

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MICHELLE PIRES 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

CURITIBA

2012

MICHELLE PIRES 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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Alexander Welker Biondo

CURITIBA

2012

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Cubilla, Michelle Pires

Estudo da ocorrência de micoplasmas hemotrópicos em primatas não humanos da área de preservação da Usina Hidrelétrica de Itaipu – Foz do Iguaçu – Paraná - Brasil. / Michelle Pires Cubilla. – Curitiba, 2012.
80 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Alexander Welker Biondo

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Primatas 2. Alouatta caraya 3. Cebus apella 4. Micoplasma Título II. Biondo, Alexander Welker III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

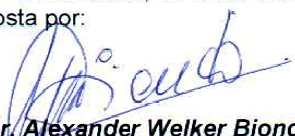
CDD (20. ed.) 574.87

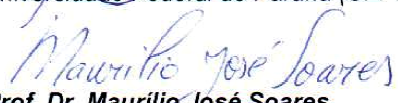
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

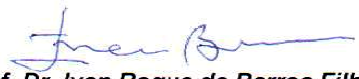
Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:


Prof. Dr. Alexander Welker Biondo
Orientador e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná (UFPR)


Prof. Dr. Maurílio José Soares
Instituto Carlos Chagas (ICC)


Prof. Dr. Ivan Roque de Barros Filho
Departamento de Veterinária
Universidade Federal do Paraná (UFPR)

E tendo como suplente,

Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Departamento de Biologia Celular
Universidade Federal do Paraná (UFPR)

Após arguir a mestrand **Michelle Pires Cubilla**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Estudo da ocorrência de micoplasmas hemotrópicos em primatas não humanos da área de preservação da Usina Hidrelétrica de Itaipu-Foz do Iguaçu-Paraná-Brasil", são de parecer favorável à APPROVAÇÃO da acadêmica, habilitando-a ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular, área de concentração Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 20 de Abril de 2012


Prof. Dr. Fernando Mazzilli Louzada
Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR
Matr: 188050

CENTRO POLITÉCNICO – CEP 81.531-990-JARDIM DAS AMÉRICAS-Caixa Postal 19031-
FONE: (41) 3361-1676 FAX 3266-2042 – E-Mail- pgbiocel@ufpr.br – www.pgbiocel.ufpr.br CURITIBA -PR

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido Diego Perez, pelo amor, incentivo e parceria.

À minha mãe Edileia Pires e minha irmã Nathalia Pires Cubilla, pelo apoio nos momentos difíceis.

À Prof^a Leonilda Correia dos Santos, por todas as oportunidades, pelos ensinamentos, confiança e amizade.

Aos médicos veterinários Wanderlei de Moraes e Zalmir Silvino Cubas, por todas as contribuições e por terem me aberto as portas do Refúgio Biológico Bela Vista.

Aos biólogos Marcos José de Oliveira e Rosana Pinto de Almeida, pelas colaborações.

Ao Prof. Maurilio José Soares, pelo incentivo, disponibilidade e auxílio com a microscopia.

À Prof^a Eloise Helena Fernandes, pela colaboração e por permitir o uso do laboratório em parte das análises.

Ao Prof. Alexander Welker Biondo, pela oportunidade e orientação.

Ao Prof. Edvaldo da Silva Trindade e à Marlene Bonifácio de Camargo, do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, por toda a atenção e auxílio durante o mestrado.

À Ana Laura, Ana Line, Celestina e Ampélia Grazziotin, que me acolheram carinhosamente como parte da família em Curitiba.

À Central Hidrelétrica Itaipu Binacional e seus colaboradores por permitirem e apoiarem a realização de projetos de pesquisa e contribuírem com o crescimento de novos profissionais.

Ao Programa de Ciência de Tecnologia da Fundação Parque Tecnológico Itaipu – FPTI-BR, pela concessão de apoio financeiro.

À Deus, por iluminar meu caminho e ter colocado nele pessoas especiais que participaram dessa conquista.

Muito obrigada!

“O Brasil é um dos países mais ricos do mundo em variedades de primatas. Mas também é dos que mais têm espécies ameaçadas de extinção, por causa da destruição das florestas e da caça. A sobrevivência de nossos macacos depende de conscientização e da multiplicação dos poucos e isolados exemplos de abnegados conservacionistas.”

**João Paulo Krajewski
(Revista Terra da Gente, Suplemento 6, dez.2011)**

“Nunca, jamais desanimeis, embora venham ventos contrários.”

