

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINARIA E ZOOTECNIA
“Júlio de Mesquita Filho”
CAMPUS DE BOTUCATU

**ESTUDO CLÍNICO – MORFOMÉTRICO, HEMATOLÓGICO, BIOQUÍMICO E
IMUNOCITOQUÍMICO EM *Alouatta belzebul* (Primates, Platyrrhini)**

VICTOR YUNES GUIMARÃES

Botucatu – SP

Setembro, 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINARIA E ZOOTECNIA
“Júlio de Mesquita Filho”
CAMPUS DE BOTUCATU

**ESTUDO CLÍNICO – MORFOMÉTRICO, HEMATOLÓGICO, BIOQUÍMICO E
IMUNOCITOQUÍMICO EM *Alouatta belzebul* (Primates, Platyrrhini)**

VICTOR YUNES GUIMARÃES

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção do título
de Mestre em Medicina Veterinária, Área de
Patologia Clínica Veterinária.

Orientadora: Prof. Dra. Regina Kiomi Takahira

Co-orientador: Dr. José Augusto P. C. Muniz

Botucatu – SP

Setembro, 2016

Nome do Autor: Victor Yunes Guimarães

Título: ESTUDO CLÍNICO-MORFOMÉTRICO, HEMATOLÓGICO, BIOQUÍMICO E IMUNOCITOQUÍMICO EM *Alouatta belzebul* (PRIMATES, PLATYRRHINI)

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Regina Kiomi Takahira

Presidente e Orientadora

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Júlio Lopes Sequeira

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Profa. Dra. Nádia Regina Pereira Almosny

Membro

Departamento Patologia Clínica Veterinária

Faculdade de Veterinária – UFF – Niterói

Data da Defesa: 27 de setembro de 2016.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Guimarães, Victor Yunes.

Estudo clínico-morfométrico, hematológico, bioquímico e imunocitoquímico em *Alouatta belzebul* (Primates:Platyrrhini) / Victor Yunes Guimarães. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Regina Kiomi Takahira

Coorientador: José Augusto Pereira Carneiro Muniz

Capes: 50503030

1. Estudo Clínico. 2. Bugio. 3. Guariba-de-mãos-ruivas.
4. Animais - Extinção. 5. Extinção (Biologia). 6. Imunidade.
7. Primatas não humanos. 8. Amazônia.

Palavras-chave: *Alouatta belzebul*; Amazônia; Extinção; Imunidade.

DEDICATÓRIA

Aos primatas capturados em nome desta pesquisa, que vivenciam o risco iminente de desaparecer do planeta, graças às ações do homem no ambiente natural.

"O homem não é único animal que pode alterar ou destruir seu ambiente, mas o único que pode, conscientemente, conservá-lo."

Fernando Dias de Ávila-Pires

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo amor, carinho, dedicação, incentivo, apoio incondicional e irrestrito durante todos os momentos desta minha caminhada. Presentes nos momentos mais difíceis, me apoiando e dando todo o suporte necessário para suportar a distância e as dificuldades! Não apenas pelos momentos durante a pós-graduação, mas também os que antecederam minha caminhada até aqui, e só assim, eu conseguir atingir esta posição!!!

Aos meus amigos!! Sem distinção de nome, pois só eu sei o quanto eles são numerosos e não gostaria de deixar nenhum de fora desta singela homenagem. Eles que estiveram ao meu lado incondicionalmente desde o começo da minha carreira profissional e estudantil!

À Biota, a empresa que considero parte da minha casa, da minha história, do meu presente e do meu futuro! Ao corpo técnico composto de grandes profissionais e amigos; que lutam aguerridamente pela conservação dos habitats brasileiros e que tenho muito orgulho de fazer parte deste time!! Equipe que me acolheu, incentivou, me fez crescer, deu oportunidades e que, indiretamente, permitiu que este projeto ambicioso se executasse.

Norte Energia e as empresas parceiras, que permitiram não somente a utilização dos dados, mas a produção científica para além dos muros das condicionantes ambientais. Todo suporte logístico, estrutural e institucional foram fundamentais para a execução desta pesquisa de campo.

À equipe do CEA, da qual jamais poderia me esquecer! Todos responsáveis pelo meu bem estar, pelos cuidados durante as etapas experimentais da pesquisa e experiência profissional.

À minha orientadora, Professora Regina, por ter recebido de braços abertos um “componente selvagem” à Patologia Clínica! Pelos ensinamentos, serenidade, paciência, pela companhia e orientação durante este período de estudos.

Aos meus companheiros e amigos batalhadores da pós-graduação, que estiveram sempre comigo, nos momentos mais delicados de meus experimentos, nas disciplinas e nas comemorações mais felizes!! Obrigado por me receberem muito bem e me auxiliar sempre nessa intensa jornada!!

Ao grupo de residentes e quadro de funcionários do Laboratório Clínico Veterinário, responsáveis por compartilhar o aprendizado durante esses dois anos e com certeza levarei pra toda a vida. À amizade construída em cima de uma rotina pesada de exames laboratoriais, em meio a boas e muitas risadas!!

Ao CEMPAS, pela disponibilidade, presteza e carinho com que sempre fui recebido e pela concessão para a pesquisa piloto. Os animais gentilmente cedidos pela direção do centro e amparados por uma equipe sempre pronta para ajudar!

Ao serviço de Patologia Veterinária desta instituição, desde os funcionários, residentes, pós-graduandos aos professores, que sempre estiveram prontamente dispostos a contribuir e somar para a minha formação, além de ter contribuído substancialmente para a execução desta pesquisa.

Aos biólogos, auxiliares de campo, pesquisadores externos, parceiros, amigos e colegas de profissão que me auxiliaram de maneira substancial para a conclusão deste estudo.

Ao meu co-orientador Dr. José Augusto P. C. Muniz pelo aceite do convite, ter me apoiado e sempre deixando as portas abertas do Centro Nacional de Primatologia!

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Anticorpos utilizados para a técnica de Imunocitoquímica.....	16
QUADRO 2 - Total estratificado de animais capturados a campo e sua localidade em coordenada UTM.....	20

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Parâmetros vitais apresentados em média, os valores máximo e mínimo de variação durante a sedação.....	22
TABELA 2 - Parâmetros biométricos estratificados de <i>Alouatta belzebul</i>	26
TABELA 3 - Valores médios (em número absoluto) e desvio padrão das variáveis hematológicas de exemplares da espécie <i>Alouatta belzebul</i> , conforme a faixa etária.	36
TABELA 4 - Valores médios (em número absoluto) e desvio padrão das variáveis hematológicas de exemplares da espécie <i>Alouatta belzebul</i> , em função do sexo.....	37
TABELA 5 - Parâmetros hematológicos de <i>Alouatta belzebul</i> adultos comparados com espécies congêneres de vida livre.....	38
TABELA 6 - Parâmetros hematológicos estatisticamente significantes entre as estações do ano amazônicas.....	39
TABELA 7 - Efeito do sexo sobre os parâmetros bioquímicos em espécimes de <i>Alouatta belzebul</i> , independente da idade.....	41
TABELA 8 - Efeito da idade sobre os parâmetros bioquímicos em espécimes de <i>Alouatta belzebul</i> , independente do sexo.	42
TABELA 9 - Parâmetros bioquímicos de <i>Alouatta belzebul</i> comparados com espécies congêneres de vida livre e cativo.....	43
TABELA 10 - Efeitos da sazonalidade sobre os parâmetros bioquímicos da espécie.	44
TABELA 11 - Avaliação quantitativa de linfócitos circulantes em <i>Alouatta belzebul</i> , considerando a influência de fatores intra-específicos e ambientais (valores absolutos).	50

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Amplitude térmica e pluviométrica do ano de 2015 para a área amostral.	19
FIGURA 2 - Mapa da área amostral com os respectivos pontos de captura: ilha e continente na região da Volta Grande do rio Xingu.	21
FIGURA 3 - Fêmeas adultas capturadas na Ilha Pimental (A) e Ilha do Meio (B), respectivamente, apresentando diferentes padrões de pelagem e disposição dos campos cromatogénicos ruivos do dorso.....	28
FIGURA 4 - Pelagem lateral distintamente longa (A) e macho adulto apresentando coloração ruiva intensa na região parietal e mãos (B).	28
FIGURA 5 - Eritrócitos maduros em esfregaço sanguíneo, aumento 1000x, Wright. ...	31
FIGURA 6 – Eosinófilo (à esquerda), neutrófilo segmentado (à direita) em meio a eritrócitos maduros, aumento 400x, Wright-Giemsa.	31
FIGURA 7 - Monócito apresentando núcleo ameboide, citoplasma acinzentado e vacúolos, aumento 1000x, Wright.	32
FIGURA 8 - Linfócito pequeno com núcleo arredondado, citoplasma escasso e de coloração basofílica, aumento 1000x, Wright-Giemsa.....	32
FIGURA 9 - Neutrófilo pouco segmentado, aumento 1000x, Wright-Giemsa.	33
FIGURA 10 - Neutrófilo maduro apresentando hipossegmentação nuclear (acima), citoplasma basofílico e monócito, aumento 1000x, Wright-Giemsa.	33
FIGURA 11 – Neutrófilos segmentados (A) com granulação basofílica fina por todo o citoplasma e linfócito típico (B), aumento 1000x, Wright-Giemsa.	34
FIGURA 12 – Eosinófilo (à esquerda) apresentando grânulos arredondados, ocupando quase totalmente o citoplasma e linfócito grande (à direita), aumento 1000x, Wright-Giemsa.....	34
FIGURA 13 - Neutrófilo segmentado (à esquerda) e plaquetas em monocamada, aumento 1000x, Wright-Giemsa.	35

FIGURA 14 – Linfócitos marcados pelo anticorpo policlonal anti-CD3 (à esquerda), apresentando visualização citoplasmática, correspondente ao imunofenótipo das células T. Linfócito negativo para a marcação anti-CD3 (à direita). Imunocitoquímica, Contracoloração: Hematoxilina de Harris, 1000x..... 48

FIGURA 15 - Linfócito marcado pelo anticorpo monoclonal anti-BSAP PAX 5, apresentando visualização nuclear (abaixo), correspondente ao imunofenótipo das células B. Linfócito negativo (acima) para a marcação anti-BSAP PAX 5. Imunocitoquímica, Contracoloração: Hematoxilina de Harris, 1000x. 48

FIGURA 16 - Secção histológica de linfonodo canino utilizada como controle positivo. Imunomarcação positiva para o anticorpo anti_BSAP PAX 5. Imunocitoquímica, Contracoloração: Hematoxilina de Harris, 400X. 49

SUMÁRIO

RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
3. OBJETIVOS.....	9
3.1. Objetivo Geral.....	9
3.2. Objetivos Específicos.....	10
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
4.1. Base legal e Normativa.....	10
4.2. Área de Estudo.....	11
4.3. Captura e Triagem dos Espécimes.....	11
4.4. Colheita e Processamento das Amostras.....	12
4.5. Análise Estatística.....	16
5. RESULTADOS.....	17
5.1. Sucesso de Captura.....	17
5.2. Exame Clínico.....	21
5.3. Aspecto Morfométricos.....	25
5.4. Avaliação hematológica.....	29
5.5. Avaliação bioquímica.....	39
5.6. Avaliação Imunocitoquímica.....	46
6. DISCUSSÃO.....	51
6.1. Aspectos clínico-morfométricos.....	51
6.2. Hematologia.....	55
6.3. Bioquímica Clínica.....	59
6.4. Imunofenotipagem e Avaliação Quantitativa de Linfócitos.....	63
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	70
8. CONCLUSÕES.....	72
9. BIBLIOGRAFIA.....	73
10. ANEXOS.....	93

RESUMO

GUIMARAES, V.Y. Estudo clínico, morfométrico, bioquímico e imunocitoquímico em *Alouatta belzebul* (Primates: Platyrrhini). 2016. 104p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Os guaribas-de-mãos-ruivas (*Alouatta belzebul*) são endêmicos do Brasil, atualmente classificados em nível global e nacional como “Vulnerável” e podem ser encontrados principalmente na Amazônia Oriental. Este estudo se propôs a realizar a avaliação clínica e laboratorial de primatas do complexo *Alouatta belzebul* no bioma amazônico, a fim de caracterizar parâmetros de higiene para uma população residente às margens do Baixo rio Xingu. 27 primatas foram capturados nas áreas de influência da UHE Belo Monte, estado do Pará, Brasil. As variáveis biométricas avaliadas reforçaram as inferências para o gênero, em relação ao dimorfismo sexual pelo tamanho corpóreo, além da constatação de polimorfismos no padrão de coloração da pelagem. Entretanto, as variações talvez possam ser atribuídas a características geográficas, não suficientes para separar as populações em nível taxonômico. A estratificação etária também revelou diferenças significativas nas contagens de eritrócitos, nas concentrações de hemoglobina, hematócrito, na atividade sérica de fosfatase alcalina e GGT para os indivíduos jovens. Enzimas como AST, CK e LDH registraram atividade sérica significativamente superior, quando comparadas aos estudos em cativeiro. Os percentuais de linfócitos T e B circulantes foram 51 e 31% respectivamente, caracterizando o predomínio de linfócitos com o imunofenótipo T. Diante dos desafios imunológicos a que estes animais estão submetidos constantemente, presume-se que o perfil imunológico encontrado corresponde ao *status* “ótimo” de sobrevivência.

Palavras-chave: Amazônia, *Alouatta belzebul*, imunidade, extinção.

ABSTRACT

GUIMARAES, V.Y. Clinical, morphometric, haematological, biochemical and immunocytochemical study in *Alouatta belzebul* (Primates: Platyrrhini). 2016. 104p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

The red-handed howler monkey (*Alouatta belzebul*) are endemic in Brazil, currently ranked in global and local scale as "Vulnerable" and occurs mainly in the Eastern Amazon. This study aimed to carry out the clinical and laboratory evaluation of red-handed howler "complex" of primates in the Amazon biome, in order to characterize healthiness parameters for a population living on the banks of the Lower Xingu River. 27 primates were captured under the areas of influence of UHE Belo Monte, Pará State, Brazil. The biometric parameters evaluated reinforced inferences for Gender, sexual dimorphism regarding to the body size, in addition to finding polymorphisms in the coat color pattern. However, variations can perhaps be attributed to geographical features, not enough to separate populations taxonomic level. The age stratification also revealed significant differences in erythrocyte counts, the hemoglobin concentration, hematocrit, serum activity of alkaline phosphatase and GGT for young individuals. Enzymes such as AST, CK and LDH recorded significantly higher serum activity compared to captive studies. The percentages of T and B lymphocytes were 51 and 31% respectively, characterizing the predominance of lymphocytes with immunophenotype T. In the face of immune challenges that these animals are constantly subjected, it is reasonable that this immunological profile corresponds to the status "great" survivability.

Keywords: Amazon, *Alouatta belzebul*, immunity, extinction.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a humanidade tem presenciado eventos de extinção de espécies em todo o planeta, atraindo atenção da comunidade científica conservacionista para as perdas irreparáveis do habitat. Muitos autores tem lamentado a perda de cobertura vegetal das florestas neotropicais associada aos impactos antropogênicos e especulam a resiliência das espécies de mamíferos em seu hábitat original (BALMFORD et al., 2002; RIMBACH, 2013; GOUVEIA et al., 2014). Todavia, há mais de duas décadas, Redford (1992) já relatava a extinção de mamíferos de grande porte em grandes áreas de floresta tropical, onde a vegetação ainda parecia intacta.

As florestas tropicais são os ecossistemas mais ricos que o nosso planeta já conheceu e ocupam a maior parte da bacia amazônica (GOULDING et al., 2003). Segundo Oliveira (2006), estas florestas estão desaparecendo rapidamente ao longo de seus limites ao sul do Brasil, onde tem ocorrido intenso desmatamento nas últimas três décadas.

No final dos anos 80, os estudos de Mahar (1989) apontavam como principal causa para o desmatamento na região amazônica a expansão da agricultura; particularmente a conversão de florestas em pastagens pelos grandes proprietários de terra. Nos dias de hoje, de acordo com Barni et al. (2014) o desmatamento acontece também graças à abertura e ampliação de rodovias e a implantação de empreendimentos hidrelétricos.

Adicionalmente, fatores ambientais como as oscilações no clima, resultando em períodos úmidos e secos durante os últimos 100 mil anos, certamente contribuíram para o isolamento de certas populações de primatas (REDFORD, 1992). A colonização de novos ambientes fez, inclusive, com que os primatas neotropicais apresentassem grande variação geográfica em seus padrões de cor (BRADLEY e MUNDY, 2008) e *status* de sobrevivência.

Atualmente, mais de um terço das espécies de primatas encontra-se classificada como “ameaçada” pela União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), e uma em cada sete, estão em perigo iminente de desaparecer (GOUVEIA et al., 2014). Apesar de sua distribuição ao longo de todo o Brasil, a maior ameaça para os macacos hoje é a perda do habitat

devido à fragmentação das florestas, que tem exterminado ou isolado populações numerosas. A maioria das espécies que vive ao sul da Amazônia, por exemplo, está ameaçada por redução do habitat e também pela caça (CROCKETT, 1998).

Os guaribas-de-mãos-ruivas (*Alouatta belzebul* Linnaeus, 1766) são endêmicos do Brasil e podem ser encontrados principalmente na Amazônia Oriental, mas também no nordeste da Floresta Atlântica e em algumas zonas de transição de formações vegetais como Cerrado e Caatinga (EMMONS e FEER, 1990; GREGORIN et al., 2008). Atualmente a espécie encontra-se classificada, em escala nacional e mundial, como “Vulnerável”; conforme os critérios estabelecidos pela *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) e Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade/ Ministério do Meio Ambiente. O seu *status* atual de ameaça se justifica principalmente pela pressão de caça, fragmentação e perda do hábitat nas florestas tropicais, que tem contribuído para o declínio das populações nativas (MMA, 2014).

Diversos fatores influenciam no mecanismo de adaptação dos primatas ao ambiente, tais como a temperatura, umidade, luminosidade, ventilação, incidência de predação, disponibilidade de alimento, abrigo e facilidade de camuflagem. Portanto, qualquer alteração ambiental pode afetar as estratégias de sobrevivência dos primatas (KINDLOVITS e KINDLOVITS, 2009). Além dos fatores ambientais, a condição clínica e o perfil imunológico são variáveis que influenciam a sobrevivência dos macacos na natureza (AHMED-ANSARI et al., 1989).

Nos últimos anos, estudos voltados para a sistemática morfológica e molecular (LIMA e SEUÁNEZ, 1989), biogeografia e caracterização genética das populações de *Alouatta belzebul* foram desenvolvidos (NASCIMENTO et al., 2008). Os padrões fenotípicos de pelagem e morfologia do crânio têm sido bastante explorados, a fim de discutir imprecisões taxonômicas envolvendo o gênero e a espécie (RYLANDS et al., 2000; GREGORIN, 2006; RYLANDS et al., 2012).

Além dos estudos citogenéticos e moleculares envolvendo o sequenciamento de aminoácidos e/ou eletroforese de proteínas, a utilização de anticorpos monoclonais ou mesmo policlonais como marcador celular, pode configurar uma poderosa ferramenta na sistematização molecular (LETVIN et

al., 1983). A detecção de epítomos de superfície compartilhados entre espécies traz evidências não somente da proximidade filogenética, bem como esclarece fenômenos imunológicos e características funcionais das linhagens marcadas (HAYNES et al., 1982).

Muitas perguntas continuam a existir sobre a sistemática, anatomia e fisiologia do gênero *Alouatta* (KOWALEWSKI et al., 2015). Apesar de ser um dos *taxa* mais estudado no neotrópico (GREGORIN et al., 2008), o número de espécies e subespécies de bugios, sua distribuição e *status* sanitário ainda são pouco documentadas.

Estudos com as populações amazônicas desta espécie, abordando aspectos clínico-patológicos ainda são incipientes ou não existem. Parâmetros clínicos, hematológicos e bioquímicos de referência, bem como o perfil imunológico da espécie tornam-se uma importante contribuição para a conservação do táxon, mediante sua vulnerabilidade.

As populações amostradas neste estudo encontram-se às margens do Baixo rio Xingu, dentro da área de influência direta da Usina Hidrelétrica de Belo Monte (UHE), estado do Pará, Brasil. A região coincide com os limites de ocorrência natural disjunta da espécie, em parapatria com o congênere *Alouatta discolor* (GREGORIN, 2006).

As análises morfométricas, clínica e patológica deste complexo grupo taxonômico que se propõem neste estudo, complementarão os estudos biogeográficos das populações (*in situ*) exploradas até o momento. A caracterização das populações amazônicas desta região permitirá extrapolações para as populações nordestinas da espécie, bem como ações de manejo *ex situ* que visem à conservação do grupo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Pouco se sabe sobre a diversidade de mamíferos do quinto maior país do mundo e primeiro em megadiversidade (COSTA et al., 2005). Diante das dimensões brasileiras, existem muitas lacunas e locais pouco explorados que, ainda dificultam o estabelecimento de uma gestão eficaz do patrimônio biológico. A informação mais preocupante é a de que o número de espécies

que a ciência desconhece, talvez corresponda a aproximadamente o mesmo número de espécies atualmente consideradas ameaçadas de extinção (PIMM et al., 2010).

Estudos recentes nos ecossistemas marinhos e terrestres apontam que os efeitos das ações antropogênicas podem aparecer tardiamente, mas que hoje, as mudanças climáticas já alteram significativamente a composição faunística (GOUVEIA et al., 2014; LAURANCE et al., 2016).

De acordo com Moran (1993), antes de 1975, o desmatamento registrado na Amazônia correspondia a menos de 1%. Entre 1975 e 1987 essas taxas aumentaram exponencialmente, devido a políticas de incentivo de crédito rural e o advento da criação da rodovia interestadual Transamazônica. Somente ao final da década de oitenta, quando a opinião pública voltou seus olhares para a destruição do bioma mais rico do mundo, as políticas de desmatamento subsidiado para criadores de gado foram reduzidas. Segundo Fearnside (2005), nos últimos 30 anos o desmatamento da região só vem aumentando, e os responsáveis por estes índices foram (e ainda são) a pecuária, o corte seletivo da madeira, os empreendimentos hidrelétricos, mineradores e o modo de ocupação em “espinha de peixe” das imediações da rodovia Transamazônica.

Este padrão de ocupação da terra potencializou a fragmentação e perda do hábitat, modificando a composição faunística e florística, de modo quase irreversível (LAURANCE, 2001). Ainda que nas últimas décadas, um enorme esforço coletivo de pesquisadores e gestores públicos tenha sido aplicado para a conservação dos recursos naturais (RYLANDS et al., 1997), é premente o estabelecimento de políticas públicas de proteção dos hábitats, com vistas a preservar o maior número de espécies ameaçadas (DUARTE, 2014).

O compartilhamento deste espaço aproxima o homem das florestas onde vivem os primatas originalmente (CHAPMAN, et al., 2013). Um dos principais problemas oriundos deste contato é a prática da caça dos macacos para consumo. Além de afetar a biomassa e abundância das populações dos macacos atelídeos (*Lagothrix*, *Ateles* e *Alouatta*), desse modo passa a existir mais uma rota de passagem de patógenos interespecífica (PERES, 1990).

Os macacos são os dispersores de sementes mais importantes para centenas de espécies de plantas, especialmente arbóreas e lianas, e, portanto, elementos-chave dos ecossistemas da floresta tropical (GOUVEIA et al., 2014). Quando suas populações são reduzidas pela caça, por exemplo, a composição de espécies de plantas das florestas pode mudar (REDFORD, 1992).

Os primatas atualmente ocorrem em ambientes tropicais e subtropicais ao longo de todo o mundo, exceto na Austrália (REIS et al., 2008). O Brasil é o país que apresenta o maior número de espécies, com 118 descritas (PAGLIA et al., 2012), mas esse número pode variar conforme o arranjo taxonômico adotado. Segundo as descrições de Rylands et al. (2000) e Rylands et al. (2012), os macacos do Novo Mundo (Platyrrhini) se distribuem em cinco famílias (Callitrichidae, Cebidae, Aotidae, Pitheciidae e Atelidae), 19 gêneros e 205 espécies e subespécies.

A família Atelidae possui cinco gêneros: *Ateles*, *Brachyteles*, *Lagothrix*, *Alouatta* e *Oreonax*, dos quais apenas o último não é encontrado no Brasil. São os maiores primatas neotropicais (STRIER, 1992; REIS et al., 2008) e os únicos que apresentam cauda preênsil.

Os *Alouatta* são popularmente conhecidos como bugios ou guaribas e exibem características que permitem fácil identificação, como a cauda preênsil e o osso hióide bastante pronunciado, com o qual executam um rugido (EMMONS e FEER, 1990). São animais de hábitos diurnos, essencialmente arborícolas e classificados como generalistas herbívoros (NEVILLE et al., 1988). Em geral, as populações do gênero são afetadas pela perturbação do habitat, como o desmatamento, a caça e a construção de empreendimentos hidrelétricos (CROCKETT, 1998; GOUVEIA et al., 2014).

Os guaribas possuem uma estratégia comportamental adaptativa de poupar energia, quando comparados aos outros representantes da família Atelidae, que maximizam sua energia adquirida nos frutos (energéticos). Embora se alimentem predominantemente de folhas (baixo teor energético), o gênero *Alouatta* consegue ser energeticamente eficiente na locomoção quadrupedal, deslocando-se um pouco mais lentamente e ainda utilizando uma área de vida menor (STRIER, 1992).

Os padrões fenotípicos de coloração da pelagem variam conforme a localidade-tipo, segundo Bonvicino et al. (1989), que agruparam 208 espécimes

analisados em cinco padrões de cor. As variações fenotípicas encontradas podem estar relacionadas aos fatores ambientais do ecossistema em que estão inseridos.

Além dos esforços para evidenciar aspectos ecológicos e taxonômicos dos primatas, poucos trabalhos tem documentado os aspectos clínico patológicos das populações de vida livre. Esta modalidade de estudo permite que as amostras sejam obtidas *in natura*, na forma como realmente se comportam os parâmetros biológicos no organismo, sem o viés do estresse adaptativo do cativeiro (KOWALEWSKI et al.,2015). Entretanto, os animais precisam ser impreterivelmente capturados, o que representa pelo menos um episódio estressante para cada indivíduo.

Sabidamente, o estresse da contenção promove aumento nos níveis séricos de cortisol nos primatas, por estimulação das glândulas suprarrenais, da mesma forma como nos demais mamíferos (KLEMM, 1996; MENDONÇA-FURTADO, 2012). Estudos avaliando o estresse de macacos rhesus contidos fisicamente (BLANK et al. 1983) demonstraram picos de cortisol sérico significativamente superiores em indivíduos que nunca foram capturados, quando comparados aos indivíduos habituados ao manejo. Os autores relatam que no macaco rhesus, o “hormônio do estresse”, como denominado o cortisol, demora cerca de 60 minutos para atingir a sua concentração sérica máxima e que o estímulo prolongado poderia iniciar seus efeitos deletérios (VERONA e PISSINATI, 2014).

Segundo as afirmações de Claman (1972), não havia dúvidas de que as células linfóides eram sensíveis aos glicocorticoides, mas existiam inúmeros mecanismos reguladores, ainda não tão bem esclarecidos para a época, mostrando que diferentes populações de linfócitos são afetadas diferentemente.

Em 1972, Claman não tinha dúvidas de que as células linfóides eram sensíveis aos glicocorticoides, mas existiam inúmeros mecanismos reguladores, ainda não tão bem esclarecidos para a época, mostrando que diferentes populações de linfócitos eram afetadas diferentemente. Segundo Campbell (2007), a idade, o sexo, estado de hidratação e condição nutricional, fatores ambientais como fotoperíodo, estresse, temperatura, manejo, bem como métodos de coleta de amostras influenciam os resultados dos testes.

Primatas não humanos representam um modelo importante para estudos dos mecanismos fisiológicos e patológicos de uma série de doenças humanas. Sua proximidade filogenética com o homem resulta na preservação de células e moléculas de superfície funcionalmente importantes (REIMANN et al., 1994), o que faz com que algumas pesquisas sejam preferencialmente realizadas em primatas, ao invés de outros modelos, como em roedores.

Recentemente, pesquisas voltadas para a maior epidemia em curso nas Américas (o Zika vírus) também estão adotando uma espécie de primata do velho mundo (*Macaca mulata*) como modelo de ensaios imunológicos e até mesmo para o desenvolvimento de vacinas (ABBINK et al., 2016).

Além dos estudos recentes, há pelo menos três décadas, as pesquisas com espécies de primatas neotropicais vêm se desenvolvendo, principalmente com o enfoque na resposta imunológica dos símios a infecções virais (NEUBAUER et al., 1983; WARD et al., 1987; ABBINK et al., 2016), parasitárias (SIDDIQUI et al., 1977), neoplasias (PILLOZI et al., 1998; ZILOTTO et al., 2013) com o objetivo final de contribuir para o conhecimento da espécie humana.

A exemplo de estudos como o de Albert et al. (1996), com primatas desafiados imunologicamente com aplicações de *Escherichia coli*, mostram que indivíduos do mesmo Gênero (*Aotus*) podem possuir diferentes quantidades de precursores e quimiotáticos para eosinófilos. Afirmam ainda que a eosinopoiese acentuada de uma espécie pode estar associada à depressão da cinética de recrutamento, em resposta a um agente infeccioso.

Segundo Weiser (2007), a inflamação de superfícies epiteliais ricas em mastócitos, tais como a pele (a exemplo da dermatite alérgica à picada de pulga), sistema respiratório e trato gastrintestinal pode estar associada à eosinofilia, especialmente quando houver um componente de hipersensibilidade. Uma única amostragem não é capaz de refletir ou deduzir aumento e diminuição de uma série leucocitária (WINTROBE, 1961), mas a detecção dos valores estatisticamente superiores pode representar um ponto de partida para a compreensão da resposta eosinofílica da espécie frente a uma infecção parasitária.

