

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**PESQUISA DE *Bartonella* spp. E *Mycoplasma* spp. E
AVALIAÇÃO HEMOSTÁTICA, HEMATOLÓGICA E
BIOQUÍMICA SANGUÍNEA DE PRIMATAS DO GÊNERO
*Alouatta***

CRISTIANE MARIA FERNANDES DE MELO

Médica Veterinária

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**PESQUISA DE *Bartonella* spp. E *Mycoplasma* spp. E
AVALIAÇÃO HEMOSTÁTICA, HEMATOLÓGICA E
BIOQUÍMICA SANGUÍNEA DE PRIMATAS DO GÊNERO
*Alouatta***

CRISTIANE MARIA FERNANDES DE MELO

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Ferreira da Rosa Sobreira

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias –Unesp,
Campus de Jaboticabal, como parte das
exigências para obtenção do Título de
Doutor em Medicina Veterinária
(Medicina Veterinária Preventiva)

M528p Melo, Cristiane Maria Fernandes de
Pesquisa de Bartonella spp. e Mycoplasma spp. e avaliação hemostática, hematológica e bioquímica sanguínea de primatas do gênero Alouatta / Cristiane Maria Fernandes de Melo. – – Jaboticabal, 2018
xxiii, 85 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018
Orientadora: Marcia Ferreira da Rosa Sobreira
Banca examinadora: Annelise Carla Camplesi, Luciano Melo de Souza, Aline Eyko Kawanami, Eveline dos Santos Zanetti
Bibliografia

1. Primatas. 2. Parâmetros sanguíneos. 3. Caracterização molecular. 4. Hemoplasmas. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.15:599.82

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: PESQUISA DE *Bartonella* spp. E *Mycoplasma* spp E AVALIAÇÃO HEMOSTÁTICA, HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA SANQUÍNEA DE PRIMATAS DO GÊNERO *Alouatta*

AUTORA: CRISTIANE MARIA FERNANDES DE MELO

ORIENTADORA: MÁRCIA FERREIRA DA ROSA SOBREIRA

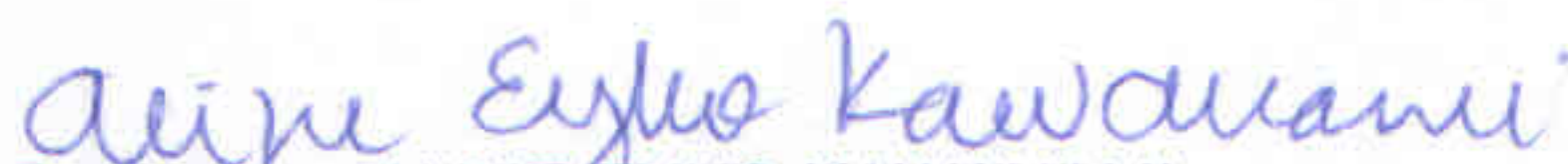
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: MEDICINA VETERINARIA PREVENTIVA pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. MÁRCIA FERREIRA DA ROSA SOBREIRA
Curso de Medicina Veterinária / Centro Universitário Moura Lacerda - Ribeirão Preto/SP



Coordenadora Dra EVELINE DOS SANTOS ZANETTI
Centro de Conservação do Cervo-do-Pantanal / Tijóia Energia / Promissão / SP



Profa. Dra. ALINE EYKO KAWANAMI
Ribeirão Preto / SP / Centro Universitário Barão de Mauá



Profa. Dra. ANNELISE CARLA CAMPLESI DOS SANTOS
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. LUCIANO MELO DE SOUZA
Descalvado/SP / Universidade Brasil

Jaboticabal, 23 de março de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CRISTIANE MARIA FERNANDES DE MELO- nascida em 13 de Julho de 1985, em Timbaúba-PE. Médica Veterinária formada pela Universidade Federal de Campina Grande, na cidade de Patos Paraíba. Mestre em Medicina Veterinária com ênfase em Patologia e Parasitologia de Animais Selvagens pela Universidade Federal de Campina Grande-Patos-PB. Trabalhou como Médica Veterinária Patologista Clínica no Hospital Reino Animal em Natal-Rio Grande do Norte, por 1 ano e 4 meses. Trabalhou com Médica Veterinária Patologista Clínica no Hospital Vet 24 horas em Ribeirão Preto por 1 ano e 6 meses. Em agosto de 2014 iniciou o Doutorado pela Universidade Estadual Paulista –Júlio de Mesquita Filho em Jaboticabal-São Paulo até o presente momento, sob orientação da professora Dra. Márcia Ferreira da Rosa Sobreira.

Não sei o que posso parecer para o mundo, para mim mesmo, porém, pareço ter sido somente como um menino que brinca à beira do mar, tendo me distraído em encontrar vez por outra um seixo mais liso ou mais bonito que o comum, ou uma concha mais bonita que outras, enquanto o grande oceano de verdade permanece desconhecido na minha frente.

Isaac Newton

À minha querida avó ALICE “*in memorian*”, que me recebeu em sua casa desde a primeira infância e me criou como se faz a uma filha querida, me ensinando o que realmente é importante na vida: o amor!

Dedico

AGRADECIMENTOS

Meu sonho de criança sempre foi ser médica veterinária e, embora tais veleidades geralmente sejam redirecionadas por influências externas e caminhos diferentes que surgem ao longo da vida, meu sonho infantil transformou-se em decisão, em empenho, em vontade firme de vencer os obstáculos do vestibular e dos cinco anos longe de casa e da família, de superar limites impostos pela exaustão física e mental. E agora, estou concluindo quatro anos de doutorado, que para mim, é o símbolo máximo de uma vitória, vitória sobre todas as perspectivas que pairam sobre jovens nascidas em pequenas cidades do interior, em ambientes que desdenham de quem sonha alto e lutam por esses objetivos. Hoje posso dizer com indisfarçável orgulho: realizei meu sonho, eu venci!

Mas no momento desse regozijo, percebo claramente que não venci sozinha e quero externar minha profunda gratidão por todos que me ajudaram e conduziram a essa vitória;

Agradeço a Deus pela oportunidade única de trabalhar com os animais e por me confiar parte tão importante de sua criação;

Agradeço a meus pais, Aderbal e Eunice, que me deram à vida e a meu irmão Carlos Alberto, pela experiência de vida que me levou a amadurecer e a construir minha personalidade;

Agradeço a minha tia Vanuza Maria Melo de França, *in memoriam*, que incutiu na criança que eu fui todo o amor pelos animais, criaturas por quem tinha ela tanto apreço;

Agradeço ao meu marido, Jorge Alfonso Morales Donoso, por me apoiar e incentivar a continuar em momentos difíceis dessa trajetória, por seguir ao meu lado durante a vida, por ser esse ser especial que Deus colocou no meu caminho, palavras não seriam suficientes para te agradecer, Te amo!

Agradeço a minha prima, Maria Alice, que sempre me apoiou em toda essa minha trajetória;

Agradeço em especial, a professora Dra. Márcia Ferreira da Rosa Sobreira, minha orientadora, tão gentil, que me concedeu a oportunidade de realizar o Doutorado, me apoiando em momentos difíceis que passei durante esta fase, e me incentivando a continuar;

Agradeço em especial, ao professor Marcos Rogério André, por sempre me estimular e me aconselhar durante o doutorado, também me incentivando em momentos difíceis, e por me conceder a oportunidade de trabalhar com sua equipe;

Agradeço a todos que compõem o Laboratório de Imunoparasitologia Veterinária do Departamento de Patologia Animal da Unesp em Jaboticabal, em especial, Simone de Jesus, Inalda Angélica, Victória Valente, Carlos Matos, Natalia Serra, que me ajudaram e me concederam o prazer do conhecimento de Biologia Molecular, me apoiando e me ajudando durante o meu experimento;

Agradeço ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinária “Professor Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto” do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Unesp em Jaboticabal São Paulo, onde pude realizar grande parte do meu experimento, em especial, ao Matheus Iamazaki e Edmilson Daneze;

Agradeço aos zoológicos e criatórios que proporcionaram a realização dessa pesquisa com os bugios: Ilha Solteira, Catanduva, Guaíra, Olímpia, Ribeirão Preto, Guarulhos, Sorocaba, CEMPAS em Botucatu, e ainda, o Projeto Mucky, na cidade de Itu;

Agradeço aos amigos, que me auxiliaram de maneira incondicional na realização dessa pesquisa, citados acima, muitas vezes abdicando de seus próprios afazeres;

Agradeço aos amigos que fiz durante o Doutorado, sendo de primordial importância neste caminho: Aline Kawanami, Denise Chung, Peterson Pacheco, Fabrícia Filgueira, Isa Marcela, Mariana Rondelli, Victor Yunes, muito obrigada por tudo;

Sou grata, enfim, a todos os bugios, objetos de estudos, enfermos ou saudáveis, que estiveram comigo durante toda a tese e sem os quais não seria possível a realização deste sonho.

SUMÁRIO

	pág
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
LISTA DE TABELAS.....	xvi
LISTA DE FIGURAS.....	xviii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xx
CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	2
Considerações sobre hematologia.....	4
Considerações sobre o perfil hepático e renal.....	8
Considerações sobre hemoplasmas e Bartonelose em primatas.....	9
Considerações sobre hemostasia.....	11
Considerações sobre eletroforese de proteína séricas.....	14
REFERÊNCIAS.....	16
CAPÍTULO 2 Parâmetros hemostáticos de primatas <i>Alouatta</i> (Primates, Atelidae) de cativeiro no Estado de São Paulo.....	22
INTRODUÇÃO.....	23
MATERIAL E MÉTODOS.....	25
RESULTADOS.....	28
DISCUSSÃO.....	29
CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS.....	32

CAPÍTULO 3: Avaliação dos parâmetros hematológico, bioquímico e eletroforético de proteínas séricas de macacos bugios <i>Alouatta</i> (Primates, Atelidae) de cativeiro no Estado de São Paulo, Brasil.....	35
INTRODUÇÃO.....	36
MATERIAL E MÉTODOS.....	38
RESULTADOS.....	41
DISCUSSÃO.....	45
CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS.....	49
CAPÍTULO 4: Avaliação hematológica, bioquímica e eletroforética de primatas neotropicais submetidos à análise molecular para hemoplasmas e <i>Bartonella</i> no Brasil.....	52
INTRODUÇÃO.....	53
MATERIAL E MÉTODOS.....	54
RESULTADOS.....	60
DISCUSSÃO.....	65
CONCLUSÃO.....	68
REFERÊNCIAS.....	68
ANEXOS	

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Pesquisa de hematozoários e avaliação dos perfis hemostático, hematológico e bioquímico sanguíneo de macacos bugios do gênero *Alouatta***", protocolo nº 5.595/16, sob a responsabilidade da Profª Drª Márcia Ferreira da Rosa Sobreira, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 06 de julho de 2016.

Vigência do Projeto	10/06/2016 a 03/03/2017
Espécie / Linhagem	Primatas (macacos bugios) <i>Alouatta</i> spp
Nº de animais	50 animais
Peso / Idade	10 kg / adultos
Sexo	Masculino e feminino
Origem	Criatórios e Zoológicos no Estado de São Paulo

Jaboticabal, 06 de julho de 2016.


Profª Drª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 51162-2	Data da Emissão: 19/07/2016 17:18	Data para Revalidação*: 18/08/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Cristiane Maria Fernandes de Melo	CPF: 060.889.804-00
Título do Projeto: Pesquisa de hematozóários e avaliação dos perfis hemostáticos, hematológicos e bioquímicos de primatas do gênero Alouatta	
Nome da Instituição : UNESP JABOTICABAL	CNPJ: 48.031.918/0012-87

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de sangue dos primatas pesquisados	03/2016	03/2017

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	OLIMPIA	SP	Thermals de Olimpia	Fora de UC Federal
2	GUARULHOS	SP	Zoológico de Guarulhos	Fora de UC Federal
3	ITU	SP	Projeto Mucky	Fora de UC Federal
4	RIBEIRÃO PRETO	SP	Bosque de Ribeirão Preto	Fora de UC Federal
5	GUAÍRA	SP	Zoológico de Guaiara	Fora de UC Federal
6	SOROCABA	SP	Zoológico de Sorocaba	Fora de UC Federal
7	BOTUCATU	SP	Cempas Botucatu	Fora de UC Federal
8	MOJI MIRIM	SP	Zoológico de Mogi Mirim	Fora de UC Federal
9	CATANDUVA	SP	Zoológico de Catanduva	Fora de UC Federal
10	ILHA SOLTEIRA	SP	Zoológico de Ilha Solteira	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
---	-----------	--------

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 57189859



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 51162-2	Data da Emissão: 19/07/2016 17:18	Data para Revalidação*: 18/08/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Cristiane Maria Fernandes de Melo	CPF: 060.889.804-00
Título do Projeto: Pesquisa de hematozoários e avaliação dos perfis hemostáticos, hematológicos e bioquímicos de primatas do gênero Alouatta	
Nome da Instituição : UNESP JABOTICABAL	CNPJ: 48.031.918/0012-87

1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Alouatta
---	--	----------

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Primates)	Sangue
2	Método de captura/coleta (Primates)	Puçã

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNESP JABOTICABAL	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 57189859



Página 2/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 51162-2	Data da Emissão: 19/07/2016 17:18	Data para Revalidação*: 18/08/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Cristiane Maria Fernandes de Melo	CPF: 060.889.804-00
Título do Projeto: Pesquisa de hematozoários e avaliação dos perfis hemostáticos, hematológicos e bioquímicos de primatas do gênero Alouatta	
Nome da Instituição : UNESP JABOTICABAL	CNPJ: 48.031.918/0012-87

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 57189859



Página 3/3

**PESQUISA DE *Bartonella* spp. E *Mycoplasma* spp. E AVALIAÇÃO
HEMOSTÁTICA, HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA SANGUÍNEA DE PRIMATAS
DO GÊNERO *Alouatta***

RESUMO - Os parâmetros sanguíneos de animais domésticos e selvagens diferem em relação às localidades no mundo. Este trabalho teve como objetivo pesquisar a presença de hematozoários e determinar os parâmetros hemostáticos, hematológicos e bioquímicos sanguíneos de macacos bugios de cativeiro no Estado de São Paulo, sudeste do Brasil. Para realização do hemograma e das análises moleculares dos macacos bugios foi colhido sangue em tubos contendo K₂EDTA de 68 primatas *Alouatta*, sendo (*Alouatta guariba clamitans*, *Alouatta caraya* e *Alouatta* spp. de cativeiro). Para as análises bioquímicas e eletroforese de proteínas, foi colhido sangue em tubos contendo ativador de coágulo de 40 macacos bugios para o proteinograma e 29 para as demais análises bioquímicas. Por fim, para avaliação dos parâmetros hemostáticos foi colhido sangue de 30 macacos *Alouatta* em tubos contendo citrato de sódio a 3,2%. Os resultados obtidos no hemograma de 27 *Alouatta caraya* e 15 *Alouatta guariba clamitans* saudáveis foram estatisticamente diferentes na contagem global de hemácias. Nas análises bioquímico-séricas dos bugios hígidos das espécies estudadas, os resultados referentes às dosagens de creatinina, ureia e fosfatase alcalina não apresentaram diferenças estatísticas, porém em relação às dosagens de ALT, os valores foram significativamente diferentes. Quanto ao eletroforetograma das espécies de bugios hígidos, ocorreram diferenças estatísticas apenas na dosagem de proteína total. Nos parâmetros hemostáticos entre espécies de bugios saudáveis, os resultados referentes a contagem de plaquetas, concentração de fibrinogênio plasmático, tempo de tromboplastina parcial ativada e tempo de protrombina não foram significativamente diferentes. Nesta pesquisa, dos 68 macacos bugios avaliados através da PCR convencional, 18 (26,47%) foram positivos para *Mycoplasma* spp. para o gene 16S rRNA e 1 (5,55%) para o gene RNase P. Mas, na cPCR para *Bartonella* spp. para o gene *gltA* a população amostrada de bugios foi negativa. O estudo mostrou que a infecção dos macacos bugios aproximou-se de um genótipo filogeneticamente associado a "*Candidatus Mycoplasma kahanei*". Nas condições do presente estudo, os resultados obtidos dos primatas *Alouatta caraya* e *Alouatta guariba clamitans* hígidos podem ser úteis como fonte de consulta para outros pesquisadores, quanto aos parâmetros hematológicos, bioquímicos sanguíneos e hemostáticos. Os resultados obtidos pela PCR convencional mostraram que espécies de hemoplasmas circulam entre primatas *Alouatta* de cativeiro no Estado de São Paulo, Brasil.

Palavras-chave: primatas, parâmetros sanguíneos, caracterização molecular, hemoplasmas, Brasil.

RESEARCH FOR *Bartonella* spp. E *Mycoplasma* spp. AND HEMOSTATIC, HEMATOLOGICAL AND BLOOD BIOCHEMICAL EVALUATION OF PRIMATAS OF THE GENDER *Alouatta*

ABSTRACT - The blood parameters of domestic and wild animals differ in relation to the localities of the world. The objective of this study was to investigate the presence of hematozoars and to determine the hemostatic parameters, hematological parameters and blood biochemical of howler monkeys of captive in the State of São Paulo, Southeastern Brazil. For realization hematological and molecular analyzis of howler monkeys, blood was collected in K2EDTA from 68 captive primates *Alouatta* (*Alouatta guariba clamitans*, *Alouattta caraya* and *Alouatta* spp.). Blood was collected in tubes containing clot activator, of 40 healthy howler monkeys for the proteinogram and 29 for the blood biochemical analyzis. Finally, to evaluate the hemostatic parameters, blood was collected from 30 healthy howler monkeys in tubes containing 3.2% sodium citrate. In the biochemical-serum analyzes of the healthy howler monkeys of the species studied, the results regarding the creatinine, urea and alkaline phosphatase dosages showed no differences statistics, but in relation to the dosages of ALT the values were significantly different. As for the electrophoretogram of the healthy monkeys, the results were statistical differences only in the total protein. In the hemostatic parameters between species of healthy howler monkeys, the results about platelet count, plasma fibrinogen concentration, activated partial thromboplastin time and prothrombin time were not significantly different. In this study, of the 68 howler monkeys evaluated through conventional PCR, 18 (26.47%) were positive for *Mycoplasma* spp. for the 16S rRNA gene and 1 (5.55%) for the RNase P gene. But in cPCR for *Bartonella* spp. for the *gltA* gene the sampled population of howler monkeys was negative. The study showed that the howler monkeys infection approached a genotype phylogenetically associated with "*Candidatus Mycoplasma kahanei*". Under the conditions of the present study, the results obtained from the *Alouatta caraya* and *Alouatta guariba clamitans* healthy can be useful as a source of consultation for other researchers about parameters hematological, blood biochemical and haemostatic. The results obtained by conventional PCR showed that hemoplasm species circulate among *Alouatta* captive in the State of São Paulo, Brazil.

Keywords: primates, blood parameters, molecular characterization, hemoplasms, Brazil.

LISTA DE TABELAS

	Pág
Capítulo 1	
Tabela 1 Fatores da cascata de coagulação e local de síntese. Adaptado do Thrall et al., 2006. Jaboticabal, 2018.....	12
Capítulo 2	
Tabela 1 Médias, desvio-padrão, valor mínimo e máximo da contagem de plaquetas, tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) e concentração plasmática de fibrinogênio da população de primatas <i>Alouatta</i> machos e fêmeas de cativeiro no Estado de São Paulo, Brasil. Jaboticabal, 2018.....	28
Capítulo 3	
Tabela 1 Análise hematológica de 49 macacos bugios <i>Alouatta</i> de acordo com o sexo, de cativeiro no Estado de São Paulo, Brasil, 2018.....	42
Tabela 2. Análise Bioquímica de 27 macacos bugios <i>Alouatta</i> , de acordo com o sexo, de cativeiro no Estado de São Paulo, Brasil, 2018.....	44
Tabela 3 Comparação dos resultados das análises do proteinograma dos macacos bugios de machos e fêmeas obtidas por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), no Estado de São Paulo, Brasil, 2018.....	45
Capítulo 4:	
Tabela 1 Análise dos resultados dos hemogramas comparando-se macacos bugios negativos e positivos para hemoplasmas no Estado de São Paulo, Brasil, 2018.....	63

Tabela 2	Resultados das análises bioquímicas referentes a funcionalidade renal e integridade hepática de macacos bugios positivos e negativos para hemoplasmas no Estado de São Paulo, Brasil, 2018.....	64
Tabela 3	Resultados das análises do proteinograma de 11 macacos bugios de cativeiro positivos e 11 negativos para hemoplasmas, obtidas por eletroforese em gel de acrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), no Estado de São Paulo, Brasil, 2018.....	64

LISTA DE FIGURAS

pág

Capítulo 1

Figura 1	Bugio-preto (<i>Alouatta caraya</i>) proveniente do Bosque Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, 2018.....	3
Figura 2	Bugio-ruivo (<i>Alouatta guariba clamitans</i>) proveniente do Protejo Mucky, Itu, São Paulo, 2018.....	3
Figura 3	Monócito de macacos bugios <i>Alouatta</i> de cativeiro no Estado de São Paulo, Brasil. Aumento de 1000x. Coloração <i>Romanowsky modificado</i>	5
Figura 4	Linfócito de macacos bugios <i>Alouatta</i> de cativeiro no Estado de São Paulo, Brasil. Aumento de 1000x. Coloração <i>Romanowsky modificado</i>	6
Figura 5	Neutrófilos de macaco bugio <i>Alouatta</i> . Aumento 1000x. Coloração <i>Romanowsky modificado</i>	7
Figura 6	Eosinófilo de macaco bugio <i>Alouatta</i> de cativeiro no Estado de São Paulo, Brasil. Aumento de 1000x. Coloração <i>Romanowsky modificado</i>	7
Figura 7	Basófilo de macacos <i>Alouatta</i> de cativeiro no Estado de São Paulo, Brasil. Aumento de 1000x. Coloração <i>Romanowsky modificado</i>	8
Figura 8	Esquema demonstrando as vias intrínseca, extrínseca e comum da cascata de coagulação. Adaptado do Thrall et al., 2006. Jaboticabal, 2018.....	13
Figura 9	Traçado eletroforético de macaco bugio <i>Alouatta</i> spp. de cativeiro obtido em gel de poliacrilamida contendo SDS-PAGE. Brasil. Jaboticabal, 2018.....	16

Capítulo 2

Figura 1	Municípios onde foram realizadas coletas de sangue para dosagens dos parâmetros hemostáticos de macacos bugios <i>Alouatta</i> no Estado de São Paulo.....	26
-----------------	--	----

Capítulo 3

Figura 1	Municípios onde foram realizadas coleta de sangue de macacos <i>Alouatta</i> de cativeiro no Estado de SP.....	39
-----------------	--	----

Capítulo 4

Figura 1	Mapa evidenciando os municípios do Estado de São Paulo onde foram realizadas coletas de sangue dos macacos bugios. Estado de São Paulo, Brasil, 2017.....	55
Figura 2	Relação filogenética dentro do gênero <i>Mycoplasma</i> baseada em um fragmento de 1280 pb do gene 16S rRNA. A árvore filogenética foi inferida usando a análise Bayesiana e modelo evolutivo HKY + G.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS

AIC: akaike information criterion

ALT: alanina aminotransferase

BLAST: basic local alignment search tool

CEUA: comissão de ética no uso de animais

CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média

cPCR: reação em cadeia de polimerase convencional

D: dáltons

dh: diversidade de haplótipos

DNA: ácido desoxirribonucleico

FA: fosfatase alcalina

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

gltA: gene citrato-sintase

h: haplótipos

HCM: hemoglobina corpuscular média

IgA: imunoglobulina A

IgG: imunoglobulina G

K₂EDTA: ácido acetil etilenodiamino tetra-acético dipotássico

MCMC: cadeia de Markov de Monte Carlo

PT: proteína total

rRNA: ácido ribonucleico ribossomal

RNase P: ribonuclease P

SISBIO: sistema de autorização e informação da biodiversidade

TEB: tampão tris-borato-Edta

TP: tempo de protrombina

TTPA: tempo de tromboplastina parcial ativada

VCM: volume corpuscular médio

VG: Volume globular

%: porcentagem

16S rRna: Rna ribossomal 16S

μL: microlitros

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.2 INTRODUÇÃO

A criação de primatas e outras espécies selvagens em cativeiro vêm sendo utilizada como estratégia para a conservação desses animais e medicina humana. O conhecimento das características particulares de cada espécie é muito importante para que a atividade conservacionista tenha sucesso e a verificação dos aspectos sanitários dos animais mantidos em cativeiro propicia o diagnóstico de distúrbios que causam riscos à vida desses animais.

Deste modo, exames laboratoriais são utilizados para a detecção de doenças, avaliação dos *status* metabólico e nutricional, entre outros. Para tanto, os resultados obtidos devem ser comparados com valores considerados como referência de normalidade para cada espécie estudada. No tocante a animais selvagens, fatores ambientais como clima, geografia e características da vegetação local, muitas vezes podem interferir em tais parâmetros. Devido a estes problemas, muitos autores utilizam fatores individuais, como sexo e idade, em suas pesquisas para avaliação destes.