Madre Paulina

RESUMO

Micoplasmas hemotrópicos são parasitas obrigatórios de hemácias e causadores de anemia hemolítica infecciosa em várias espécies de mamíferos. O objetivo deste estudo foi verificar a ocorrência de micoplasmas hemotrópicos em primatas não humanos da área de preservação da Usina Hidrelétrica de Itaipu - Foz do Iguaçu - Paraná - Brasil. As análises foram realizadas com 22 amostras de sangue de macacos, 11 de bugios-pretos (*Alouatta caraya*) e 11 de macacos-prego (*Cebus apella*), coletadas no período de 2007 a 2010. Foi realizada pesquisa microscópica de micoplasmas em extensão sanguínea corada, análise molecular por reação em cadeia da polimerase e sequenciamento das amostras positivas. Os resultados de exames laboratoriais foram comparados entre animais infectados e não infectados por micoplasmas hemotrópicos. Na observação microscópica observou-se a presença de micoplasmas hemotrópicos em 5 (22,72%) amostras. Na análise molecular, detectou-se a presença de hemoplasmas em 10 (45,45%) das 22 amostras e o sequenciamento revelou a presença da espécie '*Candidatus Mycoplasma kahanei*'. Mediante testes estatísticos, verificou-se que os animais mais susceptíveis a infecção foram os da espécie *Alouatta caraya* e os primatas não humanos de origem de vida livre ou capturados da natureza. Quanto aos exames laboratoriais, comparando-se os resultados dos animais infectados com os não infectados, os macacos da espécie *Alouatta caraya* infectados apresentaram maiores valores absolutos de neutrófilos segmentados, enquanto que os não infectados tiveram maiores valores absolutos de linfócitos. Quando as duas espécies foram analisadas de forma agrupada, apenas o volume corpuscular médio apresentou associação estatisticamente significativa com a infecção por hemoplasma, estando aumentado em animais infectados. Este é o primeiro estudo sobre a infecção por micoplasma hemotrópicos em primatas não humanos do gênero *Alouatta* e *Cebus* usando técnicas de PCR e é a segunda vez que a espécie '*Candidatus Mycoplasma kahanei*' é relatada no mundo.

Palavras-chave: Micoplasmas hemotrópicos. Hemoplasmas. Primatas não humanos. *Alouatta caraya*. *Cebus apella*.

ABSTRACT

Hemotropic mycoplasmas are obligate parasites of red blood cells and the causative agent of infectious hemolytic anemia in several mammalian species. The aim of this study was to verify the occurrence of hemotropic mycoplasmas in nonhuman primates in the area of preservation of Itaipu Hydroelectric Dam - Foz do Iguaçu - Paraná - Brazil. Blood samples from 22 monkeys were analyzed, 11 from black howler monkey (*Alouatta caraya*) and 11 from capuchin monkey (*Cebus apella*), collected from 2007 to 2010. Stained blood smears were microscopically examined and molecular analyses were performed by polymerase chain reaction assay, followed by sequencing of the samples. The results of laboratory tests were compared between infected and uninfected monkeys. Microscopic observation showed the presence of hemoplasmas in 5 (22.72%) samples. Among the 22 samples analyzed, 10 (45.45%) tested positive for hemoplasma using PCR-based assays and sequencing revealed the presence of the species '*Candidatus Mycoplasma kahanei*'. *Alouatta caraya* was more frequently infected than *Cebus apella*, as well as free-living born animals. Infected *Alouatta caraya* had higher absolute number of segmented neutrophils, whereas uninfected had higher values for lymphocyte. In general, hemoplasma infected animals showed an increased mean corpuscular volume. This is the first study on hemotropic mycoplasmas infection in nonhuman primates of the genus *Cebus* and *Alouatta* based on PCR assays and the second report of '*Candidatus Mycoplasma kahanei*' in the world.

Keywords: Hemotropic mycoplasmas. Hemoplasmas. Nonhuman primates. *Alouatta caraya*. *Cebus apella*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - FOTOGRAFIA AÉREA DA USINA HIDRELÉTRICA DE ITAIPU	17
FIGURA 2 - MACHO DE BUGIO-PRETO (<i>Alouatta caraya</i>).....	19
FIGURA 3 - FÊMEA DE BUGIO-PRETO (<i>Alouatta caraya</i>).....	19
FIGURA 4 - MACACOS-PREGO (<i>Cebus apella</i>).....	20
FIGURA 5 - MACACO-PREGO (<i>Cebus apella</i>).....	20
FIGURA 6 - HEMOPLASMA EM IMAGEM DE MICROSCOPIA ÓTICA.....	24
FIGURA 7 - HEMOPLASMA EM IMAGEM DE MICROSCOPIA ÓTICA.....	24
FIGURA 8 - HEMOPLASMA EM IMAGEM DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	25
FIGURA 9 - HEMOPLASMA EM IMAGEM DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	25
FIGURA 10 - EXTENSÃO SANGUÍNEA DE BUGIO-PRETO (<i>Alouatta caraya</i>). ...	40
FIGURA 11 - EXTENSÃO SANGUÍNEA DE MACACO-PREGO (<i>Cebus apella</i>) CORADA COM MAY-GRÜNWARD-GIEMSA.....	41
FIGURA 12 - IMAGEM DE MICROSCOPIA CONFOCAL DE ERITRÓCITOS DE MACACO-PREGO (<i>Cebus apella</i>)	41
FIGURA 13 - IMAGEM DE MICROSCOPIA CONFOCAL DE ERITRÓCITOS DE MACACO-PREGO (<i>Cebus apella</i>)	42
FIGURA 14 - GEL DE AGAROSE COM BROMETO DE ETÍDEO.....	42

