, F., Wille, M., Ortiz-Baez, AS, Costa, VA, Ghaly, T., Mifsud, JCO, Turnbull, OMH, Bellwood, DR, Williamson, JE, & Holmes, E C (2021). Virome composition in marine fish revealed by meta-transcriptomics. *Virus evolution*, 7 (1), veab005. [10.1093/ve/veab005](https://doi.org/10.1093/ve/veab005)

Gordo, M. (2012). Ecologia e conservação do sauí-de-coleira, *Saguinus bicolor* (Primates; Callitrichidae) [Tese de doutorado]. Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, Pará.

Gordo, M., Calleia, FO, Vasconcelos, SA, Leite, JFF, & Ferrari, SF (2013). The challenges of survival in a concrete jungle: conservation of the pied tamarin (*Saguinus bicolor*) in the urban landscape of Manaus, Brazil. In: Marsh, L., & Chapman, C.A. (Eds.), *Primates in Fragments: Complexity and Resilience*. Springer, New York, pp. 357–370. [10.1007/978-1-4614-8839-2_23](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8839-2_23).

Gordo, M., Jerusalinsky, L., Mittermeier, RA, Rohe, F., Boubli, J., Subirá, R., & Vidal, M. (2019). *Saguinus bicolor*. *The IUCN Red List of Threatened Species* e.T40644A17931870. [10.2305/IUCN.UK.2019-3.RLTS.T40644A17931870.en](https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-3.RLTS.T40644A17931870.en).

Guimarães, VY, Justo, AA, Martins, LL, Catão-Dias, JL, & Sacristán, C. (2020). Emerging coronaviruses in neotropical primates: A new threat? *Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública*, 7 (1), 001-012. [10.4025/revcivet.v7i1.55490](https://doi.org/10.4025/revcivet.v7i1.55490)

Hall, NH, Archer, LL, Childress, AL, & Wellehan Jr, JF (2012). Identification of a novel adenovirus in a cotton-top tamarin (*Saguinus oedipus*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 24 (2), 359-363. [10.1177/1040638711435809](https://doi.org/10.1177/1040638711435809)

Harrach, B., Tarján, ZL, & Benkő, M. (2019). Adenoviruses across the animal kingdom: a walk in the zoo. *FEBS letters*, 593 (24), 3660-3673. [10.1002/1873-3468.13687](https://doi.org/10.1002/1873-3468.13687)

Hora, AS, Taniwaki, SA, Martins, NB, Pinto, NN, Schlemper, AE, Santos, AL, Szabó, MPJ, & Brandão, PE (2021). Genomic Analysis of Novel Poxvirus Brazilian Porcupinepox Virus, Brazil, 2019. *Emerging infectious diseases*, 27 (4), 1177. [10.3201/eid2704.203818](https://doi.org/10.3201/eid2704.203818)

Huemer, HP, Larcher, C., Czedik-Eysenberg, T., Nowotny, N., & Reifinger, M. (2002). Fatal infection of a pet monkey with human herpesvirus 1. *Emerging infectious diseases*, 8 (6), 639. [10.3201/eid0806.010341](https://doi.org/10.3201/eid0806.010341)

Huff, JL, & Barry, PA (2003). B-virus (*Cercopithecine herpesvirus 1*) infection in humans and macaques: potential for zoonotic disease. *Emerging infectious diseases*, 9(2), 246. [10.3201/eid0902.020272](https://doi.org/10.3201/eid0902.020272)

Huson, DH, Auch, A. F., Qi, J., & Schuster, S. C. (2007). MEGAN analysis of metagenomic data. *Genome research*, 17(3), 377-386. [10.1101/gr.5969107](https://doi.org/10.1101/gr.5969107)

Ialeggio, DM, & Baker, A. J. (1995). Results of a preliminary survey into wasting marmoset syndrome in callitrichid collections. Toronto, Ontario, Canada, 148-158.

Jaccard, P. (1912). The distribution of the flora in the alpine zone. 1. *New phytologist*, 11(2), 37-50.

Gordo, M. Processo de elaboração, monitoria e avaliação do Plano de Ação Nacional para a conservação do Sauí-de-coleira. In: Brasil, 2017. Plano de ação nacional para a conservação do sauí-de-coleira. ICMBio/MMA.

Keita, MB, Hamad, I., & Bittar, F. (2014). Looking in apes as a source of human pathogens. *Microbial pathogenesis*, 77, 149-154. [10.1016/j.micpath.2014.09.003](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.09.003)

- Kohl, C., Brinkmann, A., Dabrowski, P. W., Radonić, A., Nitsche, A., & Kurth, A. (2015). Protocol for metagenomic virus detection in clinical specimens. *Emerging infectious diseases*, 21(1), 48. [10.3201/eid2101.140766](https://doi.org/10.3201/eid2101.140766)
- Kroon, EG, Mota, BEF, Abrahão, JS, da Fonseca, FG, & Trindade, GS (2011). Zoonotic Brazilian Vaccinia virus: from field to therapy. *Antiviral research*, 92 (2), 150-163. [10.1016/j.antiviral.2011.08.018](https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.08.018)
- Kutnjak, D., Tamisier, L., Adams, I., Boonham, N., Candresse, T., Chiumenti, M., ... & Haegeman, A. (2021). A primer on the analysis of high-throughput sequencing data for detection of plant viruses. *Microorganisms*, 9(4), 841. [10.3390/microorganisms9040841](https://doi.org/10.3390/microorganisms9040841)
- Laenen, L., Vergote, V., Calisher, CH, Klempa, B., Klingström, J., Kuhn, JH, & Maes, P. (2019). Hantaviridae: current classification and future perspectives. *Viruses*, 11(9), 788. [10.3390/v11090788](https://doi.org/10.3390/v11090788)
- Lagkouvardos, I., Fischer, S., Kumar, N., & Clavel, T. (2017). Rhea: a transparent and modular R pipeline for microbial profiling based on 16S rRNA gene amplicons. *PeerJ*, 5, e2836. [10.7717/peerj.2836](https://doi.org/10.7717/peerj.2836)
- Lambert, TD, Malcolm, JR, & Zimmerman, BL (2006). Amazonian small mammal abundances in relation to habitat structure and resource abundance. *Journal of Mammalogy*, 87 (4), 766-776. [10.1644/05-MAMM-A-261R1.1](https://doi.org/10.1644/05-MAMM-A-261R1.1)
- Lecuit, M., & Eloit, M. (2013). The human virome: new tools and concepts. *Trends in microbiology*, 21(10), 510-515. [10.1016/j.tim.2013.07.001](https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.07.001)
- Lojkić, I., Biđin, M., Prpić, J., Šimić, I., Krešić, N., & Bedeković, T. (2016). Faecalvirome of red foxes from peri-urban areas. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 45, 10-15. [10.1016/j.cimid.2016.01.005](https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.01.005)
- Longa, CS, Bruno, SF, Pires, AR, Romijn, PC, Kimura, LS, & Costa, CH (2011). Human herpesvirus 1 in wild marmosets, Brazil, 2008. *Emerging Infectious Diseases*, 17 (7), 1308. [10.3201/eid1707.100333](https://doi.org/10.3201/eid1707.100333)
- Malcolm, JR. (1991). Comparative abundances of Neotropical small mammals by trap height. *Journal of Mammalogy*, 72(1), 188-192. [10.2307/1381995](https://doi.org/10.2307/1381995)
- Mantel, N. (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27(2):209-20.
- Marsh, LK, Chapman, CA, Arroyo-Rodríguez, V., Cobden, AK, Dunn, JC, Gabriel, D., Nijman, V.; Reyna-Hurtado, R.; Serio-Silva, JC, & Wasserman, MD (2013). Primates in fragments 10 years later: once and future goals. In: Marsh, LK Chapman, CA (eds.), *Primates in fragments* (pp. 505-525). Springer, New York, NY. doi.org/10.1007/978-1-4614-8839-2_34
- Mätz-Rensing, K., Jentsch, KD, Rensing, S., Langenhuyzen, S., Verschoor, E., Niphuis, H., & Kaup, FJ (2003). Fatal Herpes simplex infection in a group of common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Veterinary pathology*, 40 (4), 405-411. [10.1354/vp.40-4-405](https://doi.org/10.1354/vp.40-4-405)

Mätz-Rensing, K., Ellerbrok, H., Ehlers, B., Pauli, G., Floto, A., Alex, M., Czerny, CP, & Kaup, F J (2006). Fatal poxvirus outbreak in a colony of New World monkeys. *Veterinary pathology*, 43 (2), 212-218. [10.1354/vp.43-2-212](https://doi.org/10.1354/vp.43-2-212)

Mendes-Oliveira, AC, Borges, MLO, Lambert, T., Santos-Filho, M., Bergallo, H., Ardente, N., Maria, SLS, Malcolm, J. (2015). Efeitos antrópicos sobre comunidades de pequenos mamíferos não-voadores na Amazônia brasileira. In: Mendes-Oliveira, Ac; Miranda, C. *Os Pequenos Mamíferos Não Voadores da Amazônia Brasileira* (pp. 257-274). Publisher: Sociedade Brasileira de Mastozoologia-Serie Livros (2).

Mertens, M.; Essbauer, SS; Rang, A.; Schröder, J.; Spletstoesser, WD; Kretzschmar, C.; Krüger, DH; Groschup, MH; Mätz-Rensing, K.; & Ulrich, RG (2011). Non-human primates in outdoor enclosures: risk for infection with rodent-borne hantaviruses. *Veterinary microbiology*, 147 (3-4), 420-425. [10.1016/j.vetmic.2010.07.018](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.07.018)

Miranda, JB, Borges, IA, Campos, SP, Vieira, FN, de Ázara, TM, Marques, FA, ... Trindade, GDS (2017). Serologic and molecular evidence of vaccinia virus circulation among small mammals from different biomes, Brazil. *Emerging infectious diseases*, 23(6), 931. [10.3201/eid2306.161643](https://doi.org/10.3201/eid2306.161643)

Miranda, TS, Muniz, CP, Moreira, SB, Bueno, MG, Kierulff, MCM, Molina, CV, Catão-Dias, JL, Pissinatti, A., Soares, MA, & Santos, A. F. (2019). Eco-Epidemiological Profile and Molecular Characterization of Simian Foamy Virus in a Recently-Captured Invasive Population of *Leontopithecus chrysomelas* (Golden-Headed Lion Tamarin) in Rio de Janeiro, Brazil. *Viruses*, 11 (10), 931. [10.3390/v11100931](https://doi.org/10.3390/v11100931)

Molina, CV, Heinemann, MB, Kierulff, C., Pissinatti, A., Silva, TF, Freitas, DG, ... Bueno, MG (2019). *Leptospira* spp., rotavirus, norovirus, and hepatitis E virus surveillance in a wild invasive golden-headed lion tamarin (*Leontopithecus chrysomelas*; Kuhl, 1820) population from an urban park in Niterói, Rio de Janeiro, Brazil. *American journal of primatology*, 81(3), e22961. [10.1002/ajp.22961](https://doi.org/10.1002/ajp.22961)

Mollentze, N., & Streicker, DG (2020). Viral zoonotic risk is homogenous among taxonomic orders of mammalian and avian reservoir hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117 (17), 9423-9430. [10.1073/pnas.1919176117](https://doi.org/10.1073/pnas.1919176117)

Morand, S., & Figuié, M. (2018). Emergence of infectious diseases: Risks and issues for societies. Versailles: Ed. Quae, 128 p. (*Matière à débattre et décider*) [10.35690/978-2-7592-2773-0](https://doi.org/10.35690/978-2-7592-2773-0)

Moreira, DR (2016). Análise de viromas em *Alouatta caraya* e *Saimiri collinsi* mantidos em cativeiro no Centro Nacional de Primatas, Ananindeua, Pará [dissertação de mestrado não publicada]. Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará.

Muniz, CP, Troncoso, LL, Moreira, MA, Soares, EA, Pissinatti, A., Bonvicino, CR, ... Soares, MA (2013). Identification and characterization of highly divergent simian foamy viruses in a wide range of new world primates from Brazil. *PLoS One*, 8 (7), e67568. [10.1371/journal.pone.0067568](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067568)

Muniz, CP, Jia, H., Shankar, A., Troncoso, LL, Augusto, AM, Farias, E., ... Switzer, WM (2015). An expanded search for simian foamy viruses (SFV) in Brazilian New World

primates identifies novel SFV lineages and host age-related infections. *Retrovirology*, 12 (1), 1-17. [10.1186/s12977-015-0217-x](https://doi.org/10.1186/s12977-015-0217-x)

Nantel-Fortier, N., Gauthier, M., L'Homme, Y., Fravallo, P., & Brassard, J. (2021). Treatments of porcine fecal samples affect high-throughput virome sequencing results. *Journal of Virological Methods*, 289, 114045. [10.1016/j.jviromet.2020.114045](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.114045)

Nunn, CL, & Altizer, S. (2006). *Infectious Diseases in Primates: Behavior, Ecology and Evolution*. Oxford: Oxford University Press.

Nunn, C.L., & Gillespie, TR (2016). Infectious disease and primate conservation. In: Wich, SA, Marshall, AJ (eds.), *An Introduction to Primate Conservation* (157-173). Oxford: Oxford University Press.

Oksanen, J., Blanchet, FG, Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlenn, D., Minchin, PR, O'Hara, RB, Simpson, GL, Solymos, P., Stevens, MHH, Szoecs, E., Wagner, H. (2020). *Vegan: Community Ecology Package (Version 2.5-5)*. Available online at: <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html>

Ondov, BD, Bergman, NH, & Phillippy, AM (2011). Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC bioinformatics*, 12 (1), 1-10. [10.1186/1471-2105-12-385](https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-385)

Park, J., & Kim, EB. (2020). Differences in microbiome and virome between cattle and horses in the same farm. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 33 (6), 1042. [10.5713/ajas.19.0267](https://doi.org/10.5713/ajas.19.0267)

Patz, JA, Daszak, P., Tabor, GM, Aguirre, AA, Pearl, M., Epstein, J., ... & Working Group on Land Use Change Disease Emergence. (2004). Unhealthy landscapes: policy recommendations on land use change and infectious disease emergence. *Environmental health perspectives*, 112 (10), 1092-1098. [10.1289/ehp.6877](https://doi.org/10.1289/ehp.6877)

Peres, MG, Bacchiega, TS, Appolinário, CM, Vicente, AF, Allendorf, SD, Antunes, JMAP., Moreira, AS, Legatti, E., Fonseca, CR, Pituco, EM, Okuda, LH, Pantoja, JCF, Ferreira, F., & Megid, J. (2013). Serological study of vaccinia virus reservoirs in areas with and without official reports of outbreaks in cattle and humans in São Paulo, Brazil. *Archives of virology*, 158 (12), 2433-2441. [10.1007/s00705-013-1740-5](https://doi.org/10.1007/s00705-013-1740-5)

Peres, MG, Barros, CB, Appolinário, CM, Antunes, JM, Mioni, MS, Bacchiega, TS, Allendorf, DS, Vicente, AF, Fonseca, CR & Megid, J. (2016). Dogs and opossums positive for vaccinia virus during outbreak affecting cattle and humans, São Paulo State, Brazil. *Emerging infectious diseases*, 22 (2), 271. [10.3201/eid2202.140747](https://doi.org/10.3201/eid2202.140747)

Pimentel, RBQ, & Costa, CA (2010). Detecção de rotavírus em um cão doméstico na Cidade de Manaus-AM. *Acta Amazonica*, 40, 405-408. [10.1590/S0044-59672010000200020](https://doi.org/10.1590/S0044-59672010000200020)

Podgorski, II, Pantó, L., Földes, K., Winter, I., Jánoska, M., Sós, E., Chenet, B., Harrach, B., & Benkő, M. (2018). Adenoviruses of the most ancient primate lineages support the theory on virus– host co-evolution. *Acta Veterinaria Hungarica*, 66 (3), 474-487. [10.1556/004.2018.042](https://doi.org/10.1556/004.2018.042)

Richards-Rios, P., Wigley, P., López, J., Wormell, D., Barbón, A. (2021). Changes in the faecal microbiome of pied tamarins (*Saguinus bicolor*) associated with chronic, recurrent diarrhoea and weight loss. *Animal microbiome*, 3(1), 1-15. [10.1186/s42523-020-00062-4](https://doi.org/10.1186/s42523-020-00062-4)

Riley, EP, MacKinnon, KC, Fernandez-Duque, E., Setchell, JM, Garber, PA (2014). Code of best practices for field primatology. Resour. doc., Int. Primatol. Soc., Am. Soc. Primatol.

Rondón, S., Ortiz, M., León, C., Galvis, N., Link, A., & González, C. (2017). Seasonality, richness and prevalence of intestinal parasites of three neotropical primates (*Alouatta seniculus*, *Ateles hybridus* and *Cebus versicolor*) in a fragmented forest in Colombia. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 6 (3), 202-208. [10.1016/j.ijppaw.2017.07.006](https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2017.07.006)

Rose, R., Constantinides, B., Tapinos, A., Robertson, DL, & Prospero, M. (2016). Challenges in the analysis of viral metagenomes. *Virus Evolution*, 2 (2), vew022. [10.1093/ve/vew022](https://doi.org/10.1093/ve/vew022)

Rovid-Spickler, A. (2018). Hantavirus Disease. CFSPH. Available from: <https://bit.ly/2RHLqhZ>

Sacchetto, L., Chaves, BA, Costa, ER, Medeiros, ASM, Gordo, M., Araújo, DB, Oliveira, DBL, da Silva, APB, Negri, AF, Durigon, EL, Hanley, KA, Vasilakis, N., de Lacerda, MVG, Nogueira, ML (2021). Lack of Evidence of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Spillover in Free-Living Neotropical Non-Human Primates, Brazil. *Viruses*, 13(10):1933. [10.3390/v13101933](https://doi.org/10.3390/v13101933)

Salmier, AM, Tirera, S., de Thoisy, B., Franc, A., Darcissac, E., Donato, D., Bouchier, C., Lacoste, V., & Lavergne, A. (2017). Virome analysis of two sympatric bat species (*Desmodus rotundus* and *Molossus molossus*) in French Guiana. *PLoS One*. 12 (11):e0186943. [10.1371/journal.pone.0186943](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186943)

Santos, AF, Cavalcante, LT, Muniz, CP, Switzer, WM, & Soares, MA (2019). Simian foamy viruses in Central and South America: A new world of discovery. *Viruses*, 11(10), 967. [10.3390/v11100967](https://doi.org/10.3390/v11100967)

Santos, RN, Campos, FS, Finoketti, F., Santos, AC, Campos, AAS, Wagner, PGC, Roehe, PM, Batista, HBCR, & Franco, AC(2020). Viral diversity in oral cavity from *Sapajus nigritus* by metagenomic analyses. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51 (4), 1941-1951. [10.1007/s42770-020-00350-w](https://doi.org/10.1007/s42770-020-00350-w)

Sawaswong, V., Fahsbender, E., Altan, E., Kemthong, T., Deng, X., Malaivijitnond, S., Payungporn, S., & Delwart, E. (2019). High diversity and novel enteric viruses in fecal viromes of healthy wild and captive Thai cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *Viruses*, 11 (10), 971. [10.3390/v11100971](https://doi.org/10.3390/v11100971)

Shan, T., Li, L., Simmonds, P., Wang, C., Moeser, A., & Delwart, E. (2011). The fecal virome of pigs on a high-density farm. *Journal of virology*, 85 (22), 11697-11708. [10.1128/JVI.05217-11](https://doi.org/10.1128/JVI.05217-11)

Shen, H., Zhang, J., Gauger, P. C., Burrough, E. R., Zhang, J., Harmon, K., Wang, L., Zheng, Y., Petznick, T., & Li, G. (2021). Genetic characterization of porcine sapoviruses identified from pigs during a diarrhoea outbreak in Iowa, 2019. *Transboundary and Emerging Diseases*. [10.1111/tbed.14087](https://doi.org/10.1111/tbed.14087)

Shivaprakash, KN, Sen, S., Paul, S., Kiesecker, JM, & Bawa, KS (2021). Mammals, wildlife trade, and the next global pandemic. *Current Biology*. [10.1016/j.cub.2021.06.006](https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.06.006)

Shroyer, EL, Kelley, ST, Taylor, PC, Vanderloo, P., & Lester, TL (1979). Three serologic types of adenovirus infections of owl monkeys. *American journal of veterinary research*, 40(4), 532-536.