Para induzir uma resposta imune adaptativa, as moléculas de antígeno precisam ser quebradas no interior das células e os fragmentos antigênicos gerados devem, então, estar associados aos receptores apresentadores de

antígeno apropriados, os MHC (complexo principal de histocompatibilidade) (TIZARD, 2014). Todos os vertebrados, desde os peixes cartilagosos até os mamíferos, possuem moléculas de histocompatibilidade que são agrupadas no MHC (JONES et al., 1993).

O MHC humano, conhecido como HLA, contém três *loci* de classe Ia – A, B, C – e pelo menos três *loci* funcionais de classe Ib – E, F e G. A maior parte dos primatas do velho mundo possuem todos os *loci*, com exceção do C, enquanto que primatas neotropicais, como o sagui do tufo branco, têm os genes de MHC de classe I mais similares ao HLA-G humano. Devido à perda de diversidade do MHC de classe I nos saguis do tufo branco, pode não ser surpreendente que sejam susceptíveis a infecções virais fatais que não são letais em humanos (BARTON et al., 1984). Em suma, o “polimorfismo do MHC” nas populações configura uma vantagem porque podem responder a mais antígenos, e então são mais adaptados para sobreviver às doenças infecciosas. O aumento da diversidade das moléculas de MHC claramente eleva a diversidade dos peptídeos aos quais poderão se ligar e, conseqüentemente, a resistência a infecções (TIZARD, 2014).

Subpopulações de linfócitos T, os quais desempenham um papel importante nos fenômenos imunológicos como efectoras ou como células reguladoras, podem ser distinguidas por diferentes determinantes antigênicos sobre a sua superfície celular, chamados clusters de diferenciação (CD) (BERNARD e BOUMSELL, 1984). De acordo com Lipman et al. (2005), anticorpos reconhecem epítomos de tamanhos variável e podem se ligar usando um ou todos os seus sítios ou regiões determinantes de complementaridade. A ligação de um epítomo ao anticorpo é reversível e depende precisamente da configuração do complexo antígeno-anticorpo.

Estudos com primatas (NOOIJ et al., 1986) caracterizaram o anticorpo RhT3 como sendo um determinante CD3-*like* das células humanas. Neste estudo com macacos rhesus, o desempenho da distribuição e função das células marcadas por este marcador foi acompanhado e concluiu-se fortemente pela homologia entre os clusters.

Sarich e Cronin (1980) apresentaram a árvore evolutiva dos primatas baseada na sequência de proteínas e parentesco antigênico e, discutiram ainda os pontos mais prováveis durante a linha evolutiva de surgimento e

desaparecimento dos epítomos. A partir deste esquema, ficam evidentes as hipóteses de que uma única mutação conduz a perda ou ganho de um epítopo, ou apenas uma alteração conformacional.

Letvin et al. (1983) pontuou que o grau de compartilhamento de antígenos de superfície específicos de das células T entre o homem e as outras espécies de primatas refletiria a distância filogenética entre si. Esses achados trazem questões provocativas em relação ao potencial do uso de anticorpos monoclonais na elucidação do papel estrutural e funcional desta linhagem celular.

Ainda na década de 80, vários estudos translacionais no ramo da imunologia entre o homem e os primatas não humanos foram desenvolvidos. Ellingsworth et al. (1983), Haynes et al. (1982), Letvin et al. (1983) e Schooley et al. (1983) mapearam epítomos de superfície especificamente da linhagem T dos linfócitos, inclusive de diversas espécies neotropicais. Até o momento, os estudos haviam se concentrado no cercopitecideo macaco rhesus, mas a partir destes estudos, outras famílias da Ordem Primates foram exploradas.

Neubauer et al. (1983) realizando estudos com *Aotus trivirgatus* e *Saguinus* spp. experimentalmente infectados pelo *Herpesvirus saimiri* (indutor de linfoma T maligno) registrou diferentes padrões de resposta imunológica. Neste estudo, 25% dos animais infectados desenvolveram infecção crônica e somente uma parte dos animais eram capazes de expressar determinantes antigênicos, outros não. Estes achados induziram os estudos subsequentes ao raciocínio de que o padrão de reatividade de um gênero não serviria para prever a reatividade de outro.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O propósito deste estudo consiste na avaliação clínica e laboratorial de primatas do complexo *Alouatta belzebul* (Linnaeus 1766) no bioma amazônico, a fim de caracterizar parâmetros de higidez para uma população residente às margens do Baixo rio Xingu.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a relação entre os parâmetros biométricos obtidos do animal *in vivo* e as variáveis sexo e idade estimada dos indivíduos;
- Avaliar os parâmetros clínico-patológicos, considerando os fatores: faixa etária, sexo, estado nutricional, estresse e ambiente (margem do rio, sazonalidade e fitofisionomia);
- Caracterizar o perfil imunológico da espécie por meio da técnica de imunofenotipagem e avaliação quantitativa de linfócitos circulantes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Base legal e Normativa

Os primatas utilizados neste estudo foram provenientes das ações de resgate do Projeto de Salvamento e Aproveitamento Científico da Fauna (PSACF) da Usina Hidrelétrica de Belo Monte, durante as etapas de supressão vegetal das áreas destinadas aos Reservatórios. Este projeto é parte integrante do Programa de Conservação da Fauna Terrestre, componente do Plano Básico Ambiental (PBA) do empreendimento, autorizado pela Diretoria de Licenciamento Ambiental do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (DILIC/IBAMA-DF), por meio da Autorização de Captura, Coleta e Transporte de Material Biológico (ACCTMB N° 473/2014_1º Retificação) (Anexo 1).

Este estudo encontra-se amparado ainda, pela “Autorização para Atividades com Finalidade Científica” de número 49643-1 (Anexo 2), por meio do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), Ministério do Meio Ambiente (MMA), prevendo expedições a campo, coleta e transporte de material biológico *in situ*. Além da autorização expedida pelo órgão ambiental competente, este estudo possui aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (nº protocolo 124/2015) (Anexo 3).

4.2. Área de Estudo

O estudo foi realizado na região do Baixo rio Xingu, Amazônia Oriental, entre os municípios de Vitória do Xingu e Altamira, sudoeste do estado do Pará, Brasil. O clima predominante na região é tropical úmido (Am e Aw), segundo a classificação climática de Köppen, com temperatura anual média de 26°C, umidade relativa do ar variando entre 84-86% e uma curta estação seca (verão amazônico) entre os meses de junho a novembro (GOULDING et al., 2003). A fitofisionomia local inclui as classificações de florestas ombrófilas abertas, densas, secundárias tardias, além da vegetação aluvial, diretamente influenciada pelo regime hidrológico do rio Xingu (SALOMÃO et al., 2007).

As covariáveis ambientais “temperatura” (°C), “umidade” (mm) e “precipitação” (%) foram fornecidas pela estação climatológica do empreendimento e Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). A classificação da vegetação foi realizada pela equipe do Projeto de Salvamento e Aproveitamento Científico da Flora e Projeto de Monitoramento de Florestas de Terra Firme da UHE Belo Monte. Cada indivíduo possui um ponto de captura correspondente, devidamente georreferenciado pelo sistema de coordenadas *Universal Transversa de Mercator* (UTM).

4.3. Captura e Triagem dos Espécimes

Duas expedições a campo foram realizadas no ano de 2015 para coleta de material biológico: uma na estação chuvosa (janeiro a abril) e outra contemplando a estação seca (julho) do calendário amazônico. A disponibilidade dos espécimes para o estudo esteve diretamente relacionada com a dinâmica de atividades do resgate de fauna e das atividades de supressão vegetal, que são influenciadas ainda, pelo regime pluvial amazônico. Portanto, os animais amostrados foram os indivíduos que precisavam ser

resgatados impreterivelmente, não sendo possível o afugentamento para remanescentes florestais adjacentes.

A captura dos espécimes de *Alouatta belzebul* foi realizada manualmente, com o auxílio de redes e/ou puçá. Os animais foram acondicionados em caixas de madeira individuais (limpas, escuras e secas), conforme recomendam Kindlovits e Kindlovits, (2009), e transportados por via terrestre ou fluvial até o centro de apoio mais próximo.

Todos os animais deste estudo foram contidos quimicamente, portanto, os resultados apresentados correspondem aos parâmetros de animais clinicamente saudáveis sob o efeito de sedativo e jejum de pelo menos 12 horas, a fim de minimizar alterações bioquímicas das amostras. O protocolo de sedação corresponde à associação do cloridrato de tiletamina + zolazepam (Zoletil®, Virbac – São Paulo, Brasil), na dose de 3,6 mg/kg, conforme as recomendações do fabricante para uma espécie congênere (*Alouatta caraya*) e os relatos de Vilani (2014), Spolti et al. (2013) Flaiban et al. (2008), Olberg (2007), Caulkett e Armeno, (2013) e Agoramoorthy e Rudran, (1994).

A avaliação clínica e morfométrica dos indivíduos baseou-se nos critérios e recomendações do Protocolo para Coleta de Dados sobre Primatas em Unidades de Conservação da Amazônia, (ICMBIO, 2012) e do Guia de Vigilância de Epizootias em Primatas Não Humanos e Entomologia aplicada à Vigilância da Febre Amarela (MS, 2014). Conforme as recomendações dos referidos manuais, o exame clínico consta da observação das cavidades naturais e mucosas aparentes, principalmente a conjuntiva, além da pesquisa de ectoparasitos. A frequência cardíaca, respiratória e a temperatura retal foram monitoradas, inclusive exame da cavidade bucal (com avaliação da dentição), auxiliando assim na estimativa da idade do espécime.

4.4. Colheita e Processamento das Amostras

As amostras de sangue foram colhidas mediante anestesia dos animais e o volume de sangue obtido não ultrapassou a proporção de 1% do peso corpóreo, a fim de minimizar prejuízos hemodinâmicos aos espécimes (SCHALM, 1975; MOORE, 2000).

A venopunção dos animais foi realizada preferencialmente na veia femoral, (CAMPBELL, 2007; SANTOS e CUBAS, 2014), com agulha 25x 7,0mm e seringas com capacidade para 10,0 ml. Outros acessos venosos, tais como veia cefálica, safena lateral e coccígea ventral, foram utilizados apenas quando o animal apresentava desidratação e, por consequência, dificuldade de acesso à veia femoral. O volume de sangue destinado à análise hematológica foi acondicionado em frascos contendo o sal dissódico do ácido etileno-diaminotetracético (EDTA) a 5%, como anticoagulante (FLAIBAN, 2006). As amostras foram processadas imediatamente após a colheita, no Laboratório Multiuso do Centro de Estudos Ambientais (*in loco*).

A contagem global de eritrócitos, leucócitos e plaquetas, os índices hematimétricos e a determinação das proteínas plasmáticas totais foram obtidas manualmente (hemocítmetro e refratômetro), conforme previsto por Campbell e Campbell, (1986); Jain, (1993); Stockham e Scott, (2011). Para fins comparativos, as amostras foram ainda submetidas à contagem por equipamento eletrônico com tecnologia de impedância (ABX Micros 60 Horiba®, ABX SAS - California, USA).

A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em 100 células, em conjunto com a avaliação da morfologia de eritrócitos, leucócitos e plaquetas, em esfregaços sanguíneos preparados *in natura* (SANTOS, 1999; CAMPBELL, 2007; WEISS e WARDROP, 2010). As extensões sanguíneas foram fixadas e coradas com corantes do tipo Romanowski (Wright, Wright-Giemsa, Panótico Rápido®), conforme protocolo de coloração, estabelecido por Schalm (1975).

As amostras destinadas à bioquímica clínica foram colhidas em tubos de ensaio sem adição de anticoagulante, mantidas em repouso por 30 minutos e centrifugadas a 3000 rpm para a separação dos componentes celulares e o soro. A porção líquida da amostra (soro) foi separada com o auxílio de uma pipeta e, logo em seguida, preservada à -18°C e -80°C, até o momento da análise (KANEKO et al., 2008). Os testes bioquímicos foram realizados em equipamento de bioquímica automatizada (Roche®-Cobas Mira Plus) utilizando reagentes comerciais (Ebram ®). Os parâmetros analisados foram os seguintes: AST (aspartato-amino-transferase), ALT (alanina-amino-transferase), FA (fosfatase alcalina), GGT (gama-glutamil-transferase), LDH (lactato-desidrogenase), uréia, creatinina, bilirrubinas, albumina, CK (creatinocinase),

proteína total sérica, colesterol, triglicerídeos, cálcio, fósforo, sódio, potássio, cloretos e magnésio. As amostras foram processadas no Laboratório Clínico Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus Botucatu.

Entre os meses de agosto a outubro de 2014, foram realizados testes preliminares com amostras sanguíneas de primatas congêneres, mantidos em cativeiro no Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Selvagens (CEMPAS), da Unesp, Campus de Botucatu. Cinco bugios-ruivos (*Alouatta guariba clamitans* Cabrera, 1940) foram as unidades amostrais durante a fase teste; com o intuito de padronizar o tipo de lâmina, a técnica de fixação do material citológico, especificidade dos anticorpos, além do tempo de processamento durante cada etapa do processo de marcação celular.

Os espécimes clínicos destinados à imunocitoquímica foram extraídos da mesma alíquota destinada ao hemograma. Duas técnicas foram testadas para preparação do material destinado à imunocitoquímica: a técnica de “homogeneização manual” (Moraes *et al.*, 2009) e a técnica de “squash” do creme leucocitário. A técnica de homogeneização manual consiste em diluir amostra de sangue total (100µl) em 2000µl de Líquido de Türk e centrifugados por cinco minutos a 3000rpm, sendo o sedimento homogeneizado e aspirado em pipetas hematimétricas. O conteúdo aspirado é distribuído em lâminas histológicas, em uma área de formato ovalado, de aproximadamente 2 cm de diâmetro e previamente delimitada com caneta hidrofóbica. O sedimento é homogeneizado nas lâminas aguardando-se a secagem. Ao passo que, a técnica de “squash” do creme leucocitário consiste em distribuir uniformemente o material por meio do deslizamento entre duas lâminas histológicas.

Um microcapilar preenchido com sangue total, centrifugado a 12.000 rpm é quebrado à altura do creme leucocitário e, todo o sobrenadante (plasma + leucócitos) acondicionado em um eppendorf. A este conteúdo foram adicionados 10µL de Líquido de Türk, em seguida homogeneizados, pipetados 1,5µL da solução e por último realizando squash do material aspirado. Nove lâminas histológicas foram confeccionadas pra cada animal. As lâminas foram mantidas no fixador (álcool 95%) por um período máximo de quatro meses após a coleta, até o momento do processamento.

A padronização e realização de todas as técnicas imunocitoquímicas aconteceram no Laboratório de Imunohistoquímica do Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus Botucatu.

Os marcadores utilizados neste estudo foram o anticorpo policlonal anti-CD3 e o monoclonal anti-BSAP PAX5, para detecção de células da linhagem linfóide em amostras humanas. As concentrações testadas, otimizadas e empregadas encontram-se relacionadas no Quadro 01.

A recuperação antigênica foi realizada em banho-maria, a 96°C, com a solução tampão TRIS EDTA (pH=9,0) por 20 minutos. Após o resfriamento à temperatura ambiente (20 minutos), as lâminas foram submetidas à lavagem com água deionizada, repetidamente, por dez vezes. As etapas seguintes foram bloqueio da peroxidase endógena em solução de água oxigenada 3%, por 20 minutos, seguida de lavagem com solução tampão TRIS (pH=7,4); delimitação do material com caneta hidrofóbica; bloqueio dos sítios inespecíficos com Protein Block 3% (Protein Block Serum-Free, Dako, USA) por dez minutos, seguida de lavagem com solução tampão. Um volume de 100µL dos anticorpos primários foi aplicado sobre as lâminas e incubado por 18 horas (*overnight*), à temperatura de 4°C.

Após a incubação do anticorpo primário, o material foi submetido a um banho de TRIS (pH=7,4), e, posteriormente incubado com o anticorpo secundário HistoFine® (Nichirei Bioscience, Japão) por 30 minutos, conforme instrução do fabricante. Uma nova lavagem com TRIS (pH=7,4) foi realizada, seguida de revelação com o cromógeno DAB (3,3'-diaminobenzidina Liquid Dab Chromogen®, Dako, USA) por três minutos e novamente lavagem com solução tampão TRIS (pH=7,4).

As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris por três minutos, com lavagem em água corrente por cinco minutos. Por último, o material foi submetido à desidratação com banhos de álcool (três minutos em cubas de álcool 85%,95%, absoluto I, II, III, xilol I, II e III) e montados com lamínulas, utilizando-se resina sintética (Permount®, Fischer Scientific).

Lâminas contendo cortes histológicos de linfonodo canino foram as amostras controle-positivo das reações imunocitoquímicas, uma vez que a espécie possui antígenos na superfície dos linfócitos sabidamente reativos aos

anticorpos testados (JONES et al., 1993). Para a quantificação das células linfóides marcadas para anti-CD3 e anti-BSAP PAX5 utilizou-se microscópio óptico ligado a um equipamento de análise morfométrica de imagem (Optikam Pro HDMI, Optika, Italy).

QUADRO 1 - Anticorpos utilizados para a técnica de Imunocitoquímica

Anticorpo Primário	Diluição	Especificidade	Visualização	Fabricante
Polyclonal Rabbit, anti-human CD3	1:100	Pan T	Citoplasmática	Dako, USA
Monoclonal Mouse, anti-human, B-Cell-Specific-Activator-Protein, Clone Dak-PAX5	1:1000	Pan B	Nuclear	Dako, USA

Para a quantificação dos linfócitos marcados foi adaptado o procedimento de contagem diferencial de leucócitos descrito por Kimura et al. (1999) e Moraes et al. (2009). De um total de 100 linfócitos (marcados e não marcados), foi considerado apenas o efetivo de células marcadas, determinando-se os percentuais de linfócitos T e B. Estes foram transformados em valores absolutos, em relação ao número de linfócitos absolutos totais obtidos na contagem diferencial de leucócitos, conforme preconizado por Ayoub e Yang (1996).

4.5. Análise Estatística

A normalidade das variáveis foi testada pelo teste de D'Agostino-Pearson e o valor $p \leq 0,05$ foi considerado indicativo de uma distribuição normal. Os parâmetros da espécie foram expressos em seus valores médios, a mediana da distribuição, o desvio padrão, bem como o respectivo erro padrão da média. Adicionalmente, a amplitude de variação entre os limites superior e inferior da distribuição de dados, com intervalo de confiança de 95% e nível de significância (alfa) 5%.

As variáveis com distribuição normal tiveram suas médias comparadas pelo teste *t-Student* para amostras independentes. Para as variáveis com

distribuição não paramétrica foi utilizado teste robusto de Mann-Whitney, considerando significantes os valores $p \leq 0,05$.

A hipótese nula deste estudo foi a de que não existe diferença entre os parâmetros clínicos, morfométricos, hematológicos, bioquímicos e imunocitoquímicos nas diferentes estações do ano (temperatura, umidade e precipitação), entre os locais de captura (margem do rio, fitofisionomia), quando estratificados quanto ao sexo e idade estimada. Apesar do pressuposto inicial, vale destacar que este estudo tem um caráter descritivo-exploratório, devido à amostragem não probabilística por acessibilidade dos dados (LEVY e LEMESHOW, 1980; MAROTTI, 2008). Todos os dados foram analisados usando *Graph Pad Prism 5.01* (Graph Pad Software Inc., San Diego, USA).

5. RESULTADOS

5.1. Sucesso de Captura

A primeira expedição a campo iniciou-se no mês de janeiro, se estendendo até meados do mês de abril e, a segunda campanha totalmente concluída no mês de julho de 2015. Durante a primeira campanha, as chuvas intensas típicas do período retardaram o processo de supressão vegetal e, conseqüentemente, as ações de resgate. O objetivo desse intervalo entre coletas foi obter amostras sazonal e espacialmente distintas, já que o cronograma de supressão vegetal avançava com o passar dos meses.

De acordo o cronograma do Projeto de Desmatamento do Plano Básico Ambiental do empreendimento, a supressão da vegetação da área destinada aos Reservatórios Principal e Intermediário se encerraria em dezembro de 2015, sendo suprimidos 13.632,32 hectares de cobertura vegetal (entre florestas aluviais, ombrófilas abertas com cipó, ombrófilas abertas com palmeiras, vegetações secundárias e pastagem). Estas operações de supressão vegetal aconteceram simultânea e cooperativamente com as ações de resgate de fauna, priorizando o afugentamento da fauna para os fragmentos florestais adjacentes.

Os animais, portanto, foram capturados nas frentes de supressão vegetal pelas equipes de salvamento de fauna, devidamente capacitadas e designadas a executar ações de manejo com animais selvagens. A movimentação das máquinas, o avanço das atividades de broque manual e mecanizado promove o afugentamento e/ou o isolamento de grupos de primatas nas porções mais altas de árvores remanescentes. Nesse momento, os primatas se lançam das árvores prestes a serem derrubadas, em direção ao solo, descem ou caem junto às árvores. Os materiais e equipamentos utilizados na contenção física dos primatas correspondem aos petrechos previstos na autorização de captura, além de obedecer aos princípios básicos de segurança do espécime manejado e de seu manipulador (VERONA e PISSINATI, 2014).

Ao final de duas expedições a campo, 27 indivíduos foram capturados (11 machos, 16 fêmeas, 18 adultos e nove jovens) pelas equipes de salvamento de fauna e apresentavam condições de ser amostrados sem prejuízos à sua condição clínica e soltura posterior. Os primatas saudáveis que necessitaram de ações de manejo em cativeiro para realização de biometria, marcação, translocação ou outra atividade relacionada ao aproveitamento científico, foram as unidades amostrais deste estudo; evitando assim, manipulações adicionais dos espécimes. Animais com suspeita clínica ou sinais de traumatismo craniano, hemorragia interna e filhotes foram poupados da pesquisa.

A Figura 1 demonstra a amplitude das variáveis meteorológicas da região nas diferentes estações do ano. Conforme previsto pela classificação de Köppen, a área amostral registrou temperatura média anual de 26,8°C e umidade relativa do ar de 87,6%, com diferenças significativas entre verão (28°C) e inverno (25,6°C) ($p < 0,03$).

Os locais de captura dos espécimes contemplaram apenas Florestas Ombrófilas Densas Aluviais (FODA), Florestas Ombrófilas Abertas com Cipó (FOAC), dispostas na margem esquerda e ilhas do Baixo rio Xingu. Um percentual de 81,48% dos primatas (22 indivíduos) foi proveniente de ilhas, com fitofisionomia do tipo “FODA” e apenas cinco indivíduos foram provenientes da margem esquerda do rio (terra firme), com a vegetação do tipo Floresta Ombrófila Aberta com Cipós (FOAC) (**Quadro 1**). A heterogeneidade das amostras por ambiente inviabilizou a comparação espacial entre os grupos,

permitindo apenas a comparação sazonal (14 espécimes no verão e 13 espécimes no inverno) (Figura 2).

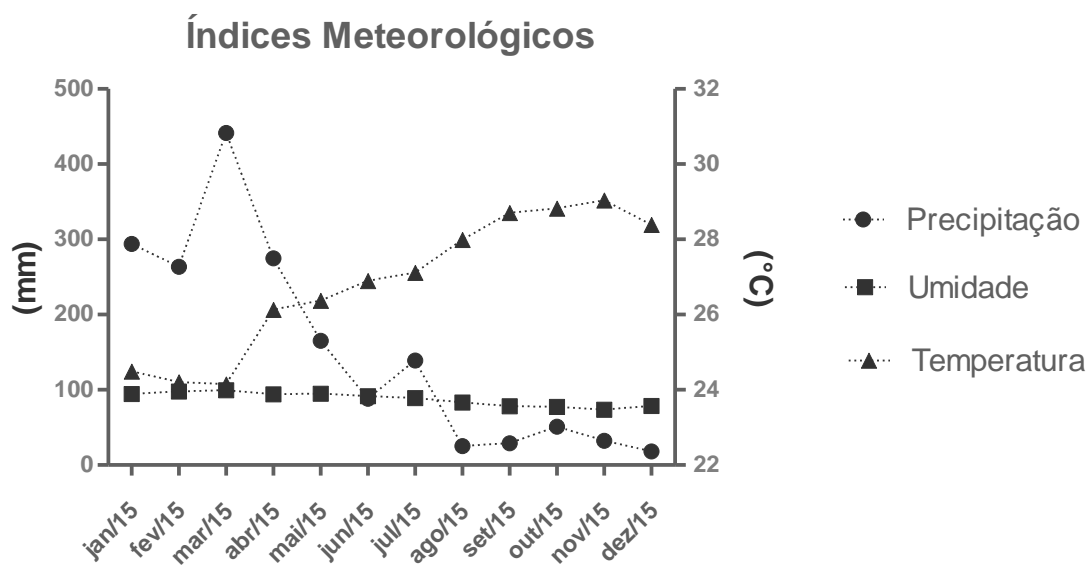


FIGURA 1 - Amplitude térmica e pluviométrica do ano de 2015 para a área amostral.

QUADRO 2 - Total estratificado de animais capturados e sua localidade em coordenada UTM.

	Identificação	Idade Estimada	Sexo	E	N	Fitofisionomia	Local
Verão	CD 436	Adulto	Macho	397542	9622005	FODA	Ilha Pimental
	CD 433	Jovem	Macho	397542	9622005	FODA	Ilha Pimental
	CD 434	Jovem	Fêmea	397542	9622005	FODA	Ilha Pimental
	CD 437	Adulto	Fêmea	397542	9622005	FODA	Ilha Pimental
	CD 435	Adulto	Fêmea	397542	9622005	FODA	Ilha Pimental
	DE012	Jovem	Macho	396875	9622500	FODA	Ilha Pimental
	DE010	Jovem	Fêmea	396875	9622500	FODA	Ilha Pimental
	DE011	Adulto	Fêmea	396875	9622500	FODA	Ilha Pimental
	NG39	Adulto	Macho	397125	9622100	FODA	Ilha Pimental
	AC10508	Adulto	Macho	414625	9644101	FOAC	Margem Esquerda
	BR5610	Adulto	Fêmea	416876	9639102	FOAC	Margem Esquerda
	BR5607	Jovem	Macho	416876	9639102	FOAC	Margem Esquerda
	BR5608	Adulto	Macho	416876	9639102	FOAC	Margem Esquerda
	BR5609	Adulto	Macho	416876	9639102	FOAC	Margem Esquerda
Inverno	NG1492	Adulto	Macho	395854	9620715	FODA	Ilha do Meio
	RH1158	Jovem	Fêmea	386120	9626897	FODA	Ilha Grande
	NG1506	Adulto	Macho	395854	9620715	FODA	Ilha do Meio
	CX03	Adulto	Fêmea	397015	9623277	FODA	Ilha 49
	CX23	Adulto	Fêmea	396694	9623241	FODA	Ilha da Maravilha
	NG1522	Adulto	Fêmea	396694	9623241	FODA	Ilha da Maravilha
	NG1521	Adulto	Fêmea	396694	9623241	FODA	Ilha da Maravilha
	CX29	Jovem	Fêmea	396694	9623241	FODA	Ilha da Maravilha
	CX25	Jovem	Fêmea	396694	9623241	FODA	Ilha da Maravilha
	NG1520	Adulto	Macho	396694	9623241	FODA	Ilha da Maravilha
	CX24	Jovem	Fêmea	396694	9623241	FODA	Ilha da Maravilha
	NG1588	Adulto	Fêmea	397376	9623177	FODA	Ilha do Meio
NG1589	Adulto	Fêmea	397376	9623177	FODA	Ilha do Meio	

FODA - Floresta Ombrófila Densa Aluvial; FOAC - Floresta Ombrófila Aberta com Cipós; E - Coordenada UTM (Leste); N - Coordenada UTM (Norte)

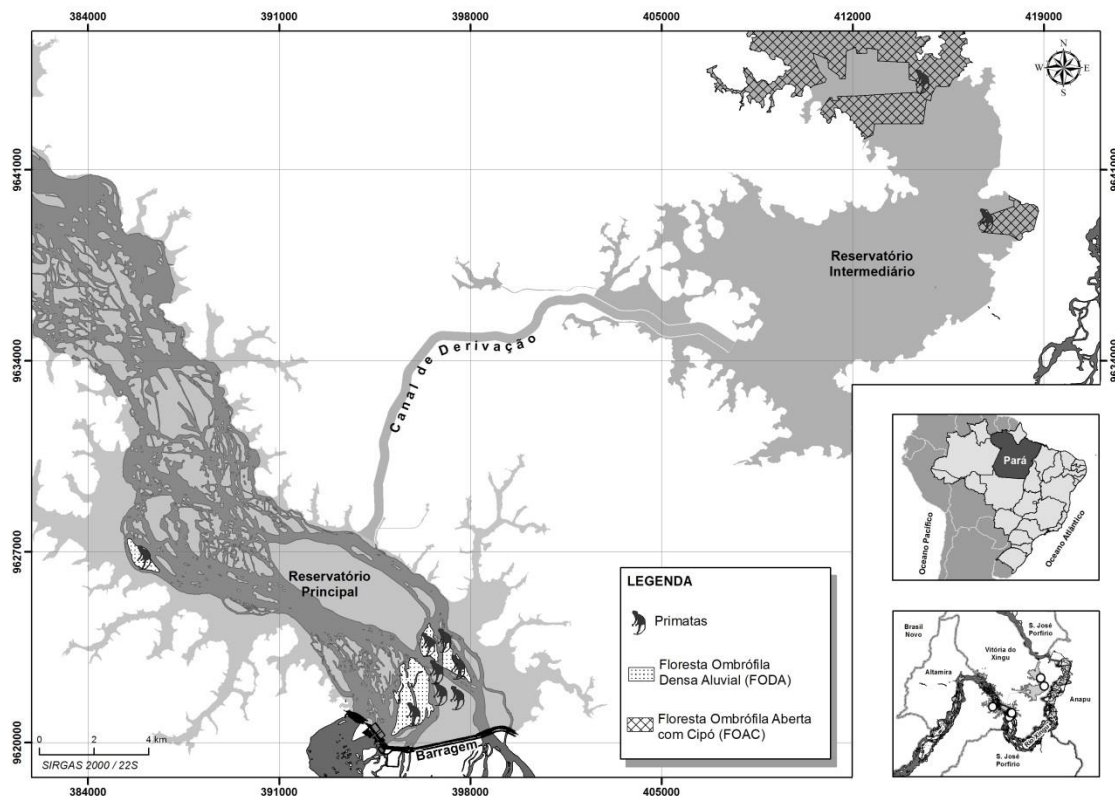


FIGURA 2 - Mapa da área amostral com os respectivos pontos de captura: ilha e continente na região da Volta Grande do rio Xingu.