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PRIMATAS NÃO HUMANOS UTILIZADAS NO ESTUDO, CONFORME A ESPÉCIE, IDADE, SEXO E ORIGEM	36
QUADRO 2 - RESULTADOS DA ANÁLISE MICROSCÓPICA E DA PCR PARA HEMOPLASMAS	43

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	CARACTERÍSTICAS DAS 22 AMOSTRAS DE MACACOS COM RESULTADOS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA HEMOPLASMAS POR PCR	44
TABELA 2 -	DADOS REFERENTES ÀS VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS DOS BUGIOS-PRETOS (<i>Alouatta caraya</i>), POSITIVOS E NEGATIVOS PARA HEMOPLASMA. MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS VALORES, FAIXA DE VARIAÇÃO (VALOR MÁXIMO E MÍNIMO ENCONTRADO), NÚMERO DE RESULTADOS ABAIXO E ACIMA DA FAIXA DE REFERÊNCIA.....	46
TABELA 3 -	DADOS REFERENTES ÀS VARIÁVEIS HEMATOLOGICAS DOS MACACOS-PREGO (<i>Cebus apella</i>), POSITIVOS E NEGATIVOS PARA HEMOPLASMA. MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS VALORES, FAIXA DE VARIAÇÃO (VALOR MÁXIMO E MÍNIMO ENCONTRADO), NÚMERO DE RESULTADOS ABAIXO E ACIMA DA FAIXA DE REFERÊNCIA.....	49
TABELA 4 -	DADOS REFERENTES ÀS DOSAGENS BIOQUÍMICAS DOS BUGIOS-PRETOS (<i>Alouatta caraya</i>), POSITIVOS E NEGATIVOS PARA HEMOPLASMA. MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS VALORES, FAIXA DE VARIAÇÃO (VALOR MÁXIMO E MÍNIMO ENCONTRADO), NÚMERO DE RESULTADOS ABAIXO E ACIMA DA FAIXA DE REFERÊNCIA.....	52
TABELA 5 -	DADOS REFERENTES ÀS DOSAGENS BIOQUÍMICAS DOS MACACOS-PREGO (<i>Cebus apella</i>), POSITIVOS E NEGATIVOS PARA HEMOPLASMA. MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS VALORES, FAIXA DE VARIAÇÃO (VALOR MÁXIMO E MÍNIMO ENCONTRADO), NÚMERO DE RESULTADOS ABAIXO E ACIMA DA FAIXA DE REFERÊNCIA.....	53
TABELA 6 -	AMOSTRAS COM RESULTADOS ABAIXO E ACIMA DOS RESPECTIVOS VALORES DE REFERÊNCIA, AGRUPANDO-SE AS 22 AMOSTRAS DE MACACOS COM RESULTADOS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA HEMOPLASMA.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	- Acquired Immunodeficiency Syndrome
bp	- <i>base pair</i>
CASIB	- Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional
CHCM	- Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
EDTA	- <i>Ethylene Diamine Triacetic Acid</i>
dL	- Decilitro
DNA	- <i>Deoxyribonucleic acid</i>
g	- Grama
HCM	- Hemoglobina Corpuscular Média
HIV	- <i>Human Immunodeficient Virus</i>
IBAMA	- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICC	- Instituto Carlos Chagas
IUCN	- <i>International Union for Conservation of Nature</i>
kg	- Quilograma
mg	- Miligrama
μ L	- Microlitro
mL	- Mililitro
μ m	- Micrômetro
μ M	- Micromol
mm^3	- Milímetro cúbico
mM	- Milimol
nm	- Nanômetro
NCBI	- <i>National Center for Biotechnology Information</i>
PCR	- <i>Polimerase Chain Reaction</i>
p_{Chi}	- p -valor do teste Qui-Quadrado.
p_F	- p -valor do teste Exato de Fisher
RBV	- Refúgio Biológico Bela Vista
RNA	- <i>Ribonucleic acid</i>
VCM	- Volume Corpuscular Médio
%	- Por cento
°C	- Graus Celsius