Silvestre, RVD, Souza, AJS, Júnior, ECS, Silva, AK, Mello, WA, Nunes, MRT, ... Sá, LRM (2016). First New World primate papillomavirus identification in the Atlantic Forest, Brazil: *Alouatta guariba* papillomavirus 1. *Genome announcements*, 4 (4), e00725-16. [10.1128/genomeA.00725-16](https://doi.org/10.1128/genomeA.00725-16)

Solorio, MR (2015) Levantamento de agentes infecciosos nas sub-populações de Sauim-de-coleira (*Saguinus bicolor*) na cidade de Manaus, Estado do Amazonas [tese de doutorado não publicada]. Universidade de São Paulo, Brasil.

Souza, F., Alfieri, AA, Alfieri, AF, Lorenzetti, E., Headley, SA, Passos, F., Silvestre, T., Zago, L., Mottin, V., Motiani-Ferreira, F., Lange, R., Svoboda, W. & Gomes, E. (2012). The evaluation of enteric viruses in asymptomatic free-ranging non-human primates (*Alouatta guariba clamitans*, *Alouatta caraya*, *Callithrix* spp., *Callithrix penicillata*, and *Leontopithecus caissara*) in southern Brazil. *Journal of medical primatology*, 41(5), 304-308. [10.1111/j.1600-0684.2012.00557.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0684.2012.00557.x)

Suzán, G., Marcé, E., Giermakowski, JT, Armién, B., Pascale, J., Mills, J., Ceballos, G., Gómez, A., Aguirre, AA, Salazar-Bravo, J., Armién A.; Parmenter, R., & Yates, T. (2008). The effect of habitat fragmentation and species diversity loss on hantavirus prevalence in Panama. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1149(1), 80-83. [10.1196/annals.1428.063](https://doi.org/10.1196/annals.1428.063)

Tangherlini, M., Dell'Anno, A., Allen, LZ, Riccioni, G., & Corinaldesi, C. (2016). Assessing viral taxonomic composition in benthic marine ecosystems: reliability and efficiency of different bioinformatic tools for viral metagenomic analyses. *Scientific reports*, 6(1), 1-10. [10.1038/srep28428](https://doi.org/10.1038/srep28428)

Trindade, GS, Emerson, GL, Carroll, DS, Kroon, EG, & Damon, IK (2007). Brazilian vaccinia viruses and their origins. *Emerging infectious diseases*, 13 (7), 965. [10.3201/eid1307.061404](https://doi.org/10.3201/eid1307.061404)

Vidal, M D; Gordo, M.; Rohe, F. (2018). *Saguinus bicolor* (Spix, 1823). In: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. (Org.). Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume II Mamíferos. 1ed. Brasília: ICMBio, v. 1, p. 244-249.

Wanzeller, ALM, Souza, ALP, Azevedo, RSS, Sousa Júnior, EC, Filho, LCF, Oliveira, RS, Lemos, PS, Júnior, JV, & Vasconcelos, PFC (2017). Complete genome sequence of the BeAn 58058 virus isolated from *Oryzomys* sp. rodents in the Amazon Region of Brazil. *Genome announcements*, 5 (9), e01575-16. [10.1128/genomeA.01575-16](https://doi.org/10.1128/genomeA.01575-16).

Weber, M. N., Mosena, A. C. S., da Silva, M. S., Canova, R., de Lorenzo, C., Olegário, J. C., ... & Canal, C. W. (2020). Virome of crab-eating (*Cerdocyon thous*) and pampas foxes (*Lycalopex gymnocercus*) from southern Brazil and Uruguay. *Infection, Genetics and Evolution*, 85, 104421. [10.1016/j.meegid.2020.104421](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104421)

Wevers, D., Metzger, S., Babweteera, F., Bieberbach, M., Boesch, C., Cameron, K., ... Ehlers, B. (2011). Novel adenoviruses in wild primates: a high level of genetic diversity and evidence of zoonotic transmissions. *Journal of virology*, 85 (20), 10774-10784. [10.1128/JVI.00810-11](https://doi.org/10.1128/JVI.00810-11)

Wood, DE, & Salzberg, SL(2014). Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome biology*, 15 (3), 1-12. [10.1186/gb-2014-15-3-r46](https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-3-r46)

Wu, Z., Lu, L., Du, J., Yang, L., Ren, X., Liu, B., ... & Jin, Q. (2018). Comparative analysis of rodent and small mammal viromes to better understand the wildlife origin of emerging infectious diseases. *Microbiome*, 6 (1), 1-14. [10.1186/s40168-018-0554-9](https://doi.org/10.1186/s40168-018-0554-9)

Xiao, Y., Wang, H., Feng, L., Pan, J., Chen, Z., Wang, H., Yang, S., Shen, Q., Wang, X., Shan, T., & Zhang, W. (2020). Fecal, oral, blood and skin virome of laboratory rabbits. *Archives of virology*, 165(12), 2847-2856. [10.1007/s00705-020-04808-y](https://doi.org/10.1007/s00705-020-04808-y)

Zhao, G., Droit, L., Gilbert, M. H., Schiro, F. R., Didier, P. J., Si, X., Paredes, A., Handley AS, Virgin, HW, Bohm, RP, & Wang, D. (2019). Virome biogeography in the lower gastrointestinal tract of rhesus macaques with chronic diarrhea. *Virology*, 527, 77-88. [10.1016/j.virol.2018.10.001](https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.10.001)

TABELAS

Tabela 1. Informações gerais sobre os grupos de *S. bicolor* trabalhados, com data de coleta, tamanho do grupo e coordenadas em graus decimais.

Código do Grupo	Data de coleta	Nº animais no grupo	Nº amostras no pool	Coordenadas geográficas	Local	Informações sobre os locais
CIGS	01/08/2019	4	2	-3.101853° -60.044209°	Zoológico do Centro de Instrução de Guerra na Selva	Mata secundária em torno do Zoo CIGS, em matriz totalmente urbana.
FCA	12/09/2019	6	4	-3.101931° -59.976403°	Faculdade de Ciências Agrárias / Setor Sul - UFAM	Mata secundária, forte efeito de borda e áreas antrópicas.
JQ	04/07/2019	13	8	-3.091092° -59.961239°	Jaqueira / Setor Norte - UFAM	Mata secundária, forte efeito de borda e áreas antrópicas.
MUSA	02/10/2019	7	5	-3.006981° -59.939718°	Museu da Amazônia – Reserva Adolpho Ducke	Área de floresta primária e borda na fronteira com bairro da cidade.
PQ	21/07/2020	5	5	-3.059167° -59.840278°	Bairro Puraquequara– Sítio Bela Vista	Mata secundária em bairro periurbano com vegetação de terra firme e áreas igapó/várzea às margens do rio Puraquequara.
SUMN	10/11/2020	10	6	-3.034917° -59.980000°	Parque Sumaúma - área Norte	Mata secundária (52 ha), inserido em matriz urbana e com muito efeito de borda.
SUMS	09/11/2020	10	8	-3.037411° -59.980939°	Parque Sumaúma -área Sul	Mata secundária (52 ha), inserido em matriz urbana e com muito efeito de borda.
TA	11/08/2020	6	6	-3.023861° -60.070417°	Bairro Tarumã (Sítio Park Fun Pet)	Mata secundária em bairro periurbano, próximo a sítios e conjuntos habitacionais.
VV	06/06/2019	8	7	-3.101050° -59.973139°	Viveiro (área florestal) / Setor Sul - UFAM	Mata secundária, forte efeito de borda e áreas antrópicas.

Tabela 2. Descrição por grupo dos resultados do sequenciamento massivo e das leituras filtradas reconhecidas para vírus nas ferramentas BLASTx e Kraken.

Grupo	Número de leituras brutas sequenciadas	Leituras filtradas para vírus (BLASTx)	Leituras filtradas para vírus (Kraken)
CIGS	3.925.636	42	1.692
FCA	2.164.176	163	4.094
JQ	2.982.096	49	6.057
MUSA	2.892.640	265	7.311
PQ	4.757.772	28	9.708
SUMN	2.406.594	395	7.910
SUMS	1.435.212	141	3.989
TA	1.779.078	68	1.949
VV	5.397.736	424	19.624

Para os resultados de leituras filtradas nas duas ferramentas foram retirados os valores correspondentes a *Coronaviridae*.

Tabela 3. Valores de abundância relativa normalizado dos vírus associados a infecções de mamíferos gerados na análise pelo Kraken.

Família viral	CIGS	FCA	JQ	MUSA	PQ	SUMN	SUMS	TA	VV
<i>Adenoviridae</i>	2,03125	2,794538	0,040331	0,196512	0,029244	0	0	1,098901	0,100129
<i>Arenaviridae</i>	0	0,031756	0,060496	0	0,014622	0	0	0,799201	0,042912
<i>Arteriviridae</i>	0	0	0,080661	0	0	0	0	0	0
<i>Caliciviridae</i>	1,25	0	0,040331	0	0,029244	0	0	0,999001	0,028608
<i>Circoviridae</i>	1,875	0,031756	0,020165	0,073692	0	0	0	0	0
<i>Flaviviridae</i>	1,5625	0	0,141157	0	0,131598	0,015272	0,323415	0	0,200257
<i>Hantaviridae</i>	0	0	0,241984	0,319332	0,014622	0,106903	0	0	0,100129
<i>Herpesviridae</i>	4,21875	0,825659	0,282315	22,00933	0,731101	21,35003	15,97671	2,097902	15,00501
<i>Orthomyxoviridae</i>	0,3125	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Papillomaviridae</i>	0,625	0	0,221819	0	0,014622	0,106903	0	0	0,286082
<i>Paramyxoviridae</i>	0,15625	0,063512	0,060496	0,24564	0,014622	0	0	0	0,085825
<i>Parvoviridae</i>	0,3125	0	0,020165	0	0,058488	0,16799	0	0,699301	0
<i>Peribunyaviridae</i>	0	0,190537	0,201654	0,442152	0,190086	0,091631	0	0	0
<i>Phenuiviridae</i>	5,15625	0	0	0,024564	0	0	0,032342	0,1998	0,028608
<i>Picobirnaviridae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0,799201	0
<i>Picornaviridae</i>	2,1875	0,063512	0,060496	0,221076	0	0,015272	0,42044	1,398601	0,042912
<i>Polyomaviridae</i>	1,5625	0	0,080661	0	0	0	0	0	0,972679
<i>Poxviridae</i>	69,0625	89,96507	98,06413	65,21739	96,87089	74,72511	77,52264	83,31668	53,54027
<i>Reoviridae</i>	0,3125	0	0,120992	0	0,029244	0	0,032342	1,998002	0,128737
<i>Retroviridae</i>	8,125	5,493808	0,080661	10,73446	1,710776	3,40562	5,530401	6,493506	29,40924
<i>Rhabdoviridae</i>	0,46875	0,539854	0,100827	0,196512	0,102354	0	0	0	0,014304
<i>Tobnaviridae</i>	0,78125	0	0	0,319332	0	0	0,161708	0,0999	0

A normalização dos dados considerou valores de $p \geq 0,05$, os dados em negrito foram aqueles reconhecidos após normalização. As famílias virais que não foram consideradas após normalização foram retiradas para melhor visualização dos dados. A tabela original encontra-se no material suplementar.

Tabela 4. Valores de riqueza e diversidade dos vírus de mamíferos dos grupos de *S. bicolor*.

Código do grupo	Riqueza Normalizada	Diversidade Alfa
CIGS	17	3,77
FCA	8	1,57
JQ	14	1,16
MUSA	11	2,64
PQ	7	1,2
SUMN	7	2,01
SUMS	6	2,03
TA	12	2,17
VV	10	2,99

FIGURAS

Figura 1 Mapa de Manaus com os pontos de amostragem dos grupos de *Saguinus bicolor*. Legenda dos códigos dos grupos: CIGS (Centro Integrado de Guerra na Selva); FCA (Faculdade de Ciências Agrárias); JQ (Jaqueira); MUSA (Museu da Amazônia); PQ (Puraquequara); SUMN (Sumaúma Norte); SUMS (Sumaúma Sul); TA (Tarumã); VV (Viveiro).

Figura 2 Abundância total padronizada do viroma no agrupamento de famílias virais associadas a mamíferos, bactérias e outros vírus (plantas, fungos, invertebrados e outros vertebrados) (A) do agrupamento de todos os grupos examinados e (B) separada por grupo examinado.

Figura 3 (A) Valores normalizados da família viral *Poxviridae*, que representou a mais abundante em todos os grupos examinados. (B) Abundância dos outros vírus associados a infecções de mamíferos gerados

Figura 4 Cluster de similaridade de Jaccard dos grupos de *Saguinus bicolor*, considerando a composição das comunidades de famílias virais.

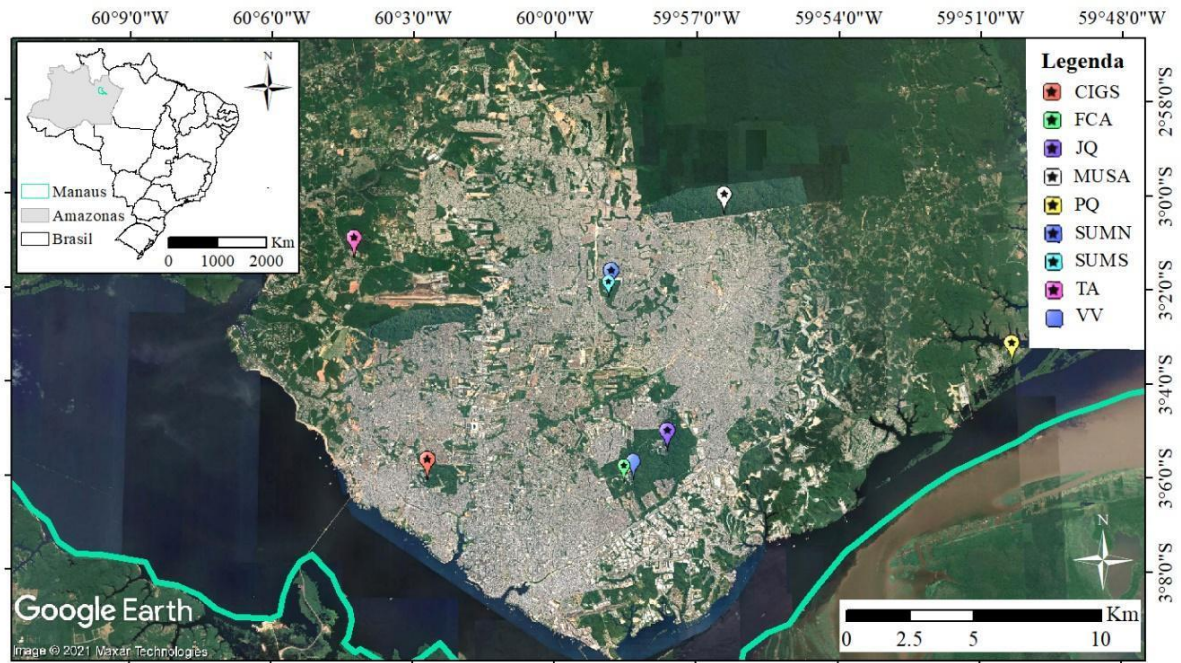


Figura 1.

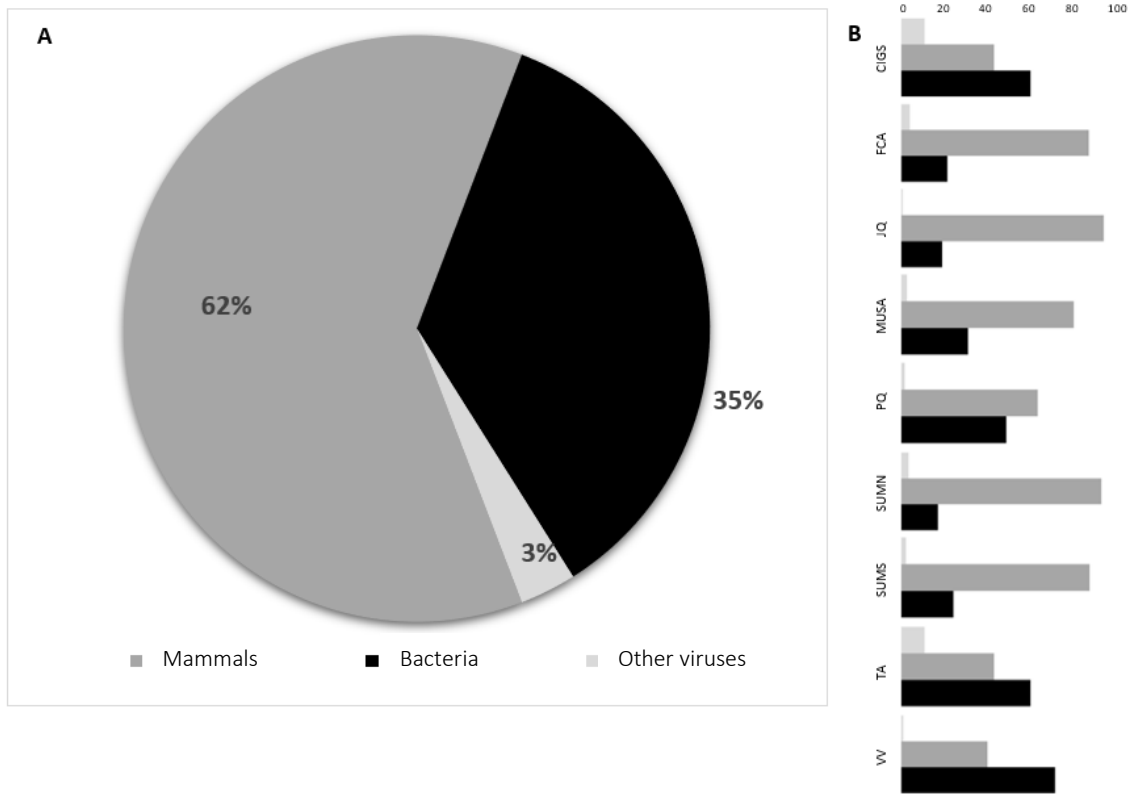


Figura 2.