5.2. Exame Clínico

Os animais capturados foram encaminhados à Base de Resgate de Fauna para reabilitação ou reintegração em ambiente natural. Estes animais permaneceram em cativeiro o menor tempo possível, apenas o tempo suficiente para recuperação do seu *status* clínico ou para a aproximação de outros indivíduos, visando à soltura de uma unidade social.

Os animais chegavam ao centro de apoio ao entardecer e somente foram anestesiados no dia seguinte, pela manhã, o que garantia que os animais tinham um período de jejum de pelo menos 12 horas. Recém-chegados à unidade de tratamento os primatas foram, portanto, submetidos à contenção química com auxílio de uma prensa - onde são aprisionados contra o fundo da caixa de madeira - permitindo assim, a aplicação direta do fármaco pela via intramuscular. Em média, sete minutos após a aplicação do fármaco, os animais já apresentavam relaxamento muscular e assim permaneciam por

um período médio de 48 minutos. As frequências cardíaca e respiratória durante o procedimento foram em média 138 batimentos/minuto e 24 movimentos respiratórios/minuto (Tabela 1). A temperatura corporal durante do procedimento variou significativamente entre adultos e jovens, de modo que os jovens apresentaram temperatura retal média superior à dos adultos.

TABELA 1 - Parâmetros vitais apresentados em média, os valores máximo e mínimo de variação durante a sedação.

	Frequência Cardíaca (bpm)	Frequência Respiratória (mpm)	Temperatura (°C)
Adultos	137,4 (119,6 - 155,3)	24,2 (20,4 - 28)	37 (36,4 - 37,6)
Jovens	139,6 (121,6 - 157,5)	24,8 (20,3 - 29,4)	38,2 (37,7 - 38,6)
	<i>p=0,86</i>	<i>p=0,82</i>	<i>p=0,005*</i>
Machos	137,6 (117,9 - 157,3)	22,8 (17,9 - 27,6)	37,5 (36,9 - 38,1)
Fêmeas	138,5 (120,6 - 156,4)	25,5 (21,8 - 29,1)	36,8 (36,1 - 37,5)
	<i>p=0,94</i>	<i>p=0,18</i>	<i>p=0,13</i>

bpm - Batimentos por minuto; mpm - Movimentos por minuto. Valores máximo e mínimo, considerando intervalo de confiança de 95% e nível de significância (alfa) 5%; *Diferença significativa entre as médias ($p > 0,05$) (Teste de T para amostras normalmente distribuídas e Mann-Whitney para as variáveis com distribuição não-paramétrica).

Os animais foram analisados de modo compartimentalizado (por sistemas), para composição de um exame clínico geral: sistema tegumentar, respiratório, cardiovascular e linfático, sistema alimentar, geniturinário, musculoesquelético, nervoso e visual, conforme as recomendações de Radostits et al. (2002).

Não foram detectadas anormalidades no sistema nervoso dos primatas examinados. Todos os animais apresentavam comportamento classificado como “atento”. Esta denominação se deu porque os animais foram submetidos a uma condição de estresse agudo (encurralamento e captura) e, ainda sim, apresentavam-se vigilantes e responsivos a qualquer estímulo visual ou auditivo que pudesse ser interpretado como “ameaça”. Mesmo com a possibilidade de haver traumatismos cranianos, em decorrência da queda das árvores ou sinais de acometimento do sistema nervoso central, nem um sinal patognomônico foi detectado clinicamente.

A inspeção do trato respiratório foi realizada com o auxílio de um estetoscópio avaliando a frequência, o ritmo, o tipo a profundidade e a simetria

da inspiração e expiração, além de quaisquer ruídos associados à respiração. Todavia, não foram detectadas anormalidades no trato superior (cavidade nasal e nasofaringe), nem inferior (brônquios, traqueia, pulmões, a pleura, espaço pleural, o diafragma e a parede do tórax) dos animais avaliados.

A avaliação do sistema cardiovascular dos espécimes consistiu na verificação das mucosas aparentes, tais como conjuntiva, cavidade nasal, oral, vulva e prepúcio, além do coração. O exame visual, seguido da compressão digital das mucosas, objetivou detectar anormalidades de coloração que pudessem indicar anemia, choque hipovolêmico (palidez) ou mesmo desidratação (ressecadas ou ligeiramente esbranquiçadas). A avaliação do estado de desidratação foi realizada por inspeção e palpação da pele, além do exame dos olhos. Animais “desidratados” foram aqueles que possuíam tempo de preenchimento capilar superior a dois segundos, afundamento do globo ocular e/ou quando a pele permanecia levantada por mais de três segundos, após ser beliscada. A auscultação cardíaca não revelou alterações no ritmo e frequência dos batimentos do coração.

O exame físico das órbitas e da cavidade auricular não apontou nenhum sinal clínico sugestivo de doença ocular, tais como alterações morfológicas, secreções ou quaisquer lesões ulcerativas.

O trato geniturinário inferior foi avaliado com base na observação das mucosas genitais aparentes, quanto à sua coloração, morfologia e palpação das estruturas correspondentes. Momentos antes da contenção química, alguns animais urinavam na caixa de madeira, mas ambos apresentavam urina de coloração transparente e odor *sui generis*. À palpação e auscultação da região abdominal e glândulas mamárias, foi possível obter o diagnóstico de gestação em estágio avançado de duas fêmeas. A repleção e presença do leite nas glândulas mamárias de duas fêmeas, palpação externa pela região abdominal, atrelada à auscultação dos batimentos cardíacos do feto, permitiu o diagnóstico clínico de prenhez. O exame clínico da genitália masculina (prepúcio e testículos) não apontou nenhuma anormalidade associada à doença.

Uma fratura exposta de tíbia e uma fratura de dois dentes incisivos foram as únicas alterações encontradas ao exame físico osteoarticular do sistema musculoesquelético. Em apenas dois casos foi possível detectar

emaciação muscular, associada ao histórico de permanência prolongada em local com baixa disponibilidade de alimento (ilhas recém-desmatadas).

O sistema tegumentar dos indivíduos foi avaliado por meio de exame visual e palpação da epiderme e suas estruturas anexas. Diversas escoriações cutâneas foram detectadas, porém sem nenhuma associação clínica direta ou histórico de doença, apenas em decorrência de autotraumatismo (escaras de decúbito).

O exame da cavidade oral (oclusão, odor, superfície labial, dentes, gengiva) e a palpação das demais estruturas do trato digestório (esôfago, estômago, intestino, fígado, baço e pâncreas) não revelou associações clínicas patognomônicas. O desgaste maior dos dentes incisivos superiores e inferiores, retração de gengiva, além de algumas microfraturas dentais foram mais marcantes ao exame odontológico nos indivíduos adultos, em relação aos jovens. Observou-se ainda que todos os animais defecaram na caixa de contenção, nos instantes que precederam a contenção química. Em todos os casos, a defecação esteve associada à emissão de vocalização agonística, acompanhada de esforço físico intenso, por manifestarem-se relutantes ao procedimento clínico. As fezes de coloração verde escura, com aspecto pastoso apresentaram-se típicas e compatíveis com o bolo fecal de uma espécie monogástrica com hábitos alimentares folívoros e frugívoros.

Os macacos atelídeos também foram classificados quanto ao seu escore corporal, extrapolando-se os critérios adotados para outras espécies de animais domésticos (RADOSTITS et al., 2002),. Com base no exame físico e palpação das estruturas musculares, os animais foram classificados em: “baixo escore” quando apresentavam ossos proeminentes e/ou pouca musculatura esquelética de revestimento e como “escore ideal” os animais que não apresentavam tais características. Dos 27 primatas examinados, apenas cinco apresentaram “baixo escore” corporal. Este achado pode ser associado ao estado recente do local de captura, onde havia pouca disponibilidade de alimento, em decorrência do desmatamento.

Um total de 48,15% dos animais (13/27) apresentavam infestação de piolhos na região gular, axila, região inguinal e membros; em alguns casos registrada a presença concomitante de miíase. Dos 13 animais com infestação parasitária, apenas cinco indivíduos apresentavam “baixo escore” corporal. Os

piolhos e larvas dos animais parasitados foram coletados durante o exame clínico e acondicionados em solução de etanol a 70% para posterior identificação no Laboratório de Enfermidades Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus Jaboticabal. Os espécimes foram identificados em nível específico (piolho *Parapediculus mjoebergi* Ratana-Salazar, 2003 e larva a mosca *Alouattamyia baeri*), com auxílio de microscopia óptica e eletrônica para descrição formal do parasita neste hospedeiro.

Após o reestabelecimento da consciência e recuperação anestésica os animais foram encaminhados para avaliação pré-soltura. As horas mais frescas do dia foram priorizadas para realização da soltura daqueles espécimes aptos à soltura imediata, a fim de minimizar os efeitos nocivos do estresse térmico adaptativo. Os fatores sociais foram ainda ponderados, buscando respeitar ao máximo, a proporção sexual (macho: fêmea), as hierarquias e a presença de filhotes no grupo. A soltura dos guaribas foi realizada pela mesma equipe do resgate de fauna, nas áreas de soltura previamente determinadas e aprovadas pelo órgão ambiental licenciador.

5.3. Aspecto Morfométricos

Com relação aos aspectos morfométricos, foram realizadas mensurações das estruturas anatômicas listadas no Protocolo para Coleta de Dados sobre Primatas em Unidades de Conservação da Amazônia, com o intuito de caracterizar morfologicamente a população amostrada. Informações como biometria (peso e medidas corporais), exame da pelagem, estado reprodutivo (em fêmeas: gestação, lactação, exames de mamilos e genitália; em machos: mensuração dos testículos), dentição (exame odontológico e mensuração) foram obtidas dos animais *in vivo*.

A faixa etária dos 27 indivíduos capturados foi apenas estimada, devido à ausência de protocolos precisos na literatura que contemplassem as medidas morfométricas compatíveis com cada categoria de idade. A classificação adotada enquadra os indivíduos nas categorias convencionais, adultos e jovens, segundo as descrições de Robinson (1988) e Hershchovitz (1977).

Essa estimativa baseou-se na dentição, seja pelo desgaste, ou presença/ausência de alguns dentes, tamanho da genitália e glândulas mamárias (fêmeas) e nos caracteres sexuais secundários masculinos, como a presença de “barba” bem desenvolvida nos machos adultos.

As medidas biométricas obtidas nos animais *in vivo* correspondem à circunferência do peito (CP), comprimento crânio-caudal (CCC), comprimento da cauda (CCA), mão direita (MD), pé direito (PD), orelha direita (OD), comprimento do pescoço (PC) e peso (P), e são apresentadas na Tabela 2. Admitiu-se que: “comprimento crânio-caudal”, refere-se à menor distância desde a extremidade superior dos ossos parietais, no crânio, até a base da cauda; “comprimento da cauda” refere-se a menor distância entre a base da cauda e sua extremidade distal, desconsiderando os pelos; padronizou-se apenas um lado para medidas de orelhas, mãos e pés, além do peso (massa corporal) em “gramas”.

TABELA 2 - Parâmetros biométricos estratificados de *Alouatta belzebul*

Índices (unidade)	Adulto (n=18)	Jovem (n=9)	Valor "p"	Macho (n=11)	Fêmea (n=16)	Valor "p"
	Valores Médios			Valores Médios		
CP (mm)	308,3	264,4	<0,001*	306,3	285	0,07
CCC (mm)	406,6	350,5	0,002*	417,2	367,8	0,005*
CCA (mm)	595,2	541,1	0,02*	601,8	560,3	0,056
MD (mm)	94,7	73,8	<0,005*	101,3	78,5	<0,0001*
PD (mm)	115,5	99	0,01*	124,9	99,7	0,0002*
OD (mm)	34,2	31,04	0,03*	34,8	32	0,04*
PC (mm)	19,9	17,35	0,31	23,35	16,1	0,001*
P (g)	4.400	2.900	0,0006*	4.700	3.400	0,003*

CP - Circunferência do Peito; CCC - Comprimento Cranio-Caudal; CCA - Comprimento da Cauda; MD - Mão Direita; PD - Pé Direito; OD - Orelha Direita; PC - Pescoço; P - Peso; *Diferença significativa entre as médias ($p > 0,05$) (Teste de *T* para amostras com distribuição normal e Mann-Whitney para as variáveis com distribuição não-paramétrica).

O peso dos espécimes foi significativamente diferente quando comparados os sexos e faixa etária. O peso das fêmeas foi significativamente menor que dos machos e indivíduos jovens estatisticamente mais leves que os adultos. O único parâmetro que não registrou diferenças consistentes entre jovens e adultos foi “PC” (comprimento do pescoço), enquanto que todas as

demais variáveis biométricas apontaram claras diferenças etárias. Quando agrupados quanto ao sexo, a média dos valores de “CP” e “CCA” para fêmeas não foi significativamente distinta dos machos.

O estado reprodutivo dos espécimes foi verificado através do exame clínico externo das genitálias masculina e feminina. Ao todo foram capturadas três fêmeas prenhes, uma no verão e duas no inverno, na segunda campanha de campo. Ambas apresentavam distensão dos mamilos, presença de leite na glândula, intumescimento de genitália e abdome dilatado pela presença do feto. O número de machos capturados por faixa etária (três jovens e nove adultos) não foi grande e uniforme o suficiente para realizar comparações estatísticas sobre a morfologia dos testículos (comprimento e largura).

Os padrões de pelagem dos primatas capturados neste estudo correspondem aos padrões e suas variações descritas para os espécimes do grupo politípico “*belzebu*”. Machos e fêmeas apresentaram pelagem negro-brilhante, com as extremidades dos membros anteriores e posteriores, ápice da cauda e uma faixa larga dorsal, que se inicia na nuca até a região lombar, ruiva ou castanho-avermelhada. Os indivíduos jovens não apresentaram exatamente o mesmo padrão ruivo de pelagem predominante, pois pareciam estar em transição para o padrão definitivo.

Porção superior da cabeça e ombros preto acastanhados, muitos pelos da região apresentando a extremidade laranja-avermelhada. Dedos da mão e pés cobertos por uma pelagem longa, em tom vermelho-amarelado. A pelagem ruiva do dorso variou em sua tonalidade e localização. Ora concentrada na região da garupa apresentando coloração forte e brilhante, ora com pelos de cor dourada e com a faixa dorsal mais estreita. A pelagem lateral de todos os indivíduos foi considerada distintamente longa, em relação aos demais pelos do dorso, registrando comprimento médio de 89,72 mm (Figuras 3 - 4).



FIGURA 3 - Fêmeas adultas capturadas na Ilha Pimental (A) e Ilha do Meio (B), respectivamente, apresentando diferentes padrões de pelagem e disposição dos campos cromatogénicos ruivos do dorso.

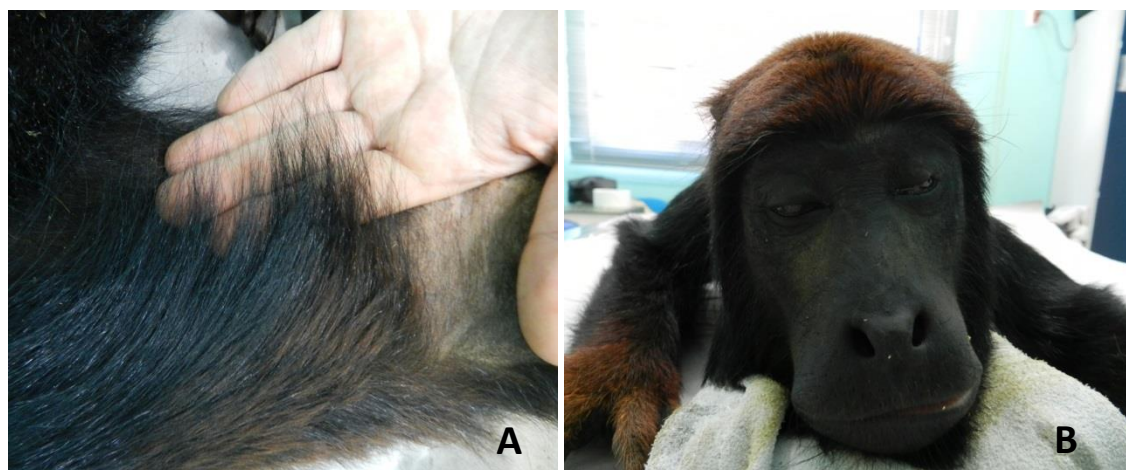


FIGURA 4 - Pelagem lateral distintamente longa (A) e macho adulto apresentando coloração ruiva intensa na região parietal e mãos (B).

5.4. Avaliação hematológica

A avaliação hematológica dos espécimes de *Aloutta belzebul* encontra-se detalhada nas Tabelas 3 e 4, evidenciando os limites máximo e mínimo de cada parâmetro, seus valores médios e o respectivo desvio padrão da média. Os animais foram agrupados conforme a faixa etária e sexo, para melhor compreensão dos demais achados clínico-laboratoriais, adotando o teste estatístico de Mann-Whitney e *T-student* para a análise das variáveis independentes. Quanto à faixa etária, houve diferença estatística apenas no número absoluto de monócitos ($p=0,04$) e quanto ao sexo, houve significância estatística apenas para a contagem de eosinófilos ($p=0,03$).

Além das contagens celulares pelo método manual, as amostras sanguíneas dos espécimes deste estudo foram submetidas à contagem celular automatizada por impedância, para fins comparativos. As contagens diferenciais de leucócitos foram desconsideradas e comparados apenas os parâmetros quantitativos do equipamento ABX Micros 60 (Horiba®, ABX SAS - California, USA).

O valor médio das contagens de eritrócitos pelo método automatizado ($4,22 \times 10^6 \text{ cel}/\mu\text{L}$) foi significativamente superior ao valor médio encontrado na contagem pelo método manual ($3,27 \times 10^6 \text{ cel}/\mu\text{L}$). A contagem global de plaquetas pelo método automatizado foi significativamente menor ($88,69 \times 10^3 \text{ cel}/\mu\text{L}$), quando comparada à contagem manual do mesmo índice ($151,77 \times 10^3 \text{ cel}/\mu\text{L}$). A determinação da hemoglobina (g/dL), do hematócrito (%) e a contagem global de leucócitos ($\times 10^3 \text{ cel}/\mu\text{L}$) não registrou diferença estatística entre os dois métodos.

As Figuras 5 – 13 ilustram os diferentes tipos celulares identificados ao exame do esfregaço sanguíneo, corados com corantes do tipo Romanowski (Panótico Rápido, Wright e Wright-Giemsa).

As hemácias da espécie apresentaram formato disco bicôncavo, coloração eosinofílica, com halo de palidez central visível nas células maduras e coloração levemente basofílica nas células mais jovens. Seis tipos celulares foram identificados no grupo dos leucócitos: neutrófilos segmentados, bastonetes, eosinófilos, monócitos, linfócitos e basófilos.

Monócitos apresentaram núcleo irregular, por vezes indentado, com

cromatina frouxa, apresentando citoplasma abundante azul-acinzentado, podendo conter vacúolos. Linfócitos apresentaram uma discreta variação de tamanho, sendo possível detectar linfócitos pequenos e grandes. Ambos com citoplasma escasso, de coloração basofílica, núcleo mais arredondado e com cromatina mais intensamente condensada.

Dentre os polimorfonucleares, destaque para os neutrófilos maduros que apresentaram, na maioria das vezes, mais que quatro segmentações nucleares. O núcleo dos neutrófilos apresentou-se de coloração basofílica, invariavelmente segmentado e cromatina intensamente condensada; com menor quantidade de segmentos apenas nas células imaturas desta mesma linhagem. O citoplasma geralmente transparente e abundante, com presença de grânulos finos de coloração eosinofílica e/ou basofílica, em quantidade variável nos indivíduos.

Os eosinófilos encontrados apresentaram núcleo pouco segmentado, em relação aos neutrófilos, citoplasma transparente, presença de grânulos grandes, com aspecto arredondado e intensamente eosinofílicos, por vezes sobrepondo o núcleo. E os basófilos, raramente encontrados no esfregaço sanguíneo destes primatas, apresentaram-se com poucas segmentações nucleares e presença marcante de grânulos citoplasmáticos basofílicos.

A comparação dos parâmetros hematológicos entre as espécies do mesmo gênero aponta diferenças mais marcantes apenas entre as espécies brasileiras e as espécies de bugios da América Central, na Guiana Francesa e México (*Alouatta seniculus* e *Alouatta pigra*) (Tabela 5). As populações de vida livre das espécies que habitam as florestas tropicais centroamericanas, apresentam valores de VCM (volume corpuscular médio) e HCM (concentração hemoglobínica média), bastante inferiores às espécies sulamericanas do gênero. Os demais parâmetros não apresentam distribuição paramétrica ou estão intimamente relacionados a fatores individuais.

Uma vez constatado que apenas as contagens de eosinófilos foram influenciadas pelo fator sexo, os indivíduos adultos foram agrupados conforme a estação do ano, para verificação das possíveis alterações sazonais (Tabela 6). Desta forma, a concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM), concentração hemoglobínica média (HCM) estiveram significativamente elevadas na estação chuvosa (inverno amazônico). A terceira variável que sofreu influên-

cia de fatores ambientais foi a concentração das proteínas plasmáticas totais (PT). Durante a estação seca (verão), onde as temperaturas são mais elevadas, os níveis de precipitação diminuem drasticamente (cerca de quatro vezes menor), sua concentração reduz significativamente ($p>0,001$).

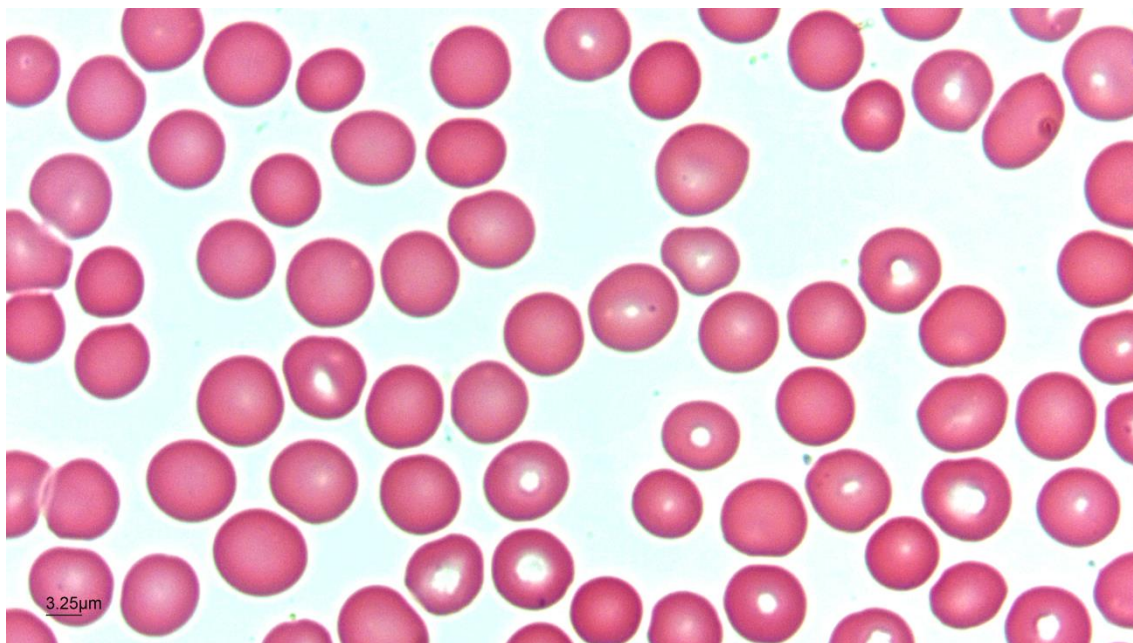


FIGURA 5 - Eritrócitos maduros em esfregaço sanguíneo, aumento 1000x, Wright.

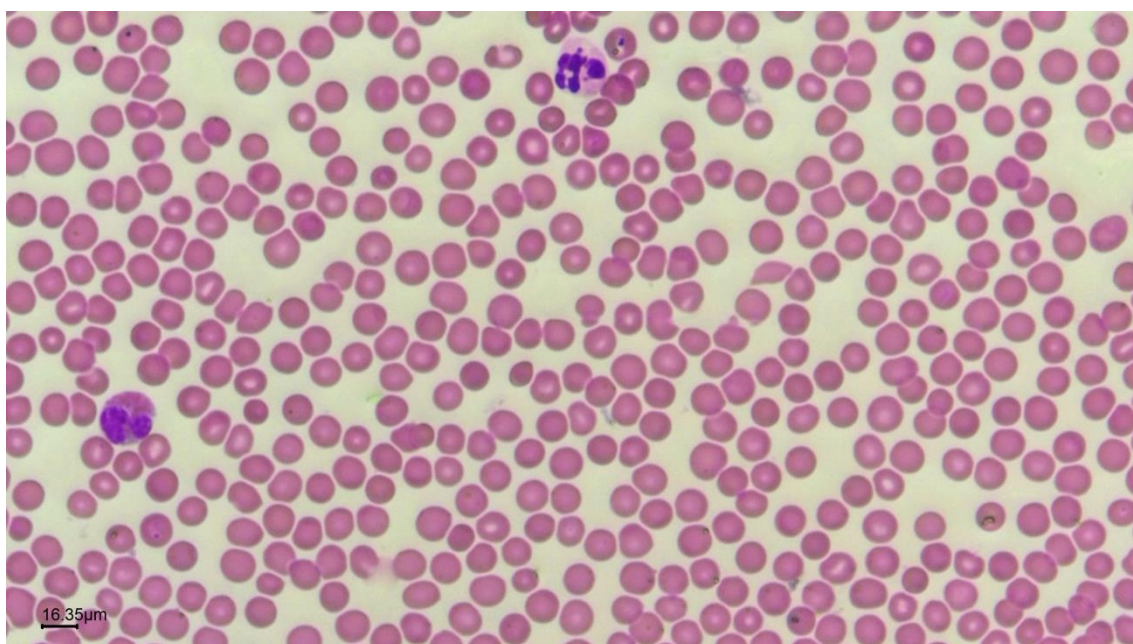


FIGURA 6 – Eosinófilo (à esquerda), neutrófilo segmentado (à direita) em meio a eritrócitos maduros, aumento 400x, Wright-Giemsa.

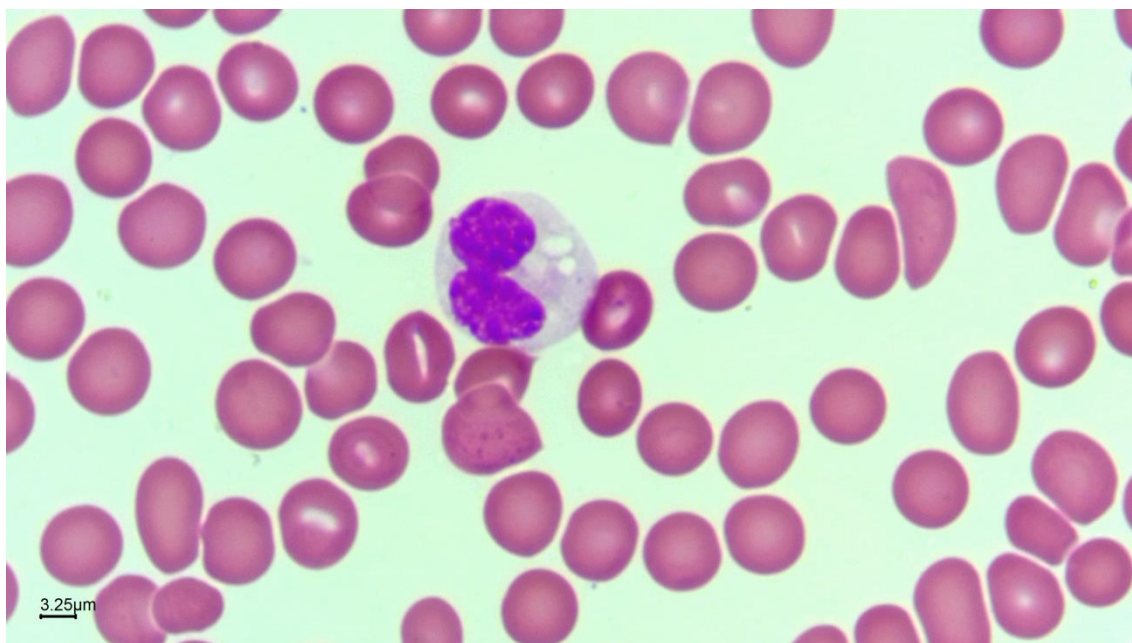


FIGURA 7 - Monócito apresentando núcleo ameboide, citoplasma acinzentado e vacúolos, aumento 1000x, Wright.