16S rRNA - 16S *ribosomal RNA*

3' - Extremidade três linha

5' - Extremidade cinco linha

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 OBJETIVOS.....	16
1.1.1 Objetivo Geral	16
1.1.2 Objetivos Específicos	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE PELA USINA HIDRELÉTRICA DE ITAIPU	17
2.2 PRIMATAS NÃO HUMANOS.....	20
2.3 MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS (HEMOPLASMAS)	22
2.3.1 Morfologia.....	23
2.3.2 Ocorrência.....	26
2.3.3 Patogenia	27
2.3.3.1 Infecção aguda.....	28
2.3.3.2 Infecção crônica	29
2.3.4 Hemoplasmas em primatas não humanos	29
2.3.5 Hemoplasmas em seres humanos	31
2.3.6 Transmissão.....	31
2.3.7 Diagnóstico.....	33
2.3.8 Tratamento	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 AMOSTRAS	35
3.2 DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS	36
3.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	37
3.3.1 Pesquisa microscópica de hemoplasmas.....	37
3.3.2 Determinação molecular.....	37
3.3.2.1 Extração do DNA.....	37
3.3.2.2 Detecção de hemoplasmas por PCR	37
3.3.2.3 Sequenciamento do 16S rRNA	38
3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	40
4.1.1 Pesquisa microscópica de hemoplasmas.....	40

4.1.2 Determinação molecular.....	42
4.1.2.1 Detecção de hemoplasmas por PCR	42
4.1.2.2 Sequenciamento do 16S rRNA	43
4.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	44
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
REFERÊNCIAS.....	60
DOCUMENTOS CONSULTADOS.....	69
APÊNDICE.....	70
ANEXOS	72

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Mycoplasma* compreende um grupo de bactérias muito pequenas (0,3 a 0,8 μm de diâmetro), desprovidas de parede celular. Seu genoma está entre os menores registrados em procariotos (HOLT *et al.*, 1994). São bactérias pleomórficas, Gram negativas, de difícil cultivo, que apresentam limitada atividade de biossíntese, proliferando-se aderidos à célula hospedeira e dependendo desta para o fornecimento de nutrientes como aminoácidos, ácidos graxos, colesterol e vitaminas, podendo causar a morte da célula parasitada (JARACH; RIBEIRO-DIAS, 2004; MESSICK, 2004).

Os micoplasmas hemotrópicos, também conhecidos como hemoplasmas, são parasitas obrigatórios de hemácias de uma grande variedade de vertebrados (NEIMARK *et al.*, 2002b). Em extensões sanguíneas observadas ao microscópio ótico, utilizando corantes do tipo Romanowsky, aparecem sob forma esférica, em bastão ou anel e são encontradas individualmente ou em cadeias ao longo da superfície de glóbulos vermelhos (NEIMARK *et al.*, 2001). Sua adesão aos eritrócitos ocorre mediante delicadas fibrilas, formando depressões e invaginações na célula hospedeira (TANAKA *et al.*, 1965; AIKAWA; NUSSENZWEIG, 1972; MESSICK *et al.*, 2002; NEIMARK *et al.*, 2002a).

Os hemoplasmas são causadores de anemia hemolítica infecciosa em várias espécies de mamíferos (WILLI *et al.*, 2006a). Pode ser um agente oportunista, estando presente em animais sadios e levando à doença apenas em determinadas situações (FIRMINO, 2008). Sua transmissão ocorre mediante artrópodes hematófagos como carrapatos, pulgas, piolhos, moscas e mosquitos (NEIMARK *et al.*, 2001).

O desenvolvimento de uma anemia hemolítica aguda ou de um quadro crônico depende da suscetibilidade do hospedeiro e a infecção pode ir de assintomática a grave, com risco de óbito. Em hospedeiros saudáveis, raramente são fulminantes, causando infecções crônicas com uma diversidade de sinais clínicos (NEIMARK *et al.*, 2001).

Embora haja relatos da presença de hemoplasmas em macacos-de-cheiro (*Saimiri sciureus*) utilizados em estudos sobre a malária humana (AIKAWA; NUSSENZWEIG, 1972; CONTAMIN; MICHEL, 1999; MICHEL; THOISY; CONTAMIN, 2000) e em macaco cynomolgus (*Macaca fascicularis*) (DILLBERGER

et al., 1994), a detecção molecular foi feita apenas em dois estudos: em macaco-da-noite (*Aotus trivirgatus*) (BARKER et al., 2011) e em macacos-de-cheiro (*Saimiri sciureus*) (*Saimiri sciureus*) (NEIMARK et al., 2002a). O parasita geralmente causa infecção latente em macacos, que pode ser exacerbada em caso de esplenectomia ou co-infecção por outros micro-organismos, provocando anemia leve ou severa (CONTAMIN; MICHEL, 1999; MICHEL; THOISY; CONTAMIN, 2000; NEIMARK et al., 2002a).