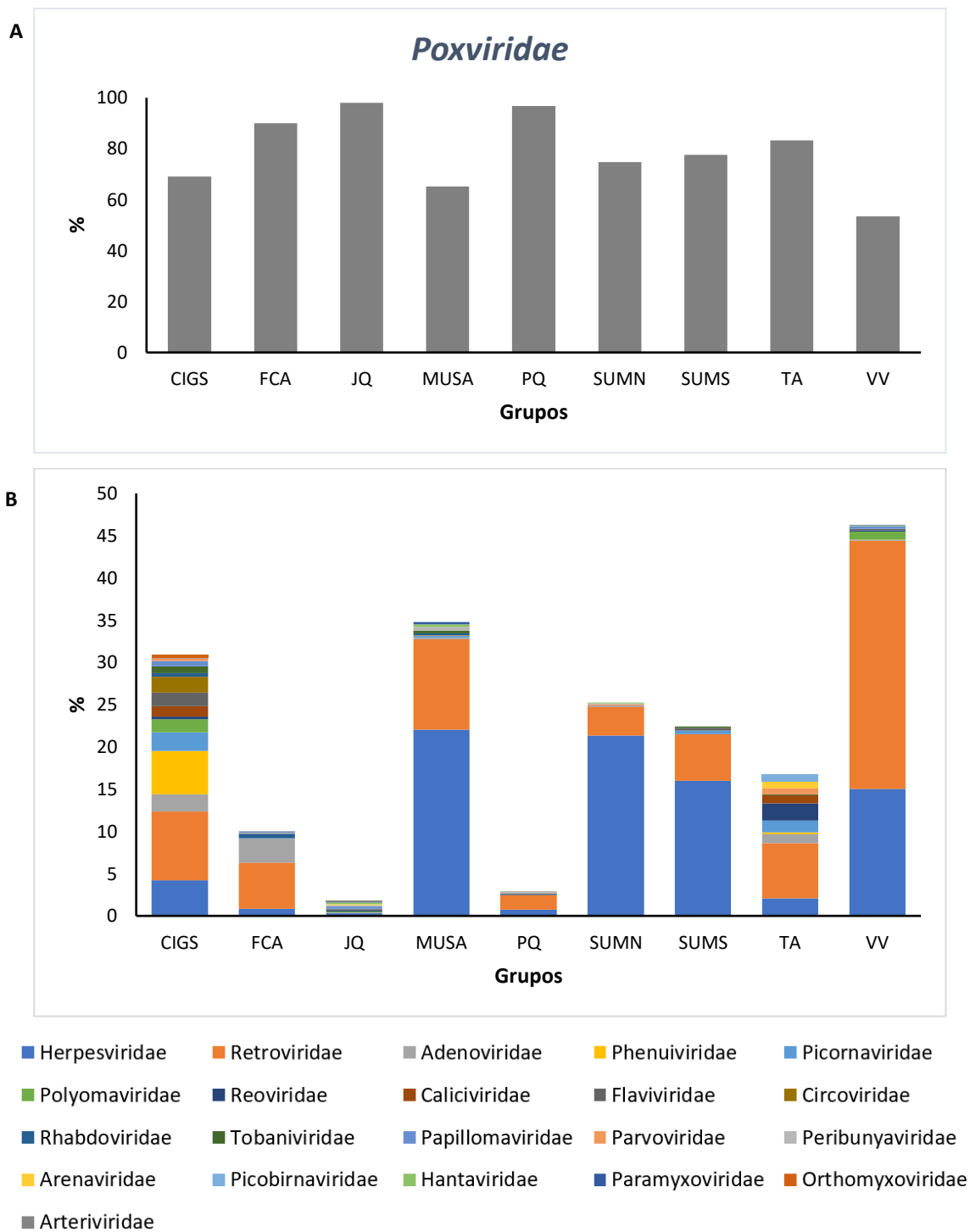


Figura 3.

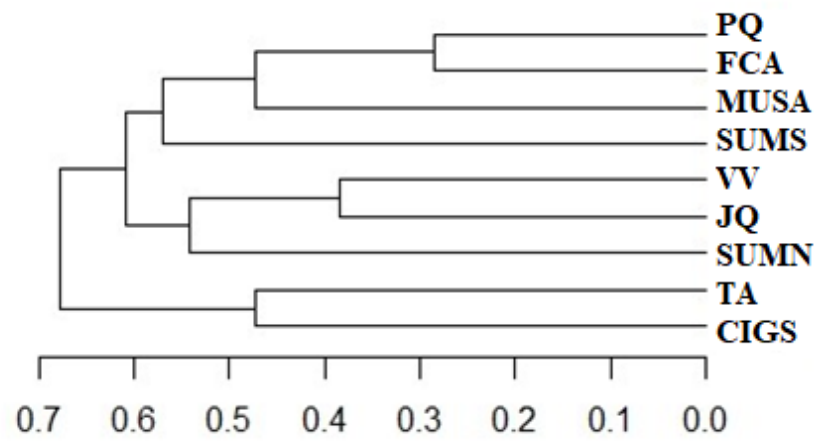


Figura 4.

INFORMAÇÕES SUPLEMENTARES

American Journal of Primatology

Diversidade do viroma fecal de grupos de *Saguinus bicolor*: um primata criticamente ameaçado de extinção, da Amazônia brasileira

MATERIAL SUPLEMENTAR 1

Dados gerais dos sauíns-de-coleira dos grupos trabalhados.

Código do Grupo	Nº de animais capturados	Nº de animais/ Sexo	Nº de animais/ Faixa etária	Nº de animais (amostras)/pool	Nº de animais por sexo e faixa etária/pool
CIGS	4	F (2); M (2)	J (1); A (3)	2	FJ (1); FA (1)
FCA	6	F (4); M (2)	J (1); A (5)	4	FJ (1); FA (3)
JQ	13	F (6); M (7)	I (2); J (4); A (7)	8	FJ (1); MJ (1); FA (3); MA (3)
MUSA	7	F (1); M (6)	J (1); A (6)	5	MJ (1); FA (1); MA (4)
PQ	5	F (2); M (3)	J (2); A (3)	5	FJ (1); MJ (1); FA (1); MA (2)
SUMN	6	F (4); M (2)	J (1); A (5)	6	MJ (1); FA (4); MA (1)
SUMS	10	F (4); M (2)	J (1); A (5)	8	MJ (1); FA (4); MA (1)
TA	6	F (4); M (2)	J (3); A (3)	6	FJ (2); MJ (1); FA (2); MA (1)
VV	8	F (4); M (4)	I (2); J (2); A (4)	7	FI (1); MI (1); FJ (2); FA (1); MA (3)

Legenda: F (fêmea); M (macho); I (infante); J (juvenil); A (adulto); FI (fêmea infante); MI (macho infante); FJ (fêmea juvenil); MJ (macho juvenil); FA (fêmea adulta); MA (macho adulto).

MATERIAL SUPLEMENTAR 2

NOTA - Contaminação das bibliotecas por SARS-CoV-2

O coronavírus da Síndrome respiratória aguda grave tipo 2 (SARS-CoV-2, do inglês – *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus type 2*), agente causador da COVID-19 (do inglês, *Coronavirus Disease 2019*), é o responsável pela pandemia atual que vem ocasionando diversos impactos sociais, na saúde pública e na economia global (Melin et al., 2020). Acredita-se que esse vírus tenha se originado de morcegos, entretanto a espécie animal intermediária responsável pela transmissão aos humanos ainda é desconhecida (Delahay et al., 2021).

A transmissão de pessoa para animal SARS-CoV-2 vem ocorrendo em muitas ocasiões (Delahay et al., 2021), envolvendo espécies de animais domésticos (Newman et al., 2020, Sit et al., 2020) e selvagens mantidos em zoológicos ou criadouros (McAloose et al., 2020; Oreshkova et al., 2020; Gibbons, 2021). Embora a transmissão de humanos para animais selvagens de vida livre tenha menos oportunidades de ocorrer, a transmissão indireta também pode representar riscos significativos (Delahay et al., 2021). Entretanto, as evidências ainda são muito limitadas sobre as infecções da fauna livre (OIE, 2021), tendo até o momento relato apenas em uma espécie de mustelídeo infectado nos Estados Unidos (Aguiló-Gisbert et al., 2021).

A suscetibilidade de várias espécies animais, inclusive os humanos, pelo SARS-CoV-2 está relacionada com a conformação da enzima conversora 2 da angiotensina (ACE2) e a ligação com a proteína S viral (proteína *spike*) (Melin et al., 2020; Mathavarajah & Dellaire, 2020; Stout et al., 2020; Shi et al., 2020; Bhattacharjee et al., 2021). Em relação aos primatas, os do grupo Catarrhini, que corresponde aos primatas africanos e asiáticos, exibem o mesmo conjunto de doze resíduos de aminoácidos chave que o ACE2 humano, enquanto os PN (Platyrrhini) diferem em quatro aminoácidos

(Melin et al., 2020). Em experimento realizado por Bhattacharjee e colaboradores (2021) foi feito ensaios e análise da estrutura da proteína para avaliar o efeito de cada variante de ACE2 de humanos e de ambos os grupos de primatas, evidenciando que os Catarrhini, como a maioria dos humanos, são suscetíveis ao SARS-CoV-2, enquanto os Platyrrhini são resistentes. Também verificado em experimento com uma espécie de PN, o *Callithrix jacchus*, infectado experimentalmente com significativa carga do vírus, porém não exibindo sinais clínicos da doença e um menor dano aos pulmões do que os primatas asiáticos (Lu et al., 2020).

Em nosso estudo, os grupos de *Saguinus bicolor* trabalhados apresentaram para ambas as ferramentas Kraken e BLASTx (em todos os grupos e sete grupos, respectivamente) leituras correspondentes à família *Coronaviridae*, esta que teve a maior abundância de número de leituras totais de todas as bibliotecas. Porém, quando verificamos os dados sequenciais em menor nível taxonômico, foi possível confirmar que tratava-se quase em sua totalidade ao SARS-CoV-2, confirmada também por uma ferramenta *online* de atualização recorrente do banco de dados específico para coronavírus, o Genome Detective (Vilsker et al, 2019). Entretanto, somado aos nossos esforços, Sacchetto e colaboradores (2021) realizou testes moleculares e sorológicos dos mesmos quatro grupos de saúns-de-coleira que trabalhamos durante o período pandêmico, não verificando nenhuma evidência de infecção por este vírus. Além disso, como os outros cinco grupos foram capturados em período pré-pandêmico, consideramos que ocorreu contaminação ambiental de todas as bibliotecas por este vírus no momento da confecção das mesmas. Além de estarmos em intenso período de transmissão viral humano-humano, o laboratório onde foram realizadas as análises laboratoriais deste trabalho estava também bastante atuante com o diagnóstico de infecções de SARS-CoV-2 em humanos. Desta maneira, acreditamos que a

contaminação possa ter ocorrido pelo material genético presente ainda no ambiente laboratorial, provavelmente na utilização de algum equipamento de uso comum com as outras equipes de pesquisa, pois o RNA do SARS-CoV-2 pode ser facilmente detectado em superfícies e fômites (Onakpoya et al., 2021). Também observado por Montgomery e colaboradores (2021) que sugere que o cDNA viral de SARS-CoV-2 pode persistir em superfícies de laboratório após a descontaminação. Como exposto anteriormente, os PN (Platyrrhini) possuem baixa suscetibilidade a esse vírus, ainda não tendo relatos de infecção natural (Guimarães et al., 2020; Abreu et al., 2021). Por conta disso, filtramos as leituras das bibliotecas para total retirada da família *Coronaviridae* e não a incluímos nas análises estatísticas por considerar que o valor alto de leituras pode gerar vieses nos resultados das análises.

REFERÊNCIAS

- Abreu, FVS, Macedo, MV, Silva, AJJ, Oliveira, CH, Ottone, VO, Almeida, MAB., ... Oliveira, DB (2021). No evidence of SARS-CoV-2 infection in Neotropical Primates sampled during COVID-19 pandemic in Minas Gerais and Rio Grande do Sul, Brazil. *bioRxiv*. [10.1101/2021.06.17.448890](https://doi.org/10.1101/2021.06.17.448890)
- Aguiló-Gisbert, J., Padilla-Blanco, M., Lizana, V., Maiques, E., Muñoz-Baquero, M., Chillida-Martínez, E., Cardells, J. & Rubio-Guerri, C. (2021). First Description of SARS-CoV-2 Infection in Two Feral American Mink (*Neovison vison*) Caught in the Wild. *Animals*, 11(5), 1422. [10.3390/ani11051422](https://doi.org/10.3390/ani11051422)
- Bhattacharjee, MJ, Lin, JJ, Chang, CY, Chiou, YT, Li, TN, Tai, CW, Shiu, TF, Chen, CA, Chou, CY, Chakraborty, P., Tseng, YY, Wang, LHC & Li, WH (2021). Identifying primate ACE2 variants that confer resistance to SARS-CoV-2. *Molecular Biology and Evolution*. [10.1093/molbev/msab060](https://doi.org/10.1093/molbev/msab060)
- Delahay, R. J., de la Fuente, J., Smith, G. C., Sharun, K., Snary, E. L., Girón, L. F., Nziza, J., Fooks, A. R., Brookes, S. M., Lean, F. Z. X., Breed, A. C. & Gortazar, C. (2021). Assessing the risks of SARS-CoV-2 in wildlife. *One health outlook*, 3(1), 1-14. [10.1186/s42522-021-00039-6](https://doi.org/10.1186/s42522-021-00039-6)
- Gibbons A. Captive gorillas test positive for coronavirus. *Science*. 2021. [10.1126/science.abg5458](https://doi.org/10.1126/science.abg5458).
- Guimarães, VY, Justo, AA, Martins, LL, Catão-Dias, JL, & Sacristán, C. (2020). Emerging coronaviruses in neotropical primates: A new threat?. *Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública*, 7 (1), 001-012. [10.4025/revcivet.v7i1.55490](https://doi.org/10.4025/revcivet.v7i1.55490)

Lu, S., Zhao, Y., Yu, W., Yang, Y., Gao, J., Wang, J., ... & Peng, X. (2020). Comparison of nonhuman primates identified the suitable model for COVID-19. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 1-9. [10.1038/s41392-020-00269-6](https://doi.org/10.1038/s41392-020-00269-6)

Mathavarajah, S., &Dellaire, G. (2020). Lions, tigers and kittens too: ACE2 and susceptibility to COVID-19. *Evolution, Medicine, and Public Health*, 2020(1), 109-113. [10.1093/emph/eoaa021](https://doi.org/10.1093/emph/eoaa021)

McAloose, D.; Laverack, M.; Wang, L.; Killian, M.L.; Caserta, L.C.; Yuan, F.; Mitchell, P.K.; Queen, K.; Mauldin, M.R.; Cronk, B.D.; et al. From people to panthera: Natural SARS-CoV-2 infection in tigers and lions at the Bronx Zoo. *mBio* **2020**, *11*, e02220. [10.1128/mBio.02220-20](https://doi.org/10.1128/mBio.02220-20)

Melin, AD, Janiak, MC, Marrone, F., Arora, PS, &Higham, JP (2020). Comparative ACE2 variation and primate COVID-19 risk. *Communications biology*, 3(1), 1-9. [10.1038/s42003-020-01370-w](https://doi.org/10.1038/s42003-020-01370-w)

Montgomery, TL, Paavola, M, Bruce, EA, Botten, JW, Crothers, JW, Kremontsov, DN (2021). Laboratory worker self-contamination with noninfectious SARS-CoV-2 DNA can result in false-positive reverse transcriptase PCR-based surveillance testing. *J Clin Microbiol* 59:e00723- 21. [10.1128/JCM.00723-21](https://doi.org/10.1128/JCM.00723-21).

Newman, A., Smith, D., Ghai, RR, Wallace, RM, Torchetti, MK, Loiacono, C., Murrell, LS, Carpenter, NA, Moroff, S, Rooney, JA &Behraves, CB (2020). First reported cases of SARS-CoV-2 infection in companion animals—New York, March–April 2020. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 69(23), 710. [10.15585/mmwr.mm6923e3](https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6923e3)

OIE World Organisation for Animal Health. Disponível em: <https://www.oie.int/en/scientific-expertise/specific-information-and-recommendations/questions-and-answers-on-2019-novel-coronavirus/events-in-animals/>. Acessado em 25 Ago 2021.

Onakpoya, IJ, Heneghan, CJ, Spencer, EA, Brassey, J., Plüddemann, A., Evans, DH, Conly, JM, & Jefferson, T. (2021). SARS-CoV-2 and the role of fomite transmission: a systematic review. *F1000Research*, 10. [10.12688/f1000research.51590.3](https://doi.org/10.12688/f1000research.51590.3)

Oreshkova, N.; Molenaar, R.J.; Vreman, S.; Harders, F.; Oude Munnink, B.B.; Hakzevan der Honing, R.W.; Gerhards, N.; Tolsma, P.; Bouwstra, R.; Sikkema, R.S.; et al. SARS-CoV-2 infection in farmed minks, the Netherlands, April and May 2020. *Eurosurveillance* 2020, 25. [10.2807/1560-7917.ES.2020.25.23.2001005](https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.23.2001005)

Sacchetto, L., Chaves, BA, Costa, ER, Medeiros, ASM, Gordo, M., Araújo, DB, Oliveira, DBL, da Silva, APB, Negri, AF, Durigon, EL, Hanley, KA, Vasilakis, N., de Lacerda, MVG, Nogueira, ML (2021). Lack of Evidence of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Spillover in Free-Living Neotropical Non-Human Primates, Brazil. *Viruses*, 13(10):1933. [10.3390/v13101933](https://doi.org/10.3390/v13101933)

Shi, J., Wen, Z., Zhong, G., Yang, H., Wang, C., Huang, B., ... & Bu, Z. (2020). Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS–coronavirus 2. *Science*, 368(6494), 1016-1020. [10.1126/science.abb7015](https://doi.org/10.1126/science.abb7015)

Sit, TH, Brackman, CJ, Ip, SM, Tam, KW, Law, PY, To, EMW, Yu , VYT , Sims, LD, Tsang, DNC, Chu, DKW, Perera, RAPM ,Poon, LLM&Peiris, M. (2020). Canine SARS-CoV-2 infection. *Nature*, 586(7831), 776. [10.1038/s41586-020-2334-5](https://doi.org/10.1038/s41586-020-2334-5)

Stout, AE, André, NM., Jaimes, J. A., Millet, JK, & Whittaker, GR (2020). Coronaviruses in cats and other companion animals: Where does SARS-CoV-2/COVID-19 fit?. *Veterinary microbiology*, 247, 108777. [10.1016/j.vetmic.2020.108777](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108777)

Vilsker, M., Moosa, Y., Nooij, S., Fonseca, V., Ghysens, Y., Dumon, K., ... & de Oliveira, T. (2019). Genome Detective: an automated system for virus identification from high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 35(5), 871-873. [10.1093/bioinformatics/bty695](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty695)

MATERIAL SUPLEMENTAR 3

Dados gerados pela análise no BLASTx das sequências de vírus dos grupos de saum-de-coleira.

Família viral	Hospedeiro natural	CIGS	FCA	JQ	MUSA	PQ	SUMN	SUMS	TA	VV
<i>Adenoviridae</i>	Vertebrados	0	118	0	0	0	0	0	0	0
<i>Autographiviridae</i>	Bactérias	0	0	2	0	4	10	0	35	0
<i>Coronaviridae</i> †	Vertebrados	1226	1013	141	30	610	50	12	738	0
<i>Herpesviridae</i>	Vertebrados	0	0	5	204	0	331	135	0	351
<i>Microviridae</i>	Bactérias	32	5	0	1	0	0	0	0	0
<i>Myoviridae</i>	Bactérias	0	0	8	25	11	0	0	21	0
<i>Papillomaviridae</i>	Vertebrados	0	0	0	0	0	0	0	0	3
<i>Phycodnaviridae</i>	Algas	2	2	0	0	0	0	0	0	0
<i>Podoviridae</i>	Bactérias	6	0	12	11	0	42	1	0	0
<i>Poxviridae</i>	Vertebrados e Invertebrados	0	0	5	0	0	0	0	0	0
<i>Retroviridae</i>	Vertebrados	0	0	0	0	0	0	2	0	2
<i>Siphoviridae</i>	Bactérias	2	26	2	24	11	12	3	12	66
<i>Solemoviridae</i>	Plantas	0	0	15	0	0	0	0	0	0
Não classificado	-	0	2	0	0	0	0	0	0	0
Cressnaviricota										
Não classificado	-	0	10	0	0	0	0	0	0	2
Não classificado	-	0	0	0	0	2	0	0	0	0
vírus ssDNA										
TOTAL		1268	1176	190	295	638	445	153	806	424

†A família *Coronaviridae* não foi considerada como infecção natural dos animais, pois acredita-se fortemente que ocorreu contaminação laboratorial das bibliotecas, sendo retirada das análises.