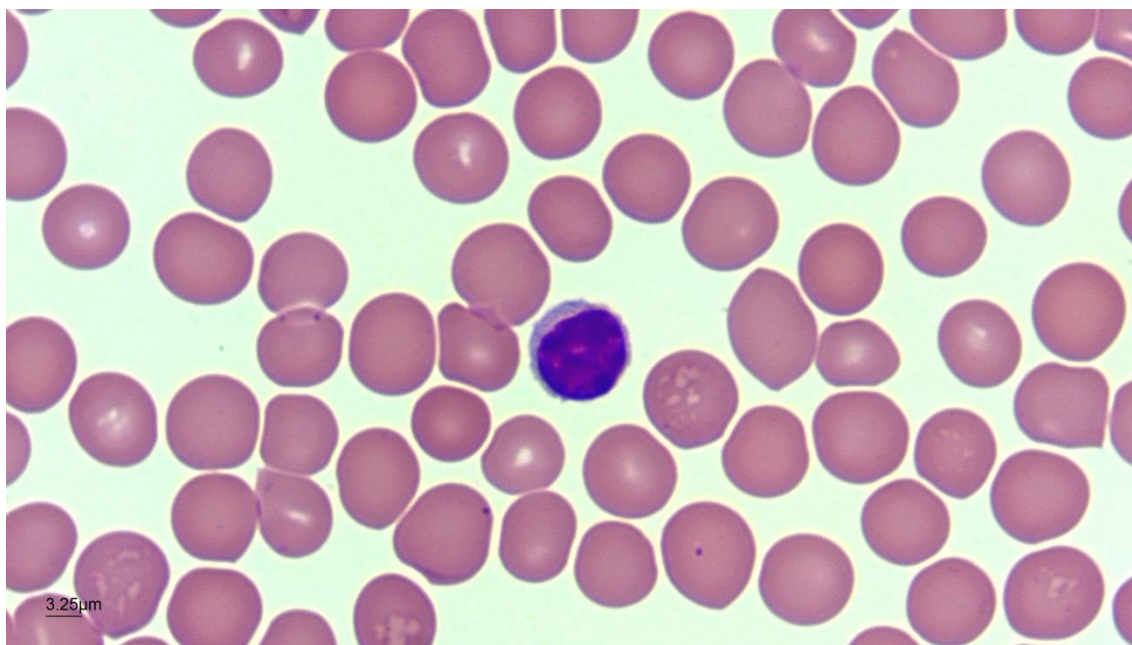


FIGURA 8 - Linfócito pequeno com núcleo arredondado, citoplasma escasso e de coloração basofílica, aumento 1000x, Wright-Giemsa.

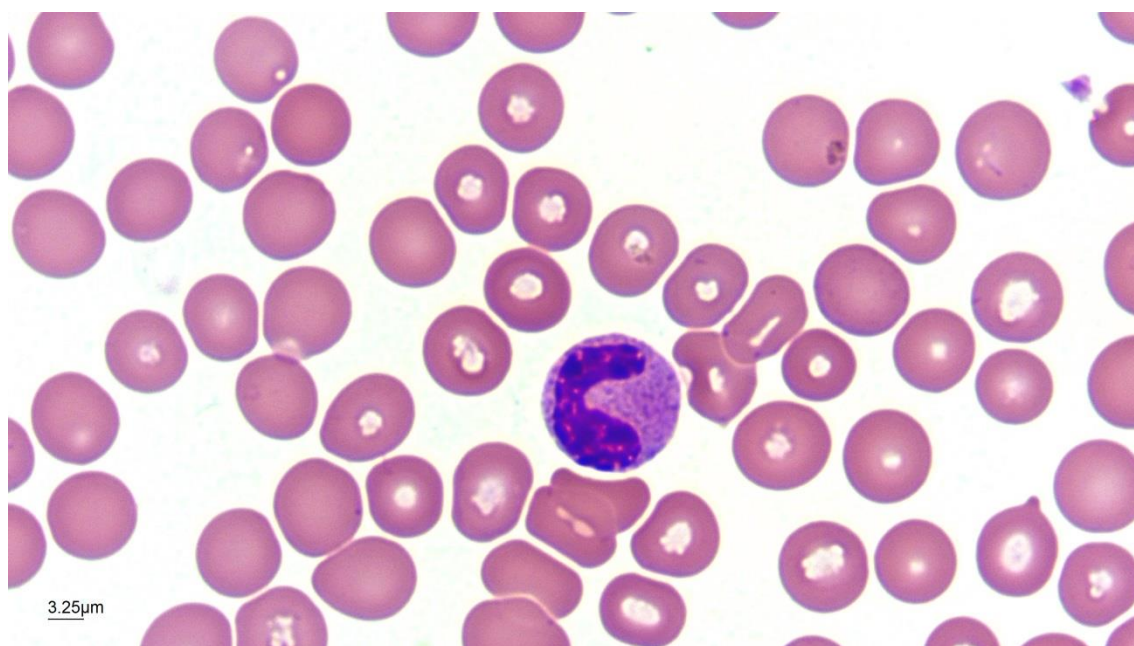


FIGURA 9 - Neutrófilo pouco segmentado, aumento 1000x, Wright-Giemsa.

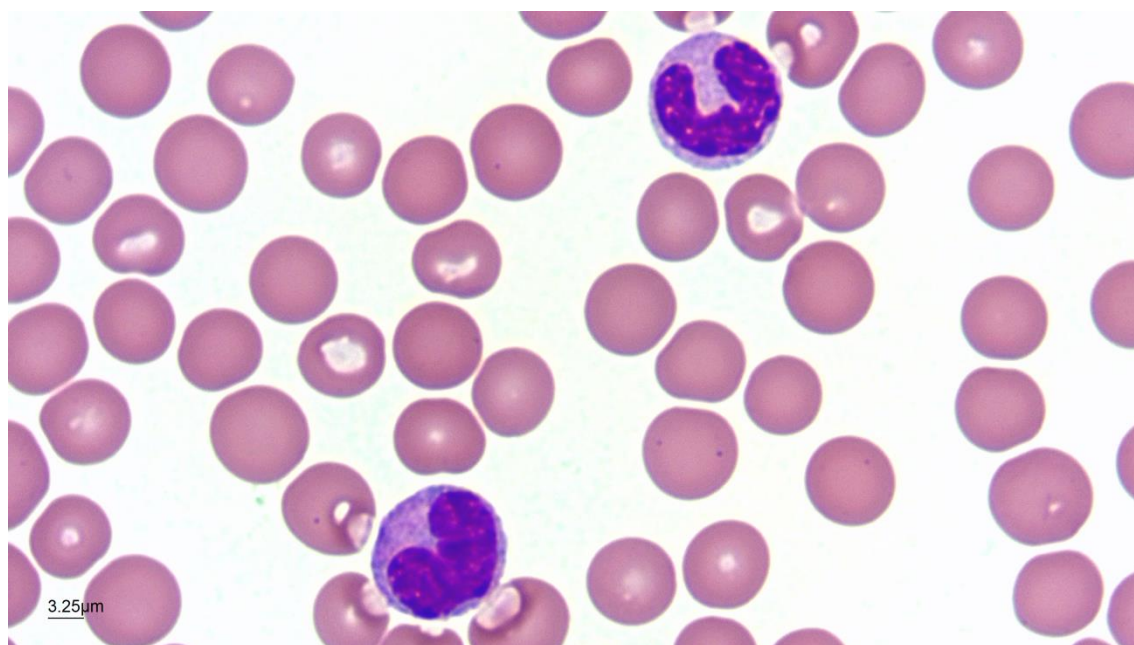


FIGURA 10 - Neutrófilo maduro apresentando hipossegmentação nuclear (acima), citoplasma basofílico e monócito, aumento 1000x, Wright-Giemsa.

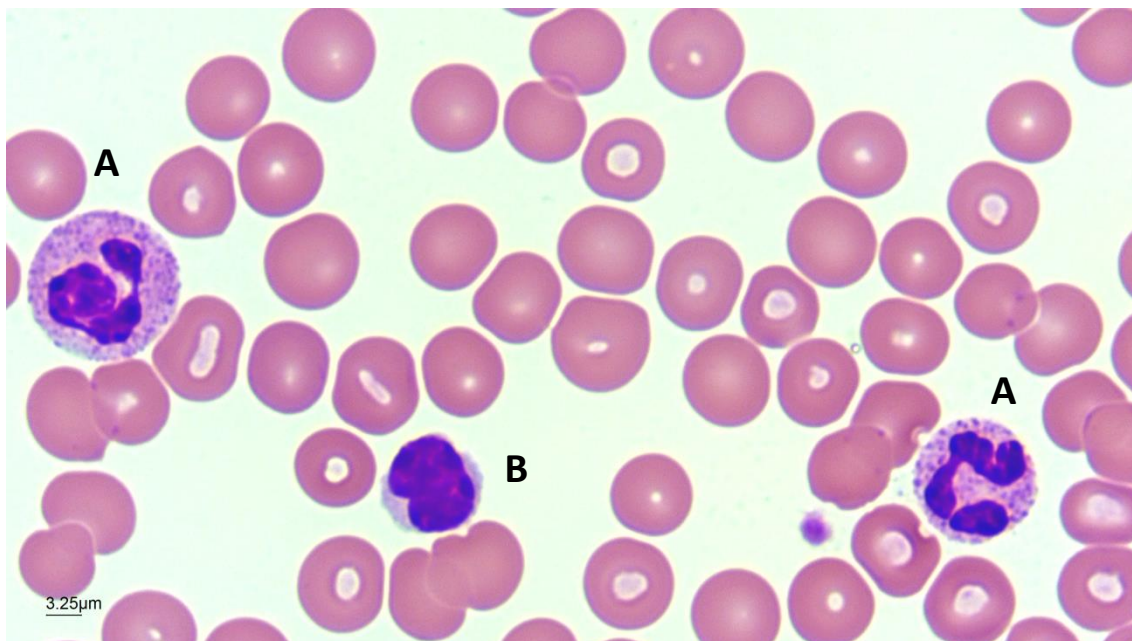


FIGURA 11 – Neutrófilos segmentados (A) com granulação basofílica fina por todo o citoplasma e linfócito típico (B), aumento 1000x, Wright-Giemsa.

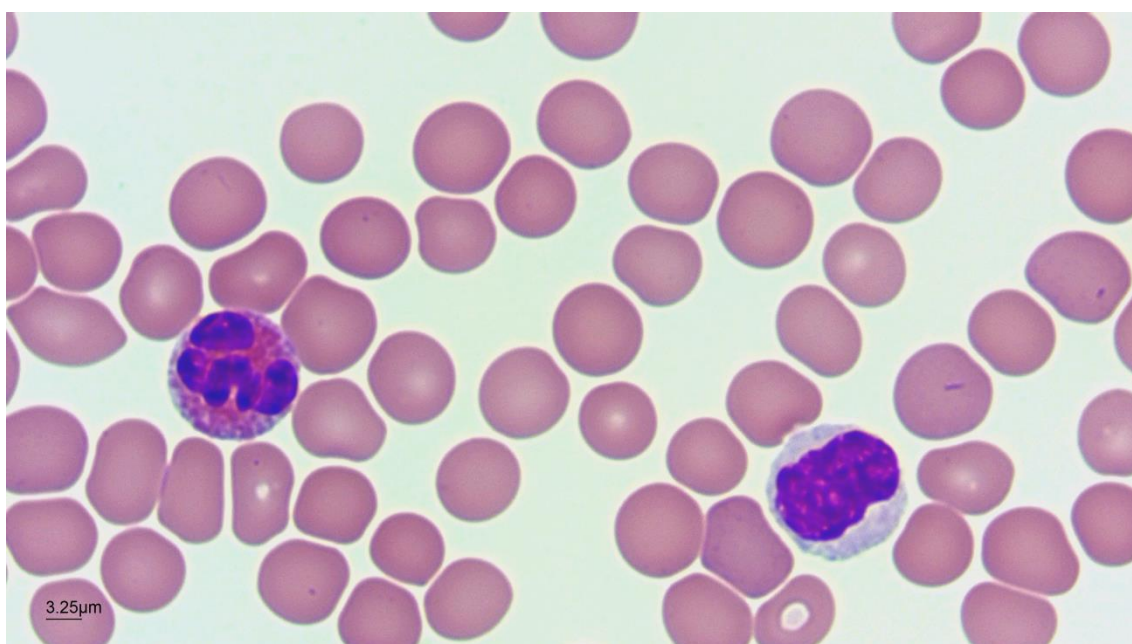


FIGURA 12 – Eosinófilo (à esquerda) apresentando grânulos arredondados, ocupando quase totalmente o citoplasma e linfócito grande (à direita), aumento 1000x, Wright-Giemsa.

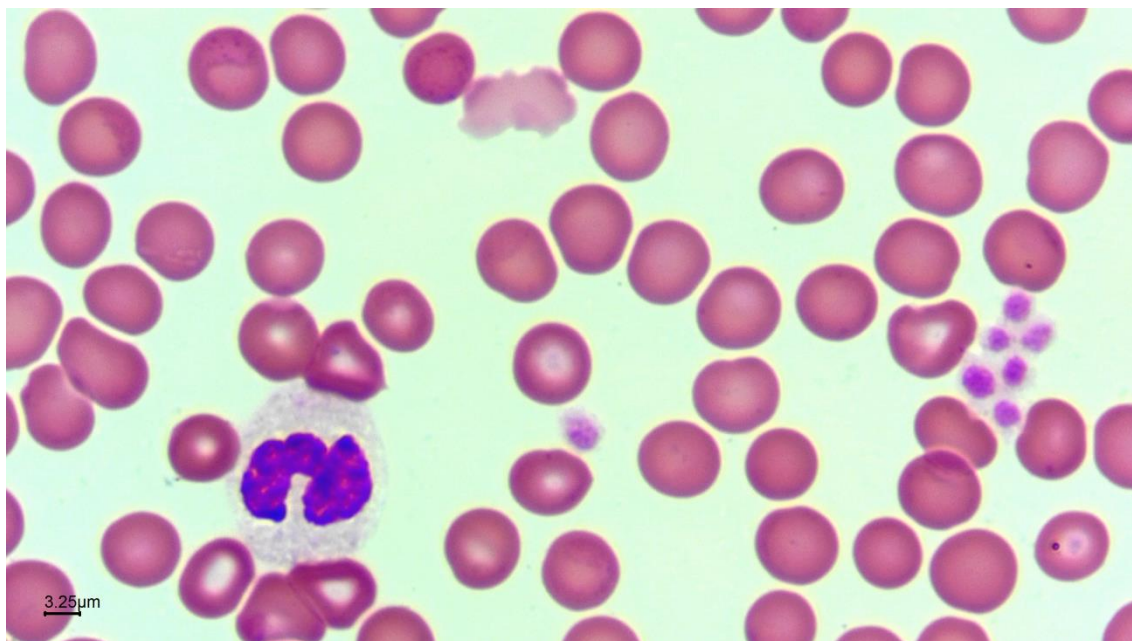


FIGURA 13 - Neutr3f3lo segmentado (3 esquerda) e plaquetas em monocamada, aumento 1000x, Wright-Giemsa.

TABELA 3 - Valores médios (em número absoluto) e desvio padrão das variáveis hematológicas de exemplares da *espécie Alouatta belzebul*, conforme a faixa etária.

ÍNDICES	Adultos (n=18)			Jovens (n=9)			Valor "p"
	Média	Desvio Padrão	Limite Inferior e Superior	Média	Desvio Padrão	Limite Inferior e Superior	
Hemácias (x 10 ⁶ cel/μL)	3,28	0,97	2,79 - 3,76	3,63	0,59	3,18 - 4,08	0,32
Hemoglobina (g/dL)	10,74	1,77	9,85 - 11,62	11,31	0,97	10,56 - 12,06	0,37
Hematócrito (%)	35,94	5,3	33 - 39	37,11	2,47	35 - 39	0,75
VCM (fL)	116	25,13	123,6 - 128,6	104,9	17,5	91,4 - 118,3	0,2
CHCM (g/dL)	29,98	3,13	28,42 - 31,54	30,45	1,42	29,35 - 31,55	0,67
HCM (pg)	34,6	7,06	31,08 - 38,11	32,04	6,09	27,36 - 36,73	0,36
Plaquetas (x 10 ³ cel/μL)	151,7	101	101,54 - 202	166,93	81,37	104,38 - 229,48	0,42
Leucócitos (x 10 ³ cel/μL)	11,13	5,48	8,40 - 13,85	12,68	4,67	9,08 - 16,27	0,32
Bastonetes (cél/μL)	208	156	130,6 - 285,8	312	292,2	87,40 - 536,6	0,23
Segmentados (cél/μL)	7.638	4.107	5.595 - 9.680	8.336	3.356	5.701 - 10.860	0,45
Linfócitos (cél/μL)	2.596	1.481	1.859 - 3.332	2.777	1.643	1.515 - 4.040	0,97
Eosinófilos (cél/μL)	72	141	26 - 142	154	167	25 - 283	0,16
Basófilos (cél/μL)	68	170,1	0,0 - 152	318	505,9	0,0 - 706	0,12
Monócitos (cél/μL)	1.093	2.805	0,0 - 2.488	1.307	1.615	65 - 2.548	0,044*
PT (g/dL)	8,3	0,83	7,8 - 8,71	8,15	0,92	7,44 - 8,86	0,68

VCM: Volume Corpuscular Médio, HCM: Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM: Concentração Hemoglobínica Corpuscular média, PT: Proteína Total plasmática; *Diferença significativa entre as médias (p> 0,05).

TABELA 4 - Valores médios (em número absoluto) e desvio padrão das variáveis hematológicas de exemplares da espécie *Alouatta belzebul*, em função do sexo.

ÍNDICES	Fêmeas (n=16)			Machos (n=11)			Valor "p"
	Média	Desvio Padrão	Limite Inferior e Superior	Média	Desvio padrão	Limite Inferior e Superior	
Hemácias (x 10 ⁶ cel/ μ L)	3,50	0,99	2,97 - 4,03	3,24	0,65	2,80 - 3,68	0,46
Hemoglobina (g/dL)	10,9	1,39	10,16 - 11,64	10,97	1,85	9,72 - 12,22	0,84
Hematócrito (%)	35,38	4,68	32,88 - 37,87	37,73	4,12	34,96 - 40,50	0,07
VCM (fL)	106,7	23,64	94,08 - 119,3	120,6	20,72	106,7 - 134,5	0,12
CHCM (g/dL)	30,94	2,43	29,64 - 32,24	28,97	2,65	27,18 - 30,75	0,05
HCM (pg)	33,09	7,86	28,91 - 37,28	34,69	4,9	31,4 - 37,99	0,55
Plaquetas (x 10 ³ cel/ μ L)	132,4	79,93	89,80 - 175	192,35	104,16	122,37 - 262,32	0,07
Leucócitos (x 10 ³ cel/ μ L)	11,52	4,52	9,11 - 13,94	11,82	6,27	7,60 - 16,03	0,82
Bastonetes (cél/ μ L)	286	251	152 - 420	180	119,9	99 - 260,2	0,31
Segmentados (cél/ μ L)	7.716	3.119	6.054 - 9.378	8.049	4.823	4.809 - 11.289	0,86
Linfócitos (cél/ μ L)	2.499	1.534	1.682 - 3.317	2.885	1.509	1.871 - 3.898	0,42
Eosinófilos (cél/ μ L)	154	175,2	60 - 247	20	50,03	0 - 54	0,02*
Basófilos (cél/ μ L)	172	411	0 - 391	121	190	0 - 248	0,47
Monócitos (cél/ μ L)	1.648	3.094	0 - 3296	461	460	151 - 770	0,09
PT (g/dL)	8,05	0,98	7,53 - 8,58	8,53	0,51	8,19 - 8,88	0,15

VCM: Volume Corpuscular Médio, HCM: Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM: Concentração Hemoglobínica Corpuscular média, PT: Proteína Total Plasmática; *Diferença significativa entre as médias (p > 0,05)

TABELA 5 - Parâmetros hematológicos de *Alouatta belzebul* adultos comparados com espécies congêneres de vida livre.

Índices (unidades)	<i>Alouatta belzebul</i>		<i>A. seniculus</i> rio Sinnamary, Guiana Francesa (Vie et al., 1998)		<i>A. caraya</i> rio Sapucaí-mirim, São Paulo, Brasil (Sánchez-Sarmiento et al., 2015)		<i>A. pigra</i> Carmen, Campeche, México (Rovirosa-Hernández et al., 2012)	
	Machos (n=11)	Fêmeas (n=16)	Machos (n=23)	Fêmeas (n=46)	Machos (n=23)	Fêmeas (n=46)	Machos (n=17)	Fêmeas (n=17)
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
Hemácias (x 10 ⁶ cel/μL)	3,24 ± 0,65	3,5 ± 0,99	4,4 ± 0,2	4,0 ± 0,2	3,62 ± 0,81	3,57 ± 0,61	3,92 ± 0,29	3,42 ± 0,31
Hemoglobina (g/dL)	10,97 ± 1,85	10,9 ± 1,39	10,9 ± 0,5	10,1 ± 0,3	12,71 ± 2,10	12 ± 1,45	10,9 ± 0,86	9,54 ± 0,91
Hematócrito (%)	37,73 ± 4,12	35,38 ± 4,68	34,8 ± 1,5	31,7 ± 1,2	37,11 ± 4,88	35,67 ± 1,03	35,07 ± 2,81	30,25 ± 3,65
VCM (fL)	120,6 ± 20,72	106,7 ± 23,64	79,1 ± 2,6	80,3 ± 1,6	106,51 ± 23,56	102,34 ± 17,84	89,56 ± 5,34	88,49 ± 3,72
CHCM (g/dL)	28,97 ± 2,65	30,94 ± 2,43	31,5 ± 0,3	31,6 ± 0,3	33,49 ± 3,60	33,63 ± 3,82	31,30 ± 1,23	31,66 ± 1,19
HCM (pg)	34,69 ± 4,9	33,09 ± 7,86	24,9 ± 0,8	25,4 ± 0,5	35,89 ± 9,24	34,51 ± 7,45	28,02 ± 1,53	28,04 ± 1,06
Plaquetas (x 10 ³ cel/μL)	192,35 ± 104,16	132,40 ± 79,93	146 ± 33	137 ± 19	96,33 ± 71,91	87,33 ± 31,60	129,45 ± 39,03	146 ± 38,15
Leucócitos (x 10 ³ cel/μL)	11,82 ± 6,27	11,52 ± 4,52	8,6 ± 2,2	8,9 ± 0,9	18,78 ± 10,39	20,48 ± 7,26	5,98 ± 1,21	8,28 ± 1,65
Bastonetes (x 10 ³ cél/μL)	0,18 ± 0,11	0,28 ± 0,25	-	-	-	0,13 ± 0,31	1,22 ± 0,24*	1,75 ± 0,29*
Neutr. Segmentados (x 10 ³ cél/μL)	8,04 ± 0,482	7,71 ± 3,11	5,5 ± 2,1	5,3 ± 0,9	12,39 ± 10,19	13,39 ± 5,18	34 ± 1,77*	47,78 ± 1,85*
Linfócitos (x 10 ³ cél/μL)	2,88 ± 1,50	2,49 ± 1,53	2,6 ± 0,7	3,0 ± 0,4	5,07 ± 1,96	4,81 ± 2,61	46,96 ± 2,09*	54,05 ± 2,05*
Eosinófilos (x 10 ³ cél/μL)	0,2 ± 0,5	0,15 ± 0,17	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	1,25 ± 0,65	1,76 ± 1,03	0,5 ± 0,02*	0,41 ± 0,03*
Basófilos (x 10 ³ cél/μL)	0,12 ± 0,19	0,17 ± 0,41	-	-	0,02 ± 0,05	-	1,22 ± 0,04*	0,25 ± 0,04*
Monócitos (x 10 ³ cél/μL)	0,46 ± 0,46	1,64 ± 3,09	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,07 ± 0,09	0,39 ± 0,38	9,6 ± 1,89*	3,2 ± 1,56*
PT (g/dL)	8,53 ± 0,51	8,05 ± 0,98	-	-	7,53 ± 0,55	7,57 ± 0,41	6,49 ± 0,93	6,07 ± 0,43

*Valores expressos em porcentagem do número total de leucócitos (relativo); DP: Desvio Padrão da Média.

TABELA 6 - Parâmetros hematológicos estatisticamente significantes entre as estações do ano amazônicas

	Verão (junho - novembro) Adultos (n=9)		Inverno (dezembro - maio) Adultos (n=9)		Valor "p"	
CHCM (g/dL)	27,93	T= 28°C P= 60,81 mm UM= 82,12 %	CHCM (g/dL)	32,03	T= 25,6°C P= 242,85 mm UM= 93,09 %	0,002
HCM (pg)	30,78		HCM (pg)	38,41		0,01
PT (g/dL)	8,94		PT (g/dL)	7,65		< 0, 001

CHCM: Concentração Hemoglobínica Corpuscular média, PT: Proteína Total Plasmática, HCM: Hemoglobina Corpuscular Média, T: Temperatura, P: Precipitação, UM: Umidade. Valor "p": diferença significativa entre as médias ($p > 0,05$) (Teste de *t* para amostras normalmente distribuídas e *Mann-Whitney* para as variáveis com distribuição não-paramétrica).

5.5. Avaliação bioquímica

O perfil bioquímico da espécie de primata foi obtido a partir da avaliação morfo-funcional compartmentalizada dos sistemas: hepático, renal, muscular, bem como o equilíbrio eletrolítico. Para a avaliação da função renal, foram mensurados os valores séricos de ureia, creatinina, cálcio, fósforo, sódio e potássio. Para verificação da integridade morfo-funcional hepática e muscular foram determinadas as concentrações de proteínas totais, albumina, bilirrubinas, bem como a atividade sérica de ALT, FA, GGT, AST e CK. E a avaliação dos lipídeos orgânicos foi realizada através da mensuração da concentração sérica de colesterol e triglicerídeos.

A fim de verificar o perfil bioquímico da espécie em diferentes estações do ano, nas diferentes faixas etárias e sexo, os animais foram agrupados em: machos, fêmeas, adultos, jovens, animais capturados no verão e inverno (Tabelas 7 – 10). Quando analisada a influência do sexo sobre as variáveis bioquímicas, apenas o valor sérico do “cálcio” nas fêmeas se apresentou significativamente superior, em relação aos machos.

As médias dos valores encontrados para os indivíduos agrupados por idade apontou diferenças significativas na atividade sérica de FA, GGT e na concentração sérica de creatinina. A concentração sérica de creatinina e a atividade sérica de GGT se mostraram mais elevadas nos adultos, enquanto que a atividade sérica de fosfatase alcalina (FA) esteve significativamente aumentada nos indivíduos mais jovens.

Os espécimes foram agrupados ainda, quanto às diferentes estações do ano amazônicas, a fim de verificar a influência da sazonalidade sobre as variáveis bioquímicas. Uma vez que não foi constatada diferença significativa entre os sexos e somente três parâmetros apresentaram diferenças estatísticas etárias, todos os demais parâmetros foram analisados conjuntamente (adultos e jovens; machos e fêmeas). A atividade sérica de aspartato-amino-transferase (AST) dos indivíduos amostrados no inverno se mostrou significativamente mais elevada no período de inverno (dezembro a maio). O mesmo padrão foi detectado para a atividade sérica da enzima GGT dos animais jovens, em que se detectaram valores médios superiores no inverno ($p=0,01$). Em contrapartida, cálcio e fósforo apresentaram concentração sérica significativamente mais elevada no verão (junho a novembro).

A avaliação interespecífica dos parâmetros bioquímicos entre congêneres de vida livre, ambos habitantes de florestas tropicais amazônicas como *Alouatta pigra* e *Alouatta seniculus*, demonstrou ser bastante similar em sua amplitude de variação, tais como os valores de AST, GGT, LDH, ureia, creatinina, colesterol, sódio, cálcio, fósforo, potássio, magnésio e cloretos.

As diferenças entre os parâmetros ficam mais evidentes quando comparados os parâmetros de animais de vida livre com os de animais cativos. A concentração sérica de colesterol (mg/dL) de bugios ruivos de cativeiro (*Alouatta g. clamitans*), pode ser até três vezes maior (295,2) do que a animais de vida livre (*Alouatta belzebul*) (111,6). Enquanto que as enzimas associadas à musculatura esquelética tais como, “CK” e “AST”, apresentaram sua atividade sérica significativamente aumentada nos animais de vida livre, que dispõem maior esforço físico durante a contenção.

TABELA 7 - Efeito do sexo sobre os parâmetros bioquímicos em espécimes de *Alouatta belzebul*, independente da idade.