As informações acerca das características hematológicas, bioquímicas sanguíneas e pesquisa de hemoparasitas de macacos bugios de vida livre e cativeiro são relatadas na literatura. Porém, no que diz respeito aos parâmetros hemostáticos de macacos bugios, ainda não existem publicações até o presente momento, sobre a concentração de fibrinogênio plasmático, tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) e tempo de protrombina (TP). Dessa forma, o presente estudo teve como objetivos gerais determinar os parâmetros hematológicos, bioquímicos sanguíneos, hemostáticos, o perfil eletroforético de proteínas séricas e pesquisar *Bartonella* spp. e *Mycoplasma* spp. em macacos bugios *Alouatta caraya* e *Alouatta guariba clamitans*, de cativeiro no estado de São Paulo, Brasil.

1.2. REVISÃO DE LITERATURA

Há cerca de 70 milhões de anos teve início o processo evolutivo dos primatas e desde então muitas espécies se extinguíram, enquanto outras seguiram evoluindo, como é o caso da espécie humana (VERONA; PISSINATTI, 2014).

Não existe uma característica única que defina um primata, para defini-los é necessário que se reúna certa quantidade de atributos. Por isso, é que talvez para caracterizá-lo, haja tanta dificuldade (AURICCHIO, 1995).

Historicamente, os primatas neotropicais foram divididos em duas grandes famílias: Callitrichidae e Cebidae, além de um gênero monoespecífico (*Callimico*), que apresenta características intermediárias entre as duas famílias. Porém, trabalhos importantes, com métodos filogenéticos e moleculares fizeram ajustes importantes na sistemática destes grupos, colocando os primatas da infraordem *Platyrrhini* (neotropicais) como tendo cinco famílias (Callitrichidae, Cebidae, Aotidae, Pitheciidae e Atelidae) (VERONA; PISSINATTI, 2014).

Os primatas do gênero *Alouatta* são animais arborícolas, de grande porte, com corpo maço e longa pelagem. São conhecidos aqui no Brasil como guaribas, barbados ou gritadores, e seu dimorfismo sexual e idade são atribuídos pelo tamanho do osso hióide, tamanho dos caninos, tamanho corpóreo e cor da pelagem. São os representantes dos *Platyrrhini* que apresentam maior habilidade de sobrevivência em áreas florestais remanescentes ou degradadas, devido a sua alimentação folívora e por apresentarem um sistema digestório que contém bactérias e protozoários que degradam a celulose. Os mecanismos de defesa destes animais são os famosos rugidos, que atuam como um papel no espaçamento intergrupar (AURICCHIO, 1995; POUGH et al., 2003). Apresentam ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde o Estado de Vera Cruz no México, até o Estado do Rio Grande do Sul no Brasil e Corrientes na Argentina (GREGORIN et al., 2006).

O bugio preto *Alouatta caraya* (Figura 1) vive em grupos de dois a 19 indivíduos, sendo encontrados desde a região Amazônica, leste do Brasil ao nordeste da Argentina, além da Bolívia (AURICCHIO, 1995). O *Alouatta caraya* apresenta dicromatismo sexual, característica rara entre as espécies deste gênero, onde os machos adultos têm pelagem completamente negra enquanto as fêmeas adultas, e

os juvenis (machos e fêmeas) e infantes (machos e fêmeas) apresentam coloração amarelo-palha (BICCA-MARQUES; CALEGARO-MARQUES, 1998).



Figura 1. Exemplar macho de bugio-preto (*Alouatta caraya*) proveniente do Bosque Municipal Fábio Barreto em Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. Jaboticabal, 2018.

Por sua vez, o bugio-ruivo (*Alouatta guariba clamitans*) (Figura 2) é endêmico da Floresta Atlântica, e encontra-se distribuído desde o sul do Rio Doce no Espírito Santo até o Rio Grande do Sul e norte da Argentina (HIRSCH et al., 1991).



Figura 2. Exemplar macho de bugio-ruivo (*Alouatta guariba clamitans*) proveniente do Protejo Mucky, Itu, São Paulo, Brasil. Jaboticabal, 2018.

1.2.1. Considerações sobre hematologia

Como referido, as características hematológicas dos animais sofrem efeitos importantes de fatores externos como alimentação, clima, altitude, entre outros, desse modo, existe um cuidado por parte dos pesquisadores em se estabelecer parâmetros hematológicos para diferentes espécies animais de acordo com as regiões onde habitam (FERREIRA, 2009).

Os bugios são animais de difícil adaptação em cativeiro, o que os torna muito susceptíveis ao desenvolvimento de doenças, e ainda, possuem dificuldade de adaptação a dietas (MILTON, 1980).

Em relação aos constituintes do eritrograma, os valores para a contagem global de hemácias, a concentração de hemoglobina e valor do hematócrito apresentam-se estatisticamente maiores nos machos que em fêmeas de primatas, enquanto que os valores absolutos de linfócitos são geralmente superiores nas fêmeas. Quanto à faixa etária, a contagem global de hemácias, valor do hematócrito, concentração de hemoglobina, contagem global de leucócitos e valores absolutos de neutrófilos, eosinófilos e linfócitos apresentam-se superiores em primatas jovens, independente do sexo (THRALL, 2006; RIBEIRO, 2010; JÚNIOR, 2007).

Quanto à série branca, ocasionalmente, notam-se linfócitos binucleados no sangue de primatas que estão em bom estado de saúde (THRALL, 2006). O leucograma de diferentes espécies de primatas *Alouatta* de vida livre ou de cativeiro é bastante caracterizado pela ação do estresse, tanto agudo quanto crônico, que constitui uma resposta biológica mediada pela liberação de esteróides do córtex adrenal, que induzem a uma apoptose de linfócitos e alteração na distribuição destas células no sangue circulante (FLAIBAN et al., 2009; ROVIROSA-HERNÁNDEZ et al., 2012; SÁNCHEZ-SARMIENTO et al., 2015). Evidencia-se também uma neutrofilia que se deve à diminuição da marginação endotelial, com saída de neutrófilos da medula óssea para a corrente sanguínea e diminuição de sua migração dos vasos para os tecidos (WALNER et al., 1986). Por sua vez, ocorre diminuição da síntese de eosinófilos pela medula óssea e apoptose celular. E ainda, o recrutamento de monócitos para desempenho de suas funções, como fagocitose e processamento de antígenos é diminuído (HOGAN et al., 1988; BARNES et al., 1998).

Os monócitos de macacos *Alouatta* sp. apresentaram núcleo irregular, indentado, podendo conter vacúolos (Figura 3).

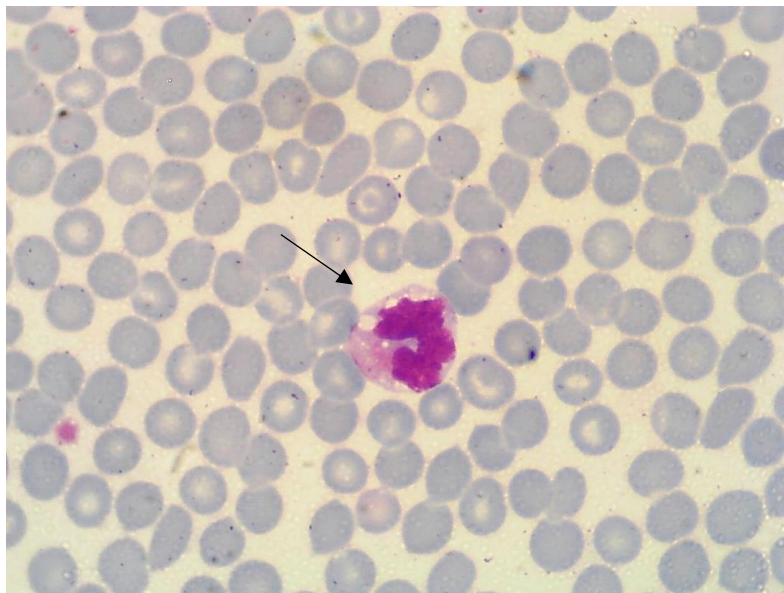


Figura 3. Monócito (seta) em sangue periférico de macacos bugios *Alouatta caraya* de cativeiro no Estado de São Paulo, Brasil. Aumento de 1000x. Coloração *Romanowsky modificado*.

Por sua vez, os linfócitos apresentaram uma discreta variação de tamanho, sendo possível detectar linfócitos pequenos e grandes, e alguns binucleados, com citoplasma escasso (Figura 4).

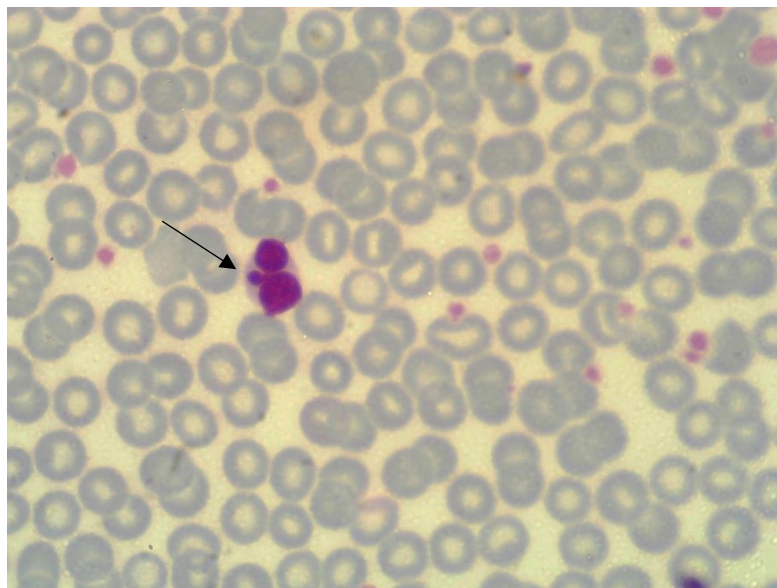


Figura 4. Linfócito (seta) em sangue periférico de macacos bugios *Alouatta caraya* de cativeiro no Estado de São Paulo, Brasil. Aumento de 1000x. Coloração *Romanowsky modificado*.

Dentre os polimorfonucleares, os neutrófilos apresentaram citoplasma com discreta granulação basofílica e núcleo com coloração basofílica (Figura 5).

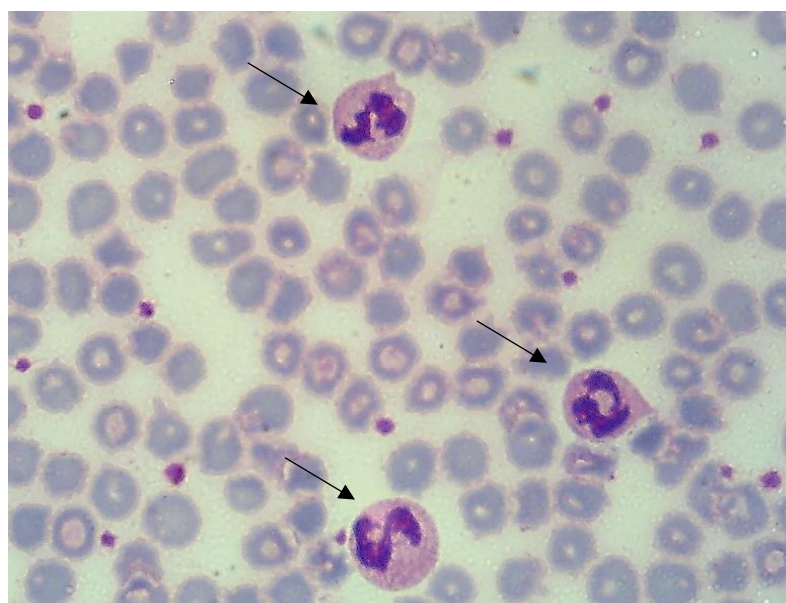


Figura 5. Neutrófilos (seta) em sangue periférico de macaco bugio *Alouatta guariba clamitans* de cativeiro no Estado de São Paulo, Brasil. Aumento 1000x. Coloração *Romanowsky modificado*.

Os eosinófilos encontrados apresentaram núcleo segmentado, com presença de grânulos grandes intensamente acidofílicos e aspecto arredondado (Figura 6).

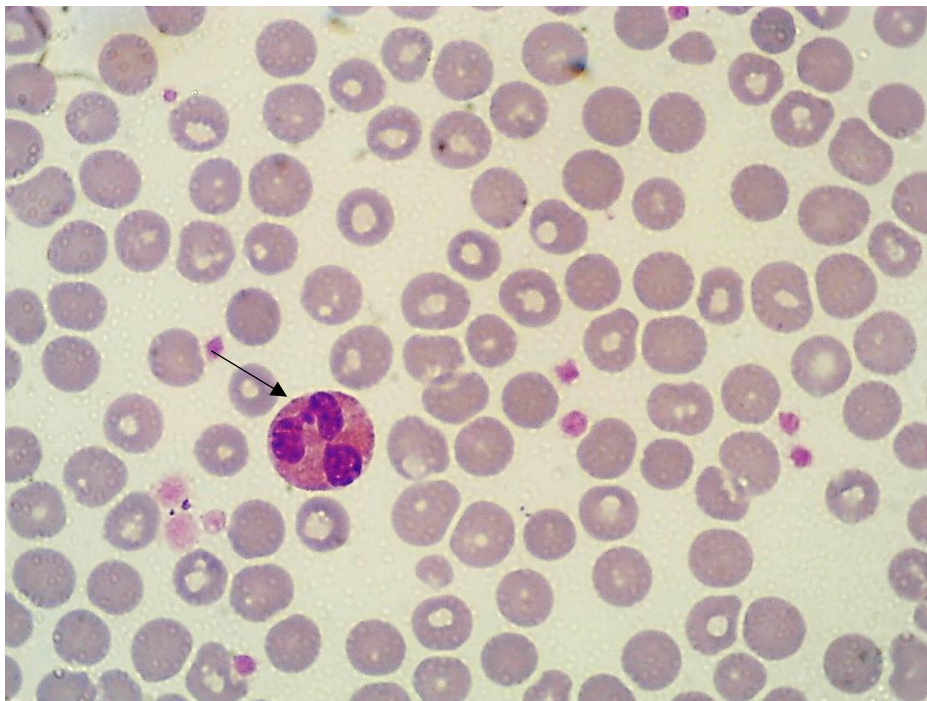


Figura 6. Eosinófilo (seta) em sangue periférico de macaco bugio *Alouatta caraya* de cativeiro no Estado de São Paulo, Brasil. Aumento de 1000x. Coloração *Romanowsky modificado*.

Os basófilos, raramente encontrados no esfregaço sanguíneo destes primatas, apresentaram-se com poucas segmentações nucleares, quase não sendo visualizadas devido à presença marcante de grânulos citoplasmáticos basofílicos (Figura 7).

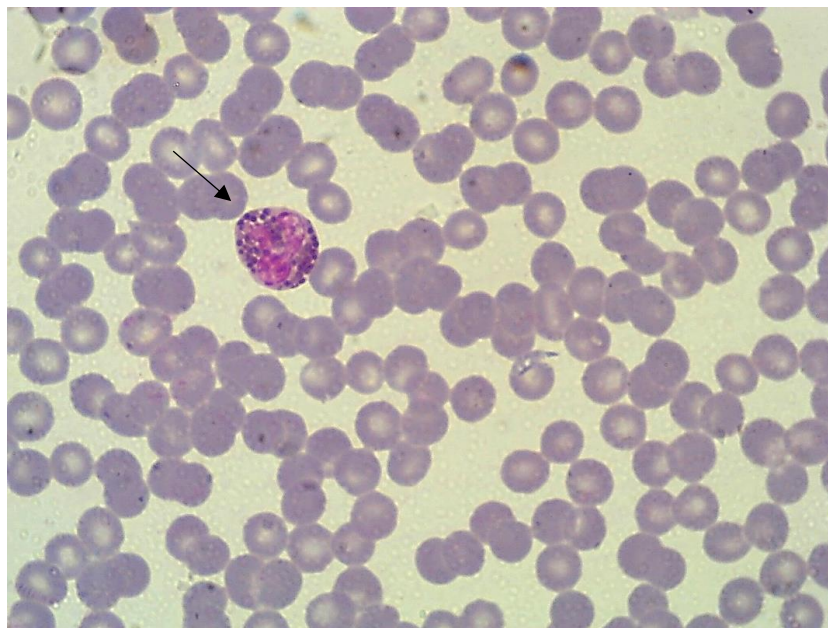


Figura 7. Basófilo (seta) em sangue periférico de primatas *Alouatta caraya* de cativeiro no Estado de São Paulo, Brasil. Aumento de 1000x. Coloração *Romanowsky modificado*.

1.2.2. Considerações sobre o perfil bioquímico renal e hepático

A mensuração das concentrações séricas ou plasmáticas de creatinina e ureia é amplamente utilizada para avaliar a função renal de primatas (FETTMAN; REBAR, 2006). 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 elevado catabolismo proteico, nas infecções, traumatismos ou hemorragias digestivas.

Na avaliação das enzimas hepáticas, existem as de extravazamento e as de indução. Dentre elas, estão a alanina aminotransferase (ALT) e a aspartato aminotransferase (AST). Essas enzimas podem ser encontradas no interior de hepatócitos, bem como de células de fibras musculares cardíacas e esqueléticas. A enzima AST é encontrada em maior quantidade que a ALT nas células musculares esqueléticas e cardíacas dos animais domésticos (ALLISON, 2015).

No fígado, a ALT está presente em maior quantidade no citoplasma, enquanto a AST está localizada no citoplasma e na mitocôndria, deste modo a AST acaba sendo mais difícil de extravasar devido a sua localização, no qual terá que ultrapassar duas barreiras físicas (membrana mitocondrial e citoplasmática), (SATAKE, 2006). No tecido hepático de primatas, acredita-se que a atividade sérica da ALT aumente com lesão celular, enquanto a atividade sérica elevada de AST ocorra somente com morte celular, ou seja, o aumento de sua atividade sérica é indicativo de lesões hepatocelulares mais graves (CAMPBELL, 2006).

Já, a fosfatase alcalina (FA) é considerada uma enzima de indução, pois tem sua produção aumentada em casos de lesão hepatobiliar. Assim, o aumento de sua atividade sérica indica obstrução ou lesão das células hepatobiliares. Estas obstruções causam rompimento de células, extravasando fosfatase alcalina para a corrente sanguínea, aumentando sua atividade na circulação, quadro que indica a colestase (ALLISON, 2015).

Estudos com macacos *Rhesus* mostraram que a atividade sérica da FA é 33% maior em fêmeas adultas do que machos adultos, mas isto difere de espécie para espécie, uma vez que o *Saimiri sciureus* tem situação contrária ao *Rhesus* na produção de fosfatase alcalina em relação ao sexo (LASSEN, 2006).

1.2.3. Considerações sobre Hemoplasmas e Bartonelose em primatas

Recentemente, diversos estudos têm sugerido que *Mycoplasma* spp. e *Bartonella* spp. têm coevoluído com várias espécies de animais, incluindo os seres humanos. Adicionalmente, tais estudos vêm ressaltando o papel dos animais selvagens na manutenção de diferentes patógenos na natureza e na emergência e/ou reemergência de algumas zoonoses (GONÇALVES, 2015).

Os *Mycoplasma* spp. (hemoplasmas) são bactérias que invadem as hemácias e afetam numerosas espécies de animais, incluindo os seres humanos (MAGGI et al., 2013). São bactérias fastidiosas, de formato cocóide e ausência de parede celular, sendo encontradas aderidas à superfície dos eritrócitos ou livres no plasma, podendo causar deformações na superfície destas células. A facilidade de desprender-se da parede celular é devido a frouxidão com que se aderem a parede das hemácias, atingindo o plasma (THRALL, 2015). Sua transmissão ocorre através de artrópodes

hematófagos, tais como carrapatos, pulgas, piolhos, moscas e mosquitos (NEIMARK et al., 2001). Estas bactérias podem persistir por anos em estado latente nos animais infectados, sem causar doença clínica (NEIMARK et al., 2001).

Anteriormente, estes microrganismos foram classificados como sendo da ordem *Rickettsiales*, família *Anaplasmataceae*, mas algumas características fenotípicas não condiziam com outros membros da ordem, como ausência de parede celular, localização extracelular, tamanho pequeno (GUIMARÃES, 2014). Observou-se filogeneticamente, que estes microrganismos eram associados ao grupo *pneumoniae* do gênero *Mycoplasma*, na classe dos Molliculites, e a partir daí, foram reclassificadas como micoplasmas. Para diferenciar as espécies novas que aparecessem, a designação *Candidatus* foi utilizada para táxons novos e não completamente descritos, que estavam com status provisório (RODRIGUES, 2010).

Esta classe é filogeneticamente diversa e inclui mais de 150 espécies em oito gêneros: *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Spiroplasma*, *Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroleplasma*, *Mesoplasma* e *Entomoplasma* (TULLY et al., 1993).

Estas espécies formam um grupo recém-definido de patógenos incultiváveis, que foram classificadas unicamente utilizando sequências de nucleotídeos dos genes 16S rRNA e RNase P (SASHIDA et al., 2014). Ensaio baseado na PCR tem sido bastante utilizados como um meio mais eficiente de diagnóstico de infecções por hemoplasmas, sendo o gene 16S rRNA, base para todos os ensaios da PCR para hemoplasmas (MESSICK, 2004). Duas espécies de hemoplasmas, já foram relatados em primatas não-humanos, *Candidatus M. kahanei* e *Candidatus M. haemomacaque*, sendo que outras continuam indefinidas (GUIMARÃES, 2014).

Por sua vez, a *Bartonella* spp. é uma bactéria de ampla variedade de hospedeiros, tendo vários mamíferos como reservatórios, com vários membros do gênero, atuando como patógenos de importância médica e veterinária (HUANG et al., 2011). São bacilos aeróbicos, fastidiosos, gram-negativos (ZEAITER et al., 2002).

Característica comum nas infecções causadas por *Bartonella* spp. em mamíferos é uma prolongada bacteremia intraeritrocítica, quadro que representa uma adaptação ao modo de transmissão mediado por artrópodes, que atuam como vetores hematófagos. Essa bacteremia intraeritrocítica duradoura ocorre exclusivamente em

mamíferos reservatórios que possuem uma longa história evolutiva com determinadas espécies de *Bartonella* (CHOMEL et al., 2009).

A recente disponibilidade de modelos de infecção e técnicas de genética molecular, tem propiciado investigações sobre a patogênese desta bactéria, fazendo avançar a nossa compreensão dos mecanismos de virulência que fundamentam o tropismo deste agente por células hospedeiras, e a formação de tumores vasculares por estes agentes patogênicos intrigantes (DEHIO, 2005). Acredita-se que as células do endotélio vascular, sejam o nicho primário durante o curso da infecção, podendo ser parasitadas durante uma infecção acidental em hospedeiros não habituais (CHOMEL et al., 2009).

Em seres humanos, o piolho do corpo tem sido associado como único vetor da *Bartonella quintana*, ocorrendo devido à má higiene, fortemente relacionada com a febre das trincheiras, sendo considerada assim, uma doença infecciosa reemergente (SATO et al., 2015).

Bartonella spp., *B. bacilliformis* e *B. quintana* são consideradas como sendo atuantes especificamente em seres humanos (KAISER et al., 2010), sendo descrita em primatas, a *Bartonella quintana*.

1.2.4. Considerações sobre a hemostasia

A hemostasia compreende uma série de eventos complexos, desencadeados pelo organismo, que tem como principal função coibir sangramentos, mantendo o sangue em estado fluido dentro do sistema cardiovascular (GASPARD, 2010).

Didaticamente, a hemostasia é dividida em três fases, a primária, a secundária e a terciária. A primária é caracterizada pelos eventos de interação entre o vaso lesado e as plaquetas, que se inicia com a ativação de plaquetas circulantes envolvendo uma sequência de eventos como adesão de plaquetas ao subendotélio, liberação do conteúdo granular e agregação plaquetária com formação de um tampão hemostático primário (BAKER, 2015).

As plaquetas respondem à lesão vascular quando ocorre exposição do colágeno subendotelial, de laminina e fibronectina. A trombina (fator IIa), durante a ativação da coagulação é um forte agonista da ativação das plaquetas. A ligação das

plaquetas ao colágeno da membrana basal e do estroma extravascular acontece por meio de um receptor de superfície plaquetária, a glicoproteína (gp) Ib-V-IX, que interage com uma glicoproteína plasmática conhecida como fator de von Willebrand (vWF) que liga-se ao colágeno. O recrutamento de plaquetas adicionais é induzido pela liberação de conteúdos granulares até o plasma, o que leva a consequente agregação plaquetária, através da interação entre uma glicoproteína de superfície plaquetária GPIIb-IIIa com o fibrinogênio plasmático. Estes fatores presentes no plasma asseguram a formação da fibrina através da ativação da cascata de coagulação, que é importante e necessária para a estabilização do tampão plaquetário (GENTRY, 2006).

Concomitantemente, tem-se início a hemostasia secundária, que envolve a ativação sequencial de várias substâncias conhecidas como fatores de coagulação, que são enumerados em algarismos romanos de I a XIII (Tabela 1).

Tabela 1. Fatores da cascata de coagulação e local de síntese. Adaptado do Thrall et al., 2006. Jaboticabal, 2018.