MATERIAL SUPLEMENTAR 4

Resultados do sequenciamento analisado na ferramenta Kraken mostrando a família viral e o número de leituras brutas em cada grupo de sauíme-de-coleira examinado.

Família viral	Hospedeiro natural	CIGS	FCA	JQ	MUSA	PQ	SUMN	SUMS	TA	VV
<i>Ackermannviridae</i>	Bactérias	1	12	7	0	9	4	0	5	13
<i>Adenoviridae</i>	Vertebrados	13	88	2	8	2	0	0	11	7
<i>Adomaviridae</i>	Peixes e répteis	0	0	2	9	0	0	0	0	0
<i>Alloherpesviridae</i>	Peixes	5	0	8	4	0	0	20	0	2
<i>Alphaflexiviridae</i>	Plantas e fungos	0	0	1	0	0	4	14	0	0
<i>Alphasatellitidae</i>	Plantas	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Alphatetraviridae</i>	Mariposas e borboletas	0	0	0	0	0	0	0	0	3
<i>Anelloviridae</i>	Vertebrados	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Arenaviridae</i>	Mamíferos	0	1	3	0	1	0	0	8	3
<i>Arteriviridae</i>	Vertebrados	0	0	4	0	0	0	0	0	0
<i>Artoviridae</i>	Artrópodes	0	0	0	0	13	0	0	0	0
<i>Ascoviridae</i>	Insetos	0	1	0	0	11	0	0	0	14
<i>Asfarviridae</i>	Mamíferos	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Aspiviridae</i>	Plantas	0	0	2	0	0	0	0	0	0
<i>Astroviridae</i>	Vertebrados	0	0	1	0	0	1	0	0	0
<i>Autographiviridae</i>	Bactérias	53	37	20	47	39	28	42	29	33
<i>Baculoviridae</i>	Artrópodes	52	40	57	45	67	2	20	24	49
<i>Benyviridae</i>	Plantas	0	0	0	0	0	4	0	0	0
<i>Betaflexiviridae</i>	Plantas e fungos	2	0	3	0	0	0	0	0	0
<i>Bicaudaviridae</i>	Arqueas	0	0	3	0	4	0	0	0	0
<i>Botourmiaviridae</i>	Plantas e fungos	0	0	1	0	0	0	0	0	2
<i>Caliciviridae</i>	Vertebrados	8	0	2	0	2	0	0	10	2

<i>Caulimoviridae</i>	Plantas e insetos	0	0	2	0	1	0	0	0	9
<i>Chaseviridae</i>	Bactérias	0	0	5	0	1	0	0	0	0
<i>Chrysoviridae</i>	Fungos	0	0	7	0	0	0	0	0	0
<i>Circoviridae</i>	Mamíferos e aves	12	1	1	3	0	0	0	0	0
<i>Closteroviridae</i>	Plantas	5	0	7	0	4	0	0	3	0
<i>Coronaviridae</i> †	Vertebrados	1460	937	146	23	557	36	36	823	4
<i>Cystoviridae</i>	Bactérias	0	0	4	0	0	0	0	0	0
<i>Demereciviridae</i>	Bactérias	10	0	9	16	9	0	1	0	16
<i>Dicistroviridae</i>	Invertebrados	0	0	0	0	9	0	0	0	0
<i>Drexleriviridae</i>	Bactérias	10	0	6	1	3	1	2	2	11
<i>Endornaviridae</i>	Plantas, fungos e algas	0	0	2	0	15	0	0	0	0
<i>Filoviridae</i>	Mamíferos	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Flaviviridae</i>	Mamíferos e insetos	10	0	7	0	9	1	10	0	14
<i>Fuselloviridae</i>	Arqueas	1	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Geminiviridae</i>	Plantas	1	1	5	1	9	0	9	0	8
<i>Genomoviridae</i>	Mamíferos, aves e fungos	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Hantaviridae</i>	Mamíferos	0	0	12	13	1	7	0	0	7
<i>Herelleviridae</i>	Bactérias	33	28	47	18	77	12	1	2	54
<i>Herpesviridae</i>	Vertebrados	27	26	14	896	50	1398	494	21	1049
<i>Hytrosaviridae</i>	Insetos	0	3	0	0	0	0	0	0	0
<i>Iflaviridae</i>	Insetos	8	3	6	0	8	1	13	0	0
<i>Inoviridae</i>	Bactérias	0	0	2	0	49	0	0	0	0
<i>Iridoviridae</i>	Anfíbios, peixes e invertebrados	6	0	5	4	3	1	12	3	1
<i>Kitaviridae</i>	Plantas	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Lipothrixviridae</i>	Arqueas	0	8	0	0	0	0	0	0	1
<i>Luteoviridae</i>	Plantas	0	0	0	0	0	0	0	0	3
<i>Malacoherpesviridae</i>	Moluscos	0	0	1	1	0	2	0	0	0

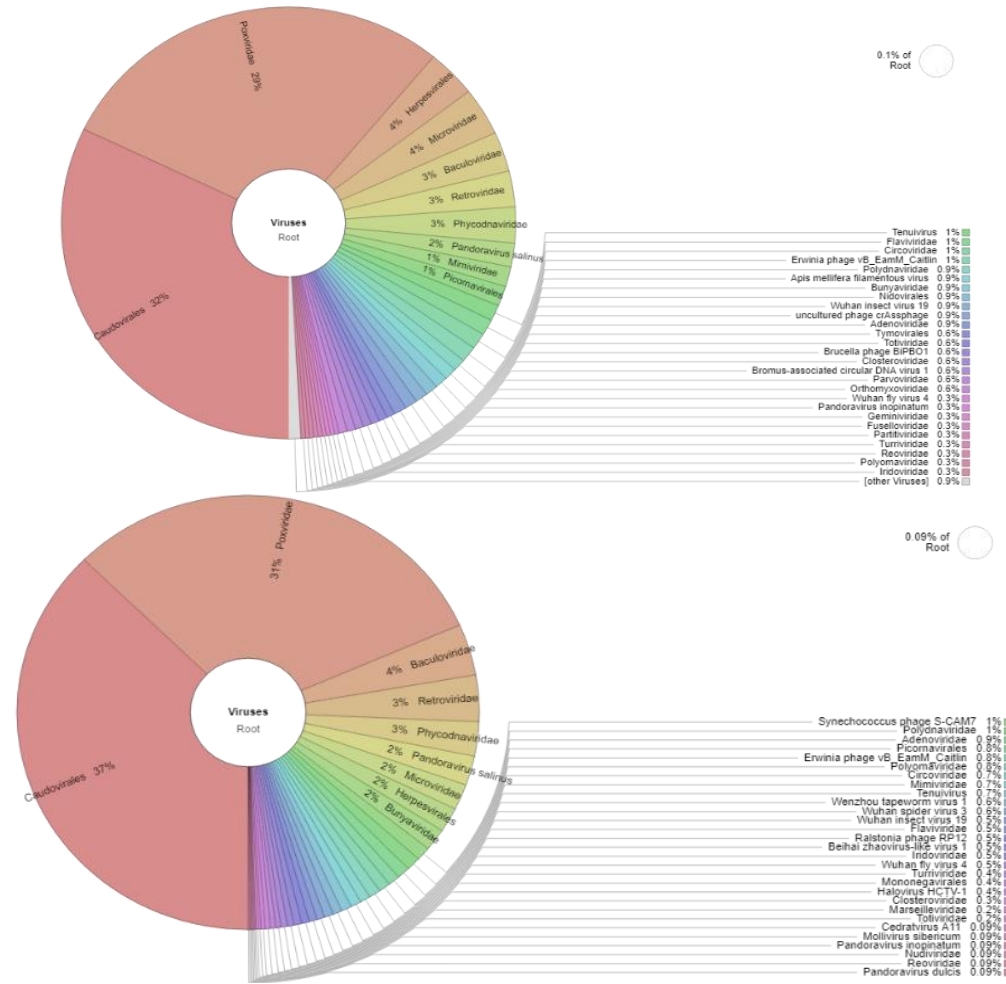
<i>Marseilleviridae</i>	Protozoários	2	0	10	0	0	0	1	1	1
<i>Medioniviridae</i>	Invertebrados	0	0	8	0	0	0	0	0	1
<i>Mesoniviridae</i>	Insetos	0	0	0	0	0	0	6	0	7
<i>Microviridae</i>	Bactérias	33	6	6	29	7	9	7	3	25
<i>Mimiviridae</i>	Protozoários	13	2	13	15	11	9	1	9	0
<i>Mitoviridae</i>	Fungos e protozoários	0	0	1	0	12	0	0	0	0
<i>Myoviridae</i>	Bactérias e arqueas	431	351	292	285	1172	190	173	216	493
<i>Mypoviridae</i>	Miriápodes	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Nairoviridae</i>	Vertebrados e artrópodes	0	0	0	0	3	0	0	0	0
<i>Nanoviridae</i>	Plantas	0	0	0	0	0	0	0	0	10
<i>Nimaviridae</i>	Crustáceos	0	0	3	0	2	0	0	0	0
<i>Nudiviridae</i>	Artrópodes	2	1	5	0	10	1	0	0	4
<i>Nyamiviridae</i>	Artrópodes e aves	7	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Orthomyxoviridae</i>	Mamíferos e aves	2	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Papillomaviridae</i>	Vertebrados	4	0	11	0	1	7	0	0	20
<i>Paramyxoviridae</i>	Vertebrados	1	2	3	10	1	0	0	0	6
<i>Partitiviridae</i>	Fungos e plantas	1	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Parvoviridae</i>	Vertebrados e artrópodes	2	0	1	0	4	11	0	7	0
<i>Peribunyaviridae</i>	Mamíferos e artrópodes	0	6	10	18	13	6	0	0	0
<i>Phasmaviridae</i>	Insetos	0	0	1	0	1	0	0	0	0
<i>Phenuiviridae</i>	Mamíferos	33	0	0	1	0	0	1	2	2
<i>Phycodnaviridae</i>	Algas	37	6	20	6	11	10	6	0	22
<i>Picobirnaviridae</i>	Mamíferos e bactérias	0	0	0	0	0	0	0	8	0
<i>Picornaviridae</i>	Vertebrados	14	2	3	9	0	1	13	14	3
<i>Pithoviridae</i>	Protozoários	1	1	2	1	6	1	1	0	14
<i>Podoviridae</i>	Bactérias	39	6	50	94	110	51	3	11	153

<i>Polydnaviridae</i>	Vespas	14	3	6	4	12	0	0	28	19
<i>Polyomaviridae</i>	Mamíferos e aves	10	0	4	0	0	0	0	0	68
<i>Potyviridae</i>	Plantas	0	3	3	0	5	0	13	1	0
<i>Poxviridae</i>	Vertebrados e artrópodes	442	2833	4863	2655	6625	4893	2397	834	3743
<i>Reoviridae</i>	Vertebrados, invertebrados, plantas e fungos	2	0	6	0	2	0	1	20	9
<i>Retroviridae</i>	Vertebrados	52	173	4	437	117	223	171	65	2056
<i>Rhabdoviridae</i>	Vertebrados, invertebrados e plantas	3	17	5	8	7	0	0	0	1
<i>Roniviridae</i>	Crustáceos	0	0	0	0	0	0	0	0	3
<i>Rudiviridae</i>	Arqueas	0	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>Secoviridae</i>	Plantas	0	11	0	13	6	3	23	9	0
<i>Siphoviridae</i>	Bactérias e arqueas	276	422	456	2643	1163	1020	529	599	11660
<i>Sphaerolipoviridae</i>	Bactérias e arqueas	0	0	0	0	3	0	0	0	0
<i>Tobaniviridae</i>	Vertebrados	5	0	0	13	0	0	5	1	0
<i>Togaviridae</i>	Mamíferos, aves e insetos	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Tolecatellitidae</i>	Plantas	0	0	2	0	0	0	0	0	0
<i>Tombusviridae</i>	Plantas	0	0	0	3	0	0	0	0	0
<i>Tospoviridae</i>	Plantas	0	0	2	0	0	7	0	0	0
<i>Totiviridae</i>	Fungos e protozoários	4	0	2	0	0	0	0	3	0
<i>Turriviridae</i>	Arqueas	5	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Tymoviridae</i>	Plantas	0	0	0	0	6	0	0	0	0
<i>Virgaviridae</i>	Plantas	0	0	1	0	0	1	0	0	0
Total		3152	5031	6203	7334	10265	7946	4025	2772	19628

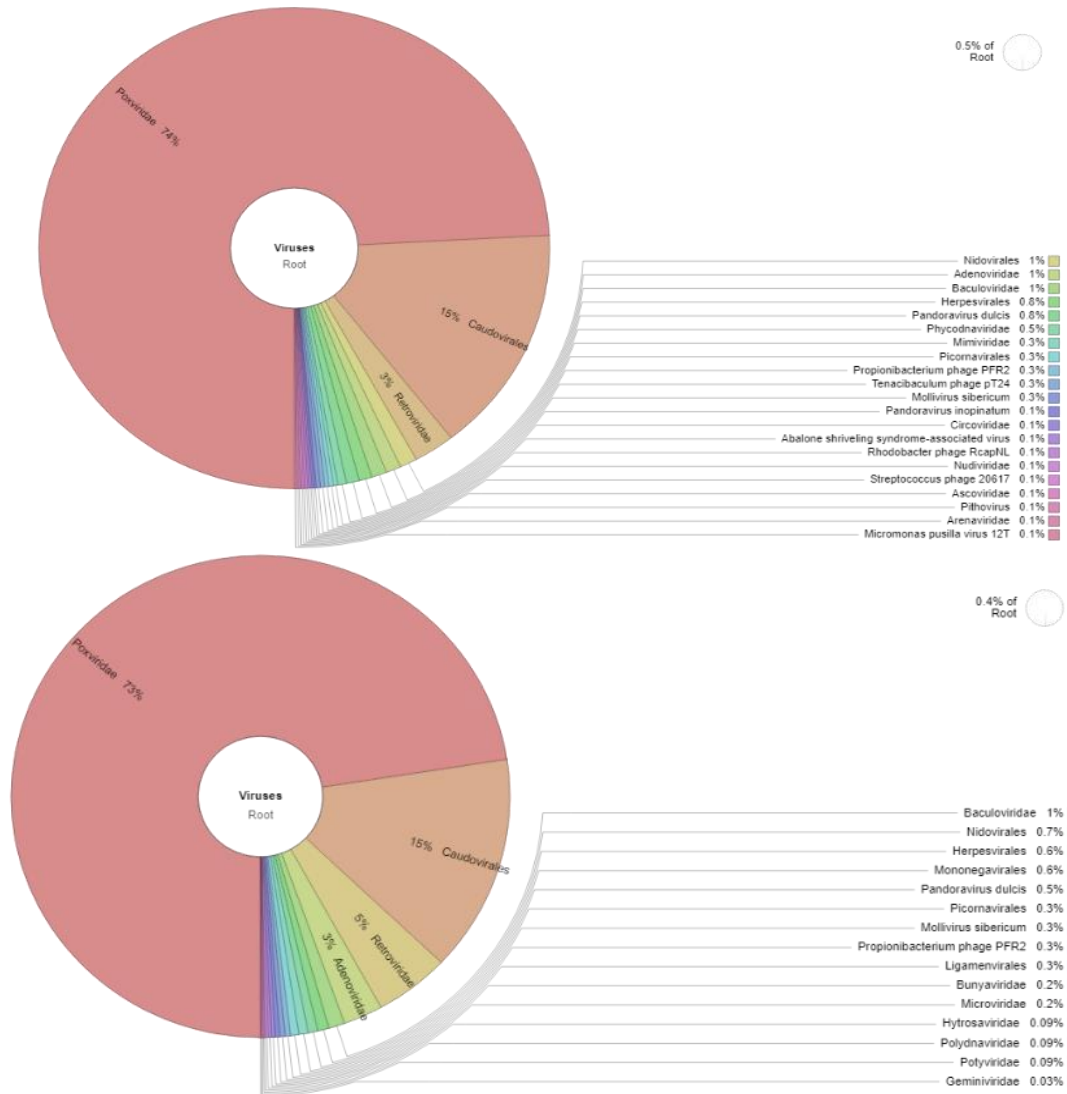
†A família Coronaviridae não foi considerada como infecção natural dos animais, pois acredita-se fortemente que ocorreu infecção laboratorial das bibliotecas, sendo retirada das análises.