Índices (unidade)	Machos (n= 11)					Fêmeas (n= 16)					Valor "p"
	ME	MD	DP	EP	Intervalo	ME	MD	DP	EP	Intervalo	
AST (UI/L)	152,7	113,4	103,2	31,11	83,39 - 222,0	211,3	191,9	131,7	32,92	141,2 - 281,5	0,22
ALT (UI/L)	13,96	10,2	14,17	4,27	4,44 - 23,48	10,95	10,95	12,48	3,12	7,64 - 20,95	0,09
FA (UI/L)	119,2	89	111,2	33,52	44,5 - 193,9	103,1	73,5	93,9	23,48	53,03 - 153,1	0,84
GGT (UI/L)	53,36	35	47,63	14,36	21,37 - 85,36	63,69	55	31,97	7,99	46,65 - 80,72	0,1
LDH (UI/L)	881,5	496	793,6	239,3	348,4 - 1415	1057	605	1083	270,7	479,7 - 1633	0,5
CK (UI/L)	8765	2579	9597	2894	2318 - 15213	8898	2161	14520	3630	1161 - 16635	0,98
BT (mg/dL)	2,86	3,09	0,85	0,25	2,29 - 3,44	3,31	3,4	1,42	0,35	2,55 - 4,07	0,36
BD (mg/dL)	0,66	0,43	0,47	0,14	0,35 - 0,98	0,48	0,32	0,39	0,09	0,27 - 0,69	0,28
BI (mg/dL)	2,2	2,3	0,89	0,27	1,59 - 2,80	2,83	3,13	1,38	0,34	2,09 - 3,56	0,19
Uréia (mg/dL)	62,39	62,4	14,29	4,31	52,79 - 71,99	66,91	58,3	38,44	9,61	46,42 - 87,39	0,71
Creatinina (mg/dL)	0,77	0,75	0,21	0,06	0,63 - 0,92	0,84	0,56	0,81	0,2	0,41 - 1,27	0,22
Colesterol (mg/dL)	111,6	103	21,4	6,45	97,26 - 126,0	118,2	111	36,84	9,2	98,56 - 137,8	0,67
Triglicerídeos (mg/dL)	63,91	54	30,78	9,28	43,23 - 84,59	67,63	68	17,35	4,33	58,38 - 76,87	0,19
Albumina (mg/dL)	4,07	4,1	0,62	0,18	3,65 - 4,49	3,94	3,95	0,64	0,16	3,59 - 4,29	0,61
Proteína total sérica (g/dl)	7,48	7,4	0,61	0,18	7,07 - 7,89	7,22	7,3	0,65	0,16	6,87 - 7,57	0,51
Ca (mg/dL)	7,42	7,8	0,85	0,25	6,85 - 8,0	8,17	8,2	0,6	0,15	7,85 - 8,49	0,01*
P (mg/dL)	4,81	5,1	1,17	0,35	4,02 - 5,6	4,39	4,03	1,01	0,25	3,85 - 4,94	0,28
Mg (mg/dL)	1,88	2	0,6	0,2	1,42 - 2,35	1,93	2	0,25	0,06	1,8 - 2,07	0,75
Na (mEq/L)	122,8	122	4,53	1,36	119,8 - 125,9	125,1	126	6,2	1,55	121,8 - 128,4	0,31
K (mEq/L)	3,56	3,5	0,64	0,19	3,13 - 3,99	3,66	3,7	0,45	0,11	3,42 - 3,91	0,62
Cl (mEq/L)	86	92	26,06	7,85	68,49 - 103,5	96	97	6,13	1,53	92,73 - 99,27	0,2

ME - Média, MD - Mediana, DP - Desvio Padrão da Média, EP - Erro Padrão da Média, n - Número de espécimes; BT - Bilirrubina Total, BD - Bilirrubina Direta, BI - Bilirrubina Indireta. Intervalo - Valores máximo e mínimo, considerando intervalo de confiança de 95% e nível de significância (alfa) 5%; *Diferença significativa entre as médias ($p > 0,05$)

TABELA 8 - Efeito da idade sobre os parâmetros bioquímicos em espécimes de *Alouatta belzebul*, independente do sexo.

Índices (unidade)	Adultos (n= 18)					Jovens (n= 9)					Valor "p"
	ME	MD	DP	EP	Intervalo	ME	MD	DP	EP	Intervalo	
AST (UI/L)	186,3	140,7	120,6	28,42	126,4 - 246,3	189,7	157	133,1	44,37	87,38 - 292	0,94
ALT (UI/L)	11,81	10,8	11,67	2,75	6,01 - 17,61	18,87	10,5	14,72	4,908	7,54 - 30,19	0,18
FA (UI/L)	71,67	54,5	59,89	14,12	41,88 - 101,4	185,6	141	121,8	40,61	91,91 - 279,2	0,008*
GGT (UI/L)	69,78	69	43,07	10,15	48,36 - 91,20	38,89	40	13,46	4,486	28,54 - 49,23	0,004*
LDH (UI/L)	897,2	605	745,5	175,7	526,5 - 1268	1161	512	1333	444,3	136,8 - 2186	0,77
CK (UI/L)	7574	2579	8712	2053	3242 - 11907	11383	1086	18392	6131	2755 - 25521	0,66
BT (mg/dL)	3,23	3,28	1,33	0,31	2,56 - 3,89	2,93	3,35	1	0,33	2,16 - 3,71	0,73
BD (mg/dL)	0,71	0,6	0,44	0,1	0,49 - 0,93	0,24	0,28	0,1	0,03	0,16 - 0,32	0,005
BI (mg/dL)	2,51	2,54	1,33	0,31	1,85 - 3,17	2,69	3,14	1,06	0,35	1,87 - 3,51	0,5
Uréia (mg/dL)	70,31	62,9	34,41	8,1	53,2 - 87,42	54,58	57,3	18,46	6,15	4,38 - 68,77	0,28
Creatinina (mg/dL)	0,97	0,79	0,71	0,16	0,61 - 1,33	0,49	0,56	0,15	0,05	0,37 - 0,61	0,03*
Colesterol (mg/dL)	117,7	111	28,85	6,8	133,3 - 132	111,2	100	36,77	12,26	82,96 - 139,5	0,62
Triglicerídeos (mg/dL)	66,61	68	16,08	3,79	58,62 - 74,61	65,11	57	34,78	11,59	38,38 - 91,84	0,21
Albumina (mg/dL)	4,02	4,05	0,6	0,14	3,72 - 4,73	3,93	3,9	0,7	0,23	3,39 - 4,43	0,72
Proteína total sérica (g/dl)	7,45	7,5	0,57	0,13	7,16 - 7,74	7,07	7,3	0,71	0,23	6,53 - 7,62	0,12
Ca (mg/dL)	7,87	7,91	0,91	0,21	7,42 - 8,33	7,86	7,91	0,5	0,16	7,47 - 8,25	0,97
P (mg/dL)	4,56	4,27	1,21	0,28	3,96 - 5,17	4,56	4,04	0,81	0,27	3,93 - 5,19	0,99
Mg (mg/dL)	1,88	2	0,33	0,08	1,71 - 2,05	2	2	0,53	0,18	1,55 - 2,44	0,55
Na (mEq/L)	124,4	126	5,98	1,41	121,4 - 127,4	123,7	122	5,05	1,68	119,8 - 127,5	0,75
K (mEq/L)	3,62	3,6	0,53	0,12	3,35 - 3,88	3,63	3,7	0,55	0,18	3,2 - 4,05	0,96
Cl (mEq/L)	90	94	21,18	4,99	79,47 - 100,5	95,78	96	4,73	1,57	92,14 - 99,42	0,47

ME - Média, MD - Mediana, DP - Desvio Padrão da Média, EP - Erro Padrão da Média, n - Número de espécimes; BT - Bilirrubina Total, BD - Bilirrubina Direta, BI - Bilirrubina Indireta. Intervalo - Valores máximo e mínimo, considerando intervalo de confiança de 95% e nível de significância (alfa) 5%; *Diferença significativa entre as médias ($p > 0,05$).

TABELA 9 - Parâmetros bioquímicos de *Alouatta belzebul* comparados com espécies congêneres de vida livre e cativo

Índices (unidade)	Animais de Vida Livre						Cativo		
	<i>Alouatta belzebul</i> rio Xingu, Pará, Brasil		<i>A. seniculus</i> rio Sinnamary, Guiana Francesa (Vie et al., 1998)		<i>A. pigra</i> Carmen, Campeche, México (Rovirosa-Hernández et al., 2012)		<i>A. g. clamitans</i> Indaial, Santa Catarina, Brasil (Sousa-Júnior, 2007)		<i>A. g. clamitans</i> Botucatu, São Paulo, Brasil (estudo piloto, 2014)
	Machos (n=11)	Fêmeas (n=16)	Machos (n=23)	Fêmeas (n=46)	Machos (n=17)	Fêmeas (n=17)	Machos (n=39)	Fêmeas (n=18)	M+F (n=5) Média ± DP
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	
AST (UI/L)	152,7 ± 103,2	211,3 ± 131,7	187 ± 44	175 ± 25	-	-	68,77 ± 19,70	45,98 ± 17,77	69,5 ± 13,21
ALT (UI/L)	13,96 ± 14,17	10,95 ± 12,48	22 ± 6,0	19 ± 3,0	-	-	35,26 ± 16,97	30,50 ± 19,8	22,2 ± 6,22
FA (UI/L)	119,2 ± 111,2	103,1 ± 93,9	111 ± 51	86 ± 30	236,5 ± 74,24	215 ± 114,55	-	-	168,2 ± 63,13
GGT (UI/L)	53,36 ± 47,63	63,69 ± 31,97	29 ± 10	47 ± 14	-	-	-	-	40,4 ± 17,84
LDH (UI/L)	881,5 ± 793,6	1.057 ± 1.083	1.491 ± 295	1.477 ± 251	-	-	-	-	174,4 ± 5,22
CK (UI/L)	8.765 ± 9.597	8.898 ± 14.520	3.441 ± 1.217	5.385 ± 2.775	-	-	-	-	756,2 ± 529,5
BT (mg/dL)	2,86 ± 0,85	3,31 ± 1,42	0,93 ± 0,10	0,78 ± 0,09	-	-	-	-	0,49 ± 0,36
BD (mg/dL)	0,66 ± 0,47	0,48 ± 0,39	-	-	-	-	-	-	0,15 ± 0,11
BI (mg/dL)	2,2 ± 0,89	2,83 ± 1,38	-	-	-	-	-	-	0,34 ± 0,25
Uréia (mg/dL)	62,39 ± 14,29	66,91 ± 38,44	56,28 ± 12,57	53,89 ± 7,18	28,89 ± 2,57	26,75 ± 1,36	39,37 ± 13,37	33,09 ± 10,85	30,2 ± 3,27
Creatinina (mg/dL)	0,77 ± 0,21	0,84 ± 0,81	1,58 ± 0,13	1,35 ± 0,07	0,92 ± 0,11	1,47 ± 0,39	1,24 ± 0,27	1,01 ± 0,30	0,84 ± 0,15
Colesterol (mg/dL)	111,6 ± 21,4	118,2 ± 36,84	119,69 ± 19,3	92,66 ± 7,72	95,81 ± 30,14	61,66 ± 24,53	147,27 ± 96,27	116,50 ± 71,84	295,2 ± 63,04
Triglicerídeos (mg/dL)	63,91 ± 30,78	67,63 ± 17,35	61,94 ± 8,84	70,79 ± 8,84	128,0 ± 29,69	75,0 ± 9,88	-	-	80,1 ± 18,4
Albumina (mg/dL)	4,07 ± 0,62	3,94 ± 0,64	-	-	3,79 ± 0,90	3,18 ± 0,33	4,05 ± 0,84	2,98 ± 0,88	4,28 ± 0,31
Proteína total sérica (g/dl)	7,48 ± 0,61	7,22 ± 0,65	9,65 ± 0,59	8,96 ± 0,4	6,49 ± 0,93	6,07 ± ,43	9,71 ± 2,03	9,22 ± 2,35	6,74 ± 1,65
Ca (mg/dL)	7,42 ± 0,85	8,17 ± 0,6	10,8 ± 0,4	10 ± 0,4	10,0 ± 0,28	9,2 ± 0,28	-	-	-
P (mg/dL)	4,81 ± 1,17	4,39 ± 1,01	8,94 ± 1,85	7,73 ± 0,92	4,05 ± 0,49	3,05 ± 0,77	-	-	-
Mg (mg/dL)	1,88 ± 0,6	1,93 ± 0,25	3,64 ±	3,40 ± 0,48	2,25 ± 0,21	2,0 ± 0,19	-	-	-
Na (mEq/L)	122,8 ± 4,53	125,1 ± 6,2	156 ± 7,0	149 ± 4	147,0 ± 2,82	142,0 ± 4,24	-	-	-
K (mEq/L)	3,56 ± 0,64	3,66 ± 0,45	5,5 ± 0,5	5,1 ± 0,3	6,55 ± 1,76	6,05 ± 0,21	-	-	-
Cl (mEq/L)	86 ± 26,06	96 ± 6,13	110 ± 5,0	105 ± 6,0	106,5 ± 2,12	106,5 ± 6,36	-	-	-

TABELA 10 - Efeitos da sazonalidade sobre os parâmetros bioquímicos da espécie

Índices (unidade)	Verão (n= 14)					Inverno (n= 13)					Valor "p"
	Idade	n	Média	±DP	Intervalo	Idade	n	Média	±DP	Intervalo	
AST (UI/L)	Adultos	9	133	97,26	76,88 - 189,2	Adultos	9	246	122,4	172,1 - 320	0,004*
	+ Jovens	5				+ Jovens	4				
ALT (UI/L)	Adultos	9	9,31	3,47	7,3 - 11,3	Adultos	9	19,38	17,09	9,05 - 29,71	0,04
	+ Jovens	5				+ Jovens	4				
FA (UI/L)	Adultos	9	76,56	71,9	21,9 - 131,8	Adultos	9	66,78	48,98	29,13 - 104,4	0,79
	Jovens	5	178,4	112,5	38,71 - 318,1	Jovens	4	194,5	150	44,26 - 341,8	0,73
GGT (UI/L)	Adultos	9	52,78	27,53	31,62 - 73,94	Adultos	9	86,78	50,34	48,09 - 125,5	0,09
	Jovens	5	30,2	8,075	20,17 - 40,23	Jovens	4	49,75	10,63	32,84 - 66,66	0,01*
LDH (UI/L)	Adultos	9	822,9	808,8	355,9 - 1290	Adultos	9	1160	1111	488,8 - 1831	0,12
	+ Jovens	5				+ Jovens	4				
CK (UI/L)	Adultos	9	7086	9385	1667 - 12.504	Adultos	9	10737	15408	1426 - 20048	0,15
	+ Jovens	5				+ Jovens	4				
BT (mg/dL)	Adultos	9	2,81	0,79	2,35 - 3,27	Adultos	9	3,47	1,51	2,55 - 4,39	0,16
	+ Jovens	5				+ Jovens	4				
BD (mg/dL)	Adultos	9	0,61	0,5	0,32 - 0,90	Adultos	9	0,49	0,34	0,29 - 0,7	0,49
	+ Jovens	5				+ Jovens	4				
BI (mg/dL)	Adultos	9	2,19	0,96	1,64 - 2,75	Adultos	9	2,97	1,39	2,13 - 3,82	0,1
	+ Jovens	5				+ Jovens	4				
Uréia (mg/dL)	Adultos	9	54,57	18,95	43,63 - 65,51	Adultos	9	76,37	37,05	53,98 - 98,76	0,12
	+ Jovens	5				+ Jovens	4				

TABELA 10. Cont.

Creatinina (mg/dL)	Adultos	9	0,72	0,21	0,55 - 089	Adultos	9	1,22	0,94	0,49 - 1,95	0,07
	Jovens	5	0,56	0,08	0,45 - 0,67	Jovens	4	0,41	0,19	0,09 - 0,72	0,32
Colesterol (mg/dL)	Adultos + Jovens	9 + 5	109,4	19,26	98,24 - 120,5	Adultos + Jovens	9 + 4	122,2	40,09	97,93 - 146,4	0,43
	Adultos + Jovens	9 + 5	71,64	29,77	54,45 - 88,83	Adultos + Jovens	9 + 4	60,15	11,8	53,02 - 67,29	0,36
Albumina (mg/dL)	Adultos + Jovens	9 + 5	4,13	0,52	3,83 - 4,43	Adultos + Jovens	9 + 4	3,84	0,71	3,41 - 4,28	0,23
	Adultos + Jovens	9 + 5	7,46	0,51	7,16 - 7,76	Adultos + Jovens	9 + 4	7,18	0,73	6,73 - 7,63	0,26
Ca (mg/dL)	Adultos + Jovens	9 + 5	8,12	0,84	7,63 - 8,61	Adultos + Jovens	9 + 4	7,6	0,65	7,2 - 8,0	0,02*
	Adultos + Jovens	9 + 5	5,01	0,84	4,52 - 5,49	Adultos + Jovens	9 + 4	4,09	1,13	3,4 - 4,77	0,01*
Mg (mg/dL)	Adultos + Jovens	9 + 5	2	0,42	1,72 - 2,27	Adultos + Jovens	9 + 4	1,84	0,37	1,61 - 2,07	0,37
	Adultos + Jovens	9 + 5	124,6	6,07	121,1 - 128,1	Adultos + Jovens	9 + 4	123,7	5,25	120,5 - 126,9	0,69
K (mEq/L)	Adultos + Jovens	9 + 5	3,55	0,56	3,22 - 3,87	Adultos + Jovens	9 + 4	3,7	0,49	3,41 - 4	0,45
	Adultos + Jovens	9 + 5	89,71	23,24	76,3 - 103,1	Adultos + Jovens	9 + 4	94,31	8,38	89,24 - 99,37	0,98

ME - Média, DP - Desvio Padrão da Média, n - Número de espécimes; BT - Bilirrubina Total, BD - Bilirrubina Direta, BI - Bilirrubina Indireta. Intervalo - Valores máximo e mínimo, considerando intervalo de confiança de 95% e nível de significância (alfa) 5%; *Diferença significativa entre as médias ($p > 0,05$) (Teste de *T* para amostras normalmente distribuídas e *Mann-Whitney* para as variáveis com distribuição não-paramétrica).

5.6. Avaliação Imunocitoquímica

Durante a etapa de padronização, foram confeccionadas 20 lâminas dos espécimes cativos de *Alouatta guariba clamitans* para realização dos testes e o método “squash” demonstrou melhor resultado quando comparado ao método de homogeneização manual. A homogeneização manual do conteúdo aspirado não permitiu uma distribuição uniforme das células pela lâmina, com a formação de grumos e conseqüentemente sobreposição celular; dificultando a marcação pelos marcadores linfóides. Por sua vez, o método “squash” permitiu a formação de uma monocamada de células sobre a lâmina, facilitando a marcação e a visualização do halo citoplasmático e nuclear acastanhado, característico das células positivas.

Após a escolha do método “squash” como método padrão, o mesmo procedimento foi aplicado aos 27 espécimes de *Alouatta belzebul* durante a fase experimental, no ano de 2015. Do total de 27 animais amostrados nas duas expedições a campo, apenas 20 animais marcaram positivamente os linfócitos, para os anticorpos testados, dos quais: dez machos e dez fêmeas, sete jovens e 13 adultos, totalizando nove espécimes no verão e 11 no inverno. A ausência de marcação dos sete primatas remanescentes inviabilizou uma comparação estatística espacial robusta sobre o perfil linfocitário dos espécimes.

O primeiro resultado evidente da imunofenotipagem nas duas espécies de primatas neotropicais (*Alouatta guariba clamitans* e *Alouatta belzebul*) é o de que as duas espécies possuem moléculas de superfície (CD) nos linfócitos, homólogas ao homem. Ainda que os anticorpos sejam produzidos para detecção de antígenos de células humanas, a presença de proteínas expressas na superfície destas células reforça a proximidade filogenética entre as espécies antropóides (Platyrrhini e Catarrhini).

As reações imunocitoquímicas positivas aos anticorpos anti-CD3 e anti-BSAP PAX 5 caracterizaram-se pela visualização de um delicado halo de coloração acastanhada na membrana celular e núcleo dos linfócitos, respectivamente. O objetivo deste estudo não foi avaliar intensidade ou determinar escores de marcação celular, mas foi possível constatar que a intensidade de marcação celular para cada anticorpo, dentro de cada lâmina,

mostrou-se desigual. Durante a leitura de uma mesma lâmina, para um mesmo anticorpo, alguns linfócitos parecem marcar mais fortemente, enquanto outros discretamente sinalizados. Entretanto, o mesmo protocolo aplicado ao corte histológico do linfonodo canino (controle positivo) evidenciou uma intensidade de marcação bastante homogênea dos linfócitos.

As Figuras 14 – 17 ilustram a marcação positiva dos linfócitos com o imunofenótipo B e T, no sangue periférico dos espécimes de *Alouatta belzebul*. A Tabela 11 demonstra uma análise comparativa entre os valores absolutos da série linfocitária dos primatas, agrupados por classe etária, sexo e estação do ano.

A avaliação quantitativa dos linfócitos circulantes demonstrou que as subpopulações T invariavelmente estiveram acima dos 51%, independente da idade, sexo ou estação do ano. Enquanto que as subpopulações B, não ultrapassaram 31% do número de linfócitos totais.

Quando agrupados conforme a classe etária e comparados os valores absolutos dos linfócitos T e B, os adultos evidenciaram uma média de linfócitos B estatisticamente superior a dos indivíduos considerados jovens ($p=0,03$); o que não pode ser constatado para os linfócitos T. Machos e fêmeas foram agrupados, do mesmo modo que os animais amostrados no verão e inverno, para fins de comparação dos perfis linfocitários, no entanto, nenhuma das variáveis testadas apontou diferenças significativas.



FIGURA 14 – Linfócitos marcados pelo anticorpo policlonal anti-CD3 (à esquerda), apresentando visualização citoplasmática, correspondente ao imunofenótipo das células T. Linfócito negativo para a marcação anti-CD3 (à direita). Imunocitoquímica, Contracoloração: Hematoxilina de Harris, 1000x.

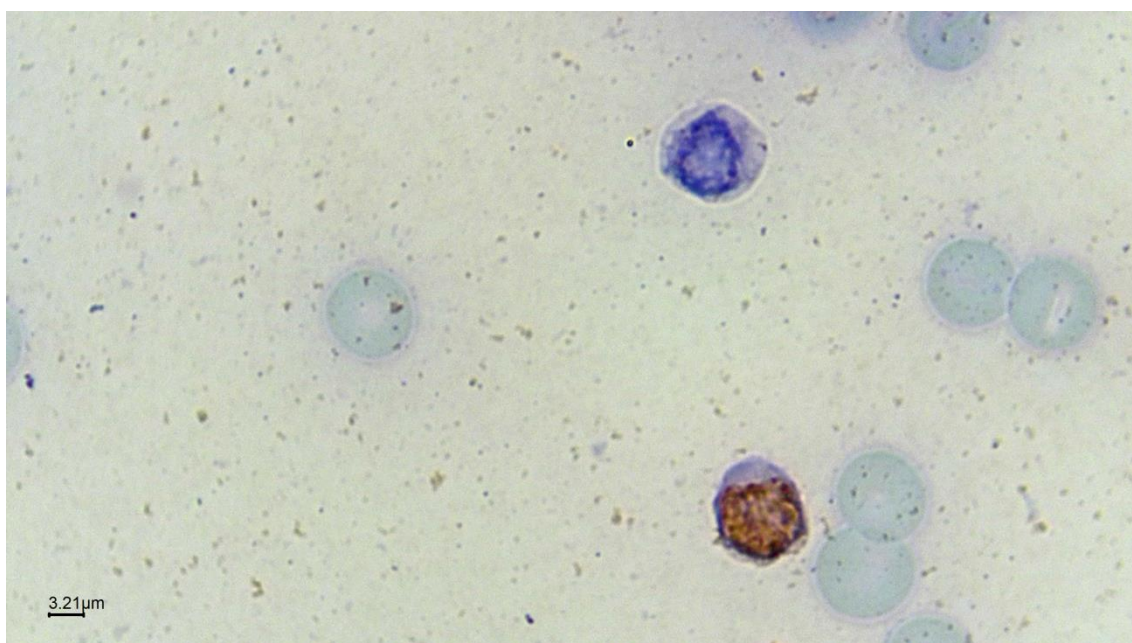


FIGURA 15 - Linfócito marcado pelo anticorpo monoclonal anti-BSAP PAX 5, apresentando visualização nuclear (abaixo), correspondente ao imunofenótipo das células B. Linfócito negativo (acima) para a marcação anti-BSAP PAX 5. Imunocitoquímica, Contracoloração: Hematoxilina de Harris, 1000x.

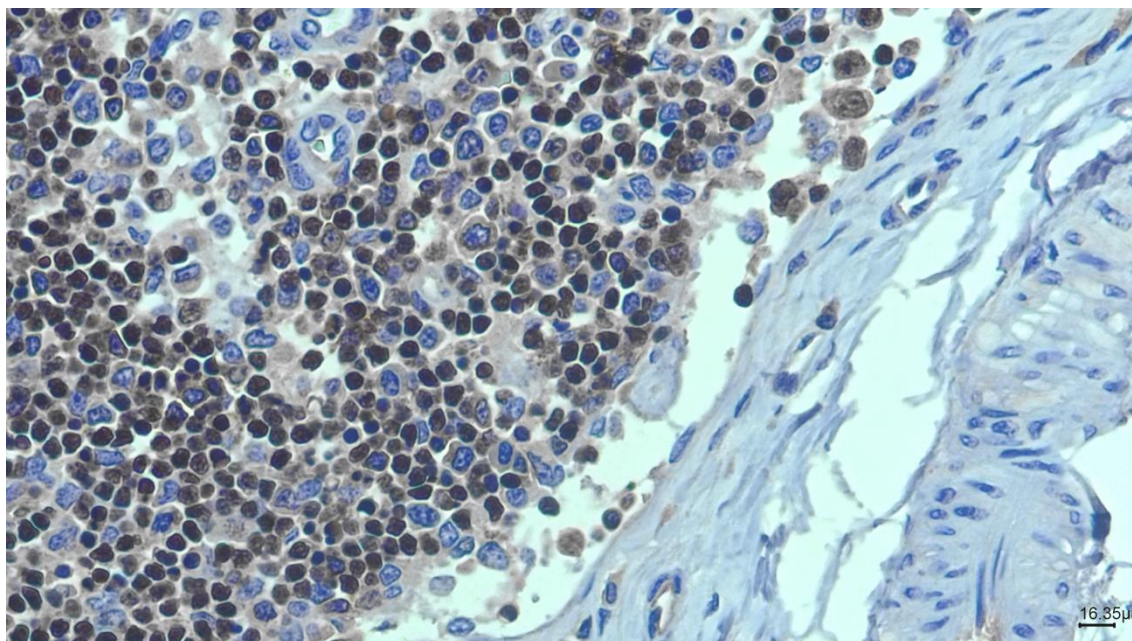


FIGURA 166 - Secção histológica de linfonodo canino utilizada como controle positivo. Imunomarcção positiva para o anticorpo anti_BSAP PAX 5. Imunocitoquímica, Contracoloração: Hematoxilina de Harris, 400X.

TABELA 11 - Avaliação quantitativa de linfócitos circulantes em *Alouatta belzebul*, considerando a influência de fatores intra-específicos e ambientais (valores absolutos).

Imunofenótipo	Idade			Sexo			Sazonal		
	Jovem (n=7) ME ± DP	Adulto (n=13) ME ± DP	Valor "p"	Macho (n=10) ME ± DP	Fêmea (n=10) ME ± DP	Valor "p"	Verão (n=9) ME ± DP	Inverno (n=11) ME ± DP	Valor "p"
Linfócitos T	1054 ± 509	1634 ± 980	0,13	1460 ± 796,4	1402 ± 993,8	0,68	1064 ± 503,3	1732 ± 1019	0,09
Linfócitos B	477 ± 229	960 ± 513	0,03*	794,1 ± 444,3	787,6 ± 553	0,52	740,3 ± 516,9	832,2 ± 484,8	0,44

ME - Média, DP - Desvio Padrão da Média, n - Número de espécimes. *Diferença significativa entre as médias ($p > 0,05$) (Teste de t para amostras normalmente distribuídas e Mann-Whitney para as variáveis com distribuição não-paramétrica).

6. DISCUSSÃO

6.1. Aspectos clínico-morfométricos

Os estudos realizados com grupo taxonômico até o momento concentram-se em craniometria, dentição, estudos genéticos e da pelagem, a fim de solucionar imprecisões taxonômicas sobre o complexo “*belzebul*” (BONVICINO et al., 1989; SCHNEIDER et al., 1991; NASCIMENTO et al., 2008; RYLANDS et al., 2000; GREGORIN, 2006; RYLANDS et al., 2012). Estudos com macacos atelídeos *in vivo* são raros ou escassos, considerando a complexidade de captura dos guaribas e a infraestrutura mínima necessária.

Os padrões fenotípicos da pelagem dos primatas deste estudo são mais compatíveis com os relatos de Dollman (1910) para *Alouatta discolor*, do que o padrão clássico de *Alouatta belzebul* descrito por Bonvicino et al. (1989) e Gregorin (2006). Ainda que os animais sejam provenientes de locais distintos, (margem esquerda e ilhas) os animais apresentaram um padrão, de certa forma, homogêneo com pequenas variações. De acordo com a distribuição original das espécies, era esperado que a pelagem dos animais da margem esquerda fosse compatível com *A. discolor* e margem direita *A. belzebul* (GREGORIN, 2006).

Os estudos que descrevem a pelagem dos primatas do interflúvio Xingu-Tapajós-Iriri não mencionam o padrão esperado para as ilhas, apenas para o continente (BONVICINO et al., 1989; LIMA e SEUANEZ, 1989; BONVICINO et al., 2001 OLIVEIRA et al., 2002; GREGORIN, 2006; KOWALEWSKI et al., 2015). O ambiente insular do rio Xingu poderia ter sido colonizado por qualquer um dos dois táxons (*A. discolor* ou *A. belzebul*), uma vez que no período de vazante o acesso às ilhas pode ser facilitado. Ainda sobre a hipótese do deslocamento dos primatas pelo rio, a “Iha Grande” amostrada neste estudo, por exemplo, dista apenas 94 metros da margem direita do rio, podendo ter sido o acesso mais curto para os indivíduos de *A. belzebul*. Em contrapartida, a pelagem lateral distintamente longa de todos os espécimes nos levaria a classificá-los como variantes de *A. discolor*, endêmico da margem esquerda.

Todas as variações encontradas nos espécimes, independente da ilha em que foram capturados, estavam previstas na revisão sistemática de Gregorin (2006). Segundo ele, a variação mais notável de coloração da pelagem para *Alouatta discolor* é ontogenética, cujos indivíduos jovens são mais escuros (enegrecidos), devido à ausência de alguns campos cromatogénéticos ruivos nas mãos, pés e/ ou dorso. Esta particularidade nos jovens também foi detectada neste estudo, contrastando com os campos cromatogénéticos ruivos mais acentuados dos adultos.