Fator	Nome	Local de síntese
I	Fibrinogênio	Fígado
II	Protrombina	Fígado, macrófago
III	Fator tissular, tromboplastina	Endotélio vascular
IV	Cálcio	
V	Pró-acelerina, fator labile	Fígado, macrófago
VII	Pró-convertina	Fígado, macrófago
VIII	Fator anti-hemofílico	Fígado
IX	Fator Christmas	Fígado
X	Fator Stuart-Power	Fígado, macrófago
XI	Antecedente de tromboplastina plasmática	Fígado
XII	Fator Hageman	Fígado
XIII	Fator estabilizante de fibrina	Fígado

A reação da coagulação pode ser iniciada de duas formas distintas: com a exposição e contato do plasma com uma superfície estranha, membrana basal, colágeno ou superfícies carregadas com cargas negativas (denominada via intrínseca). Ou com liberação de tromboplastina tecidual do tecido lesionado (denominada via extrínseca), como observado na Figura 8 (BAKER, 2015).

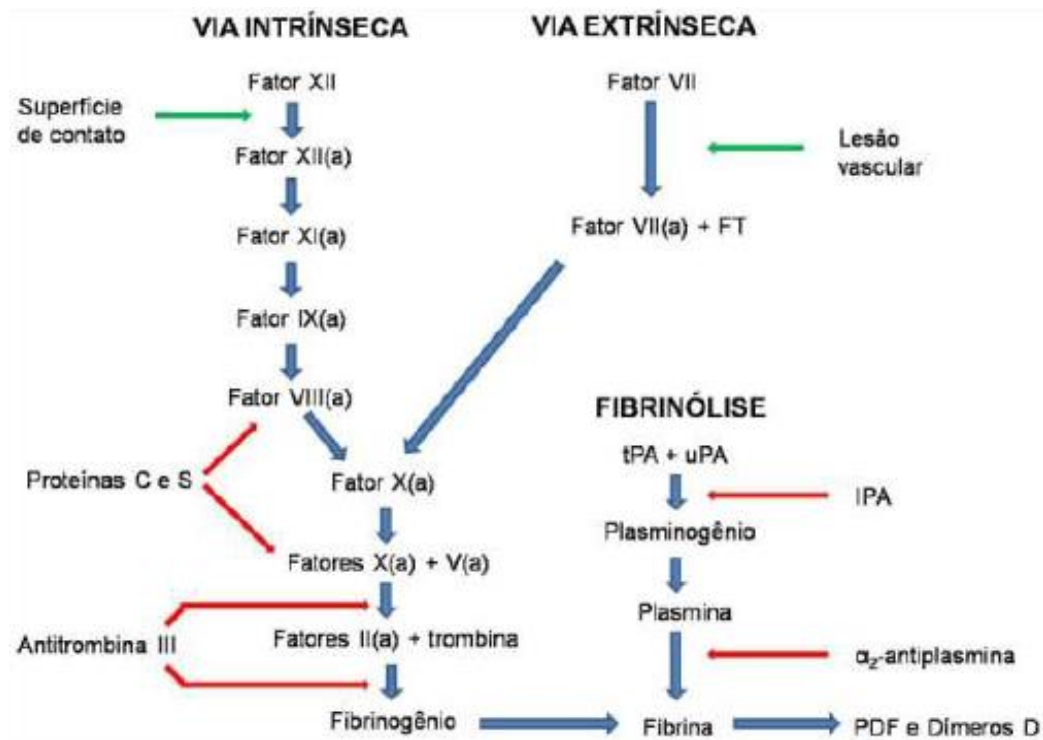


Figura 8. Esquema demonstrando as vias intrínseca, extrínseca e comum da cascata de coagulação. Adaptado do Thrall et al., 2006. Jaboticabal, 2018.

A via intrínseca inicia-se com ativação do fator XII, que por sua vez, ativa o fator IX. O fator IX ativado liga-se ao cálcio, fosfolípido plaquetário e fator VIII. Por sua vez, ocorre a ativação do fator X, com finalização da via intrínseca. Por sua vez, a tromboplastina tecidual, também denominada fator III ou fator tissular, é ativada inicialmente na via extrínseca, e posteriormente, ativa o fator VII, culminando com a ativação final do fator X (FRANCO, 2001; GENTRY, 2006)

Em seguida, ocorre a formação do denominado ativador da protrombina, que na presença do cálcio iônico, é convertida em trombina. O fibrinogênio plasmático na presença da trombina é convertido em monômeros de fibrina, que ao formar um complexo com o fator XIII torna-se insolúvel, formando o coágulo, caracterizando a etapa final da hemostasia secundária (MISCHKE; NOLTE, 2000).

A hemostasia terciária envolve o sistema fibrinolítico, constituído por uma série de proteínas sintetizadas pelo fígado, endotélio vascular e rins. Nesta etapa, ocorre um processo pelo qual os filamentos de fibrina do tampão hemostático e determinados fatores de coagulação, como o fibrinogênio, o fator V, o fator VIII, a protrombina e o

fator XII (GASPARD, 2010), são digeridos em pequenos fragmentos e peptídeos mediante ação de uma enzima chamada plasmina (LANGER; WOLOSKE, 1969). A produção de plasmina confina-se à área de trombose e a lise do coágulo ocorre de dentro pra fora, evitando, em grande parte, a geração sistêmica de plasmina (SELLON, 2004).

1.2.5. Considerações sobre a eletroforese de proteínas séricas

A maioria das proteínas séricas é sintetizada no fígado, com exceção das imunoglobulinas (anticorpos), que são sintetizadas pelas células linfóides (LASSEN, 2006). O soro sanguíneo contém vários tipos de proteínas com funções específicas, incluindo iniciadores de proteases, enzimas, fatores de coagulação, proteínas do sistema complemento e proteínas transportadoras (SATAKE, 2006).

Os dois principais tipos de proteínas do plasma sanguíneo são a albumina e as globulinas, sendo a albumina responsável por aproximadamente 75% da pressão oncótica (pressão osmótica-coloidal) do plasma vascular, e regula o conteúdo de água que se difunde do sangue aos tecidos, enquanto as globulinas representam um grupo heterogêneo, incluindo imunoglobulinas, vitaminas, hormônios e proteínas inflamatórias, entre outras (LASSEN, 2015).

As proteínas sanguíneas de fase aguda da inflamação (PFA) são classificadas em positivas e negativas. As positivas apresentam aumento na concentração sérica durante o processo inflamatório, e são as seguintes: proteína C reativa, proteína ligadora de manose, alfa-1 antitripsina, alfa-1 antitripsina, alfa-2 macroglobulina, fibrinogênio, protrombina, fator VIII, fator de von Willebrand, plasminogênio, fatores do complemento, ferritina, amiloide A sérica, ceruloplasmina, haptoglobina e alfa-1 glicoproteína ácida. Enquanto as proteínas de fase aguda negativa são aquelas cuja síntese é diminuída durante o processo inflamatório, sendo: albumina, transferrina, pré-albumina e proteína de ligação do retinol (CERÓN et al., 2005; JAIN et al., 2011).

A ceruloplasmina é uma proteína sintetizada pelo fígado, monócitos, astrócitos e células de Sertoli. Atua na defesa imunológica, sendo responsável pelo transporte de

cobre. Sua presença na circulação, indica um processo inflamatório (YAPUR et al., 2007).

Foi demonstrado que a transferrina (Tf) sérica secretada pelos hepatócitos, bem como a ovotransferrina (ovo-Tf) secretada no oviduto são a mesma proteína. Sua principal função fisiológica é a ligação e transporte de ferro para as células, sendo suas atividades bacteriostáticas e bactericidas relacionadas com a habilidade de sequestrar este metal, um elemento essencial para o crescimento bacteriano, e que contribui para a imunidade inata (XIE et al., 2002).

A haptoglobina é uma proteína ligada a hemoglobina, e é liberada durante a destruição de eritrócitos. Seu aumento na circulação indica hemólise intravascular (HUGO; YAMIR, 2011).

A glicoproteína ácida não tem uma ação bem esclarecida, mesmo com diversos estudos, mas, de acordo com alguns pesquisadores, ela desempenha numerosas atividades com significado fisiológico, sendo que localmente contribui para a manutenção da homeostasia através da redução das lesões que ocorrem nos tipos celulares extra-hepáticos, principalmente nas células endoteliais e epiteliais (FOURNIER et al., 2000).

O proteinograma (Figura 8) é uma metodologia empregada para analisar a distribuição das proteínas sanguíneas através de sua separação, identificação e quantificação de forma relativa pela aplicação de um campo elétrico (eletroforese) (ECKERSALL, 2008). Em situações patológicas, as alterações em concentrações de proteínas plasmáticas devem ser examinadas, auxiliando nas conclusões clínicas e laboratoriais antes de um diagnóstico ou prognóstico (THOMAS, 2000). No caso dos macacos bugios, bem como para muitas espécies de primatas neotropicais, pouco se tem documentado a respeito do metabolismo proteico (ALMOSNY, 2009).

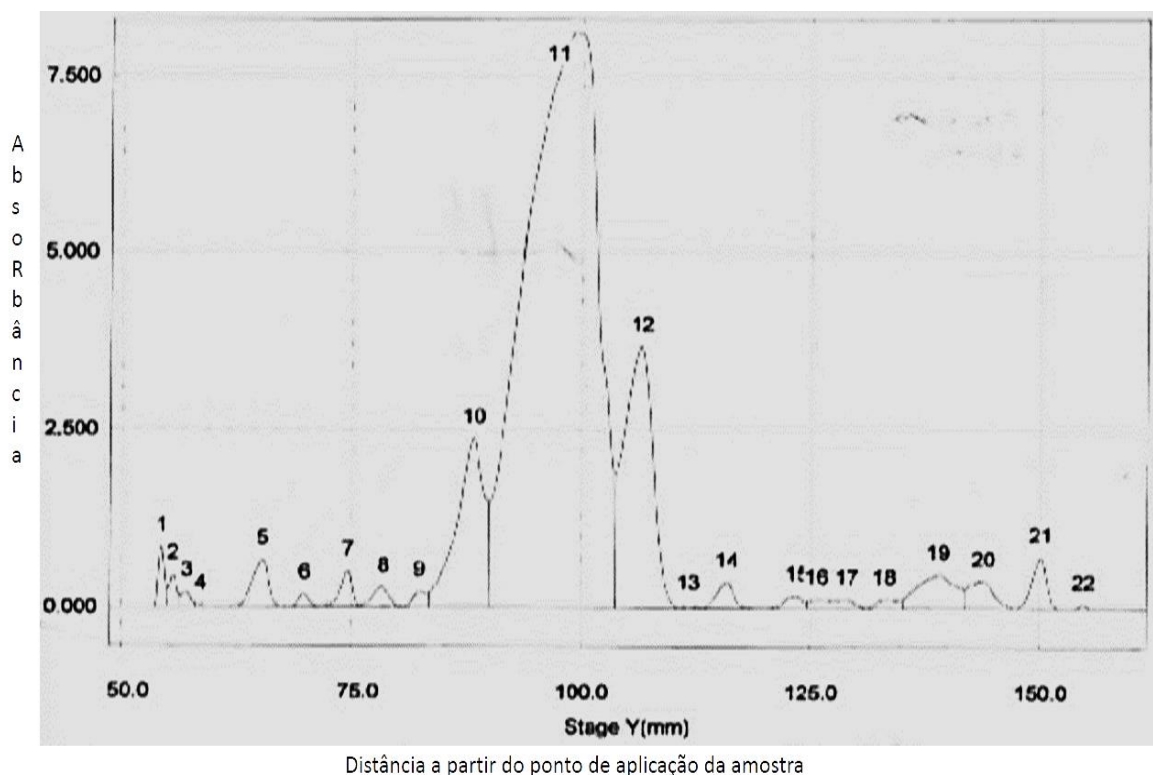


Figura 9. Traçado eletroforético de macaco bugio *Alouatta caraya* de cativeiro obtido em gel de poliacrilamida contendo SDS-PAGE. Jaboticabal, São Paulo, Brasil ,2018.

Além dos esforços para evidenciar aspectos ecológicos e taxonômicos dos primatas, poucos trabalhos tem sido documentados sobre os aspectos clínico-patológicos das populações de primatas de cativeiro e vida livre, devido à dificuldade no manejo e contenção destes animais. Devido à proximidade filogenética dos primatas com seres humanos, esta modalidade de estudo se torna importante para aumentar o conhecimento das patologias destes animais.

1.3. REFERÊNCIAS

ALLISON, R.W. **Avaliação laboratorial da função hepática.** In: THRALL, M.A.; WEISER, G.; ALLISON, R.W.; CAMPBELL, T.W. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. 2º ed. Editora Roca, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2015, cap.26, p. 346-366.

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, 2009, p.68-69.

AURICCHIO, P. **Gênero *Alouatta***. In: AURICCHIO, P. *Primatas do Brasil*. São Paulo: Terra Brasilis, 1995, 127-143.

BAKER, DC: **Diagnóstico das anormalidades da hemostasia**. In: THRALL MA, WEISER G, ALLISON RW, CAMPBELL, TW. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. 2 ed. Ed. Roca: Rio de Janeiro, 2015, cap. 16, p. 159-176.

BARNES, P.J., PEDERSEN, S., BUSSE, W.M. Efficacy and safety of inhaled corticosteroids. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medical**, EUA, v.157, p.51-53, 1998.

BICCA-MARQUES, J.C.; CALEGARO-MARQUES, C. Behavioral Thermoregulation in a sexually and developmentally dichromatic Neotropical primate, the black-and-gold howling monkey (*Alouatta caraya*). **American Journal of Physical Anthropology**, EUA, v.106, p.533-546, 1998.

CAMPBELL, T.W. **Hematologia de mamíferos: animais de laboratório e espécies variadas**. In: THRALL, M.A.; WEISER, G.; ALLISON, R.W.; CAMPBELL, T.W. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. 2º ed. Editora Roca, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2006, cap.16, p. 201-214.

CERÓN, J.J.; ECKERSALL, P.D.; MARTINEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**. Suíça, v.34, n.2, p. 85-99, 2005.

CHOMEL, B. B.; BOULOUIS, H. J.; BREITSCHWERDT, E. B.; KASTEN, R. W.; VAYSSIER-TAUSSAT, M.; BIRTLES, R. J.; KOEHLER, J. E.; DEHIO, C. Ecological fitness and strategies of adaptation of *Bartonella* species to their hosts and vectors. **Veterinary Research**, Chicago, v. 40, n. 2, 2009.

DEHIO, C. Review: *Bartonella* host cell interactions and vascular tumour formation. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, n. 8, p. 621-631, 2005.

ECKERSALL, P.D.; BELL R. Acute phase proteins: biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. **The Veterinary Journal**. EUA. v.185, n.1, p.23-27, 2010.

FERREIRA, A.F. **Perfis hematológicos e bioquímicos de macacos-prego (*Cebus spp.*, Erxlebe, 1777) mantidos em cativeiro no Estado da Paraíba**. 2009. 114f. (Tese de Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

FETMMAN, J.M.; REBAR, A. **Avaliação laboratorial da função renal**. In: THRALL, M.A.; WEISER, G.; ALLISON, R.W.; CAMPBELL, T.W. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. 2º ed. Editora Roca, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2006, cap.21, p. 285-310

FLAIBAN, K.K.M.C.; SPOHR, K.A.H.; L.S. MALANSKIL, S.; SVOBODA, W.K.; SHIOZAWA, M.M.; HILST, C.L.C.; 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. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.61, n. 3, p. 628-634, 2009.

FOURNIER, T., MEDJOUBI-N, N.; PORQUET, D. Alpha-1-acid glycoprotein. **Biochimica et Biophysica Acta**, França. v.1482, n. 1-2,157-171, 2000.

GASPARD, K. J. Distúrbios da hemostasia. In: PORTH, C. M.; MATFIN, G. **Fisiopatologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. p.269-285.

GENTRY, P. A. Coagulação sanguínea e hemostasia. In: REECE, W. O. **Dukes: fisiologia dos animais domésticos**. 12° ed. Rio de janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.49-64.

GONÇALVES, L.R. **Deteção e caracterização molecular de espécies de *Mycoplasma* e *Bartonella* em roedores silvestres e sinantrópicos no Brasil**. 2015. 102 f (Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agropecuária na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita) UNESP. Jaboticabal, 2015.

GONÇALVES, L. R.; ROQUE, A. L. R.; MATOS, C. A.; FERNANDES, S. J.; OLMOS, I. D. F.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. Diversity and molecular characterization of novel hemoplasmas infecting wild rodents from different Brazilian biomes. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 43, p. 50-56, 2015.

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

GUIMARÃES, A.M.; SANTOS, A.P.;TIMENETSKY, J.; BOWER, L.P.; STRAIT, E.; MESSICK, J.B. Identificação de antígenos de *Mycoplasma suis* e desenvolvimento de um imunoensaio de microbele múltiplas. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Canadá, v.26, n.2, 2014.

HIRSCH, A.; LANDAU, E. C.; TEDESCHI, A. C M.; MENEGHETI, J. O. **Estudo comparativo das espécies do gênero *Alouatta*, Lacépède, 1799 (Platyrrhini, Atelidae) e a sua distribuição geográfica na América do Sul**. In: RYLANDS, A. B.; BERNANDES, A. T. (eds.). Fundação Biodiversitas: Belo Horizonte, 1991, p.239-263.

HOGAN, M.M.; VOGEL, S.N. Inhibition of macrophage tumoricidal activity by glucocorticoids. **The Journal of Immunology**, EUA, v.140, n.2, p. 513-519, 1988.

HUANG, R.; LIU, Q.; LI, G.; LI, D.; SONG, X.; BIRTLES, R.J.; ZHAO, F. *Bartonella quintana* infections in captive monkeys, China. **Emerging Infectious Diseases**, EUA, v.17, p.1707–1709, 2011.

JAIN, S.; GAUTAM, V.; NASEEM S. Acute-phase proteins: as diagnostic tool. **Journal of Pharmacy and Bioallied Science**, Índia, v.3, n.1, p.118-127, 2011.

JUNIOR, J.C.S. **Perfil sanitário de bugios ruivos (*Alouatta guariba clamitans*) (Cabreria, 1940) (Primates: Atelidae): um estudo com animais recepcionados e mantidos em perímetro urbano no município de Indaial, Santa Catarina, Brasil**. 2007. 112 f. (Dissertação de Mestrado em Saúde Pública na Universidade Federal de Santa Catarina). Universidade Federal de Santa Catarina. Santa Catarina, 2007.

KAISER, P. O.; RIESSA, T.; O' ROURKE, F.; LINKEB, D.; KEMPF, V. A. J. *Bartonella* spp.: throwing light on uncommon human infections. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 301, n. 1, p. 7-15, 2010.

LANGER, B.; WOLOSKEK, M. Coagulação e fibrinólise: idéias atuais e suas aplicações clínicas. **Revista Medicina**, São Paulo, v.53, p.165-172, 1969.

LASSEN, E.D. **Avaliação laboratorial do fígado**. In: THRALL, M.A.; WEISER, G.; ALLISON, R.W.; CAMPBELL, T.W. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. 2° ed. Editora Roca, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2006, cap.23, p. 335-362.

LASSEN, E.D. **Avaliação laboratorial das proteínas séricas**. In: THRALL, M.A.; WEISER, G.; ALLISON, R.W.; CAMPBELL, T.W. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. 2° ed. Editora Roca, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2006, cap.26, p. 376-390.

MAGGI, R.G.; MASCARELLI, P.E.; BALAKRISHNAN, N.; RODHE, C.M.; KELLY, C.M.; RAMAIAH, L.; LEACH, M.W.; BREITSCHWERDT, E.B. "Candidatus *Mycoplasma haemomacae*" and *Bartonella quintana* Bacteremia em *Cynomolgus* monkeys. **Journal of Clinical Microbiology**. EUA, v.51, p.1408–1411, 2013.

MESSICK J.B. Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. **Veterinary Clinical Pathology**. Suíça, v.33, n.1, p. 2–13, 2003.

MISCHKE, R.; NOLTE, I.J.A. Hemostasis: Introduction, Overview, Laboratory Techniques. In: **Schamli's veterinary hematology**. FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.J. 5ª edição. Philadelphia: Lea & Febiger, 2000, cap. 73, p.519-525.

MILTON, K. **The foraging strategy of howler monkeys: a study in primate economics**. Columbia University Press, New York, 1980, p 70-78.

NEIMARK, H.; JOHANSSON, K.E.; RIKIHISA, Y.; TULLY, J.G. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of 'Candidatus *Mycoplasma haemofelis*', 'Candidatus *Mycoplasma haemomuris*', 'Candidatus *Mycoplasma haemosuis*' and 'Candidatus *Mycoplasma wenyonii*'. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. Londres, v.51, p.891-899, 2001.

POUGH, F.H.; JANIS, C.M.; HEISER, J.B. **A vida dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu, 2003, p. 25-30.

RIBEIRO, C.L.B.; MELO-REIS, P.R.; LEMES, S.R.; ARAÚJO, L.A.; SILVA-JUNIOR N.J. Análise hematológica de macacos-prego (*Sapajus libidinosus* Spix, 1923) e bugios (*Alouatta caraya* Humboldt, 1812) de vida livre no sul do estado de Tocantins, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 13:2, p. 110-114, 2015.

ROVIROSA-HERNÁNDEZ, M.J.; CABA, M.; 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**, Louisiana-EUA, v. 41 309–316, 2012.

SÁNCHEZ-SARMIENTO, A.M.; ZWARG, T.; SANTOS, C.F.S.; GUIMARÃES-LUIZ, T.; GENOY- PUERTO, A.; ELIANA REIKO MATUSHIMA, E.R. Hematological parameters and the variations resulting from stress of *Alouatta caraya* during a Wildlife Rescue Program in Brazil. **American Journal of Primatology**, EUA, v. 77, p. 246–253, 2015.

SASHIDA, H., SUZUKI, Y.; ROKUHARA, S.; NAGAI, K.; HARASAWA, R. Molecular Demonstration of Hemotropic Mycoplasmas in Wild Japanese Monkeys (*Macaca fuscata*). **Journal of Veterinary. Medical of Science**. Jãpão, v.76, p. 97–101, 2014.

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**. (Doutorado em Medicina Veterinária). 2006, 60f. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2006.

SELLON, D. C. Disorders of the hematopoietic system. In: REED, S. M.; BAYLY, W. M.; SELLON, D. C. **Equine internal medicine**. 2. ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2004. p.721-768

THRALL, M.A. Anemia regenerativa. In: **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. THRALL MA, WEISER G, ALLISON RW, CAMPBELL, TW. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. 2 ed. Ed. Roca: Rio de Janeiro, 2006, cap.8, 16, p.89-113.

TULLY J. G.; BOVÉ, J. M.; LAIGRET, F.; WHITCOMB, R. F. Revised Taxonomy of the Class Mollicutes: Proposed elevation of a monophyletic cluster of arthropod-associated Mollicutes to ordinal rank (*Entomoplasmales* ord. nov.), with provision for familial rank to separate species with nonhelical morphology (*Entomoplasmataceae* fam. nov.) from helical species (*Spiroplasmataceae*), and emended descriptions of the order *Mycoplasmales*, family *Mycoplasmataceae*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Londres, v. 43, n. 2, p. 378-385, 1993.

VERONA, C.E.S.; PISSINATTI, A. **Primates – Primatas do Novo Mundo** (Sagüi, Macaco-Prego, Macaco-aranha, Bugio). In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; DIAS, J.L.C. **Tratado de Animais Selvagens**. São Paulo: Roca, 2014, 723-743.

XIE, H., HUFF, G. R., HUFF, W. E., BALOG, J. M., HOLT, P. & RATH, N. C. Identification of ovotransferrin as an acute phase protein in chickens. **Poultry Science**. EUA, v.81, n.1, p.112-120, 2002.

WALNER, B.P., MATTALIANO, R.J., HESSION, C.L. Cloning and expression of human lipocortin, a phospholipase A2 inhibitor with potential anti-inflammatory activity. **Nature**. EUA. V. 320, P.77-81, 1986.

YAPUR M.V., BUSTOS M.F., GONZALES A.S., NEGRI G.A. Ceruloplasmina determinación de su actividad ferrooxidasa. **Acta bioquímica clínica latino-americana**. Buenos Aires, v.41, n.3, p.347-351, 2007.

YUNES V. **Estudo clínico–morfométrico, hematológico, bioquímico e imunocitoquímico em *Alouatta belzebul* (Primates, Platyrrhini)**. 2016. 107 f. (Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Botucatu, 2016.

ZEAITER, Z.; FOURNIER, P.E.; OGATA, H.; RAOULT, D. Phylogenetic classification of *Bartonella* species by comparing *groEL* sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. Londres, v.52, p.165-171, 2002.

CAPÍTULO 2 - Parâmetros hemostáticos de primatas *Alouatta caraya* e *Alouatta guariba clamitans* (Primates, Atelidae) de cativeiro no Estado de São Paulo, Brasil (Artigo submetido na Revista *Journal of Medical Primatology*)

Cristiane M F Melo¹, Edmilson R Daneze¹, Márcia F R Sobreira^{2*}

¹Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São Paulo, Brasil.

² Departamento de Patologia Clínica do Centro Universitário Moura Lacerda, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil

RESUMO

Introdução: Estudos dos parâmetros hemostáticos de espécies de primatas *Alouatta* não são documentados na literatura.

Objetivos: Investigar os parâmetros hemostáticos de espécies de macacos bugios de cativeiro no Estado de São Paulo, Brasil.

Material e Métodos: Foi colhido sangue de 9 *Alouatta guariba clamitans* e 21 *Alouatta caraya* para realização da contagem de plaquetas, tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), tempo de protrombina (TP) e concentração de fibrinogênio plasmático.

Resultados: Não ocorreram diferenças significativas na contagem de plaquetas, TTPA, TP e concentração de fibrinogênio plasmático entre as espécies estudadas.