MATERIAL SUPLEMENTAR 5

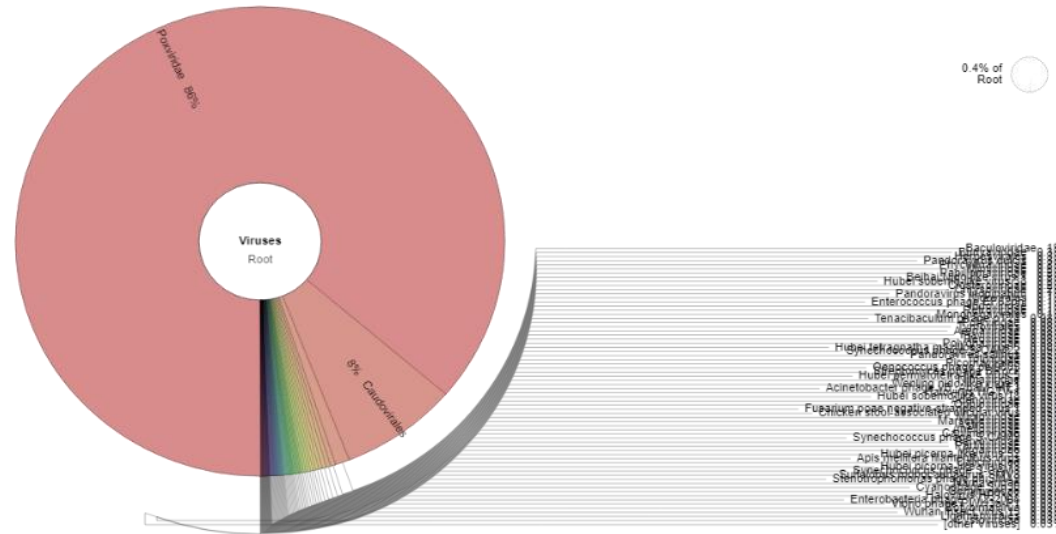
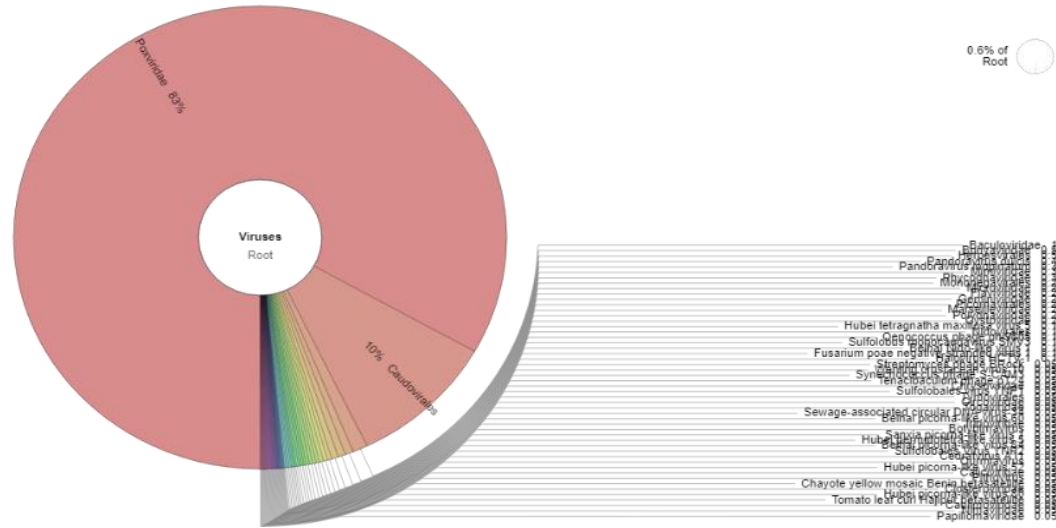
Gráficos gerados no Krona de ambos os sequenciamentos de cada *pool* analisado no Kraken.
Grupo CIGS



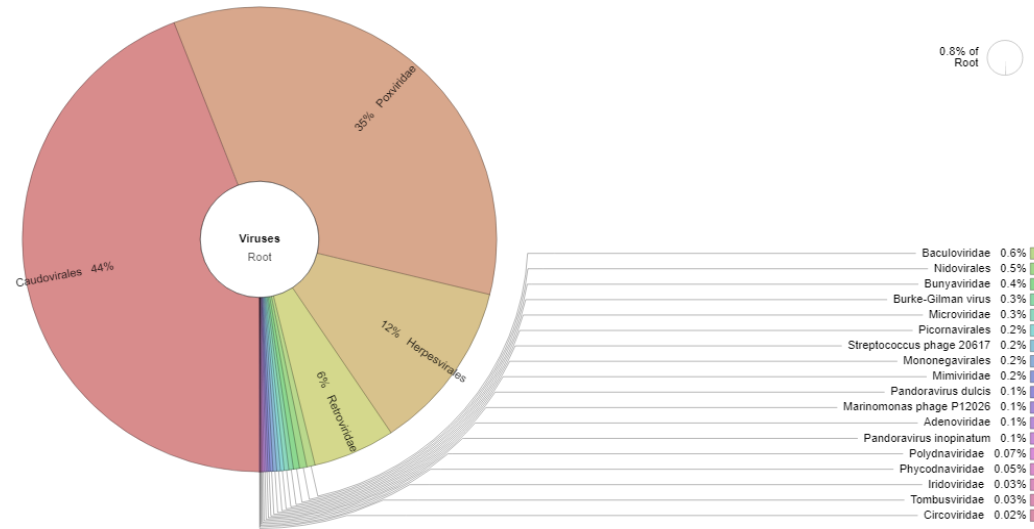
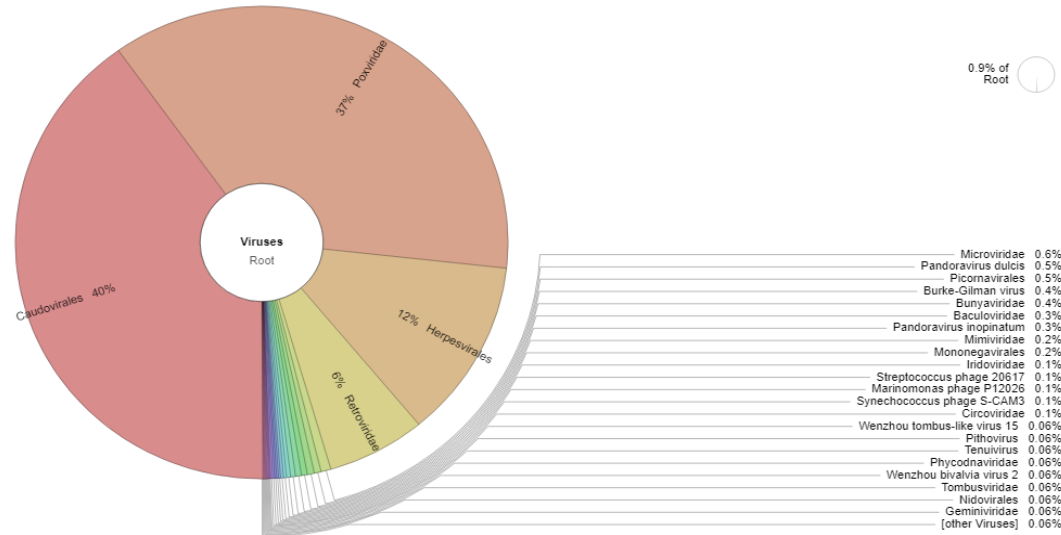
Grupo FCA



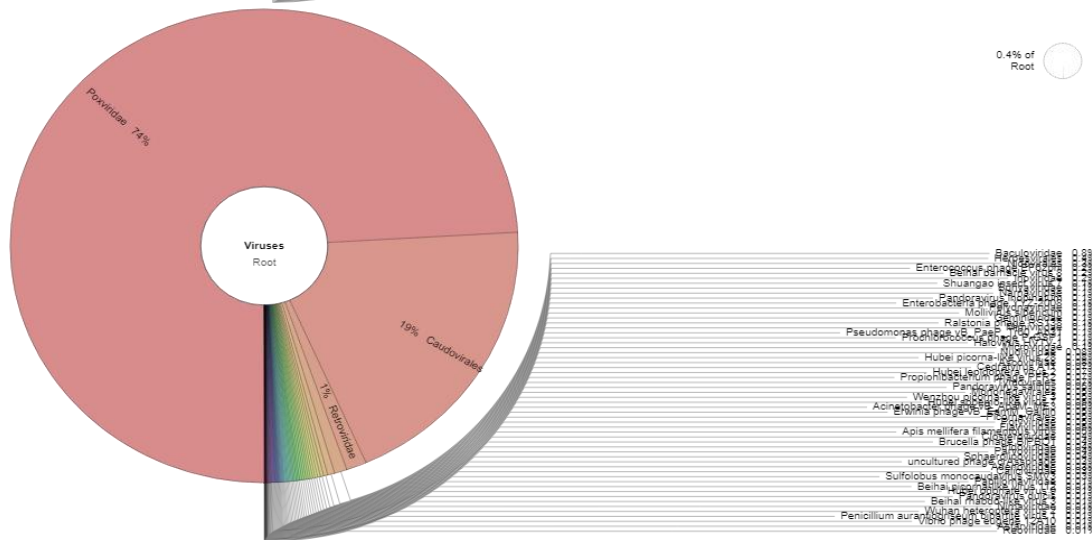
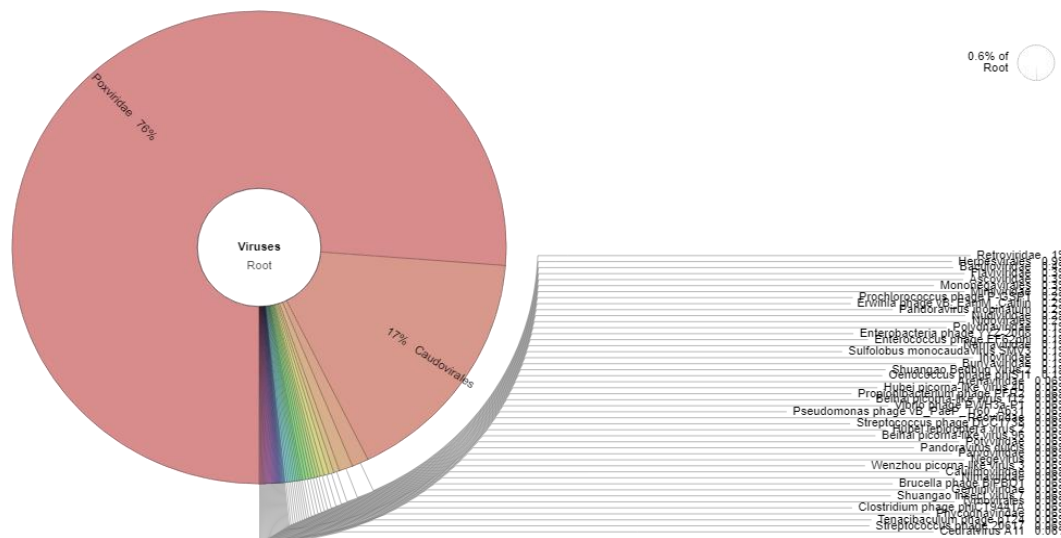
Grupo JQ