Em seres humanos, a infecção, quando não assintomática, pode provocar febre aguda e anemia, além de outras alterações (HU et al., 2009; CONGBIN et al., 2010; STEER et al., 2011). Alguns relatos sugerem a possibilidade de infecções zoonóticas por hemoplasmas (HU et al., 2009; TASKER et al., 2010).

Devido à dificuldade de crescimento em meios de cultura, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um dos métodos recorridos para sua identificação, além da observação microscópica em extensões sanguíneas com corantes tipo Romanowsky, menos sensível (TASKER et al., 2010).

A utilização de técnicas mais sensíveis tem demonstrado que a infecção por micoplasmas hemotrópicos pode ser mais comum do que se achava, principalmente em países de clima quente. Contudo, a doença clínica raramente é reportada e pouca informação existe sobre o monitoramento da infecção (HULME-MOIR et al., 2010).

No Brasil, algumas espécies já foram encontradas em animais domésticos, silvestres e de produção, mostrando ser um importante agente de infecções em nosso país (BIONDO et al., 2009). Em Foz do Iguaçu, no Paraná, já foi detectada a presença de estruturas compatíveis com micoplasmas hemotrópicos, por microscopia ótica, em várias espécies de animais silvestres, incluindo capivaras, cervídeos e felídeos, sendo esses estudos realizados no Refúgio Biológico Bela Vista (RBV) e Laboratório Ambiental da Usina Hidrelétrica de Itaipu. Alguns casos foram confirmados por técnicas moleculares em gato-maracajá (*Leopardus wiedii*) (GUIMARÃES, 2008) e cervídeos (*Blastocerus dichotomus*, *Mazama nana* e *Mazama americana*) (GRAZZIOTIN et al., 2011) e uma nova espécie foi detectada em capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) (VIEIRA et al., 2009).

Em julho de 2010, um macaco bugio-preto (*Alouatta caraya*) de vida livre, foi encontrado em uma estrada de Foz do Iguaçu, provavelmente atropelado por um carro. O animal foi levado ao Hospital Veterinário do Refúgio Biológico Bela Vista

para exame clínico e tratamento. Uma aliquota do sangue utilizado nas análises laboratoriais foi submetido à pesquisa de hemoplasmas, mediante técnica de PCR quantitativa baseada no princípio de SYBR *Green*, conforme Willi *et al.* (2009). O resultado foi positivo para '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*'-like. Devido a esse encontro, assim como em outros animais silvestres da região e ao caráter potencialmente zoonótico do micro-organismo, motivou-se a pesquisa de hemoplasmas em sangue de primatas não humanos atendidos no RBV.

O parentesco evolutivo entre os seres humanos e os primatas não humanos, evidente em semelhanças anatômicas, comportamentais e bioquímicas, permite estudos comparativos em relação a enfermidades sobre as quais há carência de conhecimentos (CASTRO, 2010). Portanto, além da importância para a saúde dos animais, o estudo de hemoplasmas em primatas não humanos é também de grande relevância para seres humanos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Verificar a ocorrência de micoplasmas hemotrópicos em primatas não humanos da área de preservação da Usina Hidrelétrica de Itaipu - Foz do Iguaçu - Paraná - Brasil.

1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Pesquisar a presença de micoplasmas hemotrópicos em extensões sanguíneas coradas de primatas não humanos;
- b) Verificar a presença de micoplasmas hemotrópicos em primatas não humanos por técnicas moleculares;
- c) Identificar alterações e comparar os resultados de exames laboratoriais de animais infectados e não infectados por micoplasmas hemotrópicos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE PELA USINA HIDRELÉTRICA DE ITAIPU

A Usina Hidrelétrica de Itaipu, localizada sobre o rio Paraná, entre Foz do Iguaçu, Brasil e Cidade do Leste, Paraguai (FIGURA 1), é a maior geradora de energia elétrica com base hidráulica do mundo e tem como uma de suas diretrizes fundamentais o compromisso ambiental (ITAIPU BINACIONAL, 2011d). Nesse sentido, a Itaipu vem desenvolvendo uma série de ações que visam proteger e conservar a biodiversidade regional. Significativos investimentos foram feitos em projetos como a implantação das Áreas de Preservação Permanente (Faixa de Proteção do Reservatório), criação dos refúgios biológicos, acompanhamento da diversidade biológica, migração e estoque pesqueiro do lago, pesquisa de processos de reprodução e criação de animais silvestres ameaçados de extinção e pesquisa florestal (ITAIPU BINACIONAL, 2011a).