Conclusão: Este trabalho refere-se ao primeiro artigo sobre a comparação de parâmetros hemostáticos entre as espécie *Alouatta caraya* e *Alouatta guariba clamitans* de cativeiro no Estado de São Paulo, Brasil.

Palavras-chave: coagulação, valores de referência, bugios, Brasil.

*Autor para correspondência: Márcia Ferreira da Rosa Sobreira, Centro Universitário Moura Lacerda. Dr Oscar de Moura Lacerda, 1520, Ribeirão Preto-São Paulo. CEP: 14076-510, E-mail: marciafrsobreira@gmail.com

1.INTRODUÇÃO

Os representantes do gênero *Alouatta* (Lacépède, 1799) são animais arborícolas, herbívoros, de dieta sazonal, com corpo maço, longa pelagem e possuem um sistema digestório que contém bactérias e protozoários que degradam a celulose. São conhecidos no Brasil como guaribas, barbados ou gritadores, e seu dimorfismo sexual e idade são dados pelo tamanho do osso hióide, tamanho dos caninos, tamanho corpóreo e cor da pelagem [Schneider et al., 1993¹, Auricchio, 1995²].

O bugio-ruivo (*Alouatta guariba clamitans*) possui distribuição associada ao Bioma Mata Atlântica ocorrendo, no Brasil, desde o Espírito Santo até a bacia do Rio Camaquã no Rio Grande do Sul [Printes et al., 2001³]. Em geral, os grupos desta subespécie têm apenas um macho adulto e, raramente, mais do que três machos adultos no total [Fortes, 2008⁴]. De acordo com a [IUCN, 2008⁵] o bugio-ruivo encontra-se em situação quase ameaçado.

Por sua vez, o bugio-preto (*Alouatta caraya*) é um primata do Novo Mundo, que habita desde a Argentina até o México e dos Andes à Costa do Atlântico [Neville et al., 1998⁶]. Esta espécie apresenta dicromatismo sexual, com machos adultos de pelagem preta e fêmeas alaranjadas, vivendo em grupos de 3 a 19 indivíduos e com hábito diurno [Auricchio, 1995²]. De acordo com a [IUCN, 2008⁶] esta espécie de primata encontra-se com *status* de menor preocupação.

Animais de vida livre coexistem com uma gama de vetores que podem transmitir doenças bacterianas, virais e por protozoários que podem levar a distúrbios secundários como desordens hemostáticas. A hemostasia é um mecanismo fisiológico que envolve a parede vascular, as plaquetas e fatores de coagulação, visando manter o sangue em estado fluído e no interior do sistema cardiovascular, promovendo a contenção de uma hemorragia através da formação de um tampão hemostático [Baker, 2015⁸].

Didaticamente, a hemostasia é dividida em três fases, assim determinadas: primária, secundária e terciária. A fase primária é caracterizada por eventos relacionados com a interação entre a parede de

vasos lesados e ativação das plaquetas, levando a adesão de plaquetas ao subendotélio, secreção do conteúdo granular e agregação de plaquetas a plaquetas formando o tampão hemostático primário ou plaquetário [Baker, 2015⁸]. Para que ocorra adesão de plaqueta a matriz extracelular e agregação plaqueta-plaqueta várias glicoproteínas são expostas na superfície plaquetária [Meyer et al., 1998⁹].

A hemostasia secundária consiste na ativação da cascata de coagulação com formação da fibrina a partir do fibrinogênio, formando o tampão hemostático. Por sua vez, na hemostasia terciária ocorre a fibrinólise, com restabelecimento do fluxo sanguíneo após reparo permanente do vaso [Bittencourt e Santos, 2016¹⁰].

As reações bioquímicas envolvidas na hemostasia são estritamente reguladas, de modo a não ocorrer ativação excessiva do sistema, bem como formação inadequada de fibrina e oclusão vascular. As proteases que atuam no fenômeno da coagulação são reguladas por proteínas inibitórias, que agem atuando como inibidores fisiológicos da coagulação [Gaspard, 2010¹¹].

As plaquetas dos mamíferos são partículas anucleadas, formadas a partir da fragmentação citoplasmática dos megacariócitos, apresentam cerca de 2 a 5 μm de diâmetro e 0,5 μm de espessura, e seu número circulante varia entre 150 e 1000 x 10³ plaquetas/ μL , de acordo com a espécie [White, 2011¹²]. As plaquetas dos primatas não-humanos apresentam morfologia semelhante a observada em outras espécies, com formato amorfo e pronunciada granulação violeta [Moore, 2000¹³]. Os fenômenos da coagulação para primatas não-humanos são similares aos relatados em humanos [April e Keith, 1988¹⁴].

Alguns indivíduos apresentam anormalidades hemostáticas que podem acarretar na incapacidade na formação do tampão, levando a eventos hemorrágicos, ou, em outros casos, em hemostasia excessiva, levando a eventos trombóticos [Colman, 2010¹⁵].

Para a avaliação laboratorial da hemostasia, inicialmente, deve-se incluir hemograma completo, tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) que avalia as vias intrínseca e comum da coagulação,

tempo de coagulação ativada (TCA), tempo de protrombina (TP) que avalia as vias extrínseca e comum e determinação da concentração de fibrinogênio plasmático [Baker, 2015⁸].

Na literatura, as pesquisas sobre os parâmetros hemostáticos de primatas *Alouatta*, (Família: Atelidae, ordem: Primates, infraordem: *Platyrrhini*), referentes as dosagens de TP, TTPA e concentração plasmática de fibrinogênio, não existem até o presente momento. Como os primatas são prioritários no campo da experimentação, não existindo dúvidas quanto ao seu valor nas pesquisas científicas, no ensino, na produção e no controle da qualidade de imunobiológicos, fármacos e de outros produtos correlatos (Andrade, 2003¹⁶), torna-se importante estudos sobre os parâmetros fisiológicos destes animais. Diante disto, o objetivo desta pesquisa foi investigar e diferenciar parâmetros hemostáticos em relação as espécies de macacos *Alouatta guariba clamitans* e *Alouatta caraya* de cativeiro no Estado de São Paulo, sudeste do Brasil.

2.MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Autorização de experimento

Este estudo foi aprovado pelo Sistema de Autorização e Informação da Biodiversidade (SISBIO, nº de cadastro: 51662-2) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista-Júlio de Mesquita (protocolo: 5.595/16).

2.2 Animais de estudo

Durante o período de abril de 2016 a janeiro de 2017 foram colhidos sangue de 30 macacos bugios hípidos de cativeiro, separados em dois grupos, de acordo com a espécie: 9 A. g. *clamitans* e 21 A. *caraya*. As coletas foram realizadas em nove municípios do Estado de São Paulo, Brasil: Zoológico de Ilha Solteira, Zoológico Municipal Missina Palmeira Zancaner em Catanduva, Zoológico Municipal Joaquim Garcia Franco em Guaíra, Zoológico Thermas do Laranjais em Olímpia, Bosque Municipal Fábio Barreto em Ribeirão Preto, Zoológico Municipal de Guarulhos, Parque Municipal Quinzinho de

Barros em Sorocaba, Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Selvagens (CEMPAS) em Botucatu, e ainda, no Projeto Mucky, na cidade de Itu (Figura 1).

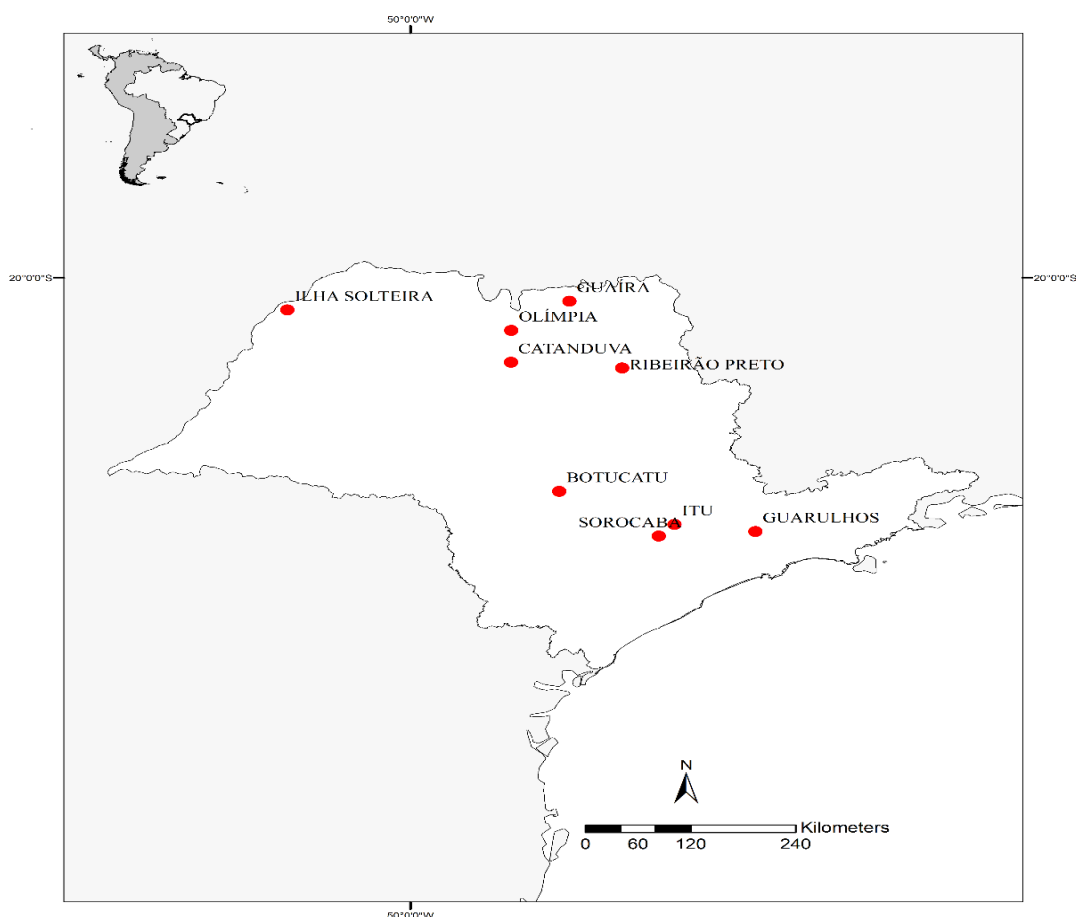


Fig 1. Municípios onde foram realizadas coletas de sangue para dosagens dos parâmetros hemostáticos de macacos bugios *Alouatta guariba clamitans* e *Alouatta caraya* de cativeiro no Estado de São Paulo, Brasil, 2018.

Antes da coleta, os animais foram capturados com puçá. Em seguida, foram anestesiados com associação de cloridrato de tiletamina / cloridrato de zolazepam na dose de 6 mg/Kg, pela via intramuscular (IM) [Verona e Pissinatti, 2014¹⁷]. As informações obtidas durante a avaliação foram catalogadas em fichas individuais, contendo os seguintes dados: identificação (nome), local de coleta, espécie (nome popular e científico), origem e gênero.

2.3 Delineamento experimental da avaliação hemostática

O tempo de captura entre as colheitas de sangue foram de 20 minutos de primata para primata. Fez-se colheitas de sangue por venopunção cefálica, onde obteve-se um total de 6 mL de sangue de cada animal, sendo 3 mL em tubos de ensaio contendo 7,2 mg de ácido etilenodiamino tetra-acético dipotássico (K_2EDTA) para obtenção da contagem de plaquetas e 3 mL em tubo de ensaio contendo citrato de sódio a 3,2% para realização de testes hemostáticos por método cronométrico.

O sangue coletado em tubos contendo K_2EDTA foi homogeneizado e as contagens globais de plaquetas foram obtidas em contador automático de células (Horiba Medical). As amostras com citrato de sódio foram centrifugadas (1.529 G, durante 30 minutos) à temperatura de 8°C a 10°C. Posteriormente, o plasma foi separado e acondicionado em microtubos estéreis, devidamente identificados e congelados a -196°C até a momento das análises.

Os testes hemostáticos foram realizados no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Núcleo Hospitalar Veterinário (NHV) do Centro Universitário Moura Lacerda (CUML) em Ribeirão Preto-São Paulo. As dosagens dos tempos de tromboplastina parcial ativada (TTPA), tempo de protrombina (TP) e os valores da concentração plasmática de fibrinogênio foram realizadas em coagulômetro (COAG 1000, WAMA Diagnóstica) com uso de reagentes comerciais da LABTEST® Diagnóstica.

2.4 Análise dos dados

Foram avaliadas as médias, desvio-padrão, valores mínimo e máximo de primatas para os parâmetros avaliados. Após esta análise, foi aplicado o Teste de Tukey para comparação das médias entre espécies ao nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram processadas no software Statistica versão 7.0.

3.RESULTADOS

Dos 30 macacos bugios: 21/30 (70%) eram *Alouatta caraya* e 9/30 (30%) eram *Alouatta guariba clamitans*. (Tabela 1). Os resultados das médias, desvio-padrão, valores mínimo e máximo das análises referentes a contagem de plaquetas, TP, TTPA e concentração de fibrinogênio plasmático da população de primatas *A. caraya* e *A. g. clamitans*, seguem na tabela abaixo, ao nível de significância de 5%. (Tabela 1).

Tabela 1. Médias, desvio-padrão, valores mínimo e máximo da contagem de plaquetas, tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) e concentração plasmática de fibrinogênio entre as espécies de primatas *Alouatta caraya* e *Alouatta guariba clamitans* de cativeiro no Estado de São Paulo, Brasil, Jaboticabal, 2018.

Parâmetros	Análises	População Total (n:30)	Ac (n:21)	Ag (n:9)	Valor de p*
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Média	273,65	271,33	239,89	0,476621
	DP	122,01	134,23	77,36	
	Mínimo	44	44	146	
	Máximo	538	532	390	
Fibrinogênio (mg/dL)	Média	218,45	154,05	280,67	0,098357
	DP	200,5	149,03	270,15	
	Mínimo	7,5	7,5	36	
	Máximo	811	602	811	
TTPA(s)	Média	32,38	32,00	30,22	0,583825
	DP	10,45	11,73	10,55	
	Mínimo	13,6	20,4	13,6	
	Máximo	76,4	76,4	46,9	
TP (s)	Média	10,88	10,81	10,03	0,274576
	DP	2,38	2,42	2,69	
	Mínimo	5,8	6,95	5,8	
	Máximo	16,6	16,6	13,7	

*: Valor de $P < 0,05$, TP: Tempo de Protrombina, TTPA: Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada, DP: desvio-padrão, s (segundos), Ac (*Alouatta caraya*), Ag (*Alouatta guariba clamitans*).

Não ocorreram diferenças estatísticas em relação aos parâmetros hemostáticos de macacos bugios *Alouatta caraya* e *Alouatta guariba clamitans*. Os valores mínimo e máximo dos primatas *A. caraya* na contagem de plaquetas, concentração de fibrinogênio plasmático, tempo de protrombina e

tempo de tromboplastina parcial ativada ficaram entre (44 a 532 $\times 10^3/\mu\text{L}$, 7,5 a 602 mg/dL, 6,95 a 16,6 s, 20,4 a 76,4 s), respectivamente.

Por sua vez, os valores mínimo e máximo dos primatas *A. guariba clamitans* referente a contagem de plaquetas, concentração de fibrinogênio plasmático, tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial ativada de (146 a 390 $\times 10^3/\mu\text{L}$, 36 a 811 mg/dL, 5,8 a 13,7 s e 13,6 a 46,9s), respectivamente.

4.DISSCUSSÃO

Alguns trabalhos já foram realizados sobre a hemostasia de primatas, principalmente do Velho Mundo, porém a comparação dos dados obtidos é limitada devido as possíveis diferenças entre as populações. Fatores como idade, tamanho, sexo, sazonalidade, saúde, habitat e dieta podem afetar os parâmetros (Duncan e Prasse, 1994¹⁸), desde hematológicos a hemostáticos. Outros fatores podem ser o método de coleta, recipiente de coleta, concentração de anticoagulante, reagentes utilizados, tempo de armazenamento das amostras de sangue e a temperatura de acondicionamento das amostras sanguíneas (Monce et al., 1995¹⁹).

As disfunções plaquetárias são classificadas em adquiridas e hereditárias. Na forma adquirida podem ocorrer devido ao uso de anti-inflamatórios não-esteroidais, proteínas plasmáticas anormais (paraproteínas do mieloma), autoanticorpos, tranquilizantes e catabólitos que se acumulam no plasma dos pacientes. Na forma hereditária, destacam-se a doença de von Willebrand, várias trombastenias (adesão deficiente de plaquetas umas às outras) e trombopatias (função de plaquetas anormal) [Baker, 2015⁸]

Não ocorreram diferenças significativas na contagem de plaquetas entre o sexo e espécies de bugios neste trabalho. A contagem de plaquetas foi realizada por um contador automático de células, em 21 primatas *Alouatta caraya* (271, $33 \pm 134,23$). Entretanto, [Satake, 2006²⁰] realizou contagem de

plaquetas manualmente em *Alouatta caraya* de vida livre provenientes do Mato Grosso do Sul, e obteve resultados semelhantes ($\sigma 226 \pm 41,55 \times 10^3 / \mu\text{L}$, $\varphi 257 \pm 10,67 \times 10^3 / \mu\text{L}$) ao desta pesquisa.

Os valores nas contagens de plaquetas observados nos macacos *Alouatta caraya* ficaram entre ($44 \times 10^3 / \mu\text{L}$ a $538 \times 10^3 / \mu\text{L}$), e foram levemente superiores ao de [Ribeiro et al., 2015²¹] em Tocantins, com *Alouatta caraya* de vida livre, ($\sigma 115 \times 10^3 / \mu\text{L}$ a $314 \times 10^3 / \mu\text{L}$, $\varphi 98 \times 10^3 / \mu\text{L}$ a $265 \times 10^3 / \mu\text{L}$ $96,33 \pm 71,91 \times 10^3 / \mu\text{L}$). Similarmente ao trabalho de [Sánchez-Sarmiento et al., 2015²²], com *Alouatta caraya* de vida livre no Estado de São Paulo, ($\sigma 87,33 \pm 31,60 \times 10^3 / \mu\text{L}$, $\varphi 96,33 \pm 71,91 \times 10^3 / \mu\text{L}$). Como estes animais eram de vida livre, as condições do ambiente, de captura, mudança de habitat, rarefação dos recursos naturais e contato com animais doentes, causam situações de estresse crônico e imunodepressão, alterando as contagens de plaquetas, o que pode ter ocasionado esta diferença (Vié et al., 1998²³).

Por sua vez, neste trabalho, a subespécie *Alouatta guariba clamitans* obteve média e desvio-padrão na contagem de plaquetas de $239,89 \pm 77,36 \times 10^3 / \mu\text{L}$. Resultado semelhante a [Souza-Júnior, 2007²⁴] em Santa Catarina, com *A. g. clamitans* ($220,67 \pm 106,69 \times 10^3 / \mu\text{L}$). O que pode ter contribuído para isto, é o fato destes animais serem mantidos em cativeiro, e assim, submetidos a melhores condições sócio-ambientais que os animais de vida livre.

Os bugios são herbívoros e bastante influenciados pela sazonalidade alimentar, em diferentes épocas do ano, devido as mudanças nas folhagens e no nível nutricional. Grande parte de plantas, sobretudo vegetais folhosos verdes possuem a vitamina K1. Seu consumo é importante para síntese dos fatores da coagulação no fígado. E sua deficiência clínica tem sido classicamente descrita como hipoprotrombinemia e está associada ao aumento no tempo de protrombina (TP) ou doença hepática grave [Rezender et al., 2012²⁵]. Nesta pesquisa, não ocorreram diferenças significativas quanto ao tempo de protrombina em relação as diferentes espécies de bugios estudadas. A população de bugios amostrada obteve tempo de protrombina entre (5,8 a 16,6s), e em relação as espécies, em *Alouatta caraya* os valores ficaram entre (6,95-16,6s) e *Alouatta guariba clamitans* (5,8 a 13,7s).

Resultados de TP em *Macaca fascicularis* variaram entre (13,1 a 13,9s) [Moore, 2000²⁶]. Já [Kelly e Gleise, 1986²⁷], obteve com *Papio* sp de cativeiro, o TP entre (♀,12,5 a 15,0 s ♂12,0 a 14,5 s). Por sua vez, [Hainsey et al., 1993²⁸], trabalhando com *Pan troglodytes* e *Papio* sp.de cativeiro, teve como resultados TP de (10,6s a 13,0s) e (11,6 a 14,4s), respectivamente. Embora estes primatas ocorram no Velho Mundo, os resultados obtidos pelos autores supracitados aproximaram-se dos macacos bugios desta pesquisa, sugerindo-se que animais cativos tem melhores condições socioambientais e alimentares em comparação com animais de vida livre, com menor interferência nos parâmetros hemostáticos.

Os valores obtidos no tempo de tromboplastina parcial ativada não foram diferentes significativamente entre as espécies de *Alouatta* estudados. [Mrema et al., 1984²⁹] com *Aotus trivirgatus* obteve TTPA ($19,6 \pm 1,8s$) inferior aos bugios deste trabalho (13,6 a 76,4 s). O autor justifica que o TTPA prolongado pode ser indício de mudanças ambientais e dietária em colônias de primatas estudadas, e considera curto e aceitável o tempo de tromboplastina parcial ativada obtido nos macaco-da-noite.

Já [Kelly e Gleise, 1986²⁷] obtiveram em babuínos de cativeiro, TTPA de (♀28,0 a 35,0 s, ♂29,0 a 35,5s) e [Hainsey et al., 1993²⁸] em *Pan troglodytes* de cativeiro entre (17,7 a 24,5 s), resultados inferiores em relação ao valor máximo do TTPA das espécies de bugios desta pesquisa. Os resultados observados por estes autores foram justificados como as diferenças existentes entre os parâmetros hemostáticos de gêneros de primatas.

Em relação aos bugios amostrados nesta pesquisa, não ocorreram diferenças significativas na concentração de fibrinogênio plasmático entre as espécies estudadas. Comparando-se bugios com *Papio* sp (♀199 a 330 mg/dL, ♂120 a 310 mg/dL) [Kelly e Gleise, 1983²⁷] e *Pan troglodytes* (♀225 mg/dL–485 mg/dL, ♂223 mg/dL-505 mg/dL) (Hainsey et al., 1993²⁸), o valor mínimo da população amostrada foi inferior, enquanto o máximo apresentou-se superior (7,5 a 811 mg/dL). Pode-se atribuir isto, a diferença existente entre os parâmetros sanguíneos de gêneros de primatas.

5.CONCLUSÃO

Este trabalho refere-se ao primeiro estudo sobre as dosagens do tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada e concentração de fibrinogênio plasmático de macacos bugios de cativeiro no Brasil, contribuindo de maneira significativa para a medicina veterinária de animais selvagens. Nesta pesquisa, não ocorreram diferenças significativas entre as espécies de primatas *Alouatta* estudadas.

6.AGRADECIMENTOS

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Núcleo Hospitalar Veterinário (NHV) do Centro Universitário Moura Lacerda (CUMML) em Ribeirão Preto-São Paulo.

7. REFERÊNCIAS

- 1 Schneider H, Schneider MPC, Sampaio I, Harada ML, Stanhopes M, Czelusnia J, Goodman M: Molecular phylogeny of the new world monkeys (*Platyrrhini*, *Primates*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1993; **2**: 225 – 242.
- 2 Auricchio P: Gênero *Alouatta*. In: *Primatas do Brasil*. São Paulo: Terra Brasilis: 1995,168p.
- 3 Printes RC, Liesenfeld MVA, Jerusalinsky L: *Alouatta guariba clamitans* (Cabrera, 1940): A New Southern Limit for the Species and for Neotropical Primates. *Neotrop. Primates* 2001; **9** :118-121.
4. Fortes V.B: Ecologia e comportamento do Bugio-ruivo (*Alouatta guariba clamitans*, Cabrera, 1940) em fragmentos florestais na Depressão Central do Rio Grande do Sul, Brasil. folhas. Doutorado em Ecologia - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2008.
5. IUCN. Fernández-Duque E., Wallace RB, Rylands AB. 2008. *Alouatta caraya*. Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN 2008: e.T41545A10496784.<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T41545A10496784.en>. Acesso em: 13-04-2017.
6. IUCN. Mendes SL, Rylands AB, Kierulff MCM, Oliveira MM 2008. *Alouatta guariba clamitans*. Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN 2008: e.T39916A10284881.<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T39916A10284881.en>. Acesso em: 13.04-2017.