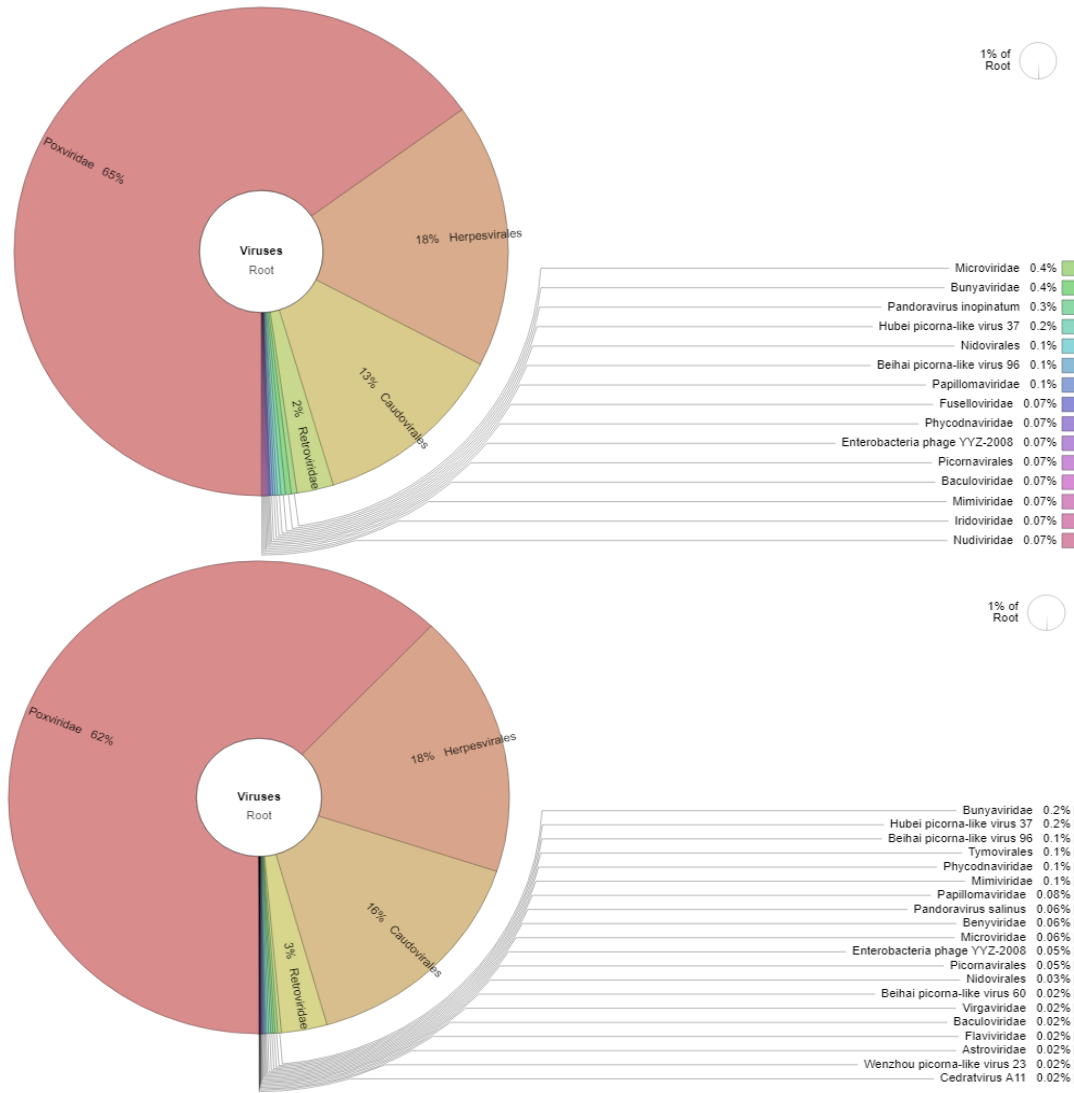
Grupo MUSA



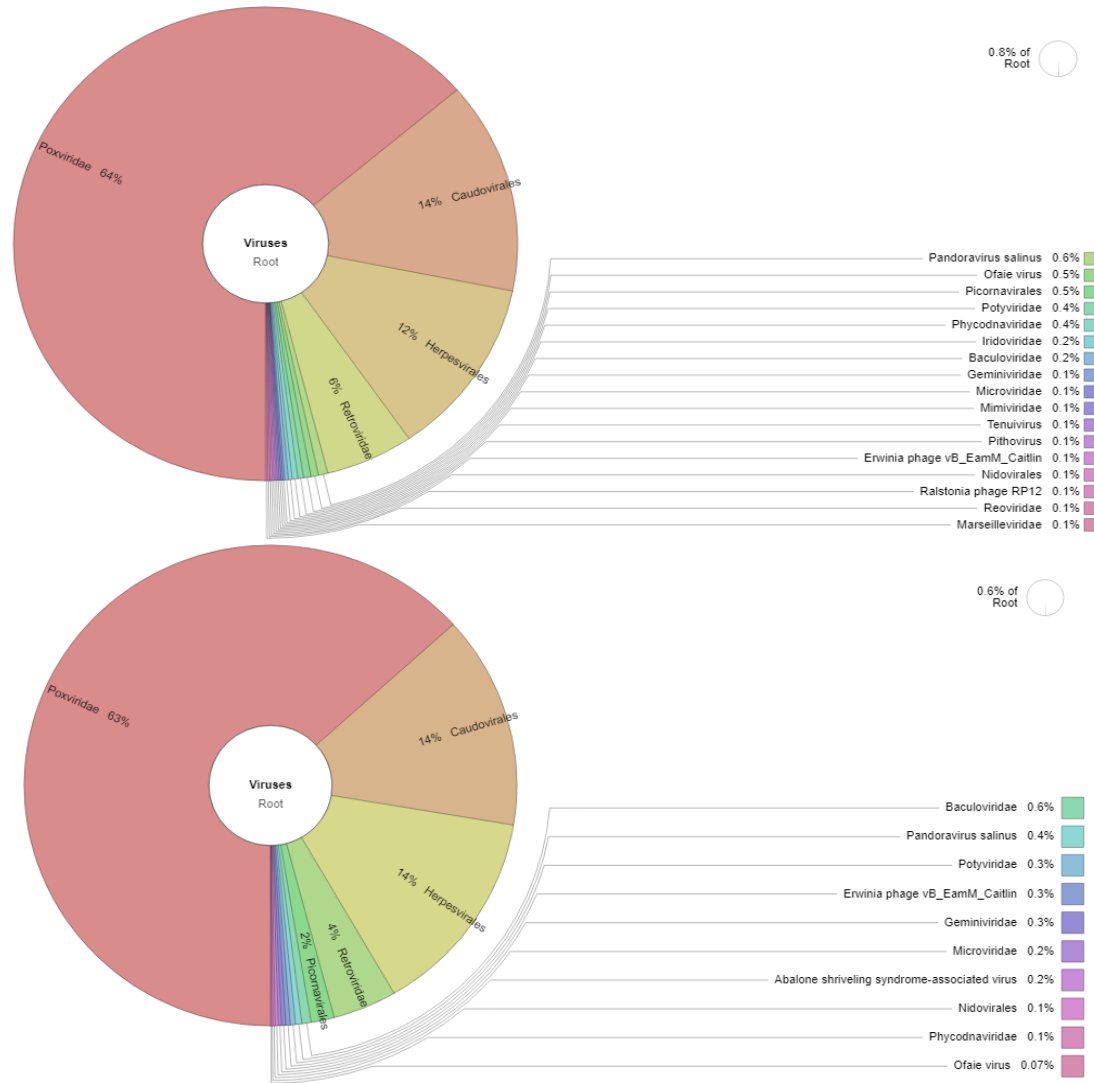
Grupo PQ



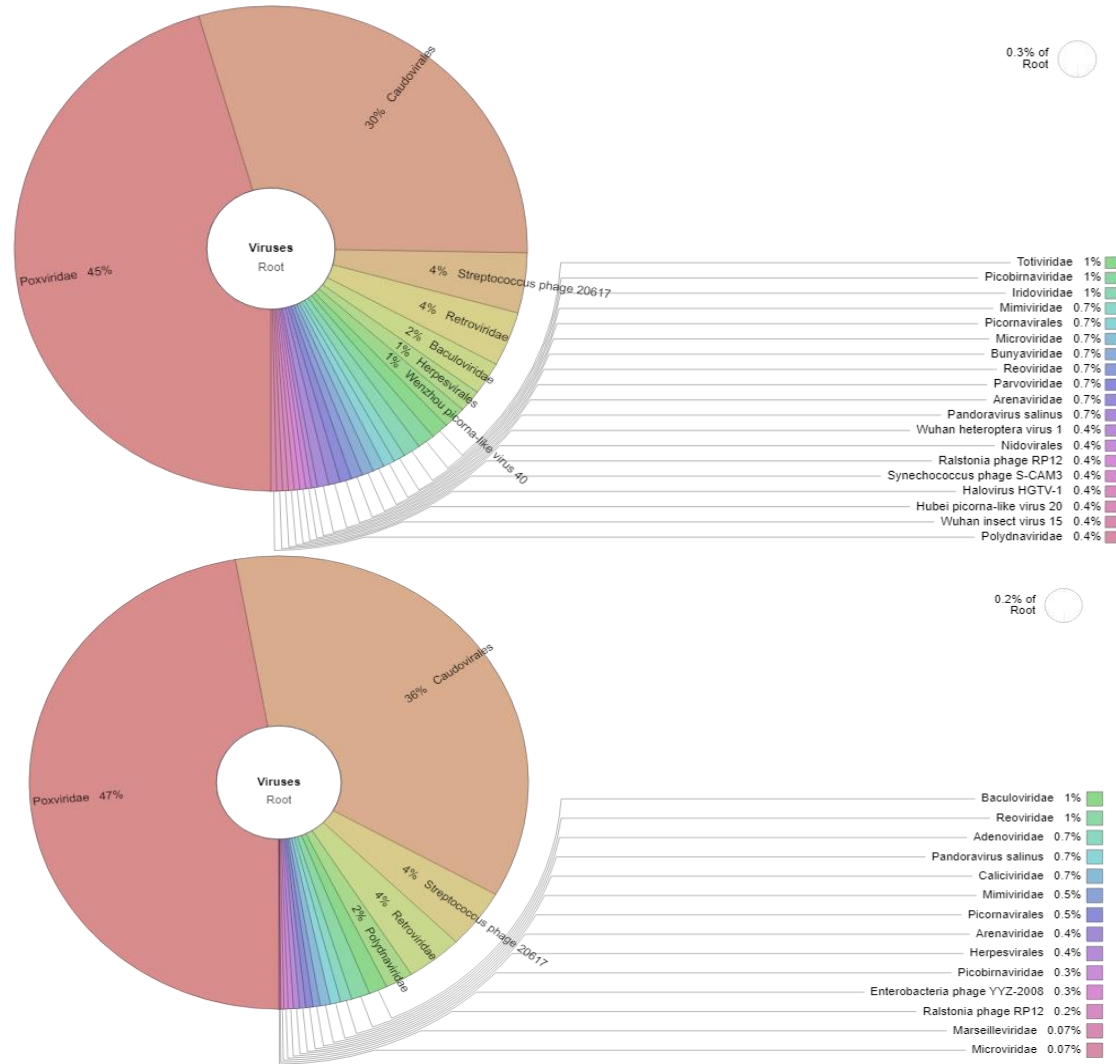
Grupo SUMN



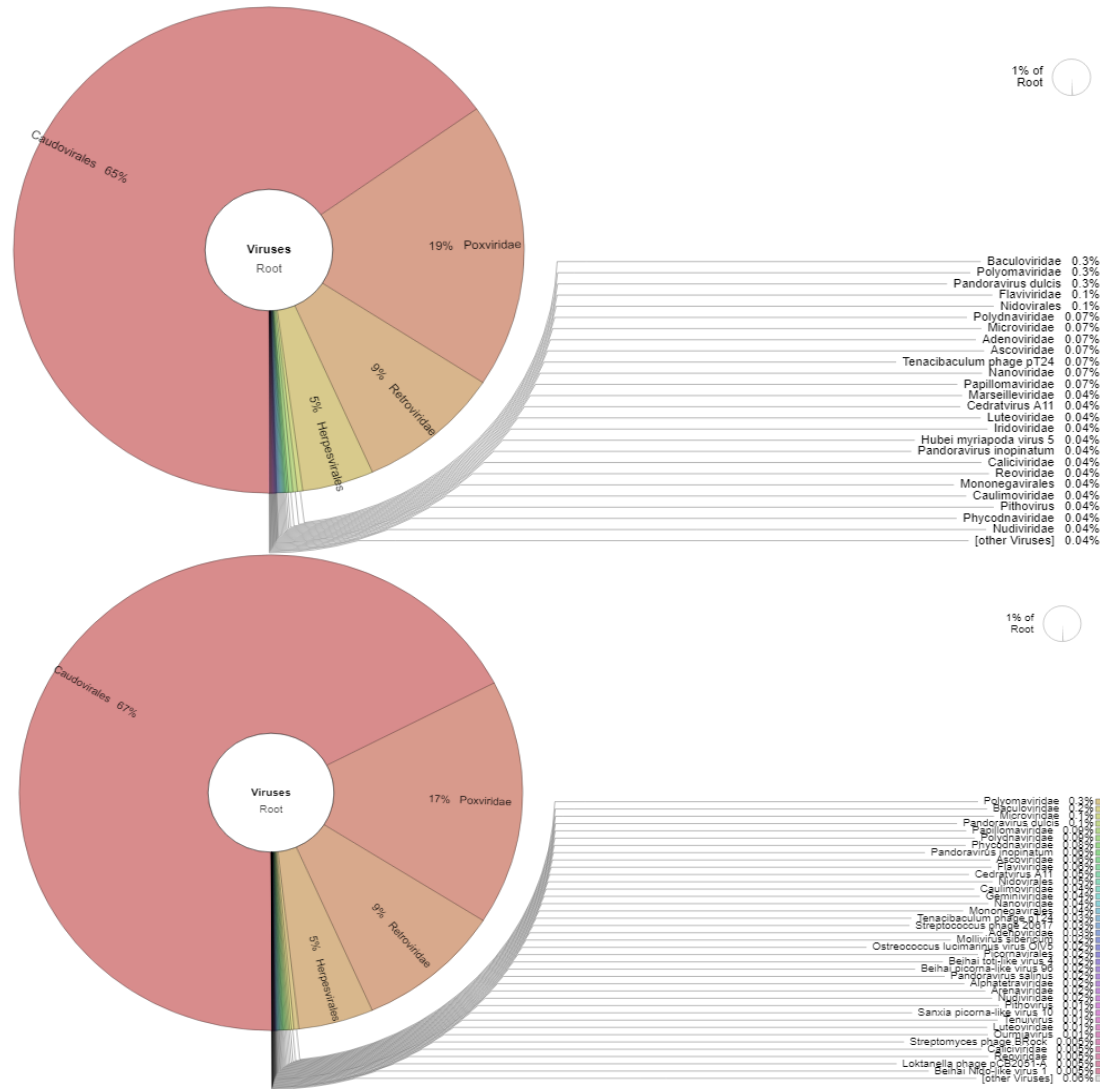
Grupo SUMS



Grupo TA



Grupo VV



MATERIAL SUPLEMENTAR 6

Normalização dos dados gerados pelo Kraken de todos os vírus.

Família viral	CIGS	FCA	JQ	MUSA	PQ	SUMN	SUMS	TA	VV
<i>Ackermannviridae</i>	0,059102	0,293112	0,115569	0	0,092707	0,050569	0	0,256542	0,066245
<i>Adenoviridae</i> ‡	0,768322	2,149487	0,03302	0,109424	0,020602	0	0	0,564392	0,035671
<i>Adomaviridae</i>	0	0	0,03302	0,123102	0	0	0	0	0
<i>Alloherpesviridae</i>	0,295508	0	0,132079	0,054712	0	0	0,501379	0	0,010192
<i>Alphaflexiviridae</i>	0	0	0,01651	0	0	0,050569	0,350965	0	0
<i>Alphasatellitidae</i> †	0	0	0	0,013678	0	0	0	0	0
<i>Alphatetraviridae</i> †	0	0	0	0	0	0	0	0	0,015287
<i>Anelloviridae</i> † ‡	0	0	0,01651	0	0	0	0	0	0
<i>Arenaviridae</i> ‡	0	0,024426	0,049529	0	0,010301	0	0	0,410467	0,015287
<i>Arteriviridae</i> ‡	0	0	0,066039	0	0	0	0	0	0
<i>Artoviridae</i>	0	0	0	0	0,13391	0	0	0	0
<i>Ascoviridae</i>	0	0,024426	0	0	0,113309	0	0	0	0,071341
<i>Asfarviridae</i> † ‡	0	0	0	0	0,010301	0	0	0	0
<i>Aspiviridae</i> †	0	0	0,03302	0	0	0	0	0	0
<i>Astroviridae</i> † ‡	0	0	0,01651	0	0	0,012642	0	0	0
<i>Autographiviridae</i>	3,132388	0,903762	0,330196	0,642867	0,401731	0,353982	1,052895	1,487943	0,168161
<i>Baculoviridae</i>	3,073286	0,97704	0,94106	0,615511	0,690152	0,025284	0,501379	1,231401	0,249694
<i>Benyviridae</i>	0	0	0	0	0	0,050569	0	0	0
<i>Betaflexiviridae</i>	0,118203	0	0,049529	0	0	0	0	0	0
<i>Bicaudaviridae</i>	0	0	0,049529	0	0,041203	0	0	0	0
<i>Botourmiaviridae</i> †	0	0	0,01651	0	0	0	0	0	0,010192
<i>Caliciviridae</i> ‡	0,472813	0	0,03302	0	0,020602	0	0	0,513084	0,010192

<i>Caulimoviridae</i> †	0	0	0,03302	0	0,010301	0	0	0	0,045862
<i>Chaseviridae</i>	0	0	0,082549	0	0,010301	0	0	0	0
<i>Chrysoviridae</i>	0	0	0,115569	0	0	0	0	0	0
<i>Circoviridae</i> ‡	0,70922	0,024426	0,01651	0,041034	0	0	0	0	0
<i>Closteroviridae</i>	0,295508	0	0,115569	0	0,041203	0	0	0,153925	0
<i>Cystoviridae</i>	0	0	0,066039	0	0	0	0	0	0
<i>Demereciviridae</i>	0,591017	0	0,148588	0,218848	0,092707	0	0,025069	0	0,081533
<i>Dicistroviridae</i>	0	0	0	0	0,092707	0	0	0	0
<i>Drexleriviridae</i>	0,591017	0	0,099059	0,013678	0,030902	0,012642	0,050138	0,102617	0,056054
<i>Endornaviridae</i>	0	0	0,03302	0	0,154512	0	0	0	0
<i>Filoviridae</i> †	0	0	0	0	0	0	0	0	0,005096
<i>Flaviviridae</i> ‡	0,591017	0	0,115569	0	0,092707	0,012642	0,250689	0	0,071341
<i>Fuselloviridae</i>	0,059102	0	0	0	0	0,012642	0	0	0
<i>Geminiviridae</i>	0,059102	0,024426	0,082549	0,013678	0,092707	0	0,22562	0	0,040766
<i>Genomoviridae</i> †	0	0	0,01651	0	0	0	0	0	0
<i>Hantaviridae</i> ‡	0	0	0,198118	0,177814	0,010301	0,088496	0	0	0,035671
<i>Herelleviridae</i>	1,950355	0,683928	0,775962	0,246204	0,79316	0,151707	0,025069	0,102617	0,275173
<i>Herpesviridae</i> ‡	1,595745	0,635076	0,231138	12,25551	0,515039	17,67383	12,38406	1,077476	5,345495
<i>Hytrosaviridae</i>	0	0,073278	0	0	0	0	0	0	0
<i>Iflaviridae</i>	0,472813	0,073278	0,099059	0	0,082406	0,012642	0,325896	0	0
<i>Inoviridae</i>	0	0	0,03302	0	0,504738	0	0	0	0
<i>Iridoviridae</i>	0,35461	0	0,082549	0,054712	0,030902	0,012642	0,300827	0,153925	0,005096
<i>Kitaviridae</i> †	0	0	0,01651	0	0	0	0	0	0
<i>Lipothrixviridae</i>	0	0,195408	0	0	0	0	0	0	0,005096
<i>Luteoviridae</i> †	0	0	0	0	0	0	0	0	0,015287
<i>Malacoherpesviridae</i> †	0	0	0,01651	0,013678	0	0,025284	0	0	0

<i>Marseilleviridae</i>	0,118203	0	0,165098	0	0	0	0,025069	0,051308	0,005096
<i>Medioniviridae</i>	0	0	0,132079	0	0	0	0	0	0,005096
<i>Mesoniviridae</i>	0	0	0	0	0	0	0,150414	0	0,035671
<i>Microviridae</i>	1,950355	0,146556	0,099059	0,396663	0,072105	0,11378	0,175483	0,153925	0,127395
<i>Mimiviridae</i>	0,768322	0,048852	0,214628	0,20517	0,113309	0,11378	0,025069	0,461775	0
<i>Mitoviridae</i>	0	0	0,01651	0	0,123609	0	0	0	0
<i>Myoviridae</i>	25,47281	8,573522	4,820868	3,898236	12,07252	2,402023	4,336927	11,08261	2,51223
<i>Mypoviridae</i> †	0	0	0	0	0	0	0	0	0,005096
<i>Nairoviridae</i> † ‡	0	0	0	0	0,030902	0	0	0	0
<i>Nanoviridae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,050958
<i>Nimaviridae</i> †	0	0	0,049529	0	0,020602	0	0	0	0
<i>Nudiviridae</i>	0,118203	0,024426	0,082549	0	0,103008	0,012642	0	0	0,020383
<i>Nyamiviridae</i>	0,413712	0	0	0	0,010301	0	0	0	0
<i>Orthomyxoviridae</i> ‡	0,118203	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Papillomaviridae</i> ‡	0,236407	0	0,181608	0	0,010301	0,088496	0	0	0,101916
<i>Paramyxoviridae</i> ‡	0,059102	0,048852	0,049529	0,13678	0,010301	0	0	0	0,030575
<i>Partitiviridae</i>	0,059102	0	0,01651	0	0	0	0	0	0
<i>Parvoviridae</i> ‡	0,118203	0	0,01651	0	0,041203	0,139064	0	0,359159	0
<i>Peribunyaviridae</i> ‡	0	0,146556	0,165098	0,246204	0,13391	0,075853	0	0	0
<i>Phasmaviridae</i> †	0	0	0,01651	0	0,010301	0	0	0	0
<i>Phenuiviridae</i> ‡	1,950355	0	0	0,013678	0	0	0,025069	0,102617	0,010192
<i>Phycodnaviridae</i>	2,186761	0,146556	0,330196	0,082068	0,113309	0,126422	0,150414	0	0,112108
<i>Picobirnaviridae</i> ‡	0	0	0	0	0	0	0	0,410467	0
<i>Picornaviridae</i> ‡	0,827423	0,048852	0,049529	0,123102	0	0,012642	0,325896	0,718317	0,015287
<i>Pithoviridae</i>	0,059102	0,024426	0,03302	0,013678	0,061805	0,012642	0,025069	0	0,071341
<i>Podoviridae</i>	2,304965	0,146556	0,825491	1,285734	1,133086	0,644753	0,075207	0,564392	0,779658

<i>Polydnaviridae</i>	0,827423	0,073278	0,099059	0,054712	0,123609	0	0	1,436634	0,09682
<i>Polyomaviridae</i> ‡	0,591017	0	0,066039	0	0	0	0	0	0,346514
<i>Potyviridae</i>	0	0,073278	0,049529	0	0,051504	0	0,325896	0,051308	0
<i>Poxviridae</i> ‡	26,12293	69,19883	80,28727	36,31514	68,24269	61,85841	60,09025	42,79117	19,07358
<i>Reoviridae</i> ‡	0,118203	0	0,099059	0	0,020602	0	0,025069	1,026167	0,045862
<i>Retroviridae</i> ‡	3,073286	4,225696	0,066039	5,977294	1,205192	2,819216	4,286789	3,335044	10,47697
<i>Rhabdoviridae</i> ‡	0,177305	0,415242	0,082549	0,109424	0,072105	0	0	0	0,005096
<i>Roniviridae</i> †	0	0	0	0	0	0	0	0	0,015287
<i>Rudiviridae</i> †	0	0	0,01651	0	0	0	0	0	0,005096
<i>Secoviridae</i>	0	0,268686	0	0,177814	0,061805	0,037927	0,576586	0,461775	0
<i>Siphoviridae</i>	16,31206	10,30777	7,528479	36,15101	11,97981	12,89507	13,26147	30,73371	59,41704
<i>Sphaerolipoviridae</i> †	0	0	0	0	0,030902	0	0	0	0
<i>Tobaniviridae</i> ‡	0,295508	0	0	0,177814	0	0	0,125345	0,051308	0
<i>Togaviridae</i> †‡	0	0	0,01651	0	0	0	0	0	0
<i>Toleusatellitidae</i> †	0	0	0,03302	0	0	0	0	0	0
<i>Tombusviridae</i> †	0	0	0	0,041034	0	0	0	0	0
<i>Tospoviridae</i>	0	0	0,03302	0	0	0,088496	0	0	0
<i>Totiviridae</i>	0,236407	0	0,03302	0	0	0	0	0,153925	0
<i>Turriviridae</i>	0,295508	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Tymoviridae</i>	0	0	0	0	0,061805	0	0	0	0
<i>Virgaviridae</i> †	0	0	0,01651	0	0	0,012642	0	0	0

Legenda: Valores de abundância relativa considerou valores de $p \geq 0,05$. Famílias virais consideradas após normalização estão em destaque.

† Essas famílias virais foram aquelas que após normalização, não foram consideradas.

‡ Famílias virais associadas a infecções de mamíferos.

MATERIAL SUPLEMENTAR 7

Normalização dos dados gerados pelo Kraken de vírus associados a infecções de mamíferos.

Família viral	CIGS	FCA	JQ	MUSA	PQ	SUMN	SUMS	TA	VV
<i>Adenoviridae</i>	2,03125	2,794538	0,040331	0,196512	0,029244	0	0	1,098901	0,100129
<i>Anelloviridae</i> †	0	0	0,020165	0	0	0	0	0	0
<i>Arenaviridae</i>	0	0,031756	0,060496	0	0,014622	0	0	0,799201	0,042912
<i>Arteriviridae</i>	0	0	0,080661	0	0	0	0	0	0
<i>Asfarviridae</i> †	0	0	0	0	0,014622	0	0	0	0
<i>Astroviridae</i> †	0	0	0,020165	0	0	0,015272	0	0	0
<i>Caliciviridae</i>	1,25	0	0,040331	0	0,029244	0	0	0,999001	0,028608
<i>Circoviridae</i>	1,875	0,031756	0,020165	0,073692	0	0	0	0	0
<i>Filoviridae</i> †	0	0	0	0	0	0	0	0	0,014304
<i>Flaviviridae</i>	1,5625	0	0,141157	0	0,131598	0,015272	0,323415	0	0,200257
<i>Genomoviridae</i> †	0	0	0,020165	0	0	0	0	0	0
<i>Hantaviridae</i>	0	0	0,241984	0,319332	0,014622	0,106903	0	0	0,100129
<i>Herpesviridae</i>	4,21875	0,825659	0,282315	22,00933	0,731101	21,35003	15,97671	2,097902	15,00501
<i>Nairoviridae</i> †	0	0	0	0	0,043866	0	0	0	0
<i>Orthomyxoviridae</i>	0,3125	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Papillomaviridae</i>	0,625	0	0,221819	0	0,014622	0,106903	0	0	0,286082
<i>Paramyxoviridae</i>	0,15625	0,063512	0,060496	0,24564	0,014622	0	0	0	0,085825
<i>Parvoviridae</i>	0,3125	0	0,020165	0	0,058488	0,16799	0	0,699301	0
<i>Peribunyaviridae</i>	0	0,190537	0,201654	0,442152	0,190086	0,091631	0	0	0
<i>Phenuiviridae</i>	5,15625	0	0	0,024564	0	0	0,032342	0,1998	0,028608
<i>Picobirnaviridae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0,799201	0
<i>Picornaviridae</i>	2,1875	0,063512	0,060496	0,221076	0	0,015272	0,42044	1,398601	0,042912
<i>Polyomaviridae</i>	1,5625	0	0,080661	0	0	0	0	0	0,972679

<i>Poxviridae</i>	69,0625	89,96507	98,06413	65,21739	96,87089	74,72511	77,52264	83,31668	53,54027
<i>Reoviridae</i>	0,3125	0	0,120992	0	0,029244	0	0,032342	1,998002	0,128737
<i>Retroviridae</i>	8,125	5,493808	0,080661	10,73446	1,710776	3,40562	5,530401	6,493506	29,40924
<i>Rhabdoviridae</i>	0,46875	0,539854	0,100827	0,196512	0,102354	0	0	0	0,014304
<i>Tobaniviridae</i>	0,78125	0	0	0,319332	0	0	0,161708	0,0999	0
<i>Togaviridae</i> †	0	0	0,020165	0	0	0	0	0	0

Valores de abundância relativa considerou valores de $p \geq 0,05$. Famílias virais consideradas após normalização estão em destaque.

†Famílias virais desconsideradas após normalização.

MATERIAL SUPLEMENTAR 8

Valores de riqueza, diversidade Shannon e Diversidade de Simpson, gerados após normalização dos dados das famílias virais associadas a mamíferos (Kraken) analisados na *pipeline* Rhea.