FIGURA 1 - FOTOGRAFIA AÉREA DA USINA HIDRELÉTRICA DE ITAIPU. À direita da foto localiza-se a margem brasileira e à esquerda a margem paraguaia do rio Paraná
FONTE: O autor (2011)

O Refúgio Biológico Bela Vista é uma das unidades de proteção ambiental

da Usina de Itaipu, de 1.920 hectares, onde estão localizados o Zoológico Roberto Ribas Lange, o Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional (CASIB) e o Hospital Veterinário. No zoológico encontram-se 210 animais de 55 espécies, que participam de projetos de manejo e conservação. No CASIB existem mais de 180 animais de 31 espécies, algumas delas ameaçadas de extinção. Neste, são desenvolvidos trabalhos de reprodução, fundamentalmente das espécies com risco de desaparecimento da natureza. Desde sua implantação já nasceram mais de 863 animais, de 43 espécies. No Hospital Veterinário é realizado atendimento de animais silvestres mantidos no zoológico e no CASIB, assim como a reabilitação de animais silvestres encontrados feridos na região de influência da usina (ITAIPU BINACIONAL, 2011c, 2011d, 2011e).

A Hidrelétrica de Itaipu também conta com o Laboratório Ambiental para atender às necessidades de projetos ambientais, onde são realizadas pesquisas e exames laboratoriais que auxiliam no diagnóstico de patologias e no monitoramento da sanidade animal (ITAIPU BINACIONAL, 2011b).

No período de coleta das amostras, segundo o censo dos animais, o CASIB possuía 31 espécies, duas delas de primatas não humanos, sendo elas bugio-preto (*Alouatta caraya*) (FIGURA 2 e 3) e macaco-prego (*Cebus apella*) (FIGURA 4 e 5). O Zoológico possuía 55 espécies, sendo uma delas macaco-prego (*Cebus apella*) (informação verbal)¹. As duas espécies de primatas não humanos foram objetos deste estudo.

¹ Informação fornecida por Wanderlei de Moraes, Médico Veterinário do Refúgio Biológico Bela Vista, Usina Hidrelétrica de Itaipu, em dezembro de 2011.



FIGURA 2 - MACHO DE BUGIO-PRETO (*Alouatta caraya*). Animal do Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional
FONTE: de Moraes; Cubilla (2011)



FIGURA 3 - FÊMEA DE BUGIO-PRETO (*Alouatta caraya*). Animal do Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional
FONTE: de Moraes; Cubilla (2011)



FIGURA 4 - MACACOS-PREGO (*Cebus apella*). Animais do Zoológico Roberto Ribas Lange da Itaipu Binacional
FONTE: de Moraes; Cubilla (2011)



FIGURA 5 - MACACO-PREGO (*Cebus apella*). Animal do Zoológico Roberto Ribas Lange da Itaipu Binacional
FONTE: de Moraes; Cubilla (2011)

2.2 PRIMATAS NÃO HUMANOS

O Brasil possui a mais rica fauna primatológica do mundo, sendo um importante país para estudos primatológicos e de conservação dos primatas (MITTERMEIER; COIMBRA-FILHO; VALLE, 1983). Das 414 espécies de primatas conhecidas no mundo (IUCN, 2011), 133 espécies e subespécies habitam o território brasileiro (MACHADO; DRUMMOND; PAGLIA, 2008).

O gênero *Cebus*, que pertence à família Cebidae (AURICCHIO,1995), compreende cinco espécies (AMARAL *et al.*, 2008). A espécie *Cebus apella*, comumente conhecida como macaco-prego, é a espécie mais amplamente distribuída desse gênero, sendo encontrado desde a Colômbia e o nordeste do Brasil, até o norte da Argentina e sudeste do Brasil (BROWN; COLILLAS, 1983). Esta espécie é onívora, sendo a maior parte de sua dieta composta de frutos e insetos (SANTINI, 1983). Muitas vezes obtêm alimentos de cultivos próximos ao seu habitat, convivendo com populações humanas (BROWN; COLILLAS, 1983). Apesar de ser abundante, o *C. apella* está diminuindo em muitas de suas áreas de distribuição (MITTERMEIER; COIMBRA-FILHO; VALLE, 1983), fato que também é citado pela União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais - IUCN (2011), que a classifica como uma espécie pouco preocupante quanto à ameaça de extinção, mas com sua população global em decréscimo.

No que se refere ao gênero *Alouatta*, existe discordância em relação à sua posição taxonômica, classificado em algumas publicações como pertencente à família Atelidae e em outras como Cebidae (AURICCHIO,1995; RYLANDS, 2001; BRASIL, 2005). Segundo o NCBI Taxonomy (2012) e a IUCN (2011), este gênero pertence à família Atelidae. Em trabalho realizado por Gregorin (2006), foram identificadas dez espécies de *Alouatta* no Brasil. Conforme Neville *et al.* (1988), este é o gênero mais amplamente distribuído dentre os primatas do Novo Mundo, indo desde o México até o Brasil e a Argentina. São folívoros e acidentalmente consomem artrópodes (NEVILLE *et al.*, 1988). A espécie *Alouatta caraya* consta nas listas de espécies ameaçadas dos estados do Rio Grande do Sul, como vulnerável, e Paraná e São Paulo, como em perigo, apesar de não estar incluída na lista nacional de espécies ameaçadas do Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (MACHADO; DRUMMOND; PAGLIA, 2008). Seu status mundial de conservação é considerado pouco preocupante e sua população global está reduzindo (IUCN, 2011).