7. Neville M.K., Glander K.E., Braza F., Rylands A.B. The howling monkeys, genus *Aouatta*. In: Mittermeier RA, AF Coimbra-Filho (eds). *Ecology and behavior of neotropical primates*. US: World Wildlife Fundation 1998: 349-453.
8. Baker DC: Diagnóstico das anormalidades da hemostasia. In: *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. Thrall MA, Weiser G, Allison RW, Campbell, TW. 2 ed, Editora Roca: Rio de Janeiro, 2015: 159-176.
9. Meyer DJ, Harvey JW. *Veterinary laboratory medicine. interpretation e diagnosis*. 2ºed. Philadelphia: W.B Saunders Company, 1998, 373p.
10. Bittencourt NC, Santos PNP: Avaliação das provas de hemostasia em indivíduos atendidos nas clínicas odontológicas da Universidade Estadual de Feira de Santana. *Revista Brasileira de Análises Clinicas* 48:144-148, 2016.
11. Gaspard KJ: Distúrbios da hemostasia. In: Porth, C.M.; Matfin, G. *Fisiopatologia*. Guanabara Koogan, 2010.
12. White JG: Platelet Structure. Em: Michelson AD. *Platelets*. Philadelphia: Academic Press. 2011.
13. Moore DM: Hematology of nonhuman in primates. In: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. *Schalm's Veterinary Hematology*. Lippincott Williams e Wilkins, 2000.
14. April M, Keith JC. Jr: Cardiovascular and lymphoreticular systems. In: Bennett BT. et al. eds. *Nonhuman primates in biomedical research-diseases*. San Diego: Academic Press, 1998.
15. Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW: Overview of coagulation, fibrinolysis and their regulation. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN. *Hemostasis and thrombosis basic principles and clinical practice*. Philadelphia: Lippincott; Williams & Wilkins, 2001.
16. Andrade MCR. Determinação de parâmetros biológicos de primatas não humanos e do status sanitário e genético da colônia de macacos Rhesus (*Macaca mulatta*) da Fundação Oswaldo Cruz [Tese de Doutorado]. Rio de Janeiro: Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz; 2003.
17. Verona, C.E.S.; Pissinatti, A. **Primates – Primatas do Novo Mundo** (Sagüi, Macaco-Prego, Macaco-aranha, Bugio). In: Cubas, Z.S.; Silva, J.C.R.; Dias, J.L.C. *Tratado de Animais Selvagens*. São Paulo: Roca, 2014, 723-743.
18. Duncan JR., Prasse KW. Quality control, test validity, and reference values. in: *Veterinary Laboratory Medicine Clinical Pathology*. Iowa: Iowa State University, 1994: 229-234.
19. Monce KA. et al. Evaluation of a commercially available prothrombin time assay kit for use in dogs and cats. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.207, 1995, p.581-584.
20. 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. 60f. Doutorado (Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2006.
21. Ribeiro CLB, Melo-Reis PR, Lemes SR., Araújo LA, Silva-Júnior NJ. Análise hematológica de macacos-prego (*Sapajus libidinosus* Spix, 1923) e bugios (*Alouatta caraya* Humboldt, 1812) de vida

- livre no sul do Estado de Tocantins, Brasil. Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre 2015 13:110-114.
22. Sánchez-Sarmiento AM, Zwarg T, Santos CFS, Guimarães-Luiz T, Genoy- Puerto A, Matushima ER.: Hematological parameters and the variations resulting from stress of *Alouatta caraya* during a Wildlife Rescue Program in Brazil. American Journal of Primatology 2015 77:246–253.
23. Vié JC, Moreau B, Thoisy B, Fournier P, Genty C. Hematology and serum biochemical values of free-ranging red howler monkeys (*Alouatta seniculus*) from French Guiana. Journal of Zoologic Wildlife Med 1998, 29 :142-149.
24. Souza-Junior JC: 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. 112 f. (Dissertação de Mestrado em Saúde Pública na Universidade Federal de Santa Catarina). UFSC. Santa Catarina, 2007.
25. Rezende JR, Alves AP, Oliveira FC, Motta MS, Martins CH, Neto CPW. Diagnóstico da deficiência de vitamina K. Revista Científica do ITPAC, Araguaína, 2012: 5.
26. Moore DM: Hematology of nonhuman in primates. In: *Schalm's Veterinary Hematology*. Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. 5° ed., Lippincott Williams e Wilkins, 2000:1133-1144.
27. Kelly CA, Gleiser CA. Selected coagulation reference values from adult and juvenile baboons. Laboratory Animal Science 1986: 36: 173-175.
28. Hainsey BM, Hubbard GB, Brasky KM: Clinical parameters of the normal baboons (*Papio species*) and chimpanzees (*Pan troglodytes*). Laboratory Animal Science 1993, 43:236-243.
29. Mrema JEK, Johnson GS, Kelley ST. et al: Activated partial thromboplastin time of owl monkey (*Aotus trivigartus*) plasma. Laboratory Animal Science 1984, 34:295-298.

CAPÍTULO 3- Avaliação dos parâmetros hematológico, bioquímica sérica e eletroforese de proteínas séricas de macacos bugios *Alouatta* (Primates, Atelidae) de cativeiro no Estado de São Paulo, Brasil (Artigo nas Normas da Revista American Journal of Primatology)

CRISTIANE MARIA FERNANDES MELO¹, EDMILSON RODRIGO DANEZE¹, JORGE ALFONSO MORALES- DONOSO¹, MÁRCIA FERREIRA DA ROSA SOBREIRA²

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, São Paulo, Brasil¹

Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Centro Universitário Moura Lacerda, Ribeirão Preto, São Paulo²

Os parâmetros sanguíneos de animais domésticos e selvagens variam conforme as características ambientais das regiões em que se encontram e características individuais como sexo, espécie e idade. O presente estudo teve como escopo principal comparar os parâmetros hematológicos, bioquímicos e o proteinograma sérico de primatas entre as espécies *Alouatta caraya* e *Alouatta guariba clamitans* de cativeiro no Estado de São Paulo, sudeste do Brasil, para uso como padrão fisiológico. No hemograma, ocorreram diferenças significativas em relação as espécies, apenas na contagem de hemácias. Na bioquímica sanguínea, os resultados referentes às dosagens de creatinina, ureia e fosfatase alcalina não apresentaram diferenças, mas, em relação às dosagens de alanina aminotransferase, os valores foram significativamente diferentes. Quanto ao proteinograma sérico, ocorreram diferenças estatísticas apenas em relação ao valor da proteína total. No presente estudo, pode-se concluir que ocorreram diferenças quanto aos parâmetros entre as espécies estudadas. Os parâmetros fisiológicos obtidos contribuem assim como fonte de estudos para outros pesquisadores.

Palavras-chave: hematologia, bugios, avaliação renal, proteínas de fase aguda, Brasil

Autor para correspondência: Márcia Ferreira da Rosa Sobreira, Centro Universitário Moura Lacerda. Dr Oscar de Moura Lacerda, 1520, Ribeirão Preto-São Paulo. CEP: 14076-510. E-mail: marciafrsobreira@gmail.com

1. | INTRODUÇÃO

Os primatas *Alouatta* (Lacépède, 1799) são animais arborícolas, de grande porte, herbívoros, com corpo maçico e longa pelagem. Estes representantes da subordem *Platyrrhine* (Primatas do novo mundo) são conhecidos aqui Brasil como guaribas, barbados ou gritadores e seu dimorfismo sexual e diferenciação entre espécies se dá pelo tamanho do osso hióide, tamanho dos caninos, tamanho corpóreo e cor da pelagem [Auricchio, 1995, Pough et al., 2003]. Existe uma preocupação por parte dos pesquisadores em se estabelecer parâmetros hematológicos e bioquímicos de acordo com cada região, uma vez que o clima, altitude e manejo são fatores que influenciam nesses parâmetros, e para isto, consideram-se nas pesquisas, caracteres individuais como sexo e idade [Ferreira, 2009].

No hemograma, os constituintes do eritrograma de primatas variam com o sexo e a idade [Campbell, 2006]. Alguns trabalhos relatam que situações de estresse podem influenciar na concentração de hemoglobina, valor do hematócrito e contagem de hemácias, entretanto, de acordo com Satake [2006], o baço dos primatas é um órgão que sofre pouca reação frente a estas situações.

O leucograma dos macacos bugios de cativeiro e vida livre é bastante influenciado pelo estresse. Isto constitui uma resposta biológica mediada pela liberação de hormônios e esteróides adrenocorticotróficos, que induzem a uma apoptose de linfócitos e alterada distribuição destas células [Vié et al., 1998; Satake, 2006; Flaiban et al., 2009; Rovirosa-Hernández et al., 2012; Sánchez-Sarmiento et al., 2015].

Na bioquímica sanguínea, a mensuração da concentração sérica ou plasmática de creatinina e do nitrogênio da uréia são amplamente utilizados na avaliação da função renal de primatas, seguindo os mesmos princípios descritos para mamíferos domésticos [Campbell, 2006]. A elevação dos níveis séricos de ureia e creatinina em primatas, corresponde a um forte indício de insuficiência renal aguda ou crônica, embora este aumento também possa ocorrer em situações de catabolismo protéico, nas infecções, traumatismos ou hemorragias digestivas [Almosny, 2009].

Para avaliação da integridade hepática, são realizadas a mensuração da alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA). A ALT é encontrada no citoplasma dos hepatócitos e classificada como enzima de armazenamento e seu aumento indica lesão hepática aguda, enquanto a fosfatase alcalina (FA) sintetizada pelas células dos ductos biliares, é considerada uma enzima de indução e seu aumento indica obstrução das vias biliares ou colestase (Allison, 2015).

Os procedimentos para avaliação laboratorial das proteínas séricas de primatas são semelhantes aos descritos para mamíferos domésticos e humanos (Campbell, 2006). As proteínas de fase aguda são classificadas em positivas e negativas. As positivas apresentam aumento na concentração sérica durante o processo inflamatório, e são as seguintes: proteína C reativa, a proteína ligadora de manose, a alfa-1 antitripsina, a alfa-1 antiquimiotripsina, a alfa-2 macroglobulina, o fibrinogênio, a protrombina, o fator VIII, o fator de von Willebrand, o plasminogênio, os fatores do complemento, a ferritina, a amilóide A sérica, a ceruloplasmina, a haptoglobina e a alfa-1 glicoproteína ácida. As proteínas de fase aguda negativa são aquelas cuja síntese é diminuída durante o processo inflamatório, sendo: a albumina, a transferrina, a pré-albumina e a proteína de ligação do retinol (Jain et al., 2011).

Estudos desenvolvidos sobre a hematologia e bioquímica sanguínea de primatas *Alouatta* nas Américas Central e do Sul foram desenvolvidos por Vié et al. [1998] na Guiana Francesa, Rovirosa-Hernández et al. [2012] no México e Carlos-Erazo et al. [2016] no Peru. Aqui no Brasil, trabalhos sobre a hematologia e bioquímica de macacos bugios foram desenvolvidos por Satake (2006) no Paraná; Souza-Júnior (2007) em Santa Catarina; Flaiban et al. (2009) no Paraná; Ribeiro (2015) em Tocantins; Sánchez-Sarmiento et al. (2015) em São Paulo; Yunes (2016) no Pará.

Diante do exposto acima, este trabalho visa comparar os parâmetros hematológicos, bioquímicos e eletroforéticos protéicos entre as espécies *Alouatta caraya* e *Alouatta guariba clamitans* de cativeiro no Estado de São Paulo, sudeste do Brasil, para atuarem como modelo de referência para outros bugios mantidos em cativeiro.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

2.1 | Animais de estudo

Foi colhido sangue de macacos *Alouatta caraya* e *Alouatta guariba clamitans* de cativeiro em nove municípios do Estado de São Paulo: Zoológico de Ilha Solteira, Zoológico Municipal Missina Palmeira Zancaner em Catanduva, Zoológico Municipal Joaquim Garcia Franco em Guaíra, Zoológico Thermas do Laranjais em Olímpia, Bosque Municipal Fábio Barreto em Ribeirão Preto, Zoológico Municipal de Guarulhos, Parque Municipal Quinzinho de Barros em Sorocaba, Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Selvagens (CEMPAS) em Botucatu, e ainda, no Projeto Mucky, na cidade de Itu (figura 1). Inicialmente os animais foram contidos com um puçá e conduzidos ao ambulatório dos criatórios, anestesiados com associação de cloridrato de tiletatmina/ cloridrato de zolazepam na dose de 6 mg/Kg pela via intramuscular (IM).

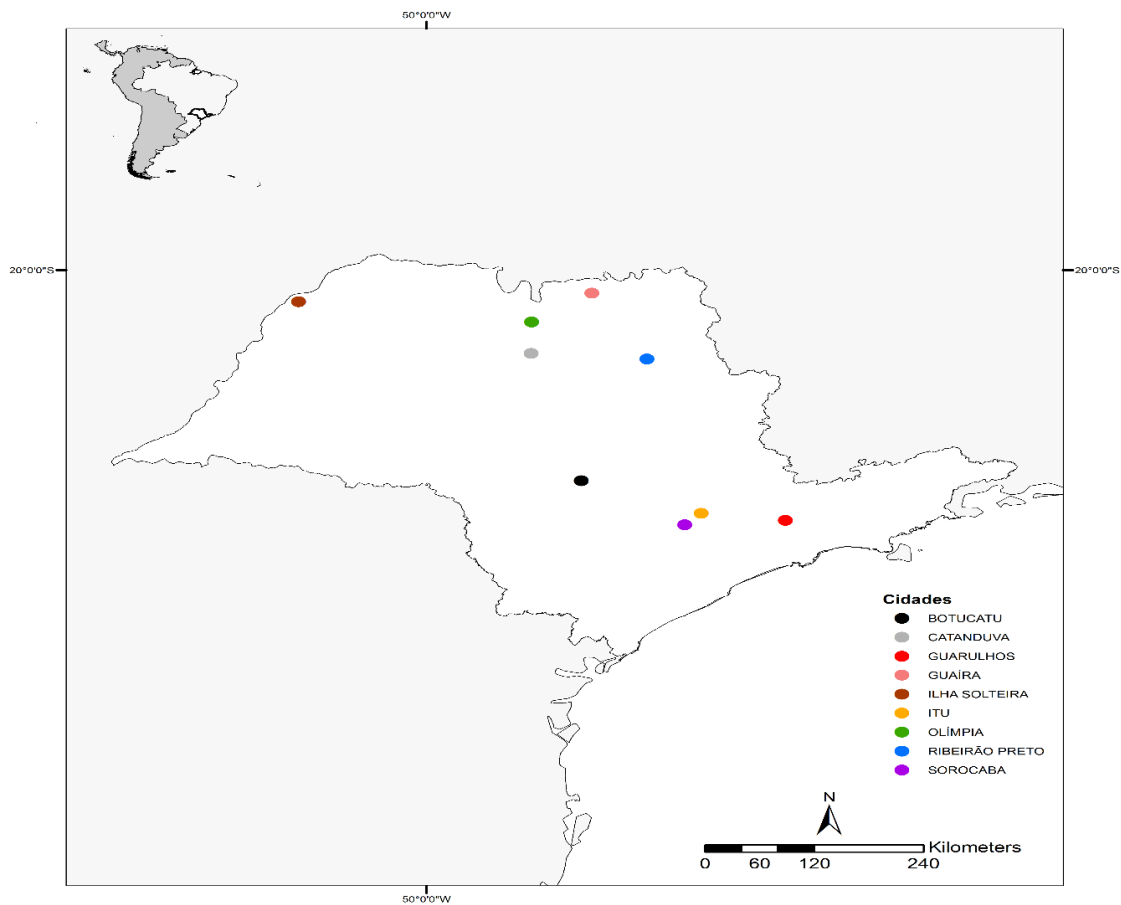


Figura 1. Municípios de realização das coletas de sangue de macacos *Alouatta caraya* e *Alouatta guariba clamitans* de cativeiro no Estado de São Paulo, Brasil, 2018. Foto: Cristiane Maria F. de Melo

2.2. | Análises hematológicas

Para coleta de sangue, foi realizada a antissepsia da região da veia cefálica e foi colhido 3mL de sangue em tubos contendo 7,2 mg de ácido acetil etilenodiamino tetra-acético dipotássico (K₂EDTA) para realização do hemograma. Após homogeneização, foram realizadas as contagens globais de hemácias, leucócitos e plaquetas, assim como determinação do volume globular (VG), concentração de hemoglobina (Hgb), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média

(CHCM), com auxílio de um contador automático de células (HORIBA Analisador, modelo ABS Micros ESV 60). A contagem diferencial de leucócitos, objetivando determinar o percentual de basófilos, eosinófilos, neutrófilos em diferentes estágios maturacionais, linfócitos e monócitos, foi obtida em microscopia óptica (aumento de 1.000 vezes) a partir do exame de esfregaços sanguíneos corados a base de Romanowsky modificado.

2.3| Bioquímica sanguínea

Para análise da bioquímica sanguínea, foram colhidos 2 mL de sangue da veia cefálica, acondicionados em tubos com ativador de coágulo, e posteriormente, submetidos à centrifugação por 10 minutos (1.529 G). As alíquotas de soro foram conservadas em nitrogênio líquido (-196°C) até o momento das análises. Para as análises bioquímicas foram utilizados conjuntos de reagentes comerciais da LABTEST® Diagnóstica, a fim de dosar as concentrações de ureia, creatinina, e as atividades da alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA) em um espectrofotômetro semiautomático (Labquest/ Labtest - Lagoa Santa – Minas Gerais – Brasil). Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária “Professor Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto” do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV/Unesp em Jaboticabal São Paulo, Brasil.

2.4| Eletroforetograma de proteínas séricas

As eletroforeses de proteínas foram realizadas com amostras de soro sanguíneo no Laboratório de Apoio do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV-UNESP através da técnica SDS-Page (Laemmli, 1970). As corridas eletroforéticas foram realizadas em miliamperagem pré-fixada em 20 mA para o gel de empilhamento e de 25 mA para o gel de separação, sendo a duração média de 5 horas e 30 minutos. O gel foi corado com azul brilhante

de Coomassie e o excesso de corante foi retirado com solução de 250 mL de metanol, 100 mL de ácido acético glacial e 1.000 mL de água destilada. A leitura do gel foi realizada em densitômetro computadorizado (SHIMADZU CS-9301-Japan).

2.5|Análise estatística

Foram avaliadas as médias e desvio-padrão para todos os parâmetros avaliados nas análises hematológicas, bioquímicas e eletroforéticas. Após esta etapa, foi aplicado o Teste de Tukey para comparação das médias entre os sexos ao nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram processadas no software Statistica versão 7.0

3 | RESULTADOS

Nesta pesquisa, os primatas submetidos as análises hematológicas foram: 27/42 (64,28%) macacos *Alouatta caraya* e 15/42 (35,72%) *Alouatta guariba clamitans*. No hemograma dos bugios amostrados, ocorreram diferenças significantes entre as espécies, apenas na contagem de hemácias (Tabela 1).

Tabela 1. Análise hematológica entre 27 *Alouatta caraya* e 15 *Alouatta guariba clamitans* macacos bugios *Alouatta* de acordo com o sexo, de cativeiro no Estado de São Paulo, Brasil, 2018.

Parâmetros avaliados	Animais		Valor de p*
	<i>A.guariba clamitans</i> (15)	<i>A. caraya</i> (27)	
Hemácias (x10 ⁶ /uL)	4,94±0,52	4,35±0,84	0,034681*
Volume Globular (%)	42,01±8,74	37,54±5,25	0,167354
Hemoglobina (g/dL)	13,3±2,66	12,6±1,72	0,493470
VCM (fL)	84,39±5,64	86,26±6,62	0,635704
HCM (pg)	27,62±3,23	29,24±2,82	0,206758
CHCM (%)	32,05±2,88	33,63±1,99	0,076714
Leucócitos (x10 ³ /uL)	12,58±5,84	12,28±4,36	0,426954
Neutrófilos segmentados (x 10 ³ /uL)	75,3±4,92	71,5±3,15	0,495292
Neutrófilos bastonetes (x 10 ³ /uL)	5,2±7,7	7,1±3,1	0,477892
Eosinófilos (x 10 ³ /uL)	2,9±1,6	2,29±1,9	0,419204
Basófilos (x 10 ³ /uL)	1,28±4,8	1,3±4,8	0,892912
Linfócitos (x 10 ³ /uL)	38,4±1,4	38,68±1,9	0,658978
Monócitos (x 10 ³ /uL)	8,4 ±6,40	9,6±7,8	0,870876
Plaquetas (x 10 ³ /uL)	239,89±77,36	271,33±134,2	0,476621

VCM: Volume corpuscular médio, **HCM:** Hemoglobina corpuscular média, **CHCM:** Concentração de hemoglobina corpuscular média, *: p < 0,05.

Os valores mínimo e máximo observados nesta pesquisa para *Alouatta caraya* no eritrograma foram: hemácias (3,58 x10⁶/uL a 6,16 x10⁶/uL), hemoglobina (10,5 g/dL a 17,5 g/dL), volume globular (29,3% a 54%), VCM (74 fL a 99 fL), HCM (25,1 pg a 35,9 pg), CHCM (30,2% a 37,4%). Quanto ao leucograma e plaquetograma, os valores mínimo e máximo observados foram: contagem total de leucócitos (5,9 x10³/uL a 22,7 x10³/uL), neutrófilos segmentados (20 x 10³/uL a 35 x 10³/uL), neutrófilos bastonetes (0,0 x 10³/uL a 2,0 x 10³/uL), eosinófilos (0 x 10³/uL a 8 x 10³/uL), basófilos (0x 10³/uL a 1 x 10³/uL), linfócitos (10x 10³/uL a 50 x 10³/uL), monócitos (3 x 10³/uL a 10 x 10³/uL), plaquetas (70x 10³/uL a 350 x 10³/uL).

Os valores mínimo e máximo observados no eritrograma de *Alouatta guariba clamitans* foram: hemácias ($3,87 \times 10^6/\mu\text{L}$ a $6,65 \times 10^6/\mu\text{L}$), hemoglobina (9,8 g/dL a 18,5 g/dL), volume globular (31,6% a 58,3%), VCM (73,1 fL a 96 fL), HCM (21,9 pg a 32,3 pg), CHCM (25,1% a 36,3%). Quanto ao leucograma e plaquetograma, os resultados mínimo e máximo foram: contagem total de leucócitos ($7,5 \times 10^3/\mu\text{L}$ a $26,8 \times 10^3/\mu\text{L}$), neutrófilos segmentados ($50 \times 10^3/\mu\text{L}$ a $80 \times 10^3/\mu\text{L}$), neutrófilos bastonetes ($0,0 \times 10^3/\mu\text{L}$ a $2,0 \times 10^3/\mu\text{L}$), eosinófilos ($0 \times 10^3/\mu\text{L}$ a $10 \times 10^3/\mu\text{L}$), basófilos ($0 \times 10^3/\mu\text{L}$ a $1 \times 10^3/\mu\text{L}$), linfócitos ($30 \times 10^3/\mu\text{L}$ a $50 \times 10^3/\mu\text{L}$), monócitos ($3 \times 10^3/\mu\text{L}$ a $10 \times 10^3/\mu\text{L}$), plaquetas ($80 \times 10^3/\mu\text{L}$ a $465 \times 10^3/\mu\text{L}$).

Foram submetidos para as análises bioquímicas: 13/18 (72,3%) macacos *Alouatta caraya* e 5/18 (27,7%) *Alouatta guariba clamitans*. Nas análises bioquímicas, os resultados referentes as dosagens de creatinina, ureia e fosfatase alcalina (FA) não apresentaram diferenças estatísticas. Porém, nas dosagens de alanina aminotransferase (ALT) os valores foram significativamente diferentes (Tabela 2).

Os valores mínimo e máximo observados nos primatas *Alouatta caraya* desta pesquisa foram: ureia (11 mg/ dL a 51 mg/ dL), ALT (5 UI/L a 15 UI/L), FA (11 UI/L a 1177 UI/L) e creatinina (0,6 mg/ dL a 1,7 mg/ dL). Quanto a população dos *Alouatta guariba clamitans* os valores mínimo e máximo foram: ureia (25 mg/ dL a 37 mg/ dL), ALT (15 UI/L a 26 UI/L), creatinina (0,5 mg/ dL a 1,3 mg/ dL) e FA (107 UI/L a 807 UI/L).

Tabela 2. Análise Bioquímica de 13 *Alouatta caraya* e 5 *Alouatta guariba clamitans*, de acordo com o sexo, de cativeiro no Estado de São Paulo, Brasil, 2018.

Parâmetros	Grupos		Valor de p*
	<i>A. guariba clamitans</i> (5)	<i>A. caraya</i> (13)	
Creatinina	0,78±0,32	0,98±0,31	0,472825
Ureia	30,4±14,96	36,92±4,98	0,489345
ALT	17,2±4,92	6,92±3,2	0,000136*
Fosfatase alcalina	316,2±315,3	355,0±326,8	0,654820

Creatinina (mg/ dL); **ureia** (mg/ dL); **ALT**: Alanina aminotransferase (UI/L), **FA**: Fosfatase alcalina (UI/L), *: p <0,05

Quanto a eletroforese de proteínas ocorreram diferenças estatísticas entre as espécies estudadas, apenas em relação ao valor da proteína total (Tabela 3) neste trabalho. Foram identificadas nove proteínas, em 9/29 (31,03%) *Alouatta guariba clamitans* e 20/29 (68,96%) *Alouatta caraya*: imunoglobulina A (139.000 D), ceruloplasmina (125.000 D), transferrina (79.000 D), albumina (69.000 D), imunoglobulina G de cadeia pesada (58.000 D), haptoglobina (45.000 D), α 1 anti-tripsina (42.000D), imunoglobulina G de cadeia leve (32.000 D), PM22 (22.000 D).

Os valores mínimo e máximo observados na eletroforese de proteínas dos *Alouatta caraya* foram: proteína total (4.000 a 11.400 mg/ dL), IgA (13 a 200 mg/ dL), Ig G (150 a 2.070 mg/ dL), ceruloplasmina (10 a 250 mg/ dL), transferrina (260 a 1.150 mg/ dL), albumina (3.160 a 8.300 mg/ dL), haptoglobina (23 a 250 mg/ dL), α 1 anti-tripsina (0,4 a 40 mg/ dL), PM22 (25 a 690 mg/ dL).