Grupo	Riqueza	Riqueza Normalizada	Riqueza Efetiva	Índice de Shannon	Shannon Efetivo	Índice de Simpson	Simpson Efetivo	Equitabilidade
CIGS	17	17	16	1,327030159	3,77	0,490043945	2,04	0,324658648
FCA	6	8	5	0,448711422	1,57	0,813272442	1,23	0,173585273
JQ	11	14	2	0,148022121	1,16	0,961688182	1,04	0,042787989
MUSA	10	11	6	0,972287675	2,64	0,485353955	2,06	0,292687755
PQ	6	7	3	0,185378733	1,2	0,938750303	1,07	0,071714283
SUMN	7	7	3	0,698280181	2,01	0,605132383	1,65	0,248732419
SUMS	6	6	5	0,707632841	2,03	0,629590991	1,59	0,273749751
TA	12	12	10	0,775396459	2,17	0,699820659	1,43	0,216291372
VV	10	10	5	1,095600729	2,99	0,39577315	2,53	0,329808683

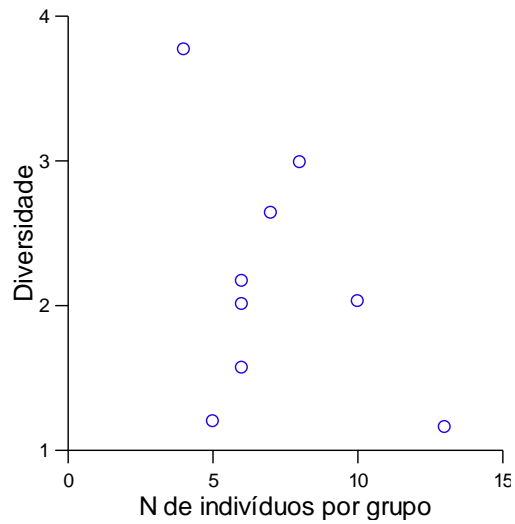
MATERIAL SUPLEMENTAR 9

Valores de riqueza, diversidade Shannon e Diversidade de Simpson, gerados após normalização dos dados de todos os vírus (Kraken) analisados na *pipeline* Rhea.

Grupo	Riqueza	Riqueza Normalizada	Riqueza Efetiva	Índice De Shannon	Shannon Efetivo	Índice Simpson	Simpson Efetivo	Equitabilidade
CIGS	44	44	29	2,3709585	10,71	0,16559012	6,04	0,434286692
FCA	24	21	12	1,220565203	3,39	0,49938392	2	0,266210509
JQ	53	35	8	0,966708955	2,63	0,65288223	1,53	0,168771365
MUSA	27	25	9	1,591262742	4,91	0,28298082	3,53	0,334658337
PQ	38	31	10	1,198720482	3,32	0,49510743	2,02	0,228417881
SUMN	20	19	7	1,207239703	3,34	0,43194938	2,32	0,279328965
SUMS	22	22	15	1,419418602	4,13	0,3979949	2,51	0,318295855
TA	29	29	19	1,680525714	5,37	0,29201093	3,42	0,345930895
VV	28	21	8	1,311710352	3,71	0,40398264	2,48	0,272854901

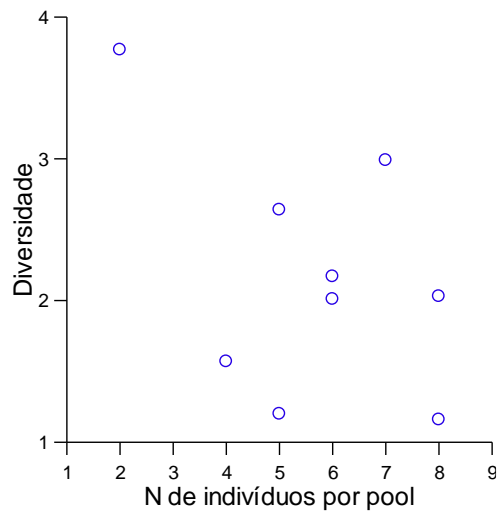
MATERIAL SUPLEMENTAR 11

Regressão Linear Simples entre diversidade efetiva de Shannon e o Número de Indivíduos por grupo.



$N = 9$; $R^2 = 0,168$; $p = 0,273$

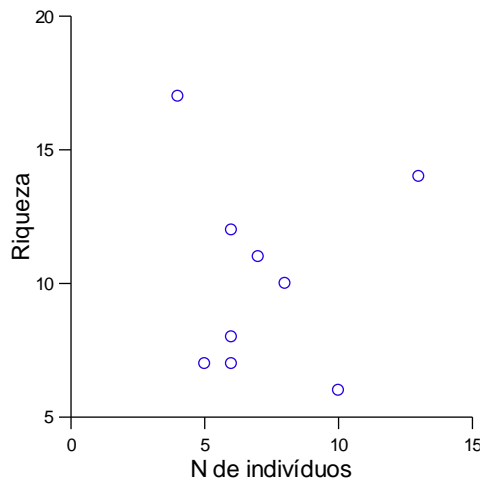
Regressão Linear Simples entre diversidade efetiva de Shannon e o Número de Indivíduos por *pool*.



$N = 9$; $R^2 = 0,219$; $p = 0,205$

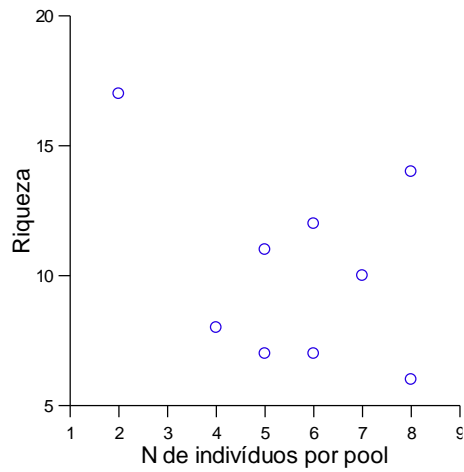
MATERIAL SUPLEMENTAR 12

Regressão Linear Simples entre Riqueza normalizada e o Número de indivíduos por grupo.



$N = 9$; $R^2 = 0,0$; $p = 0,989$

Regressão Linear Simples entre Riqueza normalizada e o Número de Indivíduos por *pool*.



$N = 9$; $R^2 = 0,141$; $p = 0,319$

MATERIAL SUPLEMENTAR 13

Matriz de Jaccard, verificando presença e ausência, dos vírus associados a infecções de mamíferos de todos os grupos trabalhados.

	CIGS	FCA	JQ	MUSA	PQ	SUMN	SUMS	TA
FCA	0,72222							
	2							
JQ	0,6	0,58333						
		3						
MUSA	0,57894	0,4	0,6					
	7							
PQ	0,72222	0,28571	0,45454	0,54545				
	2	4	6	5				
SUMN	0,73684	0,55555	0,5	0,58333	0,55555			
	2	6		3	6			
SUMS	0,64705	0,66666	0,69230	0,54545	0,5	0,7		
	9	7	8	5				
TA	0,47368	0,71428	0,78947	0,625	0,8	0,73333	0,61538	
	4	6	4			3	5	
VV	0,5	0,66666	0,38461	0,57142	0,66666	0,58333	0,66666	0,70588
		7	5	9	7	3	7	2

Capítulo 2

Souza, A. R., D'arc, M., Santos, A. F. A. & Gordo, M. Análise do viroma de duas espécies de primatas neotropicais vivendo em simpatria em um fragmento florestal urbano de Manaus, Amazonas, Brasil. Manuscrito em preparação para *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*.

Short communication

Análise do viroma de duas espécies de primatas neotropicais sintópicos em um fragmento florestal urbano de Manaus, Amazonas, Brasil.

Aline Ramos Souza^{1,2*}, Mirela D'arc³, André Felipe Andrade dos Santos³ & Marcelo Gordo^{1,2}.

¹Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Departamento de Biologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, CEP 69077-000, Amazonas, Brasil.

²Projeto Sauim-de-Coleira, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Av. General Rodrigo Otávio Jordão Ramos, 3000, Japim, 69077-000, Manaus, AM, Brasil.

³Laboratório de Diversidade e Doenças Virais, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Carlos Chagas Filho, CEP 21941-902, Rio de Janeiro, Brasil.

*E-mail para correspondência: alineramos.sza@gmail.com

RESUMO

A maioria das espécies de primatas vivem em grupos heterogêneos e, quando em áreas florestais reduzidas, pode ocorrer sobreposição de espécies. Essa aproximação pode ser um fator predisponente ao compartilhamento de patógenos, dentre eles vírus, microorganismos responsáveis por diversas doenças da fauna selvagem. Nesse contexto, nosso estudo objetivou caracterizar o viroma, em nível de famílias virais de importância para mamíferos, com uso de sequenciamento massivo de dois grupos de primatas, o sauí-de-coleira (*Saguinus bicolor*) e o mico-de-cheiro (*Saimiri sciureus*), que vivem em área sobreposta de um fragmento florestal urbano do município de Manaus, comparando também dois métodos de coleta de material biológico (material fecal e esfregaços retais). Em nossos resultados, verificamos que ambos os grupos compartilharam 12 famílias virais, sendo seis famílias encontradas apenas em sauí-de-coleira e quatro apenas em mico-de-cheiro. O uso das duas técnicas de coleta de material biológico mostraram ser complementares, entretanto, as fezes mostraram ser a melhor escolha para estudo de riqueza do viroma.

Palavras-chave

Vírus, Sequenciamento massivo, Primatas neotropicais, Simpatría, Amazônia central.

Os primatas, em sua grande maioria, são animais sociais que vivem em grupos heterogêneos, o que pode ampliar a probabilidade de propagação de patógenos entre eles ^(1,2). Associado a isso, espécies que habitam áreas florestais reduzidas e fragmentadas podem possuir áreas de vida que se sobrepõem, o que também pode aumentar o contato interespecífico, predispondo a uma maior exposição de doenças infecciosas ⁽³⁾.

Dentre os microorganismos causadores de doenças infecciosas, os vírus merecem atenção especial, pois compreendem patógenos responsáveis pelo aumento das doenças infecciosas na fauna, sendo os primatas reservatórios importantes de muitos vírus, podendo representar uma ameaça potencial à saúde pública e ser preocupantes para a conservação das espécies ^(4,5). Por este motivo, vários esforços estão em andamento para caracterizar o viroma e descobrir novos vírus em primatas ⁽⁵⁾.

O sauim-de-coleira (*Saguinus bicolor*), espécie de primata da família Callitrichidae que possui uma das menores áreas de distribuição (~7.500 km²), encontrado apenas em três municípios do Amazonas, Brasil (Manaus, Rio Preto da Eva e Itacoatiara) ⁽⁶⁾. Em contraste, o mico-de-cheiro (*Saimiri sciureus*), família Cebidae, é uma espécie de primata com uma maior área de distribuição geográfica, ocorrendo na República da Guiana, Guiana Francesa, Suriname e no Brasil (ao norte do rio Amazonas até os estados de Roraima, Amazonas, Pará e Amapá) ⁽⁷⁾. Em alguns fragmentos florestais urbanos do município de Manaus, ambas as espécies vivem em simpatria, e é comum que algumas espécies de primatas simpátricos mantenham associações poliespecíficas ⁽⁸⁾, podendo favorecer, assim, uma maior probabilidade de transmissão de uma variedade de patógenos.

Neste contexto, nosso estudo teve como objetivo caracterizar o viroma de dois grupos de primatas, o sauim-de-coleira (*Saguinus bicolor*) e o mico-de-cheiro (*Saimiri sciureus*), que vivem em um mesmo fragmento florestal urbano, comparando também dois métodos de coleta de material biológico (material fecal e esfregaços retais).

O estudo foi realizado no fragmento florestal que está localizado em torno das dependências do Jardim Zoológico do Centro de Instrução de Guerra na Selva (CIGS), na área urbana de Manaus, Amazonas, Brasil. A área florestal possui 187,36 hectares e é um dos mais antigos fragmentos florestais do município. As capturas dos animais foram realizadas em armadilhas galvanizadas do tipo *Tomahawk*, sendo um grupo de sauim-de-coleira com quatro indivíduos e um grupo de mico-de-cheiro com doze. Com os

animais nas armadilhas, foi realizada a contenção química individual, possibilitando a manipulação dos animais de forma mais segura. Foi feita a coleta de esfregaços retais com uso de hastes flexíveis e algodão, girando suavemente contra a circunferência interna do ânus, e as fezes foram coletadas individualmente a partir da defecação, podendo ocorrer desde a captura até após a realização dos procedimentos. Essas amostras foram armazenadas individualmente em *Eppendorf* (esfregaços) e tubo Falcon (fezes) contendo RNAlater (Life Technologies, Thermo Fisher, Califórnia, EUA). No total foram coletados quatro esfregaços e duas amostras de fezes de saúns-de-coleira e sete esfregaços e sete amostras de fezes dos micos-de-cheiro. O número de fezes de saúns-de-coleira foi menor, pois durante os procedimentos apenas dois animais defecaram. Todo o material foi mantido congelado a -20 °C e posteriormente encaminhado para o Laboratório de Diversidade e Doenças Virais (LDDV) do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) onde foram realizadas as análises laboratoriais.

As amostras foram organizadas por grupo e tipo, formando quatro *pools* no total. Inicialmente foi realizado uma etapa de enriquecimento viral com procedimentos de filtragem (usando um filtro Millipore, Millex-HV – 0,45µm – SLHV0135L; Merck), ultracentrifugação em gradiente de sacarose e tratamento enzimático (com mix de nucleases das empresas Promega, Epicenter, Ambion e Sigma). Seguida da extração dos ácidos nucleicos (usando *QIAamp MinElute Virus Spin Kit*, QIAGEN) e o material foi submetido à síntese de DNA complementar (usando as enzimas do *Kit Superscript III First Strand Synthesis Supermix LifeTech*, Thermo Fisher Scientific; e *Klenow Fragment 3'-5' exo*, New England Biolabs Inc), seguida pela preparação das bibliotecas (usando *Nextera XT DNA Library Preparation Kit*, Illumina) e o sequenciamento massivo foi realizado na plataforma MiSeq Illumina®, seguindo todas as especificações dos fabricantes nas diversas etapas de confecção e sequenciamento das bibliotecas. Os arquivos FastQ gerados foram analisados com a ferramenta Kraken, que possibilitou a atribuição das assinaturas taxonômicas através da análise de *k-mers*, para ancestral comum em nível de família, consultando o banco de dados RefSeq de nucleotídeos do NCBI (abril de 2021) ⁽⁹⁾. Para as análises estatísticas foram utilizadas apenas os vírus atribuídos a possíveis infecções de mamíferos, realizando a normalização dos dados na *pipeline* Rhea e em seguida foram feitas as análises de abundância e diversidade de

viroma usando o pacote *vegan* no R v3.4.0 integrado ao RStudio v1.0.143 e plotando os resultados usando o pacote *ggplot2* ^(10,11).

O sequenciamento massivo após limpeza (de qualidade, tamanho e sequências para vírus inespecíficos para mamíferos) gerou um total de 10.375 leituras brutas de sequências correspondentes às amostras de saúns-de-coleira, sendo 1.692 do *pool* de fezes e 8.683 das amostras de esfregaços retais. As bibliotecas do grupo de mico-de-cheiro geraram 12.463 leituras de sequências, das quais 4.050 eram do *pool* de fezes e 8.413 dos esfregaços retais, totalizando 57 famílias virais (material suplementar S1-S2). Após a normalização dos dados de vírus associados a infecções de mamíferos foram encontradas 22 famílias virais (material suplementar S3). A riqueza normalizada presente na junção dos dois *pools* para cada grupo gerou um total de 18 famílias virais para os saúns-de-coleira e 16 para os micos-de-cheiro. As amostras de fezes apresentaram uma maior riqueza de famílias virais, 17 famílias nas amostras de saúns e 13 famílias em mico, enquanto os esfregaços retais apresentaram seis e 10 famílias virais, respectivamente (Fig. 1). A diversidade alfa também foi maior nas amostras de saúns-de-coleira (Shannon efetivo: fezes = 3,77; esfregaço retal = 2,56) quando comparada com ambos os *pools* de micos-de-cheiro (Shannon efetivo: fezes = 1,7; esfregaço retal = 2,16).

Ambos os grupos compartilharam 12 famílias virais (*Adenoviridae*, *Circoviridae*, *Flaviviridae*, *Hantaviridae*, *Herpesviridae*, *Papillomaviridae*, *Paramyxoviridae*, *Parvoviridae*, *Poxviridae*, *Reoviridae*, *Retroviridae* e *Rhabdoviridae*), sendo seis famílias encontradas apenas em saúns-de-coleira (*Caliciviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Phenuiviridae*, *Picornaviridae*, *Polyomaviridae* e *Tobnaviridae*) e quatro apenas em mico-de-cheiro (*Arteriviridae*, *Nairoviridae*, *Smacoviridae* e *Togaviridae*) (Fig. 2). No grupo de saúns-de-coleira foi observado nas fezes a leitura de quase todos os vírus identificados nos esfregaços retais, com exceção apenas da família *Hantaviridae*. Enquanto o *pool* de fezes dos micos-de-cheiro identificou sete das famílias virais presentes nos esfregaços, com ausência de três (*Nairoviridae*, *Rhabdoviridae* e *Smacoviridae*). Em ambos os grupos, as fezes representaram uma maior diversidade de famílias virais para vírus de mamíferos.

Segundo Davies e Pedersen (2008) ⁽¹²⁾, os primatas têm maior probabilidade de compartilhar comunidades de patógenos entre si em casos de simpatria, tendo maior probabilidade de compartilhar uma proporção maior de espécies de patógenos, como

observado nos nossos resultados. Apesar disso, observamos também famílias virais únicas para cada espécie, futuros estudos investigando as famílias virais a nível taxonômico de espécie são fundamentais para verificar as particularidades genéticas e evolutivas de cada espécie viral possivelmente amostrada.

Na pesquisa molecular da microbiota bacteriana realizada por outros pesquisadores, os esfregaços retais e as amostras fecais forneceram perfis de composição do microbioma semelhantes ^(13,14,15). Os esfregaços retais também foram considerados amostras precisas, comparáveis às fezes, para a identificação baseada em PCR em tempo real de uma ampla gama de patógenos entéricos ⁽¹⁶⁾. Entretanto, em relação a composição do viroma ainda são escassos os trabalhos que comparam a eficácia do uso de ambos os métodos.

Em trabalho com macacos rhesus (*Macaca mulatta*) foi utilizado tanto fezes quanto esfregaços retais para verificar as diferenças na composição do viroma entre animais com diarreia e controles saudáveis ⁽¹⁷⁾. Porém, as metodologias de coleta não foram padronizadas, sendo utilizadas fezes de animais doentes e esfregaços retais de animais saudáveis, destes últimos foi verificado maior número de leituras para membros da família *Parvoviridae*. Entretanto, esse valor pode ter decorrido do tipo de amostra coletada, similar à nossa pesquisa, onde encontramos um maior número de leituras virais em esfregaços quando comparado às fezes. Provavelmente as fezes, apesar de bem armazenadas, podem ter maior probabilidade do material genético viral presente nelas estar mais degradado devido aos diversos componentes da amostra fecal (como plantas, insetos e substâncias oriundas da digestão). No *pool* de esfregaços dos micos-de-cheiro teve-se ainda uma maior porcentagem de números de leitura de sequências observadas nas amostras, refletindo provavelmente a carga viral sequenciada ⁽¹⁷⁾, devido ao número de amostras coletadas no *pool*, de sete animais enquanto que de sauíns-de-coleira foram apenas quatro.

Pressupõe-se que densidades mais altas do hospedeiro, maior proximidade ou o contato entre os indivíduos, resultam em maiores taxas de transmissão e diversidade de agentes infecciosos transmitidos por contato social, contudo esse compartilhamento dependerá do modo de transmissão do agente etiológico e da biologia do hospedeiro ^(18,19). Com base nesta lógica, prevê-se que mais hospedeiros sociais sofram maior exposição aos parasitas. Entretanto, em nosso estudo, o grupo dos sauíns-de-coleira

mostrou maior diversidade de famílias virais, apesar do grupo de mico-de-cheiro ter mais do que o dobro do número de indivíduos. Outras variáveis individuais devem ser analisadas futuramente para melhor inferir os potenciais determinadores dessa composição do viroma de ambos os grupos. Embora a densidade e sobreposição geográfica possam ser importantes, a infecção bem-sucedida e a transmissão do patógeno no novo hospedeiro dependerão de fatores evolutivos e ecológicos determinados pela biologia do hospedeiro e do patógeno ⁽²⁰⁾. Como identificado no Capítulo 1, evidenciando que o tamanho do grupo de sauíns-de-coleira não mostrou ser o fator determinante para maior riqueza em nível de família viral.