Diante das limitações de amostragem deste estudo, não foi possível obter amostras equitativas da margem direita, esquerda e ilhas desta região do Baixo rio Xingu ou pelo menos em número suficiente para realizar uma comparação mais robusta. O estudo com espécimes *in vivo* também inviabiliza a análise multivariada de todas as variáveis cranianas e de morfologia do hioide fundamentais para identificação, assim como procedeu Gregorin (2006).

Portanto, este estudo limitou-se a designar os espécimes capturados como pertencentes ao complexo grupo polimórfico “*belzebul*” (CORTÉS-ORTIS et al., 2015). Especula-se que os animais da margem esquerda (*Alouatta discolor*) tenham colonizado os ambientes insulares desta região e que as variações podem ser caracterizadas como de caráter geográfico, não sendo substanciais para a separação das populações em níveis taxonômicos diferenciados para expressar tais divergências.

Com relação à massa corpórea, o peso das fêmeas atelídeas capturadas neste estudo apresentaram uma proporção de cerca de 72% do peso médio dos machos adultos; dentro da expectativa prevista por Neville (1988), que menciona variação entre 68 a 84% para o gênero. O peso médio dos adultos do gênero *Alouatta* varia entre 3.500 a 11.100 gramas, sendo os menores referentes à *Alouatta caraya* e os maiores a *Alouatta seniculus*, segundo Verona e Pissinatti (2014).

Todas as espécies do gênero *Alouatta* apresentam dimorfismo sexual relativo ao peso (GREGORIN, 2006). Os únicos representantes do gênero que apresentam dicromatismo sexual são *Alouatta caraya* e *Alouatta guariba clamitans* (GREGORIN et al., 2008). O dimorfismo sexual em *Alouatta belzebul* se dá pela diferenciação nos machos adultos, que inclui maior tamanho corpóreo (DOLLMAN, 1910), crânio mais achatado com cristas dorsais

desenvolvidas e caninos mais longos (GREGORIN et al., 2008; YOULATUS et al., 2015).

Os animais cativos amostrados durante a fase teste são visivelmente habituados às ações de manejo no centro de pesquisa (CEMPAS). Os primatas nasceram ou possuem histórico prolongado de permanência em cativeiro, o que significa que a contenção representa um evento estressante de menor magnitude, quando comparados aos animais de vida livre. A contenção com puçá e luvas de raspa de couro ocorre com muito mais facilidade, uma vez que os animais oferecem menos resistência ao serem aprisionados pela rede. Os animais de vida livre são visivelmente mais agressivos, relutantes à contenção e por isso parecem sentir mais intensamente os efeitos do estresse agudo da captura, conforme previsto por Fowler (1986) e Kindlovits e Kindlovits (2009).

Vale destacar, que os animais da área de estudo estiveram submetidos a diferentes agentes estressores até o momento da captura. O desaparecimento gradual do habitat e a rarefação dos recursos tróficos representam as fontes crônicas de estresse. A captura, o transporte e a manipulação configuram as fontes de estresse agudo, a que os animais estiveram inevitavelmente submetidos (FOWLER, 1986; VIE et al., 1998). Embora não se deva desprezar as variações interespecíficas, os efeitos cumulativos destes agentes estressores podem ter contribuído para as diferenças entre os resultados deste estudo e os outros trabalhos, mais frequentemente em cativeiro.

O protocolo de sedação dos espécimes se mostrou satisfatório, quando considerada a finalidade do estudo, a duração do procedimento, o nível de relaxamento e o breve retorno. Spolti et al. (2013) Flaiban et al. (2008), Olberg (2007), Caulkett e Armeno, (2013), Agoramoorthy e Rudran, (1994) utilizaram o mesmo protocolo de sedação e também concordam com Vilani (2014), que menciona o curto tempo de retorno anestésico para esse tipo de associação anestésica (60 minutos), abreviando o tempo de cativeiro dos espécimes.

Uma característica observada durante as ações de manejo com os espécimes de vida livre foi a defecação durante a captura. Os animais emitem sons compatíveis com uma vocalização agonística durante a contenção e, em seguida, defecam na caixa de transporte, no puçá ou até mesmo nas luvas de raspa de couro. As fezes possuem coloração escura esverdeada e aspecto

pastoso, características típicas do bolo fecal da espécie, com hábitos alimentares folívoros e frugívoros (CROCKET, 1998).

A manifestação vocal dos primatas por meio de vocalização agonística reitera as evidências de Jardim e Oliveira (2002) com a mesma espécie, na Estação Científica Ferreira Pena (ECFP), na Floresta Nacional de Caxiuanã, estado do Pará. Os autores associam a vocalização dos guaribas como mecanismo de comunicação intra e intergrupar; como forma de sinalizar sua posição na floresta, evitando confrontos intra e interespecíficos, bem como nas situações de perigo frente a ameaças (predadores humanos e não humanos).

Parte da avaliação clínica por vezes pouco explorada é a da cavidade bucal. Tais avaliações colaboram, não somente para avaliação do estado geral de saúde dos primatas, mas também pode trazer informações relevantes sobre aspectos ecológicos, comportamentais e das relações do indivíduo e da espécie com o ecossistema em que está inserido (VERONA e PISSINATI, 2014).

Nos animais do gênero *Alouatta* avaliados neste estudo foram encontradas fraturas, retrações de gengiva, desgastes acentuados e por vezes, má-oclusão nos indivíduos adultos. No entanto, não foram realizadas correlações dos achados com processos mórbidos, apenas como evidências de senilidade. Estudos com calitriquídeos em vida livre (*Callithrix jacchus*) introduzidos no Parque Nacional da Tijuca, no estado do Rio de Janeiro, sugerem que os problemas dentários apresentados pelos espécimes talvez se justifique pelo fato dos animais não estarem totalmente adaptados à flora local. Como seus incisivos inferiores apresentam mais dentina que os superiores, estes não fraturam, porém neles ocorre a retração de gengiva, expondo as raízes e provocando, em longo prazo, infecções e/ou a queda dos dentes afetados, fato comprovado também nos primatas idosos de vida livre (VERONA, 2001). O autor salientou, no entanto, que estudos com as espécies em sua área original de ocorrência ainda sejam necessários para confirmação desta hipótese.

O parasitismo pode ser um achado fortuito ou relacionado com sinais clínicos, ser o agente causal de uma enfermidade clínica moderada à grave, podendo ocasionar até morte por destruição tissular maciça (KINDLOVITS e KINDLOVITS, 2009). Os símios contraem a maioria dos parasitas, protozoários

e helmintos no seu habitat natural devido à sua maior acessibilidade a determinados vetores ou hospedeiros intermediários essenciais para a transmissão do parasita. A grande maioria dos parasitas encontra-se bem adaptada aos seus hospedeiros, provavelmente provocando poucas alterações patológicas. Entretanto alguns parasitas, além de favorecer a instalação de infecções secundárias, provocam distúrbios fisiológicos, lesões que debilitam o animal, como perda de peso e até quadros fatais (TOFT e EBERHARD, 1998).

As evidências de prenhez das fêmeas do rio Xingu no verão e inverno, coincidem com os relatos de nascimento de filhotes de Camargo e Ferrari (2007) para o mesmo táxon. Os autores analisaram uma população amazônica da espécie, em uma ilha formada no reservatório da usina hidrelétrica de Tucuruí (rio Tocantins), sudeste do estado do Pará, na Amazônia oriental. Registraram ainda o comportamento das mães carregarem os filhotes na posição ventral durante três primeiras semanas de vida e, após este período, o filhote passa a ser carregado na posição dorsal; um estágio de transição importante no desenvolvimento do filhote.

Em geral, as espécies do gênero não possuem evidência de sazonalidade reprodutiva (SIGRIST, 2010), no entanto pode haver uma concentração dos nascimentos em determinada época do ano para algumas espécies, usualmente relacionada com a variação pluvial. Bonvicino, (1989) descreve a gestação de um único filhote para *Alouatta belzebul* e *Alouatta discolor*, com período superior a 154 dias. À exceção desses relatos, estudos precisos para a determinação de seu ciclo ovariano, intervalo entre partos, características seminais, níveis hormonais, aparecimento da maturidade e comportamento sexual ainda são necessários, assim como para a maioria das espécies do gênero (GREGORIN et al., 2008).

6.2. Hematologia

Existem mais de 4.200 espécies de mamíferos vivos no planeta e, destas a hematologia de apenas uma vem sendo estudada de maneira mais plena, o homem (HAWKEY, 1975). Alguma informação já está disponível sobre animais domésticos e outras daquelas espécies usadas em laboratório, no

entanto, a grande maioria dos mamíferos ainda não foi sistematicamente examinada. As dificuldades de natureza técnica e prática dificultam as amostragens e conseqüentemente o estabelecimento de valores que possam ser adotados como “referência” para uma espécie (HAWKEY, 1975; WEISS e WARDROP, 2010; STOCKHAM e SCOTT, 2011).

De acordo com Lassen (2007), para se considerar os resultados de exames laboratoriais como anormais, deve-se ter conhecimento da faixa de variação dos valores em animais sadios. Na maior parte dos casos, os animais sadios são aqueles que não aparentam doença e que manifestam comportamento normal para a espécie em questão (RADOSTITS et al., 2002). Em se tratando dos primeiros relatos clínico-patológicos para uma espécie, pesquisas com espécies filogeneticamente semelhantes, congêneres ou que compartilham de condições climáticas semelhantes são as bases de comparação (HAWKEY, 1975).

Em relação à morfologia das células, os achados desta pesquisa são coincidentes com as descrições de Huser (1970) e suas inferências sobre características hematológicas da Ordem Primates. As hemácias maduras da espécie apresentaram formato de disco bicôncavo, monócitos e linfócitos com aspecto típico e polimorfonucleares variando em aspectos morfológicos e tintoriais.

Embora não tenha sido estudado em detalhe, o tempo de vida dos glóbulos vermelhos e taxa de liberação de glóbulos vermelhos imaturos pela medula, aparentemente varia entre os diferentes mamíferos (GREER et al., 2013). Algumas espécies, particularmente alguns cebídeos, roedores e cetáceos, normalmente têm uma porcentagem muito maior de reticulócitos e glóbulos vermelhos policromáticos no sangue circulante do que o homem (WINTROBE, 1961). E, nestas espécies uma pequena proporção de células vermelhas nucleadas circulantes não tem qualquer significado patológico (HAWKEY e DENNET, 1989).

Os métodos laboratoriais utilizados para a realização do hemograma de primatas pouco diferem dos utilizados para mamíferos domésticos (Campbell e Campbell, 1986). Entretanto, segundo Almosny (2009), observa-se a necessidade de efetuarem-se contagens manuais em câmaras hematimétricas em detrimento dos contadores eletrônicos. A determinação da hematimetria,

leucometria global e plaquetometria realizada manualmente garante maior padronização do tamanho dos glóbulos e dados realmente coerentes com a espécie.

Além das contagens manuais, as amostras sanguíneas deste estudo foram também submetidas à contagem por equipamento eletrônico com tecnologia de impedância (ABX Micros 60, Horiba®, ABX SAS - California, USA), para fins comparativos. Nestes equipamentos, o circuito analisador do tamanho de partículas é calibrado com partículas de tamanho conhecido (LASSEN e WEISER, 2007). O referido analisador, calibrado para amostras de sangue humano, superestimou os valores totais de eritrócitos e subestimou os valores globais de plaquetas dos primatas. A diferença estatística encontrada para estes índices confirma as expectativas de Hawkey (1975), Schalm (1975), Lassen e Weiser (2007) e Almosny (2009), que mencionam as diferenças consideráveis no tamanho das hemácias e plaquetas entre as espécies.

Pelo menos quatro esfregaços sanguíneos foram confeccionados para cada animal. Três lâminas foram coradas com Wright, Wright-Giemsa, Panótico rápido e uma quarta réplica foi armazenada em álcool metílico para fins de arquivo. Os protocolos de fixação e coloração seguiram as recomendações de Schalm (1975) e se mostraram satisfatórios para a visualização das estruturas nucleares e citoplasmáticas em monocamada.

A escolha dos corantes baseou-se nas descrições de Almosny (2009), que mencionou os referidos corantes para a avaliação hematológica dos primatas e ainda considerou o método Giemsa mais adequado para o diagnóstico de hematozoários. Ao contrário dos estudos de Siddiqui (1977) (*Plasmodium falciparum*) e Ortunho et al. (2014) (*Babesia* sp.), nenhuma estrutura compatível com hematozoário foi detectada durante o exame do esfregaço sanguíneo.

Não foi possível realizar nenhuma associação direta entre os valores significativamente superiores de monócitos nos jovens. De modo similar aos animais domésticos, em primatas a população de monócitos não costuma ter uma distribuição normal, podendo estar relacionadas a fatores individuais, como afecções crônicas, doenças infecciosas específicas ou mesmo neoplasias (WEISER, 2007).

Os valores de eosinófilos significativamente superiores nas fêmeas podem ter alguma associação com infestação parasitária de piolhos. Do total de

animais infestados por piolhos (13/27), em nove fêmeas (seis adultas e três jovens) e apenas quatro machos foi possível verificar a presença do ectoparasita. Talvez estes achados não possam ser extrapolados para a espécie, uma vez que as amostragens por sexo, local e estação do ano não foram equitativamente distribuídas e o número de animais amostrados seja pequeno. No entanto, a presença do ectoparasita nesta pequena população de primatas pode justificar tal resposta imunológica.

A contagem total de eritrócitos, teor de hemoglobina e hematócrito foram superiores em animais jovens, quando comparados às contagens em espécimes adultos. Campbell (2007b), Campbell e Ellis (2007) e Reagan et al. (2008) mencionaram que primatas machos adultos apresentam contagens de eritrócitos, teor de hemoglobina e hematócrito maiores, em comparação com as fêmeas adultas, o que também foi possível constatar neste estudo.

A excitação e esforço decorrentes da captura e contenção induzem à contração esplênica e conseqüente aumento do hematócrito, quadro de leucocitose e linfocitose transitórias (devido à liberação de epinefrina) (SCHALM, 1975), mas o uso do anestésico, a exemplo dos fármacos dissociativos (cetamina, tiletamina, por exemplo) reduzem este efeito (THRALL, 2004; CAMPBELL, 2007; FLAIBAN et al., 2008; SANCHEZ-SARMIENTO et al., 2015).

Conforme apontado por Ives (1956), a captura consiste em um fator indutor de estresse agudo, resultando assim em alterações nos parâmetros hematológicos, compatíveis com o quadro de estresse do grupo estudado. De acordo com Moore (2000) não há grandes diferenças nas contagens de células entre as diferentes espécies de primatas, a exceção da contagem de plaquetas (Wirz et al., 2008). Assim como nos demais estudos com primatas, devem-se considerar outros fatores como a condição nutricional, status fisiológico, relações intra-grupo, além das condições climáticas (ALMOSNY, 2009; SANCHEZ-SARMIENTO, 2015).

Vie et al. (1998) em sua pesquisa com *Alouatta seniculus* nas áreas de influência da hidrelétrica de Petit Sault, na Guiana Francesa, em condições de habitat e agentes estressores similares detectaram diferenças significativas entre os valores de leucócitos, linfócitos e plaquetas entre adultos e jovens. Os estudos de Sanches-Sarmiento et al. (2015), em que os animais recém

capturados e mantidos em cativeiro por um período, tiveram seus parâmetros significativamente alterados pelos mesmos agentes estressores comprovam a interferência sobre as variáveis biológicas.

Nenhum dos estudos anteriores avaliou a influência das variáveis meteorológicas sobre os parâmetros hematológicos, enquanto que este estudo registrou maiores índices de CHCM e HCM na estação chuvosa e índices significativamente superiores de Proteínas Plasmáticas Totais durante a estação seca (verão). A menor disponibilidade hídrica da estação seca pode ter influenciado o grau de hidratação dos animais, reduzindo comparativamente as concentrações de proteínas, em gramas por decilitro de plasma (JAIN, 1993).

6.3. Bioquímica Clínica

Com frequência, o perfil bioquímico sanguíneo é utilizado para determinar a saúde de pacientes mamíferos não domésticos. De acordo com Almosny (2009), as avaliações bioquímicas mais comumente utilizadas em primatas são as proteínas totais, a glicose, o ácido úrico, AST (aspartato-aminotransferase), CK (creatinoquinase), fósforo, creatinina, ureia, LDH (lactato-desidrogenase), sódio, potássio, cloretos, gasometria e eletroforese de proteínas. A avaliação destes componentes auxiliam no diagnóstico e avaliação da função renal, hepato-biliar, das injúrias musculares, auxiliam na compreensão do equilíbrio hidro-eletrolítico, bem como os distúrbios ácido-básico metabólicos.

Assim como nos estudos de Larson et al. (1997), SANTOS (1999), Boaretto et al. (2010) com outras espécies de primatas, o presente estudo obteve o perfil bioquímico da espécie e analisando os seguintes parâmetros: AST, ALT (alanina-amino-transferase), FA (fosfatase alcalina), GGT (gama-glutamil-transferase), LDH, ureia, creatinina, bilirrubinas, albumina, CK, proteína total sérica, colesterol, triglicerídeos, cálcio, fósforo, sódio, potássio, cloretos e magnésio.

É importante ressaltar que os resultados encontrados neste estudo referem-se a uma única amostragem, e por essa razão, não têm a pretensão

de inferir sobre lesões ou o estabelecimento de processos mórbidos dos sistemas. A avaliação da integridade morfo-funcional dos sistemas analisados somente poderia ser consistente mediante o acompanhamento e realização de sucessivas amostragens (KANEKO et al., 2008). O conjunto de dados aqui demonstrados servirão como “*baseline*” para estudos com outras populações da espécie ou ainda outros primatas congêneres de vida livre (BURNS et al., 1967).

A população amostrada na fase experimental deste estudo apresentou índices significativamente superiores da atividade sérica de AST e CK, quando comparados aos congêneres de cativeiro (*A. g clamitans*). De acordo com as descrições de Almosny (2009), este padrão era esperado diante do episódio de estresse agudo a que os animais de vida livre são submetidos. Diferente dos animais cativos habituados à presença humana, à manipulação e à contenção, os guaribas de mãos ruivas de vida livre jamais tiveram contato com nenhuma dessas situações.

À semelhança de mamíferos domésticos, nota-se aumento da atividade sérica ou plasmática de AST, LDH e CK nas lesões musculares em primatas. A atividade sérica de CK aumenta em razão da atividade muscular durante os procedimentos de captura e contenção, precedendo o aumento de AST e LDH (CAMPBELL, 2007a). A atividade sérica de LDH e AST também esteve significativamente elevada nos animais de vida livre deste estudo, reiterando também os resultados de Vie et al. (1998).

A avaliação laboratorial do metabolismo hepático nos primatas se deu pela mensuração da atividade sérica de LDH, ALT, AST, FA, GGT, bilirrubinas, colesterol, bem como as concentrações séricas de produtos hepáticos como albumina, ureia. No entanto, o perfil encontrado para todos os grupos não apontou alterações compatíveis com lesão ou comprometimento da integridade funcional do órgão. A única enzima com atividade sérica significativamente superior nos adultos foi a gama-glutamilttransferase (GGT), todavia não foi possível fazer qualquer associação deste “aumento” com a faixa etária.

No tecido hepático a atividade de ALT é alta e acredita-se que a atividade aumente com lesão, enquanto o aumento da atividade sérica de AST ocorra somente quando há morte celular (WILLARD et al., 1999). GGT é considerada uma enzima de indução, no entanto está presente em baixas

concentrações nos hepatócitos, no epitélio de ductos biliares, na mucosa intestinal e outros tecidos do corpo (KANEKO et al., 2008). Apesar de sua atividade sérica significativamente maior nos animais jovens no inverno, não se pode fazer qualquer associação sazonal. Neonatos e animais jovens de espécies domésticas apresentam atividade sérica comumente elevada desta enzima (LASSEN 2007), o que também pode ser notado para a espécie de primata neotropical.

A mensuração da atividade sérica de lactato-desidrogenase é considerada um teste inespecífico para a doença hepática em primatas; é necessário o perfil da isoenzima LDH para determinar a causa de seu aumento de atividade (LASSEN, 2007).

A atividade sérica de fosfatase alcalina foi significativamente maior nos primatas jovens, quando comparados aos adultos. Em todas as espécies ocorre aumento de atividade sérica de ALP (FA) quando há maior atividade osteoblástica (KANEKO et al., 2008). O autor pondera que esse aumento costuma ser discreto e é detectado em animais jovens em fase de crescimento, nos quais a atividade da enzima está na faixa de normalidade para adultos.

De acordo com Almosny (2009), a estrutura das vias urinárias de macacos muito se assemelha à de humanos, salvo algumas pequenas variações morfológicas que não chegam a influenciar na osmolalidade, quando comparada à urina humana. Segundo a autora, a elevação dos níveis séricos de ureia e creatinina são um forte indício de insuficiência renal aguda ou crônica, embora o aumento possa ocorrer em situações de catabolismo proteico, nas infecções, traumatismos ou hemorragias digestivas. A ureia sérica é mais sensível que a creatinina nas situações de diminuição do fluxo urinário e sua elevação precede à creatinina nas oligúrias e desidratação (KANEKO et al., 2008)

Os níveis séricos de creatinina foram significativamente superiores nos animais adultos deste estudo. Em função da espécie e do sexo, pode haver secreção de pequena quantidade de creatinina nos túbulos renais, como em pacientes humanos do sexo masculino (FETTMAN e REBAR, 2007). Fatores como as citocinas que provocam o aumento do catabolismo muscular endógenos na caquexia causada por septicemia ou câncer, podem aumentar a liberação e produção de creatinina WILLARD et al. (1999).

O caso dos guaribas de mãos ruivas em particular, pouco se tem documentado a respeito do metabolismo proteico, assim como para muitas espécies neotropicais (ALMOSNY, 2009). A dieta da espécie parece ser predominantemente frugívora, alternando o consumo de folhas jovens maduras e botões florais de diversas espécies vegetais, conforme a disponibilidade e estação do ano (BONVICINO et al., 1989; JARDIM e OLIVEIRA, 1997b; PINA et al., 2002; SOUZA et al., 2002). Devido às diferentes estratégias de forrageamento entre ambientes e estações do ano, torna-se bastante complexa a compreensão dos níveis proteicos consumidos e metabolizados pelo primata.

Ainda a respeito das variáveis influenciadas pela dieta dos espécimes, as concentrações de colesterol sérico dos animais de vida livre apresentaram níveis três vezes menores, quando comparados aos congêneres de cativeiro. Mesmo com jejum de pelo menos 12 horas para ambas as populações amostradas, a composição da dieta influencia significativamente os níveis séricos de colesterol, promovendo aparente desbalanço nos mecanismos de síntese e excreção.

A verificação da função renal é complementada com a avaliação sérica de cálcio, fósforo, sódio, potássio e provas de depuração (POLZIN et al., 1995). Devido à falta de parâmetros referência para a maioria dos eletrólitos aferidos, os índices de fósforo, cálcio, sódio e potássio parecem estar dentro do intervalo esperado para o grupo. Cloretos, sódio, fósforo, potássio podem se elevar ou diminuir em diversas situações, dentre elas a desidratação hipo e hipernatrêmica e esforço físico, atuando como reguladores do balanço hidroeletrólítico dos primatas (ALMOSNY e MONTEIRO, 2006).

Os índices de magnésio encontrados para *Alouatta belzebul* apresentaram-se inferiores aos de outras espécies (*Alouatta seniculus* e *Alouatta pigra*). Vários distúrbios metabólicos e endócrinos estão associados à hipomagnesemia, inclusive a diabetes melito, hipofosfatemia, podendo acarretar perda concomitante de K e cálcio (FETTMAN, 2007; KANEKO et al., 2008).

Sabe-se que em um primata adulto, a água corresponde a cerca de 60% do peso corporal e nos neonatos a água alcança 85% e, por isso a desidratação causa efeitos graves rapidamente (ALMOSNY, 2009). As necessidades e a taxa metabólica de animais jovens, menores que os adultos

da mesma espécie, são relativamente maiores (FETTMAN, 2007). A mensuração dos eletrólitos dos espécimes clinicamente saudáveis contribuem para a compreensão dos parâmetros fisiológicos do equilíbrio hidro-eletrolítico da espécie.

Existem alguns estudos destes parâmetros para os primatas neotropicais em cativeiro (SOUSA-JUNIOR, 2007), mas poucos estudos com animais de vida livre (VIE et al. 1998; THOISY et al., 2001; ROVIROSA-HERNANDES et al., 2012). Os poucos registros possuem perfis bastante similares no que diz respeito à maioria das variáveis, inclusive sobre a concentração das proteínas plasmáticas e séricas.

Estudos como os de Rovirosa-Hernandez et al. (2012) com *Alouatta seniculus* na Guiana Francesa apresentaram valores de albumina e proteínas totais séricas muito similares aos encontrados para o congênera da amazônia brasileira. Em ambos estudos, concentração de albumina e os teores de proteína total sérica parecem flutuar proporcionalmente mediante as situações de desidratação, sem qualquer associação com doença hepática ou distúrbios que cursem com hipoproteinemia.

6.4. Imunofenotipagem e Avaliação Quantitativa de Linfócitos

O primeiro resultado inédito evidenciado pela imunofenotipagem diz respeito à reatividade das duas espécies de primatas do Novo Mundo (*Alouatta guariba clamitans* e *Alouatta belzebul*) aos anticorpos anti-CD3 e anti-BSAP PAX5, específicos para linfócitos humanos.

Estudos com primatas não humanos tem mostrado que seus linfócitos possuem morfologia e algumas moléculas de superfície bastante semelhantes aos da espécie humana (HAYNES et al., 1982). Estes achados denotam a proximidade de parentesco evolutivo entre ambos, diante da capacidade de anticorpos monoclonais identificarem antígenos leucocitários humanos (TERREL et al., 1977; TORLAKOVIC et al., 2002).

Desde 1977, Terrel e colaboradores já realizavam estudos em que foram detectados os primeiros antígenos de superfície em linfócitos de macacos rhesus (*Macaca mulata*), detectando estruturas receptoras de

imunoglobulinas para fixação do complemento, semelhantes aos linfócitos da espécie humana. Em 1979, Parham et al. utilizando anticorpos monoclonais, conseguiu concluir que humanos possuíam alguns epítomos monomórficos, enquanto que em algumas espécies de primatas eles se apresentavam como polimórficos.

Alguns anos mais tarde, Letvin et al. (1983) testaram e confirmaram a ligação de células T do sangue periférico de várias espécies de primatas (hominídeos, pongídeos, lórsídeos, lemuriídeos, cercopitecídeos, aotídeos e calitriquídeos) utilizando um painel de anticorpos monoclonais com especificidade para linfócitos T humanos. Detectaram polimorfismos nas estruturas das populações de CD4 e CD8 e, naquela época, já apontavam seu potencial prognóstico como marcador da susceptibilidade a doenças e, funcionalmente, com fatores causadores de doenças. Este estudo sugeriu, portanto, que espécies do mesmo gênero (estritamente relacionadas em sua filogenia), compartilham estruturas de superfície muito semelhantes.

Neste trabalho, intrigantemente, 100% dos indivíduos da espécie *Alouatta guariba clamitans* (5/5) marcaram positivamente durante a fase teste, enquanto na fase experimental, apenas 20 indivíduos da espécie *Alouatta belzebul* (74%) foram reativos. Vale ressaltar o processamento imediato das amostras da fase piloto, enquanto que as amostras da fase experimental permaneceram até quatro meses na solução fixadora, aguardando processamento; o que pode ter influenciado na imunorreatividade dos epítomos.

Conforme as recomendações de Suthipintawong et al. (1996), as amostras foram fixadas em álcool absoluto (etanol 100%), após a secagem ao ar livre. Segundo os autores, este método de fixação preserva morfologia e imunorreatividade, mas pode ocasionar uma coloração de fundo, minimizada pelo bloqueio da peroxidase endógena. Lâminas totalmente secas ao ar livre, seguidas de etanol 100% possuem melhor qualidade do material fixado, com menor perda de células durante as etapas de marcação (CHIVUKULA e DABBS, 2008).

Além dos fatores inerentes ao processo de armazenamento das amostras, alguns autores mencionam ainda que alguns antígenos de superfície celular se ativam ou modificam sua conformação devido à presença de algum patógeno no organismo ou estado clínico do hospedeiro. Clark et al. (1983)

testando anticorpos monoclonais em diferentes espécies (catarrinos e platirrinos) verificou que dentro da mesma espécie, alguns anticorpos monoclonais reagiram com alguns indivíduos, outros não. Este autor repetiu amostras de um mesmo indivíduo atelídeo (*Ateles fusciceps*) verificando reatividade variável; concluindo, portanto, que o estado de saúde ou variáveis hereditárias poderiam então, influenciar a ausência ou presença dos antígenos.

A complexidade das moléculas de superfície, inclusive CD3, vem sendo estudada desde a década de 80 em primatas não humanos, com vistas a compreender melhor os fenômenos imunológicos de interação celular e imunidade do indivíduo (BORST et al., 1982; NOOIJ et al., 1986a; NOOIJ et al., 1986b; NOOIJ et al., 1986c).

No sangue periférico dos humanos e roedores, CD3 é expresso em 90-95% das células T (KUNG et al. 1979) expresso em alta intensidade nos linfócitos T maduros e em baixa intensidade nos linfócitos imaturos (LEDBETTER et al. 1981). O complexo CD3 consiste em três cadeias polipeptídicas: duas glicoproteínas com uma massa molecular de 25 kDa (cadeia gama), 20 kDa (cadeia sigma) e uma não glicosilada (cadeia épsilon) de 20 kDa (BORST, et al. 1982)

Por meio de anticorpos monoclonais foi demonstrado que CD3 está envolvido na função das células T humanas de várias maneiras: como transdutor de sinais trans-membrana durante o reconhecimento do antígeno pelo receptor, envolvido na indução de fosfoinositida, hidrólise e mobilização de cálcio (BORST et al, 1982).