Enquanto os valores mínimo e máximo em *Alouatta guariba clamitans* foram: proteína total (6.300 a 11.700 mg/ dL), IgA (30 a 430 mg/ dL), Ig G (550 a 1.909 mg/ dL), ceruloplasmina (30 a 910 a mg/ dL), transferrina (220 a 1.380 mg/ dL), albumina (3.200 a 7.600

mg/ dL), haptoglobina (3 a 70 mg/ dL), α 1 anti-tripsina (3 a 70 mg/ dL), PM22 (90 a 202 mg/ dL).

Tabela 3. Comparação dos resultados das análises do proteinograma dos macacos bugios de machos e fêmeas obtidas por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), no Estado de São Paulo, Brasil, 2018.

mg/dL	Grupos		Valor de p*
	<i>A. guariba clamitans</i> (9)	<i>A. caraya</i> (20)	
Proteína Total	8300±2029	7985±1691	0,039380*
IgA	105,9±123,8	149,7±47,6	0,290115
Ceruloplasmina	165,56±286,71	62,85±54,61	0,215698
Transferrina	561,7±217,27	658,0±369,08	0,514296
Albumina	5757,7±1416,3	5476,1±1237,4	0,116855
IgG pesada	1063,2±456,4	1219,8±458,21	0,312286
Haptoglobina	67,78±51,69	78,20±50,68	0,792690
Alfa 1 anti-tripsina	18,25±21,28	12,92±12,42	0,336647
PM 22	158,78±144,96	11456±43,63	0,249843

IgA: Imunoglobulina A, IgG: Imunoglobulina G, PM22 (proteína de peso molecular 22), *: p < 0,05

4 | DISCUSSÃO

Nesta pesquisa, as médias e desvio-padrão na ontagem de hemácias e volume globular de *Alouatta guariba clamitans* foram de (4,94±0,92 e 42,01±8,74). Em Santa Catarina, Souza-Júnior [2007], obteve resultados semelhantes com *Alouatta guariba clamitans* de cativeiro (4,23 ± 0,62 e 34,90 ± 1,56), estes autores consideraram os valores obtidos altos. Em relação ao sexo, nesta pesquisa, os valores da contagem de hemácias e valor do hematócrito para a espécie supracitada foram para os machos de (♂4,19±0,47 e 34,65±3,94) e (♀4,29±0,47, 42,33±7,44). Em comparação com o autor acima (♂4,45 ± 0,56 e 36,73 ± 1,27) e (♀3,81 ± 0,52 e 31,14 ± 1,31), os valores também foram semelhantes. Estes autores atribuíram este resultado ao fato dos machos terem maior massa muscular do que as fêmeas, e portanto maior quantidade de eritrócitos para carrear oxigênio e suprir os tecidos.

Em comparação com as pesquisas de Souza-Júnior [2007] em Santa Catarina com *Alouatta guariba clamitans* (população estudada: $5,35 \pm 2,67$) os resultados obtidos nesta pesquisa na contagem de leucócitos totais da população estudada mostrou-se superior ($12,58 \pm 5,84$).

Nesta pesquisa, ocorreram diferenças significativas quanto ao sexo em relação a contagem total de leucócitos da população de *Alouatta caraya*, onde os valores foram ($\sigma 14,78 \pm 6,2$ e $\phi 11,4 \pm 3,6$), dados inferiores aos machos e fêmeas *Alouatta caraya* de cativeiro de Sánchez-Sarmiento et al. [2015] ($\sigma 38,86 \pm 8,75$, $\phi 39,00 \pm 1,41$) no Estado de São Paulo.

Os leucócitos são as principais células que sofrem alteração em resposta ao estresse agudo [Dhabhar, 2002], e os animais deste estudo encontravam-se sob situação de estresse, devido ao manejo na hora da contenção. Comparativamente a média e desvio-padrão do trabalho de Ribeiro et al. [2015] ($\sigma 11,73 \pm 4,49$; $\phi 18 \pm 3,9$) *Alouatta caraya* capturados em vida livre, os valores observados na contagem total de leucócitos dos bugios foram semelhantes. O estresse é um estímulo adaptativo do organismo com respostas para lutar contra a mudança ambiental (Fowler, 1978) e apresenta um efeito distinto na função imunológica que, sob condições de estresse agudo, como captura, transporte e manipulação, promove imuno-estimulação.

Em relação as análises bioquímicas, as dosagens de ureia sanguínea da população de bugios *Alouatta guariba clamitans* ($30,4 \pm 14,96$) e *Alouatta caraya* ($36,92 \pm 4,98$) não mostraram diferenças significativas. As médias observadas neste trabalho foram superiores as observadas por Vié et al. [1998] ($\sigma 9,41,2$, $\phi 9,0 \pm 1,2$) na Guiana Francesa e Roviroso-Hernández et al. [2012] no México. Situações como estado de hidratação, captura, contenção, dieta hiperprotéica podem ter contribuído para o aumento da ureia sanguínea dos bugios. Quanto as

239 dosagens de creatinina sérica não ocorreram diferenças significativas entre os *A. guariba clamitans* e
240 *A. caraya*.

241 Na avaliação da integridade hepática dos bugios não foi observada diferenças
242 estatísticas entre as espécies de bugios estudadas *A. guariba clamitans* ($316,2 \pm 315,3$) e *A.*
243 *caraya* ($355,0 \pm 326,8$) quanto a FA. Nesta pesquisa, os valores da fosfatase alcalina podem ter
244 sido aumentados pela alimentação com ração canina que os animais de algumas localidades
245 eram submetidos, uma vez que os bugios são herbívoros, isto pode ter provocado o aumento da
246 FA. Os resultados observados foram superiores ao de [Roviroso-Hernández et al., 2012], em
247 sua pesquisa com *Alouatta pigra*, em que nos machos foram de ($236,5 \pm 74,24$) e nas fêmeas
248 de ($215 \pm 114,55$). Estes autores também consideraram os valores da fosfatase alcalina acima
249 do normal, indicando problemas hepáticos nos primatas avaliados. Mas, ocorreram diferenças na
250 dosagem de ALT entre as espécies *A. caraya* e *A. guariba clamitans*. Em comparação com [Souza-
251 Júnior, 2007] com *A. guariba clamitans* de cativeiro a ALT foi de ($34,16 \pm 17,72$), valores superiores aos
252 observados nesta pesquisa ($17,2 \pm 4,92$).

253 No proteinograma sérico, ocorreram diferenças estatísticas entre as espécies *A. caraya*
254 (7985 ± 1691) e *A. guariba clamitans* (8300 ± 2029) apenas em relação ao valor da dosagem de
255 proteína total. No caso dos macacos bugios, bem como para muitas espécies de primatas
256 neotropicais, pouco se tem documentado a respeito do metabolismo proteico [Almosny, 2009].
257 Devido as mudanças no forrageamento nas épocas do ano e nos níveis proteicos diferentes,
258 torna-se complexa a compreensão dos níveis consumidos por primatas [Yunes, 2016]. Na
259 pesquisa de [Satake, 2006] com *Alouatta caraya* também foram observadas no
260 eletroforetograma as proteínas citadas acima: imunoglobulina A, ceruloplasmina, transferrina,
261 albumina, imunoglobulina G de cadeia pesada, haptoglobina, imunoglobulina G de cadeia leve.

Os resultados obtidos nesta pesquisa são similares aos observados por [Rovirosa-Hernández et al. 2012] com *Alouatta seniculus* na Guiana Francesa e [Yunes, 2016] no Mato Grosso do Sul com *Alouatta belzebul*. Em ambos estudos, a concentração dos teores de proteína total sérica pareceram flutuar mediante as situações de desidratação, sem qualquer associação com doença hepática ou distúrbios que cursem com hipoproteinemia.

5 | CONCLUSÃO

Nas condições do presente estudo, os parâmetros hematológicos de macacos bugios *Alouatta* apresentaram pouca distinção entre as espécies *Alouatta caraya* e *Alouatta guariba clamitans*, sendo as diferenças estatisticamente relevantes encontradas na contagem de hemácias. Nas análises bioquímicas sanguíneas, ocorreram diferenças estatísticas, apenas em relação as dosagens de alanina aminotransferase (ALT). E em relação ao proteinograma ocorreram diferenças significativas as espécies estudadas apenas em relação as dosagens de proteína total sérica.

6 | AGRADECIMENTOS

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinária “Professor Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto” do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Unesp em Jaboticabal São Paulo, Brasil.

7 | REFERÊNCIAS

Allison RW. Avaliação laboratorial da função hepática. In: Thrall MA, Weiser G, Allison RW, Campbell TW, eds. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. 2º ed., Roca, Rio de Janeiro, 2015, 346-363.

- 283 Almosny N R P. (2009). Patologia Clínica em Primatas. In: Kindlovits A, Kindlovits L M, eds.
284 *Clínica e Terapêutica em Primatas Neotropicais*. 2ºed. Rio de Janeiro: L. F. Livros, 2009, 69-
285 88.
- 286 Auricchio P. *Primatas do Brasil*. 1º ed. Terra Brasilis, São Paulo, 1995, 127-143.
- 287 Campbell TW. Hematologia de mamíferos: animais de laboratório e espécies variadas. In:
288 Tharll MA, Campbell TW, DeNicola D, Fettman MJ, Lassen ED, Rebar A, Weiser G, eds.
289 *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. 1º ed., Roca: Rio de Janeiro, 2006, 201-214.
- 290 Carlos-Erazo, N., Pomahuacre-Gómez, E., Recuenco-Rojas, F., Capunã-Becerra, C. (2016).
291 Parâmetros hematológicos del mono aullador rojo (*Alouatta seniculus*) mantenido en cautiverio
292 en el departamento de Madre de Dios, Perú. *Veterinária e Zootecnia*, 10 (2), 42-52.
- 293 Dhabhar, F. S. (2002). Stress-induced augmentation of immune function: The role of stress
294 hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. *Brain, Behavior and Immunity*, 16: 785-798.
- 295 Flaiban K.K.M.C., Spohr K.A.H., Malanskil L.S., Svoboda, W.K., Shiozawa M.M., Hilst
296 C.L.S., Aguiar, L.M., Ludwig, G., Passos F.C., Navarro I.T., Lisbôa J.A.N., Balarin M.R.S.
297 (2008). Valores hematológicos de bugios pretos (*Alouatta caraya*) de vida livre da região do
298 Alto Rio Paraná, sul do Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*,
299 61:628-634.
- 300 Ferreira AF (2009). Perfis hematológicos e bioquímicos de macacos-prego (*Cebus spp.*,
301 Erxlebe, 1777) mantidos em cativeiro no Estado da Paraíba. Universidade Federal Rural de
302 Pernambuco. (Dissertação de Mestrado em Patologia Clínica Veterinária).

- 303 Finco, D.R. Kidney function. In: Kaneko, J.J.; Harvey, J.W.; Bruss, M.L, eds. *Clinical*
 304 *biochemistry of domestic animals*. 5° ed. San Diego, Academic Press, 1997, 441-484.
- 305 Fowler, M.E. Restraint and handling of wild and domestic animals. Ames: Iowa State
 306 University Press, 1978. 332p.
- 307 Jain, S., Gautam, V., Naseem, S. (2011). Acute-phase proteins: as diagnostic tool. *Journal of*
 308 *Pharmacy and Bioallied Sciences*. 3, 118-127.
- 309 Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of
 310 bacteriophage T₄. *Nature*. 227, 680-685.
- 311 Larsson, M. H. M.; Birgel, E. H.; Benesi, F. J.; Birgel júnior, E. H.; Lazaretti, P.; Fedulo, J. D.
 312 L.; Larsson, Júnior, C. E.; Molina, S. R.; Guerra, P. P. C. A; Prada, C. S. (1999) Hematological
 313 values of *Cebus apella* anesthetized with ketamine. *Brazilian Journal of the Veterinary*
 314 *Research and Animal Science*, São Paulo, 36 (3), 131-135.
- 315 Pough FH, Pough CM, Janis JB. Heiser. *A vida dos vertebrados*. 1° ed. São Paulo: Atheneu,
 316 2003, 14-18.
- 317 Ribeiro, C.L.B., Melo-Reis, P.R., Lemes, S.R., Araújo, L.A., Silva-Júnior, N.J. (2015). Análise
 318 hematológica de macacos-prego (*Sapajus libidinosus*, Spix, 1923) e bugios (*Alouatta caraya*
 319 Humboldt, 1812) de vida livre no sul do estado de Tocantins, Brasil. *Revista Brasileira de*
 320 *Biociências*, 13 (2), 110-114.
- 321 Roviroso-Hernández, M.J., Garcia-Orduna, F., Caba, M., Canales-Espinosa, D., Hermida-
 322 Lagunes, J., Torres-Pelayo, V.R. (2011). Blood parameters are little affected by time of

- 323 sampling after the application of ketamine in black howler monkeys (*Alouatta pigra*). *Journal*
 324 *of Medical Primatology*, 40, 294–299.
- 325 Rovirosa-Hernández, M.J., Caba, M., Garcia-Orduña, F., Lopez-Muñoz, J.J.D., Canales-
 326 Espinosa D., Hermida-Lagunes J. (2012). Hematological and biochemical blood values in wild
 327 populations of black howler monkeys (*Alouatta pigra*) of Campeche, México. *Journal of*
 328 *Medical Primatology*, 41, 309–316.
- 329 Sánchez-Sarmiento, A.M., Zwarg, T., Santos, C.F.S., Guimarães-Luiz, T., Genoy-Puerto, A.,
 330 Matushima, E.R. (2015). Hematological parameters and the variations resulting from stress of
 331 *Alouatta caraya* during a Wildlife Rescue Program in Brazil. *American Journal of Primatology*,
 332 77, 246–253.
- 333 Souza-Júnior JCS (2007). Perfil sanitário de bugios ruivos (*Alouatta guariba clamitans*)
 334 (Cabrera, 1940) (*Primates: Atelidae*): um estudo com animais recepcionados e mantidos em
 335 perímetro urbano no município de Indaial, Santa Catarina, Brasil. Universidade Federal de
 336 Santa Catarina. (Dissertação de Mestrado em Saúde Pública).
- 337 Vié, JC, Moreau, B., Thoisy, B., Fournier, P., Genty, C. (1998). Hematology and serum
 338 biochemical values of free-ranging red howler monkeys (*Alouatta seniculus*) from French
 339 Guiana. *Journal of Zoologic Wildlife Med*, 29 (2), 142-149.
- 340 Yunes V (2016). Estudo clínico–morfométrico, hematológico, bioquímico e imunocitoquímico
 341 em *Alouatta belzebul* (Primates, Platyrrhini) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita
 342 Filho (Dissertação de Mestrado em Patologia Clínica Veterinária).

CAPÍTULO 4 - Avaliação hematológica, bioquímica e eletroforética de primatas neotropicais submetidos à análise molecular para hemoplasmas e *Bartonella* no Brasil (Artigo nas Normas da Revista Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases)

Cristiane Maria Fernandes de Melo^a, Edmilson Rodrigo Daneze^a, Natalia Serra Mendes^a, Inalda Angelica de Souza Ramos^a, Jorge Alfonso Morales-Donoso^b, Simone J. Fernandes^a, Rosangela Zacarias Machado^a, Marcos Rogério André^a, Márcia Ferreira da Rosa Sobreira^{c*}

^a Departamento de Patologia Veterinária, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal-SP, Brasil

^b Departamento de Genética e Melhoramento Animal, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal-SP, Brasil

^c Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Centro Universitário Moura Lacerda, Ribeirão Preto- SP, Brasil

RESUMO

O objetivo foi investigar os parâmetros hematológicos, bioquímicos e eletroforéticos de proteínas séricas de macacos bugios “*Alouatta* spp.” de cativeiro submetidos à detecção molecular de hemoplasmas e *Bartonella* spp. no Estado de São Paulo, sudeste do Brasil. Foram avaliadas amostras de sangue de 68 macacos bugios para realização do hemograma e ensaios da PCR convencional para hemoplasmas, baseados nos genes 16S rRNA e RNase P e para *Bartonella* spp. baseado no gene *gltA*. Todos os macacos bugios amostrados mostraram-se negativos para *Bartonella* spp. Para hemoplasmas, 18 (26,47%) mostraram-se positivos na cPCR baseada no gene 16 S rRNA e 1 (5,55%) na cPCR baseada no gene RNase P. A análise filogenética baseada em um fragmento de 1280 pb do gene 16S rRNA, posicionou as sequências obtidas próximas à *Candidatus Mycoplasma kahanei*. No hemograma, valores dos linfócitos e monócitos dos macacos bugios foram maiores que os encontrados na literatura, enquanto das plaquetas menores. Para bioquímica sanguínea e eletroforese de proteínas não foram observadas diferenças significativas entre os bugios positivos e negativos para hemoplasmas. Este estudo mostrou a infecção por um genótipo filogeneticamente associado a *Candidatus Mycoplasma kahanei*.

Palavras-chave: bartonelose, caracterização molecular, macacos bugios, micoplasmas hemotróficos, América do Sul.

Autor para correspondência: Márcia Ferreira da Rosa Sobreira, Centro Universitário Moura Lacerda. Dr Oscar de Moura Lacerda, 1520, Ribeirão Preto-São Paulo. CEP: 14076-510. E-mail: marciafrsobreira@gmail.com

1.Introdução

Os primatas *Alouatta* são animais arborícolas, de grande porte, com corpo maço e longa pelagem. São conhecidos aqui no Brasil como guaribas, barbados ou gritadores, e o dimorfismo sexual e idade se dá pelo tamanho do osso hióide, tamanho dos caninos, tamanho corpóreo e cor da pelagem. São os representantes Platyrrhine que apresentam maior habilidade de sobrevivência em áreas florestais remanescentes ou degradadas, devido a sua alimentação folívora e por apresentarem um sistema digestório contendo bactérias e protozoários que degradam a celulose [Auricchio, 1995¹; Pough et al., 2003²].

A verificação dos aspectos sanitários de animais selvagens mantidos em cativeiro propicia o diagnóstico de enfermidades que põe em risco a vida ou o bem-estar desses animais, neste sentido, o gênero *Mycoplasma* spp. (hemoplasmas ou micoplasmas hemotróficos) engloba bactérias que parasitam as hemácias de numerosas espécies de animais, incluindo os seres humanos [Maggi et al., 2003³]. São bactérias desprovidas de parede celular e que contém o menor genoma não viral conhecido, variando de 580 kb à aproximadamente 2.000 kb, possuindo ribossomos e DNA circular de fita dupla. São incriminados como agentes causadores de anemia hemolítica infecciosa em várias espécies de mamíferos [Neimark et al., 2001⁴; Berent et al., 2003⁵]. Animais parasitados por hemoplasmas podem apresentar hemólise extravascular, principalmente no baço, fígado, pulmão e medula óssea, e ainda, o parasitismo pode estar associado a hemólise intravascular, devido a fragilidade dos eritrócitos parasitados por tais bactérias [Tasker, 2010⁶].

Hemoplasmas foram identificados por meio de métodos moleculares: *Candidatus Mycoplasma aoti* em *Aotus trivigatus* nos Estados Unidos [Baker et al., 2011⁷], *Candidatus M. haemominutum* em *Saimiri sciureus* na Guiana Francesa [Neimark et al., 2002⁸], *Candidatus Mycoplasma haemomacaque* em *Macaca fuscata* no Japão [Sashida et al., 2014⁹], *Candidatus Mycoplasma haemomacaque* em *Macaca fascicularis* nos Estados Unidos [Maggi et al., 2013³]. No Brasil, hemoplasmas foram detectados em espécimes de *Alouatta caraya*, *Sapajus apella*, *Saimiri sciureus*, *Sapajus nigritus*, *Callithrix jacchus*, *Sapajus flavius* nos Estados do Paraná, Maranhão e Paraíba [Cubilla, 2012¹⁰; Santos et al., 2013¹¹; Bonato et al., 2015¹²; Cubilla et al., 2017¹³; Santos et al., 2017¹⁴].

Já *Bartonella* spp. são hemoparasitas de importância médica e veterinária que infectam ampla variedade de hospedeiros, tendo vários mamíferos como reservatórios. São classificados

como bacilos aeróbicos facultativos, fastidiosos e Gram-negativos [Bonato et al., 2015¹⁵]. *Bartonella quintana* foi detectada em *Macaca fascicularis* nos EUA, em *Macaca mulatta* e *Macaca fascicularis* na China, em *Gorilla gorilla* na África Ocidental e em *Macaca fuscata* no Japão [O'Rourke et al., 2005¹⁶; Li et al., 2013¹⁷; Bonato et al., 2015¹⁵; Bittar et al., 2014¹⁸; Sato et al., 2015¹⁹]. No Brasil, até o presente momento, *Bartonella* spp. ainda não foi relatada em primatas não-humanos.

Diante disto, o presente trabalho teve como objetivo investigar a ocorrência de hemoplasmas e *Bartonella* spp. em macacos bugios mantidos em cativeiro, no Estado de São Paulo, sudeste do Brasil. Adicionalmente, o presente trabalho, objetivou investigar as possíveis alterações hematológicas, bioquímicas e eletroforéticas de proteínas séricas associadas à positividade para hemoplasmas e *Bartonella* spp. em primatas de cativeiro.

2. Material e Métodos

2.1. Autorização da pesquisa

Esta pesquisa foi aprovada pelo Sistema de Autorização e Informação da Biodiversidade (SISBIO, nº de cadastro: 51662-2) e aprovado pela Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista-Júlio de Mesquita (protocolo: 5.595/16).

2.2. Animais de estudo

No período de abril de 2016 a janeiro de 2017, foram colhidas amostras de sangue de 68 macacos *Alouatta* de cativeiro, de nove municípios do Estado de São Paulo, sendo em zoológicos e criatórios: Zoológico de Ilha Solteira, Zoológico Municipal Missina Palmeira Zancaner em Catanduva, Zoológico Municipal Joaquim Garcia Franco em Guaíra, Zoológico Thermas do Laranjais em Olímpia, Bosque Municipal Fábio Barreto em Ribeirão Preto, Zoológico Municipal de Guarulhos, Parque Municipal Quinzinho de Barros em Sorocaba, Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Selvagens (CEMPAS) em Botucatu, e ainda, no Projeto Mucky, na cidade de Itu (Figura 1). Os animais foram anestesiados com associação de cloridrato de tiletatmina/ cloridrato de zolazepam (Virbac Brasil [®](#)), na dose de 6mg/kg pela via intramuscular (IM).

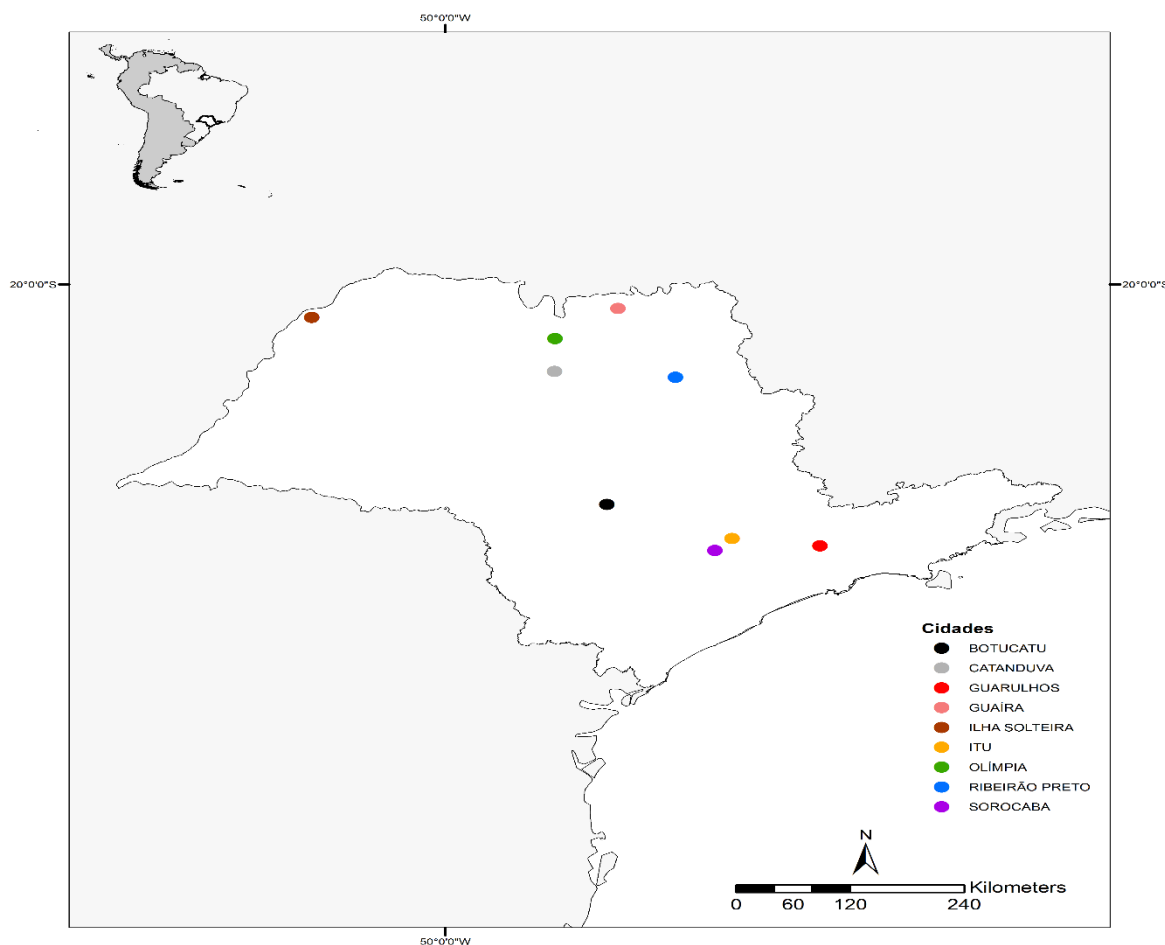


Figura 1. Mapa evidenciando os municípios do Estado de São Paulo onde foram realizadas coletas de sangue dos macacos bugios. Estado de São Paulo, Brasil, 2018. Foto: Cristiane Maria F. de Melo

2.3. Análises hematológicas

Para realização das análises, foi colhido amostras de sangue através das veias cefálica e jugular. Para o hemograma, o sangue foi acondicionado em tubos contendo 7,2 mg de ácido acetil etilenodiamino tetra-acético dipotássico (K_2EDTA) da Becton Dickinson (BD). Em seguida, o sangue foi homogeneizado e as contagens globais de hemácias, leucócitos e plaquetas, assim como determinação do volume globular (VG), concentração de hemoglobina (Hgb), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), foram realizadas com auxílio de um contador automático de células (HORIBA MEDICAL Analisador, modelo ABS Micros ESV 60). A contagem diferencial de leucócitos, objetivando determinar o percentual de basófilos, eosinófilos, neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados, linfócitos e monócitos, foi obtida

a partir do exame, em microscópio de luz (aumento de 1.000 vezes), de esfregaços sanguíneos corados com Giemsa (Sigma-Aldrich).