A proximidade genética entre os primatas não humanos e os seres humanos permite que bactérias, fungos e vírus causadores de doenças sejam facilmente transmitidos entre estes dois mamíferos. A transmissão destes micro-organismos pode ocorrer por mordidas, arranhões, durante o manuseio dos animais ou de seus tecidos, através de aerossóis e vetores artrópodes. Geralmente, os primatas não humanos são portadores e transmissores de doenças sem nenhum sinal visível, por

isso, pessoas em contato com estes animais devem ter o devido cuidado (VIRGINIA DEPARTMENT OF HEALTH, 2011).

Dentre as zoonoses potencialmente transmissíveis entre os seres humanos e os primatas não humanos, podem ser citadas febre amarela (BRASIL, 2005), tuberculose, raiva, hepatite A, rubéola, poliomielite, doenças entéricas causadas por bactérias como *Shigella*, *Salmonella* e *Campylobacter*, protozoários como *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Entamoeba* e *Balantidium* e helmintos como *Strongyloides* (VIRGINIA DEPARTMENT OF HEALTH, 2011). Os gêneros *Alouatta*, *Cebus* e *Callithrix*, são os mais associados com epizootias no Brasil (BRASIL, 2005). Em relação à susceptibilidade dos gêneros *Alouatta* e *Cebus* a doenças, este último mostra grande resistência à febre amarela, desenvolvendo uma infecção subclínica com produção de anticorpos que neutralizam futuras reinfecções, enquanto que o gênero *Alouatta* desenvolve infecção fulminante (VASCONCELOS, 2003).

Devido ao hábito de viverem praticamente durante toda vida sobre árvores, os primatas neotropicais são susceptíveis a micro-organismos veiculados por mosquitos, como o vírus da febre amarela (BRASIL, 2005). Em relação a doenças causadas por ectoparasitas, como moscas, piolhos e carrapatos, existem poucas publicações, mas sabe-se que dentre os carrapatos, o gênero *Ixodes* é o mais frequentemente observado em primatas do Novo Mundo de vida livre e de cativeiro, podendo ser potenciais vetores de várias doenças (CATÃO-DIAS, 2001).

2.3 MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS (HEMOPLASMAS)

Micoplasmas hemotrópicos, também denominados hemoplasmas, são bactérias incultiváveis, que não possuem parede celular, parasitam eritrócitos de uma grande variedade de animais e são transmitidos por vetores artrópodes hematófagos. De acordo com suas características fenotípicas, como parasitismo obrigatório, susceptibilidade a tetraciclina, dificuldade de cultivo *in vitro* e características de coloração, os hemoplasmas eram anteriormente classificados como pertencentes aos gêneros *Haemobartonella* e *Eperythrozoon*, família Anaplasmataceae, ordem Rickettsiales. Contudo, mediante a análise filogenética de sequências do gene 16S rRNA, essas bactérias foram reclassificadas como sendo do gênero *Mycoplasma*, classe Mollicutes (NEIMARK; KOCAN, 1997; RIKIHISA *et al.*, 1997; NEIMARK *et al.*, 2001, NEIMARK; HOFF; GANTER, 2004). Assim, foi

proposta a sua reclassificação taxonômica e a utilização provisória da designação *Candidatus* a espécies novas com caracterização incompleta (NEIMARK *et al.*, 2002b). A categoria *Candidatus* é recomendada para procariotos incultiváveis, que ainda não tiveram descritas suas características estruturais, metabólicas e reprodutivas, além da comprovação do ambiente natural no qual o organismo pode ser identificado, não bastando apenas sua informação genômica (MURRAY; STACKEBRANDT, 1995). É o que foi proposto para o micoplasma hemotrópico '*Candidatus* *Mycoplasma haemominutum*', primeiramente descrito em gatos (FOLEY; PEDERSEN, 2001).

Muitas espécies de hemoplasmas foram nomeadas de acordo com o hospedeiro em que foram identificadas, pois se acreditava que cada espécie parasitava um único tipo de animal. Contudo, esse conceito tem mudado, já que a gama de hospedeiros da maioria das espécies não foi totalmente pesquisada (NEIMARK *et al.*, 2001). Um exemplo disso é o *Mycoplasma ovis*, anteriormente denominado *Eperythrozoon ovis*, descrito por primeira vez em ovelhas, mas que também já foi encontrado em cabras (NEIMARK; HOFF; GANTER, 2004) e cervídeos (GRAZZIOTIN *et al.*, 2011).