Este estudo é o primeiro a explorar o viroma fecal e esfregaços retais de duas espécies de primatas amazônicos de vida livre com distribuição sobreposta. Os usos das duas técnicas de coleta de material biológico mostraram ser complementares, entretanto, as fezes mostraram ser a melhor escolha para estudo de riqueza do viroma, pois possibilitaram encontrar uma maior riqueza e diversidade de famílias virais, além de ser uma técnica menos invasiva do que os esfregaços retais.

REFERÊNCIAS

- ¹ Capitanio JP. Social Processes and Disease in Nonhuman Primates: Introduction to the Special Section *American Journal of Primatology*, 2012. 74:491–496.
- ² Guimarães VY, Justo AA, Martins LL, Catão-Dias JL, & Sacristán C. Emerging coronaviruses in neotropical primates: A new threat?. *Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública*, 2020. 7 (1), 001-012.
- ³ Gillespie TR, Chapman CA. Forest fragmentation, the decline of an endangered primate, and changes in host–parasite interactions relative to an unfragmented forest. *American Journal of Primatology: Official Journal of the American Society of Primatologists*, 2008. 70(3), 222-230.
- ⁴ Keita MB, Hamad I, Bittar, F. Looking in apes as a source of human pathogens. *Microbial pathogenesis*, 2014. 77, 149-154. 10.1016/j.micpath.2014.09.003
- ⁵ Apakupakul K, Deem SL, Maqsood R, Sithiyopasakul P, Wang D, Lim ES. Endogenization of a Prosimian Retrovirus during Lemur Evolution. *Viruses*. 2021 Feb 27;13(3):383.
- ⁶ Gordo M, Subirá RJ, Vidal MD, Röhe F, Spironello WR, Valente LM, Oliveira JB, Pissinatti A, Wormell D, Jerusalinsky L. Contextualização do Sauim-de-coleira. Jerusalinsky L, Azevedo RB, Gordo M (Eds.), Plano de ação nacional para a

conservação do sauí-de-coleira, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Brasília, 2017, pp. 25-44

⁷ Mercês MP, Alfaro JW, Ferreira, WA, Harada, ML, Júnior, JSS. Morphology and mitochondrial phylogenetics reveal that the Amazon River separates two eastern squirrel monkey species: *Saimiri sciureus* and *S. collinsi*. *Molecular phylogenetics and evolution*, 2015. 82, 426-435.

⁸ Camarotti FLM, Silva VLD, Oliveira MABD. The effects of introducing the Amazonian squirrel monkey on the behavior of the northeast marmoset. *Acta Amazonica*, 2015. 45, 29-34.

⁹ Wood DE, Salzberg SL. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome biology*, 2014.15 (3), 1-12.

¹⁰ Lagkouvardos I, Fischer S, Kumar N, Clavel T.. Rhea: a transparent and modular R pipeline for microbial profiling based on 16S rRNA gene amplicons. *PeerJ*, 2017, 5, e2836.

¹¹ Geoghegan JL, Giallonardo FD, Wille M, Ortiz-Baez AS, Costa VA, Ghaly T, Mifsud JCO, Turnbull OMH, Bellwood DR, Williamson JE, Holmes, EdC. Virome composition in marine fish revealed by meta-transcriptomics, *Virus Evolution*, January 2021. Volume 7, Issue 1, , veab005.

¹² Davies TJ, Pedersen, AB. . Phylogeny and geography predict pathogen community similarity in wild primates and humans. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2008. 275(1643), 1695-1701.

¹³ Budding AE, Grasman ME, Eck A, Bogaards JA, Vandenbroucke-Grauls CM, van Bodegraven AA, Savelkoul PH. Rectal swabs for analysis of the intestinal microbiota. *PLoS One*. 2014; 14;9(7):e101344.

¹⁴ Choudhury R, Middelkoop A, Bolhuis JE, Kleerebezem, M. Legitimate and reliable determination of the age-related intestinal microbiome in young piglets; rectal swabs and fecal samples provide comparable insights. *Frontiers in microbiology*, 2019. 10, 1886.

¹⁵ Artim SC, Sheh A, Burns MA, Fox JG. Evaluating rectal swab collection method for gut microbiome analysis in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *PloS one*, 2019.14(11), e0224950.

¹⁶ Kabayiza JC, Andersson ME, Welinder-Olsson C, Bergström T, Muhirwa G, Lindh M . Comparison of rectal swabs and faeces for real-time PCR detection of enteric agents in Rwandan children with gastroenteritis. *BMC infectious diseases*, 2013. 13(1), 1-7.

¹⁷ Kapusinszky B, Ardeshir A, Mulvaney U, Deng X, Delwart E. Case-control comparison of enteric viromes in captive rhesus macaques with acute or idiopathic chronic diarrhea. *Journal of virology*, 2017, 91(18), e00952-17.

¹⁸ Nunn CL, Altizer S. *Infectious Diseases in Primates: Behavior, Ecology and Evolution*, 2006. Oxford: Oxford University Press.

¹⁹Nunn CL, Gillespie TR. Infectious disease and primate conservation. In: Wich SA, Marshall AJ (eds.), *An Introduction to Primate Conservation*, 2016. (157-173). Oxford: Oxford University Press.

²⁰ Pedersen AB, Davies TJ . Cross-species pathogen transmission and disease emergence in primates. *EcoHealth*, 2009. 6(4), 496-508.

FIGURAS

Figura 1 Riqueza de famílias virais de importância para mamíferos presentes nos grupos de saim-de-coleira (*Saguinus bicolor*) e mico-de-cheiro (*Saimiri sciureus*) de acordo com o método de coleta.

Figura 2 Abundância normalizada das famílias virais de importância para mamíferos nos grupos de saim-de-coleira (*Saguinus bicolor*) e mico-de-cheiro (*Saimiri sciureus*) de acordo com o método de coleta.

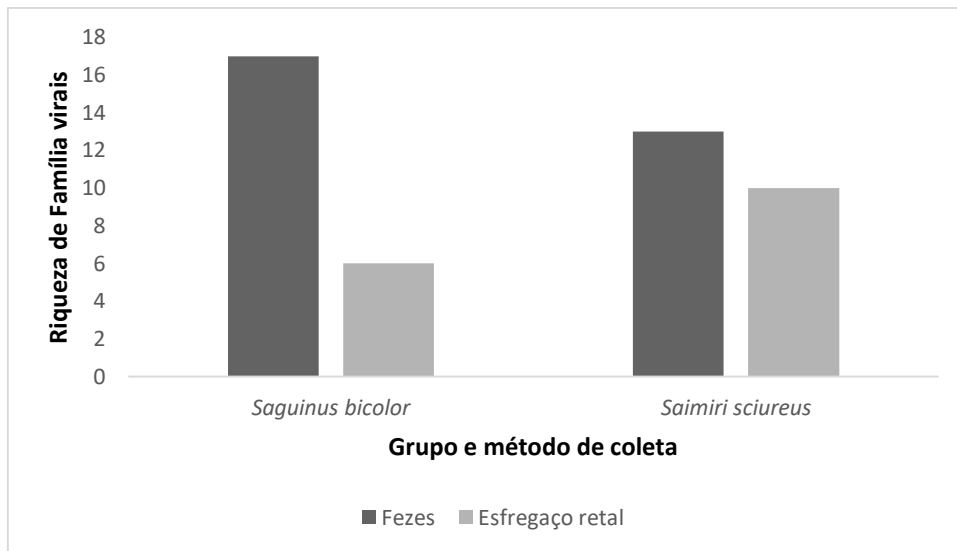


Figura 1

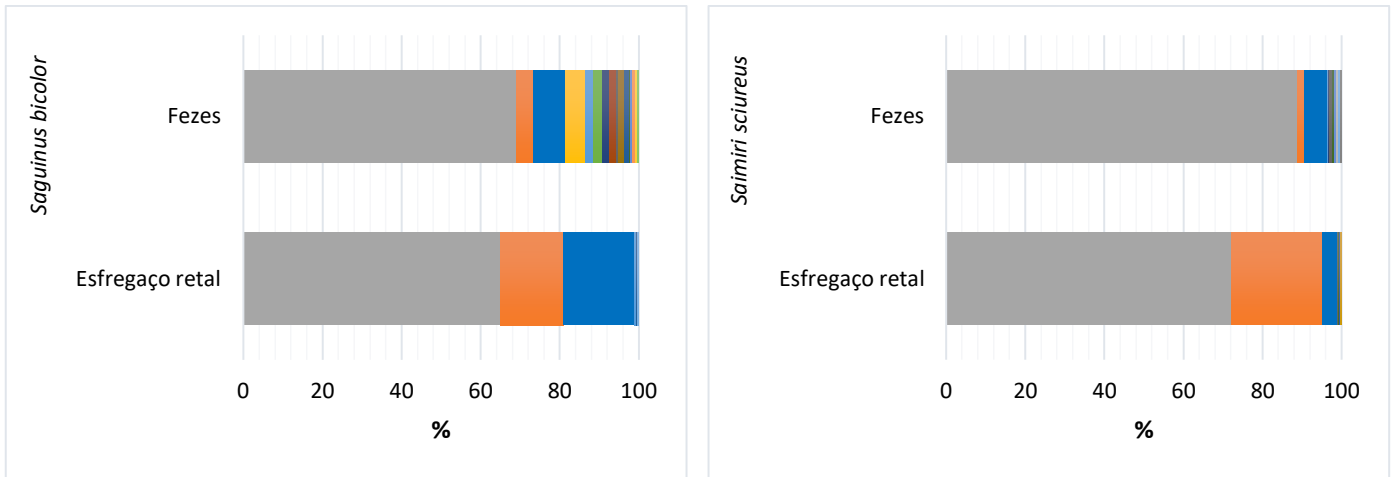


Figura 2

INFORMAÇÕES SUPLEMENTARES

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

MATERIAL SUPLEMENTAR

Análise do viroma de duas espécies de primatas neotropicais vivendo em simpatria em um fragmento florestal urbano de Manaus, Amazonas, Brasil

Tabela S1 Dados de sequências de leituras brutas gerados no Kraken para todos os vírus.

Família viral	Sb	Sb	Ss	Ss
	fezes	esfregaço retal	fezes	esfregaço retal
<i>Ackermannviridae</i>	1	2	12	3
<i>Adenoviridae</i>	13	23	5	9
<i>Alloherpesviridae</i>	5	11	3	11
<i>Alphaflexiviridae</i>	0	0	0	1
<i>Anelloviridae</i>	0	0	1	0
<i>Arteriviridae</i>	0	0	3	10
<i>Ascoviridae</i>	0	0	1	5
<i>Asfarviridae</i>	0	0	0	1
<i>Autographiviridae</i>	53	30	40	22
<i>Baculoviridae</i>	52	24	58	40
<i>Betaflexiviridae</i>	2	5	8	0
<i>Bicaudaviridae</i>	0	0	14	0
<i>Caliciviridae</i>	8	11	0	0
<i>Circoviridae</i>	12	0	4	0
<i>Closteroviridae</i>	5	0	0	0
<i>Demereciviridae</i>	10	8	1	7
<i>Drexleriviridae</i>	10	5	18	1
<i>Endornaviridae</i>	0	0	1	0
<i>Flaviviridae</i>	10	0	4	1
<i>Fuselloviridae</i>	1	0	2	0
<i>Geminiviridae</i>	1	0	9	0
<i>Genomoviridae</i>	0	2	0	0
<i>Hantaviridae</i>	0	8	11	0
<i>Herelleviridae</i>	33	0	26	3
<i>Herpesviridae</i>	27	721	41	1656
<i>Hypoviridae</i>	0	12	0	0
<i>Iflaviridae</i>	8	0	0	0
<i>Inoviridae</i>	0	3	4	0
<i>Iridoviridae</i>	6	0	1	4
<i>Lipothrixviridae</i>	0	0	3	1
<i>Marseilleviridae</i>	2	0	7	2
<i>Mesoniviridae</i>	0	0	1	0
<i>Microviridae</i>	33	15	14	3

<i>Mimiviridae</i>	13	0	16	8
<i>Mitoviridae</i>	0	0	8	0
<i>Myoviridae</i>	431	161	543	168
<i>Nairoviridae</i>	0	0	0	11
<i>Nimaviridae</i>	0	0	10	0
<i>Nudiviridae</i>	2	0	6	0
<i>Nyamiviridae</i>	7	0	0	0
<i>Orthomyxoviridae</i>	2	0	1	0
<i>Papillomaviridae</i>	4	0	15	22
<i>Paramyxoviridae</i>	1	0	12	2
<i>Partitiviridae</i>	1	0	0	3
<i>Parvoviridae</i>	2	0	14	1
<i>Phenuiviridae</i>	33	0	0	0
<i>Phycodnaviridae</i>	37	1	22	19
<i>Picornaviridae</i>	14	2	0	3
<i>Pithoviridae</i>	1	0	0	5
<i>Podoviridae</i>	39	70	70	27
<i>Polydnaviridae</i>	14	0	2	0
<i>Polyomaviridae</i>	10	0	0	0
<i>Potyviridae</i>	0	0	9	2
<i>Poxviridae</i>	442	2971	2212	5180
<i>Reoviridae</i>	2	0	14	5
<i>Retroviridae</i>	52	827	149	262
<i>Rhabdoviridae</i>	3	0	0	11
<i>Secoviridae</i>	0	8	7	7
<i>Siphoviridae</i>	276	3763	646	880
<i>Smacoviridae</i>	0	0	0	5
<i>Tobaniviridae</i>	5	0	0	0
<i>Togaviridae</i>	0	0	2	0
<i>Tolecatellitidae</i>	0	0	0	2
<i>Tospoviridae</i>	0	0	0	2
<i>Totiviridae</i>	4	0	0	2
<i>Turriviridae</i>	5	0	0	0
<i>Virgaviridae</i>	0	0	0	6

Legenda: Sb (*Saguinus bicolor*); Ss (*Saimiri sciureus*).

Tabela S2 Dados de sequências de leituras brutas gerados no Kraken para os vírus de importância para mamíferos.

Família viral	Sb fezes	Sb esfregaço retal	Ss fezes	Ss esfregaço retal
<i>Adenoviridae</i>	13	23	5	9
<i>Anelloviridae</i>	0	0	1	0
<i>Arteriviridae</i>	0	0	3	10
<i>Asfarviridae</i>	0	0	0	1
<i>Caliciviridae</i>	8	11	0	0
<i>Circoviridae</i>	12	0	4	0
<i>Flaviviridae</i>	10	0	4	1
<i>Genomoviridae</i>	0	2	0	0
<i>Hantaviridae</i>	0	8	11	0
<i>Herpesviridae</i>	27	721	41	1656
<i>Nairoviridae</i>	0	0	0	11
<i>Orthomyxoviridae</i>	2	0	1	0
<i>Papillomaviridae</i>	4	0	15	22
<i>Paramyxoviridae</i>	1	0	12	2
<i>Parvoviridae</i>	2	0	14	1
<i>Phenuiviridae</i>	33	0	0	0
<i>Picornaviridae</i>	14	2	0	3
<i>Polyomaviridae</i>	10	0	0	0
<i>Poxviridae</i>	442	2971	2212	5180
<i>Reoviridae</i>	2	0	14	5
<i>Retroviridae</i>	52	827	149	262
<i>Rhabdoviridae</i>	3	0	0	11
<i>Smacoviridae</i>	0	0	0	5
<i>Tobnaviridae</i>	5	0	0	0
<i>Togaviridae</i>	0	0	2	0
Total	640	4565	2488	7179

Legenda: Sb (*Saguinus bicolor*); Ss (*Saimiri sciureus*).

Tabela S3 Vírus associados a infecções de mamíferos gerados pelo Kraken após normalização dos dados.

Família viral	Sb	Sb	Ss	Ss
	fezes	esfregaço retal	fezes	esfregaço retal
<i>Adenoviridae</i>	2,03125	0,503833516	0,20096463	0,12536565
<i>Anelloviridae</i> *	0	0	0,040192926	0
<i>Arteriviridae</i>	0	0	0,120578778	0,139295166
<i>Asfarviridae</i> *	0	0	0	0,013929517
<i>Caliciviridae</i>	1,25	0,240963855	0	0
<i>Circoviridae</i>	1,875	0	0,160771704	0
<i>Flaviviridae</i>	1,5625	0	0,160771704	0,013929517
<i>Genomoviridae</i> *	0	0,04381161	0	0
<i>Hantaviridae</i>	0	0,17524644	0,442122186	0
<i>Herpesviridae</i>	4,21875	15,79408543	1,647909968	23,06727957
<i>Nairoviridae</i>	0	0	0	0,153224683
<i>Orthomyxoviridae</i>	0,3125	0	0,040192926	0
<i>Papillomaviridae</i>	0,625	0	0,602893891	0,306449366
<i>Paramyxoviridae</i>	0,15625	0	0,482315113	0,027859033
<i>Parvoviridae</i>	0,3125	0	0,562700965	0,013929517
<i>Phenuiviridae</i>	5,15625	0	0	0
<i>Picornaviridae</i>	2,1875	0,04381161	0	0,04178855
<i>Polyomaviridae</i>	1,5625	0	0	0
<i>Poxviridae</i>	69,0625	65,08214677	88,90675241	72,15489623
<i>Reoviridae</i>	0,3125	0	0,562700965	0,069647583
<i>Retroviridae</i>	8,125	18,11610077	5,988745981	3,649533361
<i>Rhabdoviridae</i>	0,46875	0	0	0,153224683
<i>Smacoviridae</i>	0	0	0	0,069647583
<i>Tobaniviridae</i>	0,78125	0	0	0
<i>Togaviridae</i>	0	0	0,080385852	0

Legenda: Sb (*Saguinus bicolor*); Ss (*Saimiri sciureus*).

Valores de abundância relativa consideraram valores de $p \geq 0,05$. As famílias virais marcadas com * foram aquelas que após normalização, não foram consideradas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O nosso estudo é de grande relevância, pois é o primeiro a caracterizar o viroma de duas espécies de primatas de vida livre da Amazônia brasileira, importante para a conservação das espécies e no contexto de saúde única.

O sequenciamento massivo realizado nesse estudo gerou um grande volume de dados, mostrando que o viroma do primata *Saguinus bicolor* é bastante diverso, apresentando famílias virais capazes de infectar uma gama de hospedeiros, de bactérias, arqueas, algas, fungos, plantas, invertebrados e vertebrados. As informações obtidas nesse estudo deverão impulsionar novos trabalhos para a identificação, em nível de espécie, do maior número de vírus de importância para infecções de mamíferos.

Capítulo 1:

- I. Em relação às famílias virais importantes para infecções de mamíferos, foi verificada grande diversidade compondo o viroma fecal, inclusive entre os grupos de *Saguinus bicolor*;
- II. Também foi verificado que o tamanho do grupo e o número de animais por *pool* não foram fatores que influenciaram a diversidade das famílias virais encontradas, podendo estar relacionada com diversas variáveis, desde individuais até ambientais;
- III. A composição viral dos grupos analisados não teve relação com a proximidade geográfica entre eles;
- IV. A ferramenta Kraken mostrou ser a melhor opção para caracterizar a diversidade do viroma em nível de família.

Capítulo 2:

- V. Ambos os grupos de *Saguinus bicolor* e *Saimiri sciureus* compartilham famílias virais, entretanto, o *S. bicolor* apresentou maior riqueza;
- VI. O uso das duas técnicas de coleta de material biológico mostraram ser complementares, entretanto, as fezes mostraram ser a melhor escolha para estudo de riqueza do viroma.