2.4. Análises bioquímicas sanguíneas

Para análises bioquímico-séricas de substâncias que avaliam a funcionalidade ou integridade renal e hepática, realizou-se coleta de sangue em tubos com ativador de coágulo, cujas amostras foram posteriormente centrifugadas, e o soro sanguíneo separado e armazenado em nitrogênio líquido (-196° C). Para as avaliações, foram utilizados Kits comerciais da Labtest Diagnóstica (Lagoa Santa – Minas Gerais – Brasil), a fim de dosar as concentrações de ureia e de creatinina, e as atividades de alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA). As análises hematológicas e bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária “Professor Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto” do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV/Unesp em Jaboticabal São Paulo, Brasil.

2.5. Proteinograma sérico

Para realização da eletroforese de proteínas séricas, foram colhidas amostras de sangue em tubos contendo ativador de coágulo. Inicialmente foram dosadas as proteínas totais pelo Método do Biureto, com auxílio de um conjunto de reagentes da marca Labtest Diagnóstica (Lagoa Santa – Minas Gerais – Brasil) e leitura em espectrofotômetro semiautomático (Labquest/ Labtest - Lagoa Santa – Minas Gerais – Brasil) no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária “Professor Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto” do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV/Unesp em Jaboticabal São Paulo, Brasil. Posteriormente, as eletroforeses foram realizadas no Laboratório de Apoio do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV/UNESP.

A técnica consistiu na identificação e quantificação das proteínas séricas por meio do fracionamento eletroforético em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), segundo a técnica descrita por [Laemmli, 1970²⁰] utilizando-se um sistema vertical de eletroforese (PROTEAN II XI VERTICAL ELETROPHORESIS CELLS® - BIO-RAD) e empregando-se gel de empilhamento a 4 % e gel de separação a 10%. As corridas eletroforéticas foram realizadas em miliamperagem pré-fixada em 20 mA para o gel de empilhamento e de 25

mA para o gel de separação, sendo a duração média de 5 horas e 30 minutos. Posteriormente, o gel foi corado com azul brilhante de Coomassie e o excesso de corante foi retirado com solução que continha 250 mL de metanol, 100 mL de ácido acético glacial e 1.000 mL de água destilada. A leitura do gel foi realizada em densitômetro computadorizado (SHIMADZU CS-9301-Japan).

2.6. Reação em cadeia de polimerase (PCR)

2.6.1. Extração de DNA

As análises moleculares, foram desenvolvidas no Laboratório de Imunoparasitologia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho em Jaboticabal, São Paulo. Para tanto, foi realizada inicialmente a extração do DNA genômico de sangue colhido em K₂EDTA (BD) de 68 macacos bugios, através do uso de Kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Valência, Califórnia, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração do DNA e taxa de absorbância (260/280) nm foram mensuradas usando um espectrofotômetro (Nanodrop, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). O DNA extraído também foi identificado e armazenado a -20°C para realização da PCR. Em seguida, as amostras de DNA foram submetidas a ensaios de PCR convencional baseada no gene GAPDH (controle endógeno).

2.6.2. PCR convencional para hemoplasmas e Bartonella spp.

Posteriormente as amostras positivas no gene endógeno foram submetidas a ensaios de cPCR adicionais dirigidos para os genes 16S rRNA e RNase P de *Mycoplasma* spp e para o fragmento gênico citrato-sintase (*gltA*) de *Bartonella* spp.

A detecção e caracterização de *Mycoplasma* spp. foi inicialmente realizada utilizando dois conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores: HemMycop16S-41s (5'-GYATGCMTAAYACATGCAAGTCGARCG-3'), HemMyco16S-938as (5'-CTCCACCACTTGTTTCAGGTCCCCGTC-3') (os quais amplificam um fragmento de 800 bp) e HemMycop 16S-322s (5'-GCCCCATATTCCTACGGGAAGCAGCAGT-3'), HemMycop16S-1420as (5'-GTTTGACGGGCGGTGTGTACAAGACC-3') (os quais amplificam um fragmento de 800 pb). A amplificação foi realizada nas seguintes condições:

95°C por 2 minutos, seguidos por 55 ciclos de 94°C por 15 segundos, 68°C por 15 segundos e 72°C por 18 segundos, seguido por uma extensão final a 72°C por 1 minuto [Maggi et al., 2013³].

Adicionalmente, amostras positivas para *Mycoplasma* spp. na cPCR baseada no gene 16S rRNA, foram submetidas a cPCR baseada no gene RNase P, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores HemoMyco RNaseP30s (5'-GATKGTGYGAGYATATAAAAAATAAARCTCRAC-3') e HemoMyco RNaseP200as (5'-GMGGRGTTTACCGCGTTTCAC-3'), os quais amplificam um fragmento de 165 pb de *Mycoplasma* spp. A sequência térmica e tempo de amplificação foram de: 95°C por 2 minutos, seguidos por 55 ciclos de 94°C por 15 segundos, 59°C por 15 segundos e 72°C por 18 segundos, seguido por uma extensão final a 72°C por 1 minuto (Maggi et al., 2013³). As reações de amplificação foram realizadas utilizando reações de volume final de 25µL, contendo 0,2mM de cada deoxinucleotídeo (Life Technologies®), 0,5µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Integrated DNA Technologies® – IDT, Coralville, Iowa, Estados Unidos), 1,5mM de Cloreto de Magnésio (Life Technologies®), 1,25U de Taq DNA Polimerase (Life Technologies®), tampão da PCR 10X (Life Technologies®), e água ultra-pura esterilizada q.s.p. 25µL. Amostra de DNA de *Mycoplasma* spp. detectado em um macaco [Bonato et al., 2015¹²] foi utilizada como controle positivo nas reações. Água ultra-pura esterilizada (Nuclease-Free Water, Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) foi utilizada como controle negativo em todos os ensaios cPCR.

Para as análises moleculares para *Bartonella* spp., as amostras foram submetidas à cPCR baseada em fragmento gênico (350 pb) do gene citrato-sintase (*glta*) [Norman et al., 1995²¹; Birtles e Raoult, 1996²²]. A reação de amplificação continha 0.5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, (BhCS.1137 (AATGCAAAAAGAACAGTAAACA) e CSH1f (GCGAATGAAGCGTGCCTAAA), 5 µL de DNA, 25 µL de buffer, 1.0 mM MgCl₂, 0.8 mM deoxynucleotide triphosphate (dNTPs), 1.0 U Taq DNA Polymerase (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). DNA de *Bartonella henselae* obtido de um felino naturalmente infectado e água ultrapura esterilizada foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente. A sequência térmica e tempo de amplificação foram de: 94°C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto [Bonato et al., 2015¹²].

Os produtos amplificados por meio da cPCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,0% corado com brometo de etídeo (0,5 µL/mL) em tampão de corrida TEB pH 8,0 (44,58 M Tris-base; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA). A eletroforese foi realizada a 90V/150mA durante 60 minutos. Para a determinação dos produtos, foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pares de base (Life Technologies®).

Os resultados da cPCR para *Mycoplasma* spp e *Bartonella* spp. foram visualizados e analisados por meio de um transiluminador de luz ultravioleta (ChemiDoc MP Imaging System, Bio Rad®).

Os produtos amplificados das reações foram purificados com o Kit “Silica Bead DNA Gel Extraction”, de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram encaminhadas para sequenciamento no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) da FCAV/ Unesp em Jaboticabal, São Paulo, Brasil. O sequenciamento dos produtos amplificados foi realizado por meio de técnica automatizada baseada no método de terminação da cadeia por dideoxinucleotídeos [Sanger et al., 1977²³].

2.7. Análises filogenéticas

Para as análises filogenéticas, sequências obtidas de amostras positivas foram submetidas a um teste de triagem utilizando o software Phred-Phrap, versão 23 [Ewing et al., 1998²⁴] a fim de avaliar a qualidade do eletroferograma e obter uma sequência consenso. O programa BLAST [Altschul et al., 1990²⁵] foi utilizado para analisar as sequências de nucleotídeos (BLASTn), visando comparar as sequências com outras depositadas em uma base de dados internacional (GenBank) [Beson et al., 2012²⁶]. As sequências foram alinhadas com outras sequências publicadas no GenBank através do software MAFFT versão 7 [Kato e Standley et al., 2013²⁷].

A inferência filogenética foi baseada na Inferência Bayesiana (BI). A análise de Inferência Bayesiana (BI) foi realizada com o programa MrBayes 3.1.2 [Ronquist e Huelsenbeck, 2003²⁸]. Foram corridas 10⁹ gerações de cadeia de Markov de Monte Carlo (MCMC) com uma amostragem em cada 100 gerações e um “burn-in” de 25%. O melhor modelo evolutivo foi selecionado pelo programa ModelTest 2 (versão 2.1.6) em XSEDE [Darriba et al., 2009²⁹] sobre o Akaike Information Criterion (AIC) [Posada et al., 2004³⁰]. Todas as análises filogenéticas foram executadas utilizando a plataforma CIPRES Science

Gateway [Miller et al., 2010³¹]. As árvores foram editadas através do programa Treegraph 2.0.56-381 beta [Stover e Miller et al., 2010³²].

O alinhamento das sequências do gene 16S rRNA de hemoplasmas amplificadas no presente estudo foi utilizado para calcular número de sítios variáveis, nível de polimorfismo (diversidade de haplótipo – [dh]) e número de haplótipos (h) através do programa DnaSP v5 [Librado e Rozas, 2009³³].

2.8. Análise estatística

Para análise estatística, os animais amostrados foram separados em dois grupos, de acordo com a positividade e negatividade para os hemoparasitas estudados. Posteriormente, foi realizada estatística descritiva, obtendo-se as médias e desvio padrão dos parâmetros avaliados, referentes ao hemograma, bioquímica e eletroforese de proteínas. Após essa análise, foi aplicado o teste de Tukey para a comparação de médias ao nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram processadas no software Statistica versão 7.0.

3.Resultados

Todos os animais mostraram-se positivos na cPCR baseada no gene endógeno GAPDH. Dos 68 macacos bugios avaliados, 18 (26,47%) mostraram-se positivos na cPCR para *Mycoplasma* spp. baseada no gene 16S rRNA, e apenas 1 (5,55%) animal mostrou-se positivo na cPCR para hemoplasmas baseada no gene RNase P. Todos os animais mostraram-se negativos na cPCR para *Bartonella* spp baseada no gene *gltA*. Em relação à análise filogenética, todas as amostras positivas para hemoplasmas posicionaram-se dentro do grupo *Mycoplasma suis*. Por meio da análise de inferência Bayesiana (Figura 2), foram observados dois clados suportados por valor de probabilidade posterior 64%. O clado 1, suportado por uma probabilidade posterior de 100 %, foi constituído de 4 sequências (100%) de *Mycoplasma* spp. de bugios de cativeiro, provenientes das cidades de Botucatu, Ilha Solteira e Catanduva. Já o clado 2, foi formado por quatro sequências (100%) obtidas de primatas de cativeiro amostrados nas cidades de Botucatu, Itu, Guarulhos e Sorocaba. As sequências obtidas mostraram-se filogeneticamente relacionadas a *Candidatus Mycoplasma kahanei* (AF338269; KT314165, KT314166), com um suporte estatístico de 100%.

As sequências obtidas quando comparadas com outras sequências de *Mycoplasma* encontradas no Genbank, constituíram um grupo monofilético, distribuídos entre primatas amostrados em diferentes localidades do Estado de São Paulo.

Dentre as 18 amostras positivas para hemoplasmas na cPCR baseada no gene 16S rRNA, amplicons foram enviados para sequenciamento, considerando a intensidade de bandas na eletroforese em gel de agarose. Das 8 sequências submetidas ao sequenciamento para o gene 16S rRNA, foram identificados número de haplótipos (h:8), número de sítios variáveis: 77, diversidade de haplótipos ($dh = 1,000$).

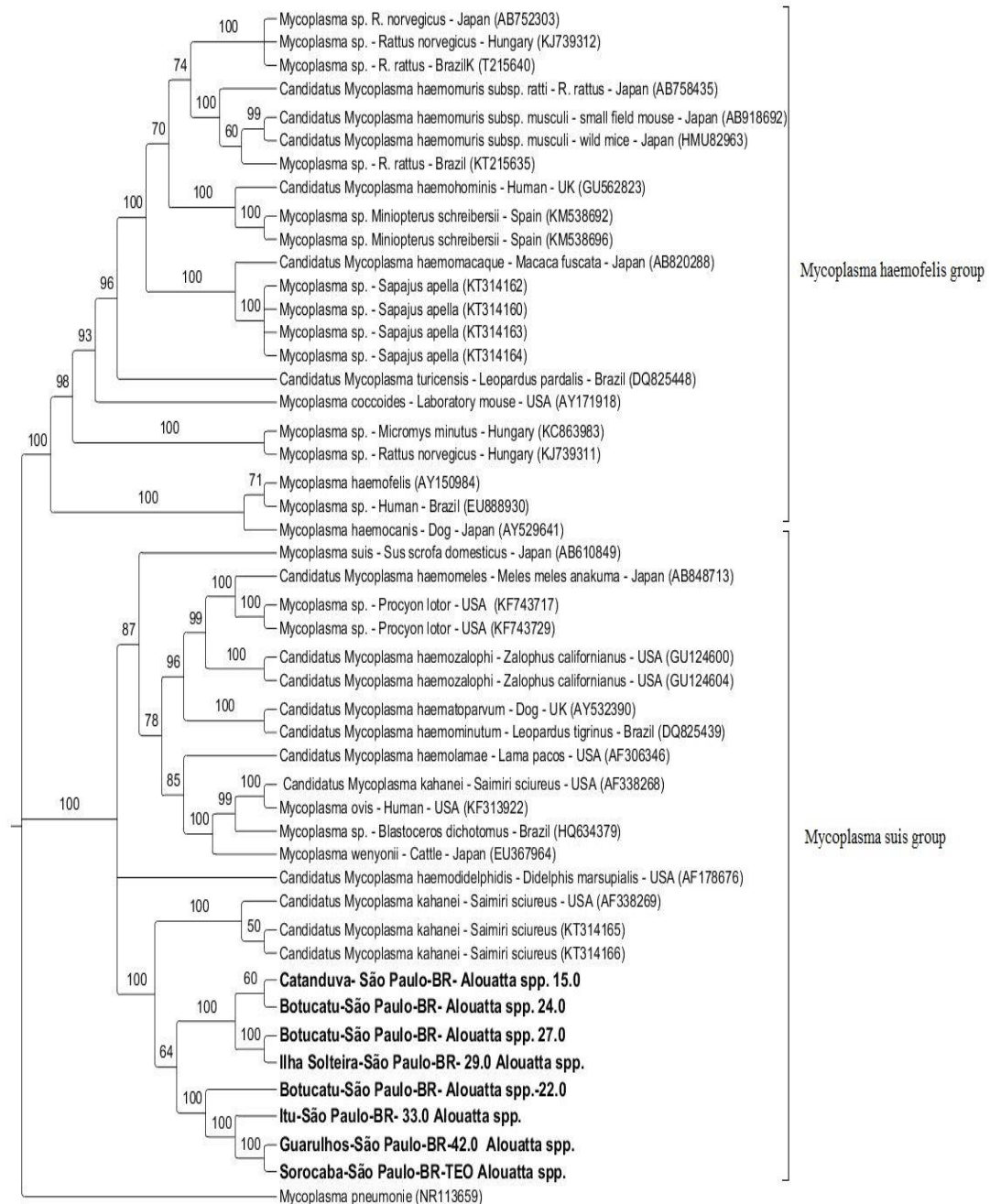


Figura 2. Relação filogenética dentro do gênero *Mycoplasma* baseada em um fragmento de 1280 pb do gene 16S rRNA. A árvore filogenética foi inferida usando a análise Bayesiana e modelo evolutivo HKY + G. As sequências neste estudo estão destacadas em negrito.

Ao se comparar os resultados do hemograma de 18 bugios negativos e 18 positivos para *Mycoplasma* spp. (Tabela 1), verificou-se diferença estatística significativa, em relação aos valores de linfócitos, monócitos e plaquetas. Nesta pesquisa, os valores de linfócitos estavam maiores em 3/18 (16,6%) macacos *Alouatta* positivos e 4/18 (22,2%) dos negativos para hemoplasma. Em relação ao plaquetograma, foi observada diminuição nos valores das

plaquetas em 4/18 bugios (22,22%) positivos para *Mycoplasma*. Os valores dos monócitos observados estavam aumentados em 3/18 (16,6%) *Alouatta* positivos e 1/18 (5,5%) *Alouatta* negativos.

Tabela 1. Análise dos resultados dos hemogramas comparando-se macacos bugios negativos e positivos para hemoplasmas no Estado de São Paulo, Brasil, 2018.

Parâmetro	Grupo		Valor de P
	Positivo (n=18)	Negativo (n=18)	
Hemácias ($\times 10^6$ cells/ μ L)	4,6 $\pm$ 0,55	4,59 $\pm$ 0,75	0,975997
Hemoglobina (g/dL)	12,62 $\pm$ 1,55	13,17 $\pm$ 1,96	0,357952
VG (volume globular)	37,93 $\pm$ 4,61	39,35 $\pm$ 7,95	0,515979
VCM (fL)	82,63 $\pm$ 7,28	85,24 $\pm$ 7,09	0,283678
HCM (g/dL)	33,25 $\pm$ 2,31	33,83 $\pm$ 3,02	0,526326
CHCM (g/dL)	27,46 $\pm$ 2,17	28,87 $\pm$ 3,38	0,145844
Leucócitos totais ($\times 10^3$ / μ L)	13,80 $\pm$ 4,27	12,56 $\pm$ 4,4	0,398840
Basófilos ($\times 10^3$ / μ L)	2,7 $\pm$ 7,2	1,0 $\pm$ 4,2	0,324375
Eosinófilos ($\times 10^3$ / μ L)	3,6 $\pm$ 4,2	2,6 $\pm$ 2,0	0,372690
Bastonetes ($\times 10^3$ / μ L)	0,00 $\pm$ 0,00	3,4 $\pm$ 5,9	0,732807
Segmentados ($\times 10^3$ / μ L)	69,3 $\pm$ 2,6	79,7 $\pm$ 3,7	0,343550
Linfócitos ($\times 10^3$ / μ L)	50,2 $\pm$ 1,40	36,2 $\pm$ 22,7	0,033571*
Monócitos ($\times 10^3$ / μ L)	10,5 $\pm$ 1,0	6,5 $\pm$ 4,5	0,004563*
Plaquetas ($\times 10^3$ / μ L)	223,44 $\pm$ 75,61	323,06 $\pm$ 109,27	0,003133*

Legendas: VCM: Volume corpuscular médio, CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média, HCM: hemoglobina corpuscular média *: valor de P < 0,05

Dos 18 animais positivos para *Mycoplasma*, 16 tiveram amostras de soro sanguíneo submetidas às dosagens bioquímicas para avaliação da funcionalidade renal (ureia e creatinina) e da integridade hepática (fosfatase alcalina e alanina aminotransferase), comparando-se os resultados com 16 bugios negativos. Os resultados com médias e desvio-padrão dos macacos

Alouatta spp. positivos e negativos para *Mycoplasma* estão apresentados na Tabela 2, com nível de significância de 5%. Não foram observadas diferenças significativas em relação às análises bioquímicas sanguíneas dos bugios positivos e negativos para hemoplasmas.

Tabela 2. Resultados das análises bioquímicas referentes a funcionalidade renal e integridade hepática de macacos bugios positivos e negativos para hemoplasmas no Estado de São Paulo, Brasil, 2018.

Parâmetro	Grupos		Valor de P
	Positivos (16)	Negativos (16)	
Creatinina	1,01±0,35	0,84±0,21	0,119587
Ureia	37,5±12,76	37,44±10,83	0,988181
ALT	11,63±5,56	9,06±4,55	0,164111
FA	251±164	268±293	0,721560

Creatinina (mg/ dL); **ureia** (mg/ dL); **ALT**: Alanina aminotransferase (U/L), **FA**: Fosfatase alcalina (UI/L)

Para o proteinograma, foram avaliadas 11 amostras de soro sanguíneo de macacos bugios de cativeiro positivos e negativos para o *Mycoplasma* spp. (Tabela 3).

Tabela 3. Resultados das análises do proteinograma de 11 macacos bugios de cativeiro positivos e 11 negativos para hemoplasmas, obtidas por eletroforese em gel de acrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), no Estado de São Paulo, Brasil, 2018.

	Peso molecular (daltons)	Negativo (n=11)		Positivo (n=11)		Valor P
		Média	DesPad	Média	DesPad	
PT	-	7836,36	2683,38	7872,73	1912, 11	0,971165
IgA	139.000 D	108,18	62,74	94,82	48,43	0,582215
Ceru	125.000 D	64,09	61,14	56,36	69,44	0,784632
Transf	79.000 D	681,62	328,26	574,82	176,01	0,352082
Alb	69.000 D	5484,64	1250,77	4917,45	1772,54	0,396163
IgG pesada	58.000 D	916,73	303,57	757,82	376,24	0,288583
Hapt	45.000 D	81,73	41,71	53,64	33,73	0,097782
Alfa 1	42.000 D	11,64	11,33	8,74	9,37	0,520457
IgG leve	32.000 D	259,36	127,02	251,30	131,93	0,885356
Não identificada	22.000 D	137,45	61,54	129,36	49,46	0,737486

PT: proteínas totais; IgA: imunoglobulina A; Ceru: ceruloplasmina; Transf: transferrina; Alb: albumina; IgG: Imunoglobulina G; Hapt: haptoglobina; Alfa 1: α 1 antitripsina.

Foram identificadas nove proteínas nos primatas desta pesquisa, cujos pesos moleculares foram: imunoglobulina A (139.000 D), ceruloplasmina (125.000 D), transferrina (79.000D), albumina (69.000D), imunoglobulina G de cadeia pesada (58.000 D), haptoglobina (45.000D), α 1 antitripsina (42.000 D), imunoglobulina G de cadeia leve (32.000 D). Nesta pesquisa, não foram observadas diferenças estatísticas em relação ao proteinograma de macacos bugios positivos e negativos para hemoplasmas.

4.Discussão

No presente estudo, todas as amostras de sangue de bugios mostraram-se negativas na cPCR para *Bartonella* spp. No Brasil [Bonato et al., 2015¹²], ao amostrarem primatas na Amazônia, também verificaram negatividade para o referido agente com base em ensaios de PCR convencional e em tempo real, baseados no gene *gltA* e *nuoG*, respectivamente.

Em estudo prévio conduzidos no Brasil, com amostras de sangue de doadores de seres humanos, verificou-se que 3% dos indivíduos eram bacterêmicos para *Bartonella* spp., quando testados por um líquido de enriquecimento de cultura antes da realização da PCR [Pitassi et al., 2015³⁴]. A cultura líquida seguida de semeamento em placas de ágar, e posterior amplificação de DNA pela PCR aumenta a sensibilidade de detecção de *Bartonella* em amostras biológicas com baixa bacteremia [Ducan et al., 2007³⁵]. Aventando a possibilidade da ocorrência de *Bartonella* spp. em amostras de sangue de primatas não-humanos, esperaria-se uma bacteremia de baixíssima magnitude, a qual estaria abaixo do limiar de detecção das técnicas moleculares utilizadas no presente estudo. Desta forma o presente estudo se beneficiaria da utilização de pré-cultura em meio líquido de enriquecimento anteriormente a inoculação em meios sólidos (ágar sangue ou chocolate), com posterior detecção por meio de técnicas moleculares conforme ressaltado anteriormente por [Bonato et al., 2015¹²].