Como marcador de células B, o anticorpo monoclonal anti-BSAP PAX 5 se mostrou eficaz para marcação dos mesmos 20 animais CD3+. A escolha do anticorpo monoclonal pan pre-B e pan-B cell, baseou-se nas descrições de Torlakovic et al. (2002), Tiacci et al. (2004) e Barcelos et al. (2009) que o classificam como excelente marcador para detecção de precursores à células maduras da linhagem B. Torlakovic et al. (2002) afirmaram ser melhor que CD20 no diagnóstico da leucemia linfoblástica e Tiacci et al. (2004) confirmaram sua superioridade em relação ao correlato CD79. Os sete animais remanescentes foram negativos para CD3 e PAX5, talvez em função do tempo prolongado de armazenamento.

Quanto ao método de quantificação e identificação de subpopulações de linfócitos, o mais utilizado na literatura internacional tem sido a citometria de fluxo (LOKEN et al. 1990). Devido à expressão dos antígenos de superfície não ser restrita apenas a uma linhagem celular, muitas vezes as características de dispersão de luz tem sido utilizada para diferenciar a imunofluorescência associada aos linfócitos (SALZMAN et al. 1990). Todavia, para este painel de anticorpos, o método imunocitoquímico se mostrou satisfatório; permitindo a diferenciação clara dos diferentes imunofenótipos no material citológico.

Estudos interespecíficos com o vírus HIV (humanos e primatas) têm evidenciado as fontes de variabilidade em contagens repetidas de linfócitos T CD4, mesmo com métodos automatizados (MALONE et al. 1990). Segundo os autores, as flutuações diárias nas contagens de linfócitos T CD4 em pacientes humanos soropositivos foram atribuídas ao ciclo diário próprio da linhagem celular e às diferenças inerentes ao processo de contagem total de linfócitos, mesmo que realizadas por um citômetro de fluxo.

O estudo de Reimann et al. (1994) com *Macaca mulatta* enfatizou a importância de se estabelecer “gates” de aquisição de linfócitos, que incluam a maior parte dos linfócitos para que o estudo seja reproduzível. A definição de um “estreito” sítio resulta em perdas significativas de subpopulações de linfócitos. Os autores mostram a distribuição desuniforme dos subconjuntos celulares dentro dos sítios de dispersão da luz, esclarecendo que células B possuem menor dispersão frontal e lateral, enquanto que CD8₊ apresentam configuração oposta. Dessa forma, sugere-se que o aparelho seja adequadamente calibrado para que mais de 90% dos linfócitos sejam incluídos na contagem.

Os valores médios do percentual de linfócitos T e B circulantes registrados por este estudo, em *Alouatta belzebul* foram 51 e 31%, respectivamente, caracterizando o predomínio de linfócitos com o imunofenótipo T. Esta proporção corresponde à prevista por Park et al. (1992), Bittar et al. (2004), Moraes et al. (2009), Pessa-Morikawa et al. (2004) com a espécie bovina, Claman (1972), Terrell et al. (1977), Barton et al. (1984), Sandusky et al. (1986), Ahmed-Ansari et al. (1989), Gust et al. (1992), Reimann et al. (1994) com primatas não humanos e dentro dos intervalos

tradicionalmente preconizados para equinos, caninos, felinos, ovinos, suínos e felinos (TIZARD, 2014).

Estudos com a espécie bovina vêm sendo intensamente desenvolvidos, com o intuito de evidenciar aspectos relativos à “resistência” das raças e seu potencial para cruzamentos. Bittar et al. (2004) identificaram diferentes perfis fenotípicos de linfócitos T e B circulantes em bovinos de origem europeia, considerando as raças Hereford, Pardo Suíça e Holandesa. Esses autores obtiveram 65,8%, 56,9% e 43,1% de linfócitos T, respectivamente, 14,9% de linfócitos B nos animais Hereford e Pardo Suíça e 18,58% nos Holandeses. Os autores sugerem que o perfil fenotípico do sangue periférico de bovinos europeus pode influenciar no padrão da imunidade clínica apresentada pelos animais, relacionando o menor nível de linfócitos T (CD4 e CD8) em animais da raça Holandesa à sua susceptibilidade a infecções por *Babesia* spp.. Enquanto maiores níveis de linfócitos T justificariam a maior resistência da raça Hereford às infecções parasitárias.

Esta mesma proporção de linfócitos T: B foi identificada por Park et al. (1992), Pessa-Morikawa et al. (2004) e Moraes et al. (2009) na espécie bovina. Bovinos da raça curraleiro, conhecidamente denominados “resistentes” (JULIANO, 2006; MORAES et al. 2009), expostos à babesiose e leptospirose apresentaram o mesmo perfil linfocitário, além de nenhuma alteração hematológica, clínica ou bioquímica que denotasse estado mórbido. Ao contrário, as evidências sugerem que os animais apresentaram imunidade contra tais agentes, sem manifestação clínica de doença, indicando resistência ou adaptação suficiente ao hospedeiro.

Em um estudo longitudinal, Ayoub e Yang (1996) verificaram que as contagens de linfócitos totais de bovinos permaneceram elevadas e semelhantes até os seis meses de idade em todos os animais avaliados, sendo que o número de linfócitos T declinou a partir do sétimo e oitavo mês de idade. Para a linhagem B, houve um aumento gradativo sem nenhuma causa aparente, uma vez que os animais apresentavam-se clinicamente sadios. Neste estudo com a espécie de primata amazônico, não se pode inferir sobre o aumento ou diminuição de alguma série linfocitária, pois os animais foram amostrados uma única vez.

De acordo com Jain (1993), uma diminuição no número de linfócitos com a idade poderia ser esperado pelo declínio primário de linfócitos T, em razão da diminuição da função do timo; enquanto o número de linfócitos B permanecia relativamente estável. Nem um dos padrões mencionados por este autor para as variáveis linfocitárias foi observado neste estudo. Os linfócitos T dos adultos tiveram seus valores médios maiores que os jovens e os linfócitos B significativamente superiores nos adultos.

Os machos obtiveram valores médios de linfócitos T e B superiores aos das fêmeas, mas sem significância estatística. Pessa-Morikawa et al. (2004) também encontraram este padrão de linfócitos T superior nos machos, trabalhando com bovinos. Não foram encontradas pesquisas envolvendo primatas não humanos que correlacionassem a influência do fator sexo nas subpopulações de linfócitos.

Alguns fatores ambientais também foram ponderados neste estudo, com o objetivo de verificar se as estações do ano ou covariáveis extrínsecas poderiam influenciar o perfil imunológico dos primatas. Temperatura, umidade e pluviosidade foram verificadas ao longo do ano de 2015, juntamente com as características fitofisionômicas dos locais de captura. Quando agrupados sazonalmente, mesmo com os níveis de pluviosidade significativamente diferentes entre verão e inverno amazônicos, não foram identificadas diferenças estatísticas. As subpopulações de linfócitos T e B registraram valores médios superiores no inverno chuvoso, quando a temperatura registrada é um pouco mais baixa, a precipitação praticamente quadruplica seus índices, caracterizando um período de chuvas torrenciais na floresta amazônica (GOUDING et al., 2003).

Apesar dos diferentes pontos de captura dos espécimes (ilhas e margem), do ponto de vista imunológico, talvez exista uma certa uniformidade de variáveis externas. Em suma, apenas duas fitofisionomias foram detectadas nos diferentes pontos de captura; a perturbação das áreas pela movimentação das máquinas e por último, a macro região ser endêmica de malária, febre amarela e leishmaniose tegumentar (MS, 2016), configuram pontos em comum. Adicionalmente, o clima da região tropical úmida, caracterizado por altos níveis de precipitação pluviométrica e poucos meses de déficit hídrico (SUDAM,

1994), poderia não afetar de forma significativa a oferta de recursos (JARDIM e OLIVEIRA, 1997).

Os desafios imunológicos das espécies de primatas frente aos agentes infecciosos tem sido amplamente analisados, como preditivos de doenças em humanos (BORST, et al., 1982; NEUBAUER et al., 1983; BARTON et al., 1984; NOOIJ et al., 1986a; NOOIJ et al., 1986b; NOOIJ et al., 1986c; SCHIMITZ et al., 1999).

Do mesmo modo que a proximidade filogenética entre as espécies permite estudos que beneficiem o homem, tamanha similaridade facilita o trânsito de agentes infecciosos originalmente animais, para a espécie humana (CALVIGNAC-SPENCER et al., 2012). Estudos como os de Carneiro et al. (2004) utilizando *Sapajus apella* como modelos experimentais de infecção para *Leishmania infantum chagasi*, Langermans et al. (2000) para o *Plasmodium falciparum* e *P. vivax* em *Aotus azarae* ssp. *boliviensis*, Hendrickx et al. (2002), Vasconcelos (2010) para a febre amarela abordam ainda, o potencial dos primatas como sentinelas biológicas frente a surtos de zoonoses emergentes.

No que diz respeito ao habitat, cabe ressaltar o nível de fragmentação e os estágios de sucessão ecológica que as florestas da região se encontram. O domínio vegetal predominante nos fragmentos florestais em terra firme amostrados foi classificado como “Floresta Ombrófila Aberta com Cipós” (LEME, 2008). Esta classificação fitofisionômica denota o grau de perturbação da área, uma vez que a presença maciça dos cipós (lianas) está estreitamente relacionada com a degradação da área (LAURANCE et al., 2001). As lianas compreendem um grupo vegetal menos exigente e oportunista, que prolifera principalmente em áreas degradadas (NASCIMENTO e LAURANCE, 2006).

Estudos recentes associam a presença de florestas infestadas por cipós (“liana-infested-forests”) à perturbação do habitat e sugerem que estas sejam um indicador de fragmentação das florestas tropicais (TYMEN et al., 2016). Evidentemente, a fragmentação florestal prejudica, portanto, o estabelecimento de populações viáveis de primatas (RYLANDS et al., 1997; CHAPMAN et al., 2013).

O isolamento das populações de primatas de vida livre, em decorrência do desmatamento, dos efeitos de borda e das mudanças na composição florística interfere diretamente no seu *status* imunológico e configuram a

principal ameaça ao táxon (KOWALEWSKI et al., 2015). O cenário de isolamento intra-grupo das populações de *Alouatta belzebul* na região de estudo parece iminente, uma vez que os índices de salvamento dos espécimes de cada bando é extremamente variável e a soltura dos espécimes acontece nos remanescentes florestais com características diferentes do original.

A separação social nos primatas não humanos (mãe-filhote ou par a par) tem demonstrado afetar os parâmetros cardíacos, temperatura corporal, padrões de sono, os níveis de cortisol (CLAMAN, 1972) e conseqüentemente a resposta imune (BOCIA et al. 1989). O contato dos infantes com adultos alóctones pode influenciar negativamente a resposta imune, modulando a resposta imunológica frente a um agente estressor. Experimentos com macacos rhesus juvenis (GUST, et al. 1992), removidos do contato materno em diferentes idades, demonstrou redução significativa dos níveis de IgG, linfócitos T CD4 (-56,9%), T CD8 (-57,6%) , seguida de elevação drástica dos níveis de cortisol (+43,9%).

Diante dos desafios imunológicos a que estes animais estão submetidos constantemente, presume-se que o perfil imunológico encontrado corresponde ao *status* ótimo de sobrevivência, conforme deduzido por Graham et al. (2010). De acordo com estes autores, a pressão exercida por parasitas e agentes infecciosos e ambientais deveria favorecer os mecanismos de resistência e de uma forte imunidade. Entretanto, um sistema imunológico efetivo implica gastos energéticos significativos; investimentos excessivos na imunidade podem prejudicar outros mecanismos-chave de sobrevivência, como a capacidade reprodutiva. O custo de respostas imunológicas elevadas são tais que, em média, os animais desenvolvem “ótima”, em vez de máxima imunidade.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os registros morfométricos dos espécimes amostrados neste estudo trouxeram evidências e indagações sobre a real colonização dos ambientes insulares do Baixo rio Xingu pelo complexo grupo polimórfico *Alouatta belzebul*. A proximidade das ilhas com o continente no período de vazante pode ter

facilitado o acesso de populações de ambas margens, que em tese, seriam isoladas pela grande barreira geográfica.

Os aspectos clínico-patológicos associados às variáveis ambientais revelaram a capacidade da espécie em sobreviver em ambientes perturbados, e o respectivo impacto clínico, em nível populacional. As variáveis ambientais influenciam sim, o perfil das variáveis hematológicas e bioquímicas, no entanto de maneira distinta, nas diferentes situações de estresse.

Sem dúvida, um sistema imunológico funcional é fundamental para a sobrevivência em ambiente natural, principalmente diante dos inúmeros desafios imunológicos inerentes ao ambiente em que a espécie está inserida. O estabelecimento dos parâmetros clínico-patológicos de populações saudáveis permitirá o reconhecimento dos limites entre saúde e doença, bem como servir de referência para estudos que visem à conservação do táxon.

Ainda que os animais estejam submetidos a fontes de estresse contínuo e dispendendo grande energia para estabelecer uma resposta imune eficaz, sua plasticidade adaptativa pode se esgotar. Esses resultados devem servir de referência para futuros programas de manejo de guaribas, minimizando os efeitos nocivos do estresse sobre os indivíduos, com vistas a preservar as populações selvagens.

A caracterização do *status* morfológico e clínico-patológico desta população selvagem de guaribas de mãos ruivas almeja ainda, despertar o interesse dos órgãos ambientais reguladores para o risco iminente de desaparecimento que a espécie está inserida. Caso não sejam eliminadas ou pelo menos mitigadas, a redução do habitat, o isolamento de populações, o compartilhamento de patógenos e a ausência de políticas públicas específicas de conservação culminarão com a extinção das populações *in situ*.

8. CONCLUSÕES

Os parâmetros biométricos obtidos para esta população amazônica de *Alouatta belzebul* são bastante similares aos poucos estudos para a espécie e para outros congêneres. Ainda que a espécie não possua dicromatismo sexual, tais estruturas anatômicas variaram significativamente em tamanho, entre os sexos, permitindo até mesmo a diferenciação etária do táxon.

Os parâmetros bioquímicos foram influenciados mais fortemente pela idade dos espécimes, do que pelo sexo ou estação do ano. Os índices são compatíveis com outros estudos com o gênero *Alouatta* em vida livre, em que a circunstância do estresse foi semelhante.

Os parâmetros hematológicos também apresentaram pouca distinção entre machos e fêmeas. As diferenças estatisticamente relevantes foram encontradas entre as diferentes faixas etárias e quanto às variáveis ambientais, principalmente relacionadas à disponibilidade hídrica das estações.

A utilização da técnica de imunofenotipagem das células linfoides permitiu a caracterização quantitativa das subpopulações linfocitárias, contribuindo para a compreensão da resposta imunológica da espécie, frente aos agentes estressores sazonais e infecciosos.

9. BIBLIOGRAFIA

ABBINK, P.; LAROCCA, R.; DE LA BARRERA, R. A.; BRICAULT, C. A.; BAROUK, D. H. Protective efficacy of multiple vaccine platforms against Zika virus challenge in rhesus monkeys. *Science*, 2016.

AGORAMOORTHY, G. & RUDRAN, R. Field Application of Telazol® (Tiletamine Hydrochloride and Zolazepam Hydrochloride) to immobilize wild red howler monkeys (*Alouatta seniculus*) in Venezuela. *Journal of Wildlife Disease*, v. 30, n. 3, p. 417-420, 1994.

AHMED-ANSARI, A.; BRODIE, A. R.; FULTZ, P. N.; ANDERSON, D. C.; SELL, K. W.; McCLURE, H. M. Flow Microfluorometric Analysis of Peripheral Blood Mononuclear Cells from Nonhuman Primates: Correlation of Phenotype with Immune Function. *American Journal of Primatology*, n. 17, p. 107-131, 1989.

ALBERT, D. L.; BRODIE, S. J.; SASSEVILLLE, V. G.; RINGLER, D. J. Peripheral Blood Eosinophilia in Owl Monkeys is Associated With Increased Eosinophilopoiesis yet Depressed Recruitment Kinetics to the Chemokine RANTES. *Blood*, v. 88, n. 5, p. 1718-1724, 1996.

AYOUB, I. A. & YANG, T. J. Age Dependent changes in peripheral blood lymphocyte subpopulations in cattle: a longitudinal study. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 20, n. 5, p. 353-363, 1996.

ALMOSNY, N. R. P.; Patologia Clínica em Primatas. In.: KINDLOVITS, A. & KINDLOVITS, L. M. *Clínica e Terapêutica em Primatas Neotropicais*. 2. ed. Rio de Janeiro: L. F. Livros, p. 69-88, 2009.

ALMOSNY, N. R. P.; MONTEIRO, A. O. Patologia Clínica. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Org.). *Medicina Veterinária de Animais Selvagens*. 1. ed. São Paulo: Editora Roca, 2006, v. 1, p. 939-966.

ALMOSNY, N. R. P.; SANTOS, L. C. Laboratory in Wild Animals. 2000. In: FOWLER, M. *Biology, medicine and surgery of South american wild animals*. Editora Iowa State University, p.300-320, 2000.

BALMFORD, A.; BRUNER, A.; COOPER, P.; CONSTANZA, R.; FARBER, S.; GREEN, R. E.; JENKINS, M.; JEFFERIS, P.; JESSAMY, V.; MADDEN, J.; MUNRO, K.; MYERS, N.; NAHEEM, S.; PAAVOLA, J.; RAYMENT, M.; ROSENDO, S.; ROUGHGARDEN, J.; TRUMPER, K.; TURNER, R. K. Economic Reasons for Conservaing Wild Nature. *Science*, v. 297, n. 950, 2002.

BARCELOS, M. M.; NAVARINI, A. L. F.; BELLETINI, R. W.; I-CHING, L.; SANTOS-SILVA, M. C. Importância da análise da Proteína PAX 5 no diagnóstico diferencial entre linfoma de Hodgkin e linfoma difuso de grandes células B em biópsias de mediastino. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 31, n. 5, 2009.

BARNI, P. E.; FEARNSIDE, P. M.; GRAÇA, P. M. L. A. Simulating Forestation and Carbon Loss in Amazonia: Impacts in Brazil's Roraima State from Reconstructing Highway BR-319 (Manaus-Porto Velho). *Environmental Management*. v. 55, n. 2, p. 259-278, 2015.

BARTON, R. W.; THRALL, R. S.; NEUBAUER, R. H.; Binding of Human Lymphocyte-specific monoclonal antibodies to Common Marmostet lymphoid Cells. *Celular Immunology*, v. 84, p. 446-452, 1984.

BERNARD, A.; BOUMSELL, L. The Clusters of Differentiation defined by the First International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens. *Human Immunology*, v. 11, n. 1, p. 1-10, 1984.

BITTAR, J. F. F.; RIBEIRO, M. F. B.; MARCIANO, A. P. V.; SALCEDO, J. H. P. MARTINS FILHO, O. A. Perfil fenotípico de linfócitos periféricos de bovinos de raças europeias. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 56, n.1, p. 107-110, 2004.

BLANK, M. S.; GORDON, T. P.; WILSON, M. A. Effectsof capture and venipuncture on sérum levels of prolactina, growth hormone and cortisol in outdoor compoun-housed female rhesus monkey (*Macaca mulata*). *Acta Endocrinologica*, v. 102, p.190-195, 1983.

BOCIA, M. L.; REITE, M.; KAEMINGK, K.; HELD, P.; LAUDENSLAGER, M. Behavior and autonomic responses to peer separation in pigtail macaque monkey infants. *Developmental Psychobiology*, v. 22, p.447-461, 1989.

BONVICINO, C. R.; LANGGUTH, A.; MITTERMEIER, R. A. Study of pelage color and geographic distribution in *Alouatta belzebul* (Primates: Cebidae). *Revista Nordestina de Biologia*, v. 6, n. 2, p. 139-148, 1989.

BOARETTO, J. L.; SILVA, K. S. M.; IMBELONI, A. A.; SILVA, G. A.; CASTRO, P. H.; TORRES, L. B.; SILVA, B. A. Avaliação de parâmetros hematológicos, fisiológicos e perfil bioquímico em *Chlorocebus aethiops* induzidos ao Mal de Parkinson e à Leucemia aguda. 8º Seminário Anual de Iniciação Científica e 2º Seminário de Pesquisa da UFRA. Anais do 8º Seminário Anual de Iniciação Científica e 2º Seminário de Pesquisa da UFRA, 2010.

BORST, J.; PRENDIVILLE, M. A.; TERHORST, J. Complexity of the Human T-lymphocyte-specific cell surface antigen T3. *The Journal of Immunology*, v. 128, p. 1560-1565, 1982.

BRADLEY, B. J.; MUNDY, N. I. The Primate Palette: The Evolution of Primate Coloration. *Evolutionary Anthropology*, v.17, p. 97-111, 2008.

BURNS, K. F.; FERGUSON, F. G.; HAMPTON, S. H. Compendium of Normal Blood Values for Baboons, Chimpanzees and Marmosets. *The American Journal of Clinical Pathology*, v. 48, n. 5, 1967.

CALVINAG-SPENCER, S. LEENDERTZ, S. A. J.; GILLESPIE, T. R.; LEENDERTZ, F. H. Wild great apes as sentinels and sources of infectious disease. *Clinical Microbiology and Infection*, n. 18, p.521-527, 2012.

CAMARGO, C. C. e FERRARI, S. S. Observations of daytime births in two groups of red-handed-howlers (*Alouatta belzebul*) on an island in the Tucuruí Reservoir in eastern Brazilian Amazonia. *American Journal of Primatology*, v. 69, p.1075-1079, 2007.

CAMPBELL, J. M. & CAMPBELL, J. B. *Matemática de Laboratório – Aplicações Médicas e Biológicas*. 3. ed. São Paulo: ROCA, 1986. 347p.

CAMPBELL, T. W. Bioquímica Clínica de Mamíferos: Animais de Laboratório e Espécies Variadas. In: THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPBELL, T. W.; DeNICOLLA, D.; FETTMAN, N. J.; LASSEN, D. E.; REBAR, A.; WEISER, G. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. São Paulo: ROCA, 2007. cap. 31, p. 433-447a.

CAMPBELL, T. W.; ELLIS, C. K. *Avian & Exotic Animal Hematology and Cytology*. 3. ed. Iowa: Blackwell Publishing. 2007, 279p.

CAMPBELL, T. W. Hematologia de Mamíferos: Animais de Laboratório e Espécies Variadas. In: THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPBELL, T. W.; DeNICOLLA, D.; FETTMAN, N. J.; LASSEN, D. E.; REBAR, A.; WEISER, G. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. São Paulo: ROCA, 2007. cap. 16, p. 201-214b.

CARNEIRO, L. A.; SILVEIRA, F. T.; CAMPOS, M. B.; BRIGIDO, M. C. O.; GOMES, C. M. C.; CORBETT, C. E. P.; LAURENTI, M. D. Susceptibility of *Cebus paella* Monkey (Primates: Cebidae) to Experimental *Leishmania (L.) infantum chagasi*-Infection. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 53, n. 1, p.45-50, 2011.

CAULKETT, N. A. & ARMENO, J. M. Imobilização Química de Mamíferos Terrestres de Vida Livre. In: *Lumb & Jones Anestesiologia e Analgesia Veterinária*. São Paulo: ROCA, 2013. cap. 32, p. 884 – 913.

CHAPMAN, C. A.; BONNEL, T. R.; GOGARTEN, J. F.; LAMBERT, J. E.; OMEJA, P. A.; TWINOMUGISHA, D.; WASSERMAN, M. D.; ROTHMAN, J. M. Are Primates Ecosystem Engineers? *International Journal of Primatology*, v. 34, p.1-14, 2013.

CHIVUKULA, M.; DABBS, D. J. Immunocytochemistry. In: BIBO, M.; WILBUR, D. *Comprehensive Cytopathology*. 3. ed. China: Saunders Elsevier, 2008, cap.35, p. 1043-1069.

CLAMAN, H. N. Corticosteroids and Lymphoid Cells. *The New England Journal of Medicine*, v. 287, n. 8, 1972.

CLARK, E. A.; MARTIN, P. J.; HANSEN, J. A.; LEDBETTER, J. A. Evolution of Epitopes on Human and Nonhuman Primate Lymphocyte Cell Surface Antigens. *Immunogenetics*, v. 18, p. 599-615, 1983.

CORTÉS-ORTIZ, L.; BERMINGHAM, E.; RICO, C.; RODRIGUÉZ-LUNA, E.; SAMPAIO, I.; RUIZ-GARCIA, M. Molecular systematics and biogeography of the Neotropical monkeys genus *Alouatta*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*.v. 26, p.64-81, 2003.

CORTÉS-ORTIS, L.; RYLANDS, A. B.; MITTERMEIER, R. A. The Taxonomy of Howler Monkeys: Integrating Old and New Knowledge from Morphological and Genetic Studies. In.: KOWALEWSKI, M. M.; GARBER, P. A.; CORTES-ORTIZ, L.; URBANI, B.; YOULATUS, D. *Howler Monkeys: Adaptive Radiations, Systematics and Morphology*, New York: Springer, 2015, p.55-84.

COSTA, L. P.; LEITE, Y. L. R.; MENDES, S. L.; DITCHFIELD, A. D. Mammal Conservation in Brazil, *Conservation Biology*, v. 19, n 3, 2005.

CROCKETT, C. M. Conservation Biology of Genus *Alouatta*. *International Journal of Primatology*, v. 19, n. 3, p. 549-578, 1998.

DOLLMAN, G. (1910) XLV. - A note of *Alouatta discolor* of Spix. *Annals and Magazine of Natural History: Series 8*, v.6., n. 34, p.422 – 424, DOI: 10.1080/00222931008692868. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/00222931008692868>.

DUARTE, J. M. B. Implicações Genéticas, Ecológicas e Sanitárias nos Processos de Movimentação de Fauna. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. *Tratado de Animais Selvagens-Medicina Veterinária*. 2. ed. São Paulo: ROCA, 2014, p.2339-2349.

ELLINGSWORTH, L. R.; OSBURN, B. I.; HAYASHI, L. G.; HOLMBERG, C. A. Characterization of rhesus macaque peripheral blood T-lymphocytes subpopulations. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 4, p. 517-532, 1983.

EMMONS, L. H. & FEER, F. *Neotropical Rainforest Mammals: a Field Guide*. ed. Chicago: University Chicago Press, 1990. 281 p.

FEARNSIDE, P. M. Deforestation in Brazilian Amazonia: History, Rates and Consequences. *Conservation Biology*, v. 19, n.3, 2005.

FLAIBAN, K. K. M. C. *Valores Hematológicos de Macacos-prego (Cebus cay e Cebus nigritus) e Bugios pretos (Alouatta caraya) de vida livre da região do Alto Rio Paraná, Sul do Brasil*. 2006. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

FLAIBAN, K. K. M. C.; SPOHR, K. A. H.; MALANSKI, L. S.; SVOBODA, W. K.; SHIOZAWA, M. M.; HILST, C. L. S.; AGUIAR, L. M.; LUDWIG, G.; PASSOS, F. C.; NAVARRO, I. T.; LISBÔA, J. A. N.; BALARIN, M. R. S. Valores hematológicos de bugios pretos (*Alouatta caraya*) de vida livre da região do Alto Rio Paraná, sul do Brasil. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 61, n.3, p. 628-634, 2008.

FETTMAN, M. J.; REBAR, A. Avaliação Laboratorial da Função Renal. In: In: THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPBELL, T. W.; DeNICOLLA, D.; FETTMAN, N. J.; LASSEN, D. E.; REBAR, A.; WEISER, G. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. São Paulo: ROCA, 2007. cap. 21, p. 285-310.

FOWLER, M. E. *Zoo & Wild Animal Medicine*. 2. Ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1986.

GOULDING, M.; BARTHEM, R.; FERREIRA, E. *The Smithsonian Atlas of Amazon*. The Smithsonian Institute, 2003.

GOUVEIA, S. F.; VILLALOBOS, F.; DOBROVOLSKI, R.; BELTRÃO-MENDES, R.; FERRARI, S. Forest Structure drives global diversity of primates. *Journal of Animal Ecology*. 2014.

GODBOLD, J. A.; SOLAN, M. Long-term effects of warming and ocean acidification are modified by seasonal variation in species responses and environmental conditions, *Philosophical Transactions of The Royal Society B*. v. 38, 2016

GRAHAM, A. L.; HAYWARD, A. D.; WATT, K. A.; PILKINGTON, J. G.; PEMBERTON, J. M.; NUSSEY, D. H. Fitness Correlates of Heritable Variation in Antibody responsiveness in a wild mammal. *Science*, v. 330, p.662-665, 2010.

GREER, J. P.; ARBER, D. A.; GLADER, B.; LIST, A. F.; MEANS Jr., R. T.; PARASKEVAS, F.; RODGERS, G. M.; FOERSTER, J. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 13. ed. Lippincott Williams & Wilkins. 2013. 2312p.

GREGORIN, R. Taxonomia e Variação Geográfica das espécies do gênero *Alouatta* Lacépède (Primates, Atelidae) no Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 23, n. 1, p. 64-144, 2006.

GREGORIN, R.; KUGELMEIER, T.; DEL RIO DO VALLE, R. Gênero *Alouatta*. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; ANDRADE, F. R. *Primates Brasileiros*. Londrina: Technical Books, 2008. cap. 19, p. 189-204.

GUST, D. A.; GORDON, T. P.; WILSON, M. E.; BRODIE, A. E.; AHMED-ANSARI, A.; McCLURE, H. M. Removal from Natal Social group to Peer Housing Affects Cortisol Levels and Absolute Numbers of T Cell Subsets in juvenile Rhesus Monkeys. *Brain, Behavior and Immunity*, v. 6, p.189-199, 1992.

HARVEY, J. W. *Atlas of Veterinary Hematology, Blood and Bone marrow of Domestic Animals*. Philadelphia: Elsevier, 2001, 224p.