Na pesquisa de [O'Rourke et al., 2005¹⁶], com amostra de sangue de *Macaca fascicularis* nos Estados Unidos, foram detectadas colônias de *Bartonella* spp. em meio ágar sangue bovino e ágar chocolate, anteriormente à realização da cPCR. No Japão, [Huang et al., 2011¹⁵], detectaram colônias de *Bartonella* spp. em cultura com ágar sangue ovino a partir de amostras de sangue de *Macaca fascicularis* e no referido estudo, 2/36 placas desenvolveram colônias de *Bartonella* spp. [Sato et al., 2015¹⁹], por sua vez, também realizaram cultura em meio ágar chocolate anteriormente à PCR, detectando colônias de *Bartonella* spp. em 6/45

amostras de sangue de *Macaca fuscata* amostradas. Estes dados mostram a importância da realização da pré-cultura para *Bartonella*, antes da realização da PCR, a fim de aumentar a sensibilidade de detecção de *Bartonella* spp. Por meio da cPCR, os autores supracitados detectaram *Bartonella quintana* nos primatas amostrados.

Hemoplasmas medem entre 0,3 a 0,8µL de diâmetro, e podem ser visualizados em microscopia de luz em extensões sanguíneas coradas por Giemsa e corantes a base de Romanowsky, como estruturas basofílicas, de forma esférica [Neimark et al., 2001⁴]. Nesta pesquisa não foram visualizados tais organismos nos esfregaços sanguíneos dos macacos bugios, reenfatizando a baixa sensibilidade desta técnica no que diz respeito à detecção de hemoplasmas [Santos et al., 2013¹¹]. Por outro lado [Cubilla et al., 2017¹³] visualizaram hemoplasmas em esfregaços sanguíneos de 8/40 (20%) primatas amostrados, enquanto na cPCR 10/40 (25%) primatas foram positivos para *Mycoplasma* spp., incluindo as oito amostras detectadas no esfregaço sanguíneo.

Candidatus Mycoplasma kahanei foi descrito pela primeira vez por [Neimark et al., 2002⁸] em *Saimiri scirieus*, no Instituto Pasteur na Guiana Francesa. [Maggi et al., 2013³] e [Sashida et al., 2014⁹] detectaram *Candidatus Mycoplasma haemomacaque*, em *Macaca fascicularis* e *Macaca fuscata*, respectivamente, nos Estados Unidos e Japão.

As sequências detectadas no presente estudo quando comparadas com outras sequências de hemoplasmas depositadas no Genbank, agruparam-se próximas àsquelas de *Candidatus Mycoplasma kahanei* encontradas por [Bonato et al., 2015¹²] em espécimes de *Saimiri scirieus* na Amazônia brasileira.

Adicionalmente, [Bonato et al., 2015¹²] detectaram amostras de sangue de primatas não-humanos (*Sapajus apela* e *Saguinus midas niger*) positivas para um outro genótipo de *Mycoplasma* sp.

Embora tentativas de amplificar um fragmento do gene RNase P tenham sido realizadas, a banda produzida na PCR estava muito fraca, impedindo o sequenciamento de boa qualidade, provavelmente devido a baixa bacteremia, como observado previamente por [Bonato et al., 2015¹²]. Já [Cubilla et al., 2017¹³], ao amostrarem espécies de *Alouatta caraya* no Estado do Paraná, sul do Brasil, também detectaram genótipos de hemoplasmas filogeneticamente associados a *Candidatus Mycoplasma kahanei*. Mais recentemente, [Ramalho et al., 2017¹⁴], ao amostrarem espécimes de *Sapajus flavius*, espécie ameaçada de extinção, no estado da Paraíba, no nordeste do Brasil, detectaram uma amostra positiva para *Mycoplasma* sp., a qual

foi posicionada dentro de um clado monofilético, composto por sequências de *Mycoplasma* sp detectadas em *Sapajus apella* provenientes da região Nordeste do Brasil.

Hemoplasmas podem induzir ao desenvolvimento de anemia regenerativa [Foley et al., 1998³⁶; Sykes, 2010³⁷]. No presente trabalho, os resultados obtidos no eritrograma não foram significantes ao se comparar os macacos bugios positivos e negativos para *Mycoplasma* spp. Alguns primatas positivos estavam com os valores do eritrograma diminuídos, porém este quadro não mostrou-se associado com a positividade para hemoplasmas. Geralmente, a macrocitose é observada em animais positivos para *Mycoplasma*, como descrito por [Sykes, 2010³⁷] em gatos domésticos positivos para *Mycoplasma haemofelis*. Similarmente, [Cubilla et al., 2017¹³] também não encontraram diferenças estatísticas significantes no hemograma dos bugios (*Alouatta caraya*) amostrados no Paraná, positivos e negativos para hemoplasmas, corroborando com esta pesquisa.

Na pesquisa de [Maggi et al., 2013³], também não foram observadas evidências de anormalidades hematológicas e bioquímicas associadas à infecção por *Candidatus Mycoplasma haemomacaque* em uma colônia de *Macaca fascicularis* nos Estados Unidos.

No presente estudo, observou-se aumento na contagem de monócitos em (6/18) bugios positivos para hemoplasmas, embora não tenha apresentado associação significativa com a infecção por hemoplasmas. Leucocitose devido a monocitose em *Alouatta* geralmente ocorre associada ao estresse de captura em cativeiro e vida livre [Flaiban et al., 2009³⁸; Satake, 2006³⁹, Vié et al., 1998⁴⁰, Sánchez-Sarmiento et al., 2015⁴¹].

Por sua vez, os valores de linfócitos observados estavam aumentados em 18/18 macacos bugios positivos e 14/18 negativos para hemoplasmas neste ensaio. No trabalho de [Cubilla, 2012¹⁰] foi relatado que a contagem absoluta de linfócitos foi maior em *Alouatta caraya* não infectados (2/3) do que infectados (1/8) com *Candidatus Mycoplasma kahanei*.

Comparando-se as análises bioquímicas dos animais positivos e negativos para *Mycoplasma*, não foram observadas diferenças significativas para as dosagens de ureia, creatinina, ALT e FA. Provavelmente indicando que a infecção na população estudada não induziu alterações funcionais renais nem lesões hepatocelulares.

Quanto ao resultado do proteinograma sérico, nesta pesquisa não foram observadas diferenças estatísticas entre os primatas *Alouatta* positivos e negativos para hemoplasmas. Estudos avaliando as proteínas plasmáticas de fase aguda devem ser realizados, com intuito de detectar a concentração destas proteínas nos processos inflamatórios. [Cubilla, 2012¹⁰], da

mesma forma, não observou diferenças estatísticas significativas entre as dosagens de proteína total dos macacos bugios infectados e não infectados por *Mycoplasma* spp.

5. Conclusão

O presente trabalho mostrou que “*Candidatus Mycoplasma kahanei*” circula entre primatas *Alouatta* mantidos em cativeiro no Estado de São Paulo, Brasil. No hemograma, ocorreram diferenças significativas entre os bugios positivos e negativos para “*Candidatus Mycoplasma kahanei*”, apenas em relação a contagem de linfócitos, monócitos e plaquetas. Quanto as análises da bioquímica sérica e proteinograma sérico não foram observados diferenças entre os *Alouatta* positivos em negativos. Deste modo, o real potencial patogênico desta espécie de hemoplasma deve ser melhor investigado.

6. Agradecimentos

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Laboratório de Imunoparasitologia da Unesp em Jaboticabal, ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinária “Professor Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto” do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Unesp em Jaboticabal São Paulo, Brasil.

7. Referências

1. P. Auricchio. Gênero *Alouatta*. In: Primatas do Brasil. São Paulo: Terra Brasilis, 1995, p.127-143.
2. F.H. Pough, C.M. Janis, J.B. Heiser. A vida dos vertebrados. São Paulo: Atheneu, 2003.
3. R.G. Maggi, P.E. Mascarelli, N. Balakrishnan, C.M. Rodhe, C.M. Kelly, L. Ramaiah, M.W. Leach, E.B. Breitschwerdt. “*Candidatus Mycoplasma haemomacae*” and *Bartonella quintana* Bacteremia em *Cynomolgus monkeys*. Journal of Clinical. Microbiology. 51 (2013) 1408–1411.
4. H. Neimark, K.E. Johansson, Y. Rikihisa, J. G. Tully. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of ‘*Candidatus Mycoplasma haemofelis*’, ‘*Candidatus Mycoplasma haemomuris*’, ‘*Candidatus Mycoplasma haemosuis*’ and ‘*Candidatus Mycoplasma wenyonii*’. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 51 (2001) 891-899.

5. L.M. Berent, J.B. Messick. Physical map and genome sequencing survey of *Mycoplasma haemofelis* (*Haemobartonella felis*). *Infect. Immun.* 71 (2003) 3657-3662.
6. S. Tasker. Haemotropic mycoplasmas: what's their real significance in cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 12 (2010) 369-381.
7. E.N. Baker, C.R. Helps, H. Neimark, I.R. Peters, W. Peters, S. Tasker. A novel haemoplasma species identified in archived primate blood smears, *Veterinary of Microbiology*. 149 (2011) 478–481.
8. H. Neimark, A. Barnaud, P. Gounon, J.C. Michel, H. Contamin. The putative haemobartonella that influences *Plasmodium falciparum* parasitemia in squirrel monkeys is a haemotrophic mycoplasma. *Microbes and Infection*. 4 (2002) 693-698.
9. H. Sashida, Y. Suzuki, S. Rokuhara, K. Nagai, R. Harasawa. Molecular Demonstration of Hemotropic Mycoplasmas in Wild Japanese Monkeys (*Macaca fuscata*). *Journal of Veterinary. Medical of Science*. 76 (2014) 97–101.
10. M.P. Cubilla. Estudo da ocorrência de Micoplasmas hemotrópicos em primatas não-humanos da área de preservação da Usina Hidrelétrica de Itaipu-Foz do Iguaçu-Paraná-Brasil. 2012, 80f. (Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária). UFPR, Paraná, 2012.
11. L.C. Santos, M.P. Cubilla, W. Moraes, Z.S. Cubas, M.J. Oliveira, M. Estrada, C.M. Leutenegger, J.E. Sykes, L.L. Lindsay, M. Marcondes, M.I.B. Filho, A.W. Biondo. Hemotropic Mycoplasma in a Free-ranging Black Howler Monkey (*Alouatta caraya*) in Brazil. *Journal of Wildlife Diseases*. 49 (2013) 728–731.
12. L. Bonato, M.A.P. Figueiredo, L.R. Gonçalves, R.Z. Machado, M.R. André. Occurrence and molecular characterization of *Bartonella* spp. and hemoplasmas in neotropical primates from Brazilian Amazon. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 42 (2015) 15-20.
13. M.P. Cubilla, L.C Santos, W. Moraes, Z.S. Cubas, C.M. Leutenegger, M. Estrada, R.F.C. Vieira, J.S. Maurilio, L.L. Lindsay, J.E. Sykes, A.W. Biondo. Occurrence of hemotropic mycoplasmas in non-human primates (*Alouatta caraya*, *Sapajus nigritus* and *Callithrix jacchus*) of southern Brazil. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 52 (2017) 6–13.
14. A.C. Ramalho, R.R. Guerra, A.C.B. Mongruel, O. Vidotto, R.B. Lucena, M.V.S.F. Guerra, T.S.W. Vieira, R.F.C. Vieira. *Mycoplasma* sp. infection in captive Marcgrave's capuchin monkeys (*Sapajus flavius*). *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 51 (2017) 34–36.
15. R. Huang, Q. Liu, G. Li, D. Li, X. Song, R.J. Birtles, F. Zhao. *Bartonella Quintana* infections in captive monkeys, China, *Emerg. Infect. Dis.* 17 (2011) 1707–1709.

16. L.G. O'Rourke, C. Pitulle, B.C. Hegarty, S. Kraycirik, K.A. Killary, P. Grosenstein, J.W. Brown, E.B. Breitschwerdt. *Bartonella quintana* in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*), Emerg. Infect. Dis. 11 (2005) 1931–1934
17. H. Li, J.Y. Bai, L.Y. Wang, L. Zeng, Y.S. Shi, Z.L. Qiu, H.H. Ye, X.F. Zhang, Q.B. Lu, M. Kosoy, W. Liu, W.C. Cao. Genetic diversity of *Bartonella quintana* in macaques suggests zoonotic origin of trench fever, Mol. Ecol. 22 (2013) 2118–2127.
18. F. Bittar, M.B. Keita, J-C. Lagier, M. Peeters, E. Delaporte, D. Raoult. *Gorilla gorilla gorilla* gut: a potential reservoir of pathogenic bacteria as revealed using culturomics and molecular tools, Scientific Reports, 4 (2014) 7174.
19. S. Sato, H. Kabeya, A. Yoshino, W. Sekine, W. Suzuki, H.B. Tamate, S. Yamazaki, B.B. Chomel, S. Maruyam. Japanese macaques (*Macaca fuscata*) as natural reservoir of *Bartonella quintana*, Emerging Infectious Diseases, 21 (2015).
20. U.K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature. 227 (1970) 680-685.
21. A.F. Norman, R. Regnery, P. Jameson, C. Greene, D.C. Krause, Differentiation of *Bartonella*-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene, J. Clin. Microbiol. 33 (1995) 1797–1803.
22. R.J. Birtles, D. Raoult, Comparison of partial citrate synthase gene (**gltA**) sequences for phylogenetic analysis of *Bartonella* species, Int. J. Syst. Bacteriol. 46 (1996) 891–897.
23. F. Sanger; S. Nicklen; A. R. Coulson. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, 74 (1977), 5463-5467.
24. B. Ewing, L. Hillier, M.C. Wendl, P. Green. Base-calling de traços de sequenciadores automatizados usando phred. Avaliação de precisão. Genoma Res.;8 (1998) 175-185.
25. S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman, Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol. 215 (1990) 403–410.
26. D.A. Benson, I. Karsch-Mizrachi, D.J. Lipman, J. Ostell, B.A. Rapp, D.L. Wheeler. GenBank. Nucleic Acids Res. 30 (2002) 17–2002.
27. K. Katoh, D.M. Standley. Software de Alinhamento de Sequências Múltiplas MAFFT Versão 7: Melhorias em Desempenho e Usabilidade. Biologia Molecular e Evolução, 30 (2013) 772-780.

28. F. Ronquist, J.P. Huelsenbeck. MrBayes 3: inferência filogenética bayesiana sob modelos mistos. *Bioinformática*. 19 (2003) 1572-1574.
29. D. Darriba, G.L. Taboada, R. Doallo, D. Posada. ProtTest 3: seleção rápida dos melhores modelos de evolução de proteínas, *Bioinformática*. 8 (2011) 1164-1165.
30. D. Posada, T.R. Buckley. Seleção do modelo e média do modelo em filogenética: vantagens do critério de informação do akaike e abordagens bayesianas sobre os testes de razão de verossimilhança. *System. Biosciences*. 53 (2004) 793-808.
31. M.A. Miller, W. Pfeiffer, T. Schwartz Criando o portal de ciência CIPRES para a inferência de grandes árvores filogenéticas. *Procedimentos do Workshop de Ambientes de Computação Gateway (GCE)*.2010, Nova Orleans, 1-8.
32. B.C. Stöver, K.F. Muller. TreeGraph 2: combinando e visualizando evidências de diferentes análises filogenéticas. *BMC Bioinformatics* 11 (1) 2010.
33. P. Librado, J. Rozas. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25 (2009) 1451-1452.
34. L.H. Pitassi, P.P. Diniz, D.G. Scorpio, M.R. Drummond, B.G. Lania, M.L. Barjas-Castro, R. Gilioli, S. Colombo, S. Sow, E.B. Breitschwerdt, W.L. Nicholson, P.E. Velho. *Bartonella* spp. bacteremia in blood donors from Campinas, Brazil, *PLoS Negl Trop. Dis*. 9 (2015).
35. A.W. Duncan, R.G. Maggi, E.B. Breitschwerdt. A combined approach for the enhanced detection and isolation of *Bartonella* species in dog blood samples: pre-enrichment liquid culture followed by PCR and subculture onto agar plates, *J. Microbiol. Methods*, 69 (2007) 273-281.
36. J.E. Foley, S. Harrus, A. Poland, B. Chomel, N.C. Pedersen Molecular, clinical, and pathologic comparison of two distinct strains of *Haemobartonella felis* in domestic cats, *American Journal of Veterinary Research*, Chicago, 59 (1998), 1581-1588.
37. J.E. Sykes. Feline hemotropic mycoplasmas, *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 40 (2010) 1157-1170.
38. K.K.M.C. Flaiban, K.A.H. Spohr, L.S. Malanski, W.K. Svoboda, M.M. Shiozawa, C.L.C. Hilst, L.M. Aguiar, G. Ludwig, F.C. Passos, I.T. Navarro, J.A.N. Lisboa, M.R.S. Balarin. Valores hematológicos de bugios pretos (*Alouatta caraya*) de vida livre da região do Alto Rio Paraná, sul do Brasil, *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte. 61 (2009).
39. F. Satake. Constituintes sanguíneos de bugios-pretos (*Alouatta caraya*) e macacos-prego (*Cebus apella*) capturados no resgate de fauna da Usina Hidrelétrica Engenheiro Sérgio Motta. (Doutorado em Medicina Veterinária). 60f. 2006. UNESP, Jaboticabal, 2006

40. J.C. Vie, B. Moreau, B. Thoisy. Hematology and serum biochemical values of free-ranging red howler monkeys (*Alouatta seniculus*) from French Guiana., *Journal of Zoological Wildlife Medical*. 29 (1998) 142-149.
41. A.M. Sanchez-Sarmiento, T. Zwarg, C.F.S. Santos, L.T. Guimarães, A. Genoy-Puerto, E.R. Matushima. Hematological parameters and the variations resulting from stress of *Alouatta caraya* during a Wildlife Rescue Program in Brazil, *American Journal of Primatology*. 77 (2015) 246–253.

ANEXOS

Animal: Pedrita	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Olímpia	Idade: adulto
Sexo: F	Peso: 3,5kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: ração Mega zoo

Animal: Preta Gil	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Olímpia	Idade: adulto
Sexo: F	Peso: 3,95 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: ração Mega zoo

Animal: Duda	Espécie: <i>Alouatta sp.</i>
Local: Olímpia	Idade: adulto
Sexo: F	Peso: 4 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: ração Mega zoo

Animal: Bonny	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Olímpia	Idade: adulto
Sexo: M	Peso: 7,8 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: ração Mega zoo

Animal: Caco	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Guaira	Idade: filhote
Sexo: M	Peso: 1,65 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras, ração para cão

Animal: Joãozinho	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Guaira	Idade: filhote
Sexo: M	Peso: 3,150 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras, ração canina

Animal: Brioche	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Catanduva	Idade: adulto
Sexo: F	Peso: 5,36 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Loirinha	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Catanduva	Idade: adulto
Sexo: F	Peso: 5,13kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Catatau	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Catanduva	Idade: adulto
Sexo: M	Peso: 7 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Pipoca	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Catanduva	Idade: adulto
Sexo: F	Peso: 5,23 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Cicinho	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Catanduva	Idade: adulto
Sexo: F	Peso: 5,23 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Zeca	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Bosque Rib Preto	Idade: adulto
Sexo: M	Peso: 10,2 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Gil	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Bosque Rib Preto	Idade: adulto
Sexo: M	Peso: 7,7 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Mila	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Bosque Rib Preto	Idade: adulto
Sexo: F	Peso: 4,3 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Caco	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Bosque Rib Preto	Idade: adulto
Sexo: M	Peso: 8,5 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Lana	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Bosque Rib Preto	Idade: adulto
Sexo: F	Peso: 2,4 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Sem nome Bosque	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Bosque Rib Preto	Idade: adulto
Sexo: M	Peso: 2,5 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: 4571	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Zoo Guarulhos	Idade: adulto
Sexo: F	Peso: 2,5kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: 3811	Espécie: <i>Alouatta g. clamitans</i>
Local: Zoo Guarulhos	Idade: adulto
Sexo: M	Peso: 3,93kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: 2187	Espécie: <i>Alouatta guariba clamitans</i>
Local: Zoo Guarulhos	Idade: adulto
Sexo: M	Peso: 6 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: 3809	Espécie: <i>Alouatta guariba clamitans</i>
Local: Zoo Guarulhos	Idade: adulto
Sexo: F	Peso: 3,8kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: 2189	Espécie: <i>Alouatta guariba clamitans</i>
Local: Zoo Guarulhos	Idade: adulto
Sexo: F	Peso: 4,67kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Mangi	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Mucky-Itu	Idade: adulto
Sexo: F	Peso: 3,2kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Ariel	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Mucky-Itu	Idade: adulto
Sexo: M	Peso: 6 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Pirata	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Mucky-Itu	Idade: adulto
Sexo: M	Peso: 5,2 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Ingá	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Mucky-Itu	Idade: adulto
Sexo: F	Peso: 3 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Uli	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Mucky-Itu	Idade: adulto
Sexo: F	Peso: 3,6 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Baobá	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Mucky-Itu	Idade: filhote
Sexo: M	Peso: 2,2 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Bel	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Mucky-Itu	Idade: adulto
Sexo: F	Peso: 3,0 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Noa	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Mucky-Itu	Idade: adulto
Sexo: M	Peso: 5,8 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Frangolina	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Mucky-Itu	Idade: adulto
Sexo: F	Peso: 3,30 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Bambam	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Mucky-Itu	Idade: adulto
Sexo: F	Peso: 3 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Barney	Espécie: <i>Alouatta guariba clamitans</i>
Local: Mucky-Itu	Idade: adulto
Sexo: M	Peso: 7,9 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Leucena	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Mucky-Itu	Idade: adulto
Sexo: F	Peso: kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Ibisco	Espécie: <i>Alouatta guariba clamitans</i>
Local: Mucky-Itu	Idade: adulto
Sexo: M	Peso: kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Júpiter	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Mucky-Itu	Idade: adulto
Sexo: M	Peso: 5,4 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Ciça	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Mucky-Itu	Idade: adulto
Sexo: F	Peso: kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Valentina	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Mucky-Itu	Idade: adulto
Sexo: F	Peso: kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Panda	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Mucky-Itu	Idade: adulto
Sexo: M	Peso: kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Luar	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Mucky-Itu	Idade: adulto
Sexo: F	Peso: kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Venus	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Mucky-Itu	Idade: adulto
Sexo: F	Peso: 3,2 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Castanha	Espécie: <i>Alouatta g. clamitans</i>
Local: Mucky-Itu	Idade: adulto
Sexo: F	Peso: 3,6 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Soneca	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Mucky-Itu	Idade: adulto
Sexo: M	Peso: 5,3kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Baru	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Mucky-Itu	Idade: adulto
Sexo: M	Peso: 4,4 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Avelã	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Mucky-Itu	Idade: adulto
Sexo: F	Peso: kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Pirata	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Mucky-Itu	Idade: adulto
Sexo: F	Peso: 3,7kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Buiú	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Mucky-Itu	Idade: adulto
Sexo: M	Peso: 7,2 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Fiona	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Mucky-Itu	Idade: adulto
Sexo: F	Peso: 5,1kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Filhote	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Mucky-Itu	Idade: filhote
Sexo: M	Peso: 1,6kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Urso	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Mucky-Itu	Idade: adulto
Sexo: M	Peso: 7,3 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Baobá	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Mucky-Itu	Idade: filhote
Sexo: M	Peso: 2,2 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: F2	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Ilha Solteira	Idade: adulto
Sexo: F	Peso: 5,45 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: 3432	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Ilha Solteira	Idade: adulto
Sexo: F	Peso: 4,8 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: 2336	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Ilha Solteira	Idade: adulto
Sexo: M	Peso: 7 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: 2039	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Ilha Solteira	Idade: adulto
Sexo: M	Peso: 7,5 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: 2333	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Ilha Solteira	Idade: adulto
Sexo: F	Peso: 4,53 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Caio	Espécie: <i>Alouatta g. clamitans</i>
Local: Cempas	Idade: adulto
Sexo: M	Peso: 8 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Gil	Espécie: <i>Alouatta sp.</i>
Local: Cempas	Idade: adulto
Sexo: M	Peso: 6,25 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Baia 10	Espécie: <i>Alouatta sp.</i>
Local: Cempas	Idade: adulto
Sexo: F	Peso: 5 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Sem nome 2	Espécie: <i>Alouatta</i> sp.
Local: Cempas	Idade: adulto
Sexo: F	Peso: 4,2kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Conde	Espécie: <i>Alouatta g. clamitans</i>
Local: Cempas	Idade: adulto
Sexo: F	Peso: 5,130 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Sem nome 3	Espécie: <i>Alouatta</i> sp.
Local: Cempas	Idade: adulto
Sexo: F	Peso: 3,26 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Murilo	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Cempas	Idade: adulto
Sexo: M	Peso: 6,5 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: 2039	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Ilha Solteira	Idade: adulto
Sexo: M	Peso: 7,5 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Novo	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Cempas	Idade: adulto
Sexo: M	Peso: 7,9kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Sem nome 4	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Cempas	Idade: adulto
Sexo: F	Peso: kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Cad 1	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Sorocaba	Idade: adulto
Sexo: M	Peso: 3,8 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Monguinho	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Sorocaba	Idade: adulto
Sexo: M	Peso: 3,13 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Téó	Espécie: <i>Alouatta caraya</i>
Local: Sorocaba	Idade: adulto
Sexo: M	Peso: 1,64 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras

Animal: Seniculus	Espécie: <i>Alouatta seniculus</i>
Local: Sorocaba	Idade: adulto
Sexo: M	Peso: 7,8 kg
Ectoparasitas: não	Alimentação: frutas, verduras