HAWKEY, C. M. *Comparative Mammalian Haematology*. Great Britain: The Whitefrias Press, 1975, 311p.

HAWKEY, C. M.; DENNET, T. B. *A Colour Atlas of Comparative Veterinary Haematology*. England: W. S. Cowell Ltd., 1989, 190p.

HAYNES, B. F.; DOWELL, B. L.; HENSLEY, L. L.; GORE, I.; METZGAR, R. S. Human T Cell Antigen Expression by Primate T Cells. *Science*, v. 215, p. 298-299, 1982.

HENDRICKX, A. G.; NAKORI, M.; PETERSON, P.; The Nonhuman Primate as a model of developmental immunotoxicity. *Human and experimental Toxicology*, v.21, p.537-542, 2002.

HERSHKOVITZ, P. *Living New World Monkeys (Platyrrhini): with an introduction to Primates*, University of Chicago Press, v. 1, 1977, 1210p.

HSU, S. M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and

unlabeled (PAP) procedures. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 29, n. 4, p. 577-580, 1981.

HUSER, H. T. *Atlas of Comparative Primate Hematology*. New York: Academic Press, 1970. 405p.

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. *Protocolo para Coleta de Dados sobre Primatas em Unidades de Conservação da Amazônia*. Brasília, 2012, 38p.

IVES, M. D. G. M. "Alarm reaction" and normal blood picture in *Macaca mulata*. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* .v. 47, p.723-729, 1956.

JAIN, N. C. *Essentials of Veterinary Hematology*. Pennsylvania: Lea and Febiger, 1993. 989p.

JARDIM, M. M. A.; OLIVEIRA, L. F. B. Vocalização de um grupo de guaribas (*Alouatta belzebul*). In: Caxiuanã Populações Tradicionais, Meio Físico e Diversidade Biológica. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 2002.p. 697-604a.

JARDIM, M. M. A.; OLIVEIRA, L. F. B. Uso do espaço de *Alouatta belzebul* (Primates, Cebidae) em Função da Temporalidade de Recursos. *Caxiuanã*. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 1997. cap. 29.p. 417-436b.

JONES, M.; CORDEL, J. L.; BEYERS, A. D.; TSE, A. G.; MASON, D. Y. Detection of T and B cells in many animal species using cross-reactive anti-peptide antibodies. *The Journal of Immunology*, n.150: p. 5429-5435, 1993.

JULIANO, R. S. Aspectos sanitários e imunológicos de bovinos da raça curraleiro. 107f. Tese (Doutorado). Programa de Pós Graduação em Sanidade Animal, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6.ed. USA: Elsevier, 2008. 913 p.

KERR, M. G. *Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária – Bioquímica Clínica e Hematologia*. 2. ed. São Paulo: ROCA, 2003. 436 p.

KIMURA, K.; GOFF, J. P.; KEHRLI Jr, M. E.; HARP, J. A.; Phenotype analysis of peripheral blood mononuclear cells in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 82, n. 2, p. 315-319, 1999.

KINDLOVITS, A. & KINDLOVITS, L. M. *Clínica e Terapêutica em Primatas Neotropicais*. 2. ed. Rio de Janeiro: L. F. Livros de Veterinária, 2009. 535 p.

KLEMM, W. R. Fisiologia Comportamental. In: SWENSON, M. J.; REECE, W. O. Dukes – Fisiologia dos Animais Domésticos. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. P.825-841.

KOWALEWSKI, M. M.; GARBER, P. A.; CORTES-ORTIZ, L.; URBANI, B.; YOULATUS, D. Why is it Important to Continue Studying the Anatomy, Physiology, Sensory Ecology and Evolution of Howler Monkeys. In: KOWALEWSKI, M. M.; GARBER, P. A.; CORTES-ORTIZ, L.; URBANI, B.; YOULATUS, D. *Howler Monkeys: Adaptive Radiations, Systematics and Morphology*, New York: Springer, 2015. cap. 1, p. 3-17.

KOWALEWSKI, M. M.; GARBER, P. A.; CORTES-ORTIZ, L.; URBANI, B.; YOULATUS, D. *Howler Monkeys: Adaptive Radiations, Systematics and Morphology*, New York: Springer, 2015, 436p.

KUNG, P. C.; GOLDSTEIN, G.; REINHERZ, E. L.; SCHLOSSMAN, S. F. Monoclonal Antibodies Defining Distinctive Human T cell surface antigens. *Science*, v. 216, 1979.

LANGERMANS, J. A. M.; VERVENE, R. A.W.; HERBACH, J.; THOMAS, A. W. Reactivity of human T-lymphocyte-specific antibodies with peripheral blood mononuclear cells and spleen of *Aotus azarae* ssp. *boliviensis* (owl monkey) *Journal of Medical Primatology*, v. 29, p. 397-401, 2000.

LARSSON, M. H. M. A.; LUCAS, S. R. R.; MIRANDOLA, R. M. S.; LAZARETTI, P.; FEDULLO, J. D. L.; GUIMARAES, M. A. B. V. Valores de Referência das Provas de Função Hepática, Renal e de alguns eletrólitos em *Cebus apella* anestesiados com cetamina. *Ciência Rural*, v. 27, n. 2, 1997.

LASSEN, E. D. Considerações sobre Interpretação de Resultados de Exames Laboratoriais. In: THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPBELL, T. W.;

DeNICOLLA, D.; FETTMAN, N. J.; LASSEN, D. E.; REBAR, A.; WEISER, G. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. São Paulo: ROCA, 2007. cap. 3, p. 43-50.

LASSEN, E. D.; WEISER, G. Tecnologia Laboratorial em Medicina Veterinária. In: THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPBELL, T. W.; DeNICOLLA, D.; FETTMAN, N. J.; LASSEN, D. E.; REBAR, A.; WEISER, G. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. São Paulo: ROCA, 2007. cap. 1, p. 3-36.

LAURANCE, W. F.; COCHRANE, M. A.; BERGEN, S.; FEARNSIDE, P. M.; DELAMONICA, P.; BARBER, C.; D'ANGELO, S.; FERNANDES, T. The Future of the Amazon. *Science*, v. 291, .n. 19, 2001.

LEDBETTER, J. A.; EVANS, R. L.; LIPINSKI, M.; CUNNINGHAM-RUNDLES, C.; GOOD, R. A.; HERZENBERG, R. A. Evolutionary Conservation of Surface Molecules that Distinguish T Lymphocyte Helper/inducer and Cytotoxic/Supressor subpopulations in Mouse and Man. *Journal of Experimental Medicine*, v. 153, p. 310-323, 1981.

LEME. Aproveitamento Hidrelétrico Belo Monte: Estudo de Impacto Ambiental. Leme Engenharia Ltda, 2009.

LETVIN, N. L.; KING, N. W.; REINHERZ, E. L.; HUNT, R. D.; LANE, H.; SCHLOSSMAN, S. F. T Lymphocyte surface antigens in primates. *European Journal of Immunology*, n. 13, p. 345-347, 1983.

LEVY, P. S.; LEMESHOW, S. *Sampling for Health Professionals*. Belmont: LLP, 1980.

LIMA, M. M. C. E SEUÁNEZ, H. N. Cytogenetic Characterization of *Alouatta belzebul* with Atypical Pelage Coloration. *Folia Primatologica*, n. 52, p. 97-101, 1989.

LIPMAN, N. S.; JACKSON, L. R.; TRUDEL, L. J.; WEIS-GARCIA, F. Monoclonal vs Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications and Information Resources. *ILAR*, v. 49, n. 3, 2005.

LOKEN, M. R.; BROSNAN, J. M.; BACH, B. A. AULT, K. A. Establishing Optimal Lymphocyte Gates for immunophenotyping by Flow Cytometry. *Cytometry*, v. 11, p. 453-459, 1990.

MAHAR, D. J. Government Policies and Deforestation in Brazil's Amazon Region. *The World Bank*. Washington DC, 1989. 64p.

MALONE, J. L.; SIMMS, T. E.; GRAY, G. C.; WAGNER, K. F.; BURGE, J. R.; BURKE, D. S. Source of Variability in repeated T-Helper Lymphocyte Counts from Human immunodeficiency Virus Tipe 1-Infected Patients: Total Lymphocyte Count Flutuations and Diurnal Cycle are Important. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, v. 3, p.144-151, 1990.

MAROTTI, J.; GALHARDO, A. P. M.; FURUYAMA, R. J.; PIGOZZO, M. N.; CAMPOS, T. N.; LAGANÁ, D. C. Amostragem em pesquisa Clínica: tamanho da amostra. *Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo*. v. 20, n. 2, p.186-194, 2008.

MENDOÇA-FURTADO, O. Medidas de Metabólitos de Cortisol em macacos-prego (Gênero: Sapajus): análise comparativa entre populações para investigação de fatores estressores. 2012. 113f. Tese (Doutorado) – Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, SP.

MMA, 2014. Ministério do Meio Ambiente. Instrução Normativa nº 444 de 17 de dezembro de 2014. *Lista Nacional das Espécies de mamíferos, aves, répteis, anfíbios e invertebrados terrestres ameaçados de extinção*. Diário Oficial da União, Brasília.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Grupo de Trabalho em Arboviroses, Sistema de Vigilância em Saúde. Portal da Saúde. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-febre-amarela>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. *Guia de Vigilância de Epizootias em Primatas Não Humanos e Entomologia aplicada à Vigilância da Febre Amarela*. 2. ed. Brasília: Editora MS, 2014, 102p.

MOORE, D. M. Hematology of Nonhuman Primates. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. *Schalm's Veterinary Hematology*. 5. ed. Canada: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, cap. 176, p. 1133- 1144.

MORAES, J. M.; BRITO, L. A. B.; DE MOURA, V. M. B. D.; RIBEIRO, C. S.; GUIMARAES, V. Y.; ANDRADE, D. D.; LOBO, J. R.; FIORAVANTI, M. C. S. Imunofenotipagem e Avaliação Quantitativa de linfócitos circulantes de bovinos da raça Curraleiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 29, n. 4, p. 339-344, 2009.

MORAN, E. F.; Deforestation and Land Use in the Brazilian Amazon. *Human Ecology*, v. 21, n.1,1993.

NASCIMENTO, F. F.; BONVICINO, C. R.; DE OLIVEIRA, M. M.; SCHNEIDER, M. P. C.; SEUÁNEZ. H. N. Population Genetic Studies of *Alouatta belzebul* from the Amazonian and Atlantic Forests. *American Journal of Primatology*, n. 70, p. 423-431, 2008.

NASCIMENTO, H. E. M.; LAURANCE, W. F. Efeitos de área e de borda sobre a estrutura florestal em fragmentos de floresta de terra-firme após 13-17 anos de isolamento. *Acta Amazonica*, v. 36, n. 2, p. 183-192. 2006.

NEUBAUER, R. H.; BRIGGS, C. J.; NOER, K. B.; RABIN, H. Identification of Normal and Transformed lymphocyte subsets of nonhuman primates with monoclonal antibodies to human lymphocytes. *The Journal of Immunology*, v. 130, p. 1323-1329, 1983.

NEVILLE, M. K.; GLANDER, K. E.; BRASA, F.; RYLANDS, A. The Howling Monkeys, Genus *Alouatta*. *Ecology and Behavior of Neotropical Primates*, p. 349-453, 1988.

NOOIJ, F. J. M.; BORST, J. G.; VAN MEURS, G. J. E.; JONKER, M.; BALNER, H. Differentiation antigens on rhesus monkey lymphocytes I: Identification of T Cells bearing of CD3 and CD8, and of a subset of CD8-bearing cells. *European Journal of Immunology*, v. 16, p. 975-979, 1986a.

NOOIJ, F. J. M.; JONKER, M.; BALNER, H. Differentiation antigens on rhesus monkey lymphocytes II: Characterization of RhT3, a CD3-like antigen on T-cells. *European Journal of Immunology*, v. 16, p. 981-984, 1986b.

NOOIJ, F. J. M.; VAN VREESWIJK, W.; COOLEN, J. Polymorphism for RhT3, a CD3-like cell surface antigen, expressed on rhesus monkey T lymphocytes. *Immunology*, v. 59, 611-620, 1986c.

OLBERG, R. A. Monkeys and gibbons. In: WEST, G.; HEARD, D.; CAULKETT, N. *Zoo animal & wildlife immobilization and anesthesia*. Ames: Blackwell Publishing, 2007. p. 375-386.

OLIVEIRA, A. U. A Amazônia e a nova geografia da produção da soja. *Terra Livre*, v.1, n. 26, p.13-43, 2006.

ORTUNHO, V. V.; LOBO, R. R.; CARVALHO, G. S. P.; REIS, V. D. Hemo parasita em um casal de bugios (*Alouatta caraya*) criados em cativeiro. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, v. 8, n. 2, p. 65-72, 2014.

PAGLIA, A. P.; FONSECA, G. A. B.; RYLANDS, A. B.; HERRMANN, G.; AGUIAR, L. M. S.; CHIARELLO, A. G.; LEITE, Y. R. L.; COSTA, L. P.; SICILIANO, S.; KIERULFF, M. C. M.; MENDES, S. L.; TAVARES, V. C.; MITTERMEIER, R. B.; PATON, J. L. *Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil/ Annotated Checklist of Brazilian Mammals*. 2. ed. Occasional Papers in Conservation Biology. n. 6, Conservation International, Arlington, VA, 76p, 2012.

PARK, Y. H.; FOX, L. K.; HAMILTON, M. J.; DAVIS, W. C. Bovine mononuclear leukocyte subpopulations in peripheral blood and mammary gland secretions during lactation. *Journal of Dairy Science*, v. 75, n. 5, p.998-1006, 1992.

PARHAM, P.; SEHGAL, P. K.; BRODSKI, F. M. Anti HLA-A, B, C monoclonal antibodies with no alloantigenic specificity in humans define polymorphisms in other primate species. *Nature*, v. 279, 1979.

PESSA-MORIKAWA, T.; NIKU, M.; LIVANAINEN, A. Persistent differences in the level of chimerism in B versus T cells of freemartin cattle. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 28, n. 1, p.77-87, 2004.

PILOZI, E.; PULFORD, K.; JONES, M.; MULLER-HERMELINK, H.; FALINI, B.; RAFKIAER, E.; PILERI, S.; PEZELLA, F.; WOLF-PEETRES, C.; ARBER, D.; STEIN, H.; MASON, D.; GATTER, K. Co-Expression of CD79a (JC117) and CD3 by Lymphoblastic Lymphoma. *Journal of Pathology*, v. 186, p. 140-143, 1988.

PIMM, S. L.; JENKINS, C. N.; JOPPA, L. N.; ROBERTS, D. L.; RUSSEL, G. J. How many endangered species remain to be discovered in Brazil? *Natureza & Conservação*, v. 8, n. 1, p.71-77, 2010.

PINA, A. L. C. B.; SOUZA, L. L.; FERRARI, S. F. Spacing patterns of *Alouatta belzebul* groups. In: *Caxiuanã Populações Tradicionais, Meio Físico e Diversidade Biológica*. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 2002. cap 8. p.685-698.

POLZIN, D. J.; OSBORNE, C. A.; BARTGES, J. B.; JAMES, K. M.; CHURCHILL, J. A. Crhonic renal failure. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (eds.). *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 4. ed., v. 2. Philadelphia: WB Saunders, p. 1734-1760, 1995.

RADOSTITS, O. M.; MAYHEW, I. G.; HOUSTON, D. M. Exame Clínico e Diagnóstico em Veterinária. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN S.A., 2002. 591p.

REAGAN, W. J.; ROVIRA, A. R. I.; DeNICOLA, D. B. *Veterinary hematology, Atlas of Common Domestic and Non domestic species*. 2. ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2008, 107p.

REDFORD, K. H. The Empty Forest. *BioScience*, v. 42, n. 6, p. 412-422, 1992.

REIMANN, K. A.; WAITE, B. C. D.; LEE-PARRITZ, D. E.; WENYU, L.; UCHANZA-ZIEGLER, B.; O'CONNEL, M. J.; LETVIN, N. L. Use of Human Leukocyte-Specific Monoclonal Antibodies for Clinically Immunophenotyping Lymphocytes of rhesus monkeys. *Cytometry*, v. 17, p.102-108, 1994.

REIS, N, R.; PERACCHI, A. L.; ANDRADE, F. R. *Primatas Brasileiros*. Londrina: Technical Books, 2008. 259p.

ROBINSON, J. G. Group size in wedge-capped Capuchin monkeys (*Cebus olivaceus*) and the reproductive success of males and females. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, v.23, p. 187-197, 1988.

ROVIROSA-HERNÁNDEZ, M. J.; CABA, C.; GARCIA-ORDUNA, F.; LOPEZ-MUNOZ, J. J. D.; CANALES-ESPINOSA, D.; HERMIDA-LAGUNES, J. Hematological and biochemical blood values in wild populations of black howler monkeys (*Alouatta pigra*) of Campeche, México. *Journal of Medical Primatology*, v. 41, p. 309-316, 2012.

RYLANDS, A. B.; MITTERMEIER, R. A.; RODRIGUES-LUNA, E. Conservation of Neotropical Primates: Threatened Species and an Analysis of Primate Diversity by Country and Region. *Folia Primatologica*, v.68, p.134-160, 1997.

RYLANDS, A. B.; SCHNEIDER, H.; LANGGUTH, A.; MITTERMEIER, R. A.; GROVES, C. P.; RODRIGUEZ-LUNA, E. As Assessment of the Diversity of New World Primates. *Neotropical Primates*, v. 8, n. 2, p. 61-93, 2000.

RYLANDS, A. B.; MITTERMEIER, R. A. & SILVA Jr., J. S. Neotropical Primates: taxonomy and recently described species and subspecies. *International Zoo Yearbook*. v. 46, p. 11-24, 2012.

RIMBACH, R. Effects of Forest Fragmentation on brown spider monkeys (*Ateles hybridus*) and red howler monkeys (*Alouatta seniculus*). 2013. 137f. Gottingen. Dissertação – Centre of Biodiversity and Sustainable Land Use – Section – Biodiversity, Ecology and Nature Conservation.

SALOMÃO, R. P.; VIEIRA, I. C. G.; SUEMITSU, C.; ROSA, N. A.; ALMEIDA, S. S.; AMARAL, D. D.; MENEZES, M. P. M. As Florestas de Belo Monte na grande curva do rio Xingu, Amazônia Oriental. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, Ciências Naturais*, Belém, v. 2, n. 3, p. 57-153, 2007.

SALZMAN, G. C.; CROWEL, J. M.; MARTIN, J. C.; TRUJILLO, T. T.; ROMERO, A.; MULLANEY, P. F.; LABAUVE, P. M. Cell classification by laser light scattering: identification and separation of unstained leukocytes. *Acta Cytologica*, v. 19, n. 4, p. 374-377, 1975.

SANCHEZ-SARMIENTO, A. M.; ZWARG, T.; FERNADES-SANTOS, R. C.; GUIMARAES-LUIZ, T.; GENOY-PUERTO, A.; MATUSHIMA, E. R. Hematological Parameters and the Variation Resulting from stress of *Alouatta caraya* during a Wildlife Rescue Program in Brazil. *American Journal of Primatology*, v. 77, p. 246-253, 2015.

SANDUSKI, G. E.; HORTON, P. J.; WIGHTMAN, K. A. Use of monoclonal antibodies to human lymphocytes to identify lymphocyte subsets in lymph nodes of the rhesus monkey and the dog. *Journal of Medical Primatology*, v. 15, n. 6, p. 441-451, 1986.

SANTOS, L. C. *Laboratório Ambiental*. Cascavel: EDUNIOESTE, 1999. 323 p.

SANTOS, L. C. & CUBAS, P. H. Colheita e Conservação de Amostras Biológicas. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. *Tratado de Animais Selvagens-Medicina Veterinária*. 2. ed. São Paulo: ROCA, 2014. p. 1554-1564.

SARICH, V. M.; CRONIN, J. E. South American Mammal Molecular Systematics, Evolutionary Clocks and Continental Drifts. In: CIOCHON, R. L.; CHIARELLI, A. B. *Evolutionary Biology of the New World Monkeys and Continental Drifts*. Plenum Publishing Corporation, p.399-421, 1980.

SATAKE, F. *Constituintes sanguíneos de bugios-pretos (Alouatta caraya) e macacos-prego (Cebus apella) capturados no resgate de fauna da Usina Hidrelétrica Engenheiro Sérgio Motta*. 2006. 60f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

SCHALM, O. W. *Veterinary Hematology*. 3.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1975. 807 p.

SCHIMTZ, J. E.; SIMON, M. A.; KURODA, M. J.; LIFTON, M. A.; OLLERT, M. W.; VOGEL, C.; RACZ, P.; TENNER-RACZ, K.; SCALLON, B. J.; DALESANDRO, M.; GHAYEB, J. RIEBER, P.; SASSEVILLE, V. G.; REIMANN, K. A. A Nonhuman Primate Model for The Selective Elimination of

CD8+ Lymphocytes using a Mouse Human Chimeric Monoclonal Antibody. *American Journal of Pathology*, v. 154, n. 6, 1999.

SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, M. I. C.; SCHNEIDER, M. P. C.; AYRES, J. M.; BARROSO, C. M. L.; HAMEL, A. R.; SILVA, B. T. F.; SALZANO, F. M. Coat Color and Biochemical Variation in Amazonian Wild Populations of *Alouatta belzebul*. *American Journal of Physical Anthropology*, v.85, p. 85-93, 1991.

SCHOOLEY, R. T.; BYINGTON, R.; FALK, L. A. Jr.; Phenotypic analysis of new world primate mononuclear cell surface antigen. *Journal of Medical Primatology*, v. 12, n. 1, p. 30-40, 1983.

SIDDIQUI, W. A. An Effective Immunization of Experimental Monkeys Against a Human Malaria Parasite, *Plasmodium falciparum*. *Science*, v.197, 1977.

SIGRIST, T. *Mamíferos do Brasil, Uma Visão Artística*. 1. ed. Vinhedo: Editora AvisBrasilis, 2012. 443 p.

SOUZA, L. L.; PINA, A. L. C. B.; FERRARI, S. F. Diet of the Red-Handed Howler Monkey (*Alouatta belzebul*). In: *Caxiuanã Populações Tradicionais, Meio Físico e Diversidade Biológica*. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 2002. cap 8. p.669-683.

SOUZA-JUNIOR, J. C. *Perfil Sanitário de Bugios ruivos *Alouatta guariba clamitans* (Cabrera, 1940) (Primates: Atelidae): um estudo com animais recepcionados e mantidos em perímetro urbano, no município de Indaial, Santa Catarina- Brasil*. 2007. 112f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SPOLTI, P.; MORAES, A. N.; TAMANHO, R. B.; GEHRCKE, M. I.; SOUSA JUNIOR, J. C.; OLESKOVICZ, N. Efeitos da associação de tiletamina/zolazepam ou cetamina S (+)/ midazolam/ tramadol para contenção química em bugios-ruivos (*Alouatta guariba clamitans*). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, n. 2, p. 236-240, 2013.

STOCKHAM, S. L. & SCOTT, M. A. *Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária*. 2. ed. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN, 2011, 729 p.

STRIER, K. B. Atelinae adaptations: behavioral strategies and ecological constraints. *American Journal of Physical Anthropology*. v. 88, p.515-524, 1992.

SUDAM. *Atlas Climatológico da Amazônia*. 1994, 125p.

SUTHIPINTAWONG, C.; LEONG, A. Y.; VINYUVAT, S. Immunostaining of cell preparations: a comparative evaluation of common fixatives and protocols. *Diagnostic Cytopathology*, v. 15, p. 167-174, 1996.

TAKESHITA, R. S. C.; MONTEIRO, F. O. B.; LINS, F. L. M.; SILVA, G. A.; FATURI, C.; COUTINHO, L. N.; MONTEIRO, M. V. B.; KUGELMEIER, T.; CASTRO, P. H. G.; MUNIZ, J. A. P. C. Ultrassonografia, hematologia e bioquímica hepática e renal de macacos-da-noite, *Aotus azarai infulatus* (Kuhl, 1820) criados em cativeiro. In.: MIRANDA, J. M. B & HIRANO, Z. M. B. *A Primatologia no Brasil*. Curitiba, v. 12, 2011.

TERREL, T. G.; HOLMBERG, C. A.; OSBURN, B. I. Immunologic surface markers on nonhuman primates lymphocytes. *American Journal of Veterinary Research*, v. 38, n. 4, p. 503-507, 1977.

THRALL, M. A. Hematology of common non domestic mammals. In.: TROY, B. *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p.221-224, 2004.

TIACCI, E.; PILERI, S.; ORLETH, A.; PACINI, R. TABARRINI, A.; FRENGUELLI, F.; LISO, A.; DIVERIO, D.; LO-COCO, F.; FALINI, B. Pax 5 Expression in Acute Leukemias: Higher B-lineage Specificity than CD 79a and Selective Association with t (8;21)-Acute Myelogenous Leukemia. *Cancer Research*, v. 64, p. 7399-7404, 2004.

TOFT, J. D. & EBERHARD, M. L. Parasitic Diseases. In.: BENNET, B. T.; ABEE, C. R.; HENRYCKSON, R. *Nonhuman Primates in Biomedical Research: Diseases*. United States of America: Academic Press, 1998, 378p.

TORLAKOVIC, E.; TORLAKOVIC, G.; NGUYEN, P. L.; BRUNNING, R. D.; DELABIE, J. The Value of Anti-Pax 5 immunostaining in routinely Fixed and Paraffin-Embedded Sections- A Novel Pan Pre B and B-Cell Marker. *The American Journal of Surgical Pathology*, v. 26, n. 10, p.1343-1350, 2002.

TYMEN, B.; REJOU-MECHAIN, M.; DALLING J. W.; FAUSET, S.; FELDPAUSCH, T. R.; NORDEN, N; PHILIPS O. P.; TURNER, B. L.; VIERS, J.; CHAVE, J. Evidence for arrested succession in a liana-infested Amazon forest. *Journal of Ecology*, v. 104, 149-159, 2006.

VALENÇA-MONTENEGRO, M. M. & LAROQUE, P. O. Protocolo de Exame Clínico e Coleta de Dados Morfométricos para Primatas Neotropicais. In: 2º CONGRESSO INTERNACIONAL DE MEDICINA DA CONSERVAÇÃO, RECIFE, PE. *Anais do 2º Congresso Internacional de Medicina da Conservação*. Recife, 2009.

VASCONCELOS, P. F. C.; Yellow Fever in Brazil: thoughts and hypotheses on the emergence in previously free áreas. *Revista Saúde Pública*, 2010.

VERONA, C. *Avaliação da condição física versus custos de reprodução e lactação em fêmeas de Callithrix jacchus e Leontopithecus rosalia selvagens (Callithrichidae – Primates)*. Dissertação (Mestrado) – Laboratório de Ciências Ambientais da Universidade Estadual Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2001.

VERONA, C. E. & PISSINATTI, A. Primates – Primatas do Novo Mundo (sagui, macaco-prego, macaco-aranha, bugio e muriqui). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. *Tratado de Animais Selvagens-Medicina Veterinária*. 2. ed. São Paulo: ROCA, 2014 p. 723-743.

VIE, J. C.; MOREAU, B.; THOISY, B. Hematology and Serum Biochemical values of free-ranging red howler monkeys (*Alouatta seniculus*) from French Guiana, *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 29, p. 142-149, 1998.

VILANI, R. G. D. C. Anestesia Injetável e Inalatória. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. *Tratado de Animais Selvagens-Medicina Veterinária*. 2. ed. São Paulo: ROCA, 2014, p. 1826-1863.

WARD, J. M.; O'LEARY, T. J.; BASKIN, G. B.; BENVENISTE, R.; HARRIS, C. A.; NARA, P. L.; RHODES, R. H. Immunohistochemical Localization of Human and Simian Immunodeficiency Viral Antigens in Fixed Tissue Sections. *American Journal of Pathology*, v. 27, n. 2, 1987.

WEISER, G. Interpretação da Resposta Leucocitária nas Doenças. In: THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPBELL, T. W.; DeNICOLLA, D.; FETTMAN, N. J.; LASSEN, D. E.; REBAR, A.; WEISER, G. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. São Paulo: ROCA, 2007. cap. 12, p. 127-140.

WEISS, D. J. & WARDROP, K. J. *Schalm's Veterinary Hematology*. 6. ed. Iowa: WILEY BLACKWELL, 2010, 1206 p.

WILLARD, M. D.; TEVDTEN, H.; TURNWALD, G. H. Small animal clinical diagnosis by laboratory methods. 3.ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1999.

WINTROBE, M. M. *Clinical Haematology*. 5. ed. Londres: Kimpton, 1961.

WIRZ, A.; TRUPPA, V.; RIVIELLO, M. C. Hematological and plasma chemical values for captive tufted capuchin monkeys (*Cebus apella*). *American Journal of Primatology*. v. 70, p. 463-472.

YOULATUS, D.; COUETTE, S.; HALENAR, L. B. Morphology of Howler Monkeys: A review and Quantitative Analyses. In.: KOWALEWSKI, M. M.; GARBER, P. A.; CORTES-ORTIZ, L.; URBANI, B.; YOULATUS, D. *Howler Monkeys: Adaptive Radiations, Systematics and Morphology*, New York: Springer, 2015, p.133-176.

ZILOTO, L.; TRANQUILIM, M. V.; LIMA, E. L.; VECCHIA, P. C. D.; LEHMKUHL, R. C.; CARRASCO, A. O. T. Carcinoma mamário pouco diferenciado em macaco prego *Cebus* sp. (Cebidae). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, n. 1, p.99-104, 2013.

10. ANEXOS

Anexo 01 - Autorização de Captura, Coleta e Transporte de Material biológico (ACCTMB), nº 473/2014_Arcadis, Naturae_PSCAF_1 retif.

Anexo 02 – Autorização para Atividades com Finalidade Científica SISBIO

Anexo 03 – Atestado de aprovação CEUA