2.3.1 Morfologia

Os hemoplasmas são organismos muito pequenos, medindo de 0,3 a 0,8 μm de diâmetro (HOLT *et al.*, 1994), que podem ser visualizados ao microscópio ótico em extensões sanguíneas coradas por corantes do tipo Romanowsky (FIGURA 6 e 7) como estruturas basofílicas, de forma esférica, em bastão ou anel e são encontrados individualmente, agrupados ou em cadeias ao longo da superfície de glóbulos vermelhos (VENABLE; EWING, 1968; NEIMARK *et al.*, 2001).

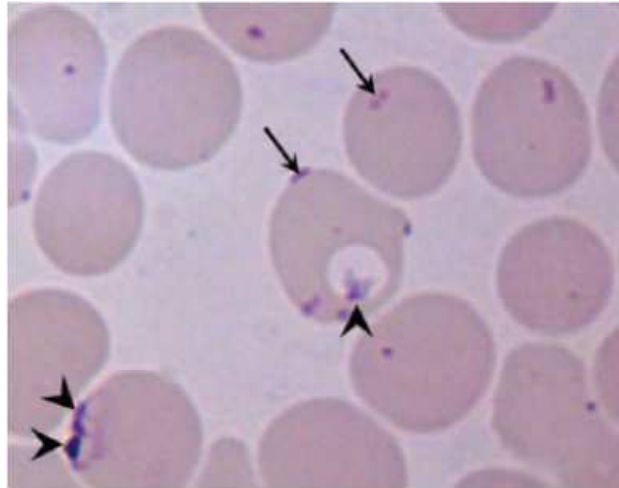


FIGURA 6 - HEMOPLASMA EM IMAGEM DE MICROSCOPIA ÓTICA. Extensão sanguínea corada com Giemsa. Sangue de macaco-da-noite (*Aotus trivirgatus*). As setas indicam hemoplasmas sobre a membrana de eritrócitos. As pontas de setas sinalizam trofozoítos de *Plasmodium falciparum*. Aumento de 1000x.

FONTE: Barker *et al.*, 2011

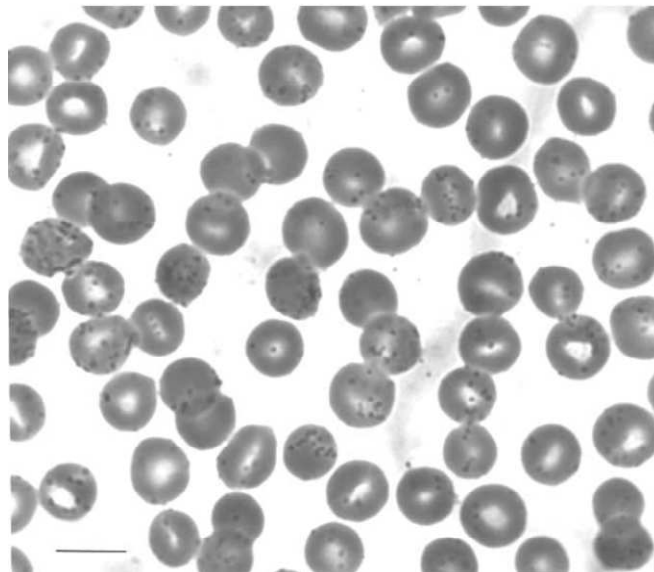


FIGURA 7 - HEMOPLASMA EM IMAGEM DE MICROSCOPIA ÓTICA. Extensão sanguínea corada com Giemsa. Sangue de macaco-de-cheiro (*Saimiri sciureus*). 100% dos eritrócitos estão parasitados. Barra = 7μm

FONTE: Neimark *et al.*, 2002a

Geralmente estão localizados em depressões e invaginações na membrana dos eritrócitos e aderidos a esta por delicadas fibrilas (TANAKA *et al.*, 1965; AIKAWA; NUSSENZWEIG, 1972; PETERS; MOLYNEUX; HOWELLS, 1974; ADAMS; LEWIS; BULLOCK, 1984; ZACHARY; BASGALL, 1985; DILLBERGER *et al.*, 1994; NEIMARK; KOCAN, 1997; MESSICK *et al.*, 2002; NEIMARK *et al.*, 2002a; NEIMARK; HOFF; GANTER, 2004).

Sua morfologia e localização epieritrocítica podem ser observadas mediante imagens de microscopia eletrônica de transmissão (FIGURA 8) e de varredura (FIGURA 9), nas quais é possível visualizar a ausência de parede celular e a presença de fibrilas entre a célula bacteriana e a hemácia (NEIMARK *et al.*, 2002a; NEIMARK; HOFF; GANTER, 2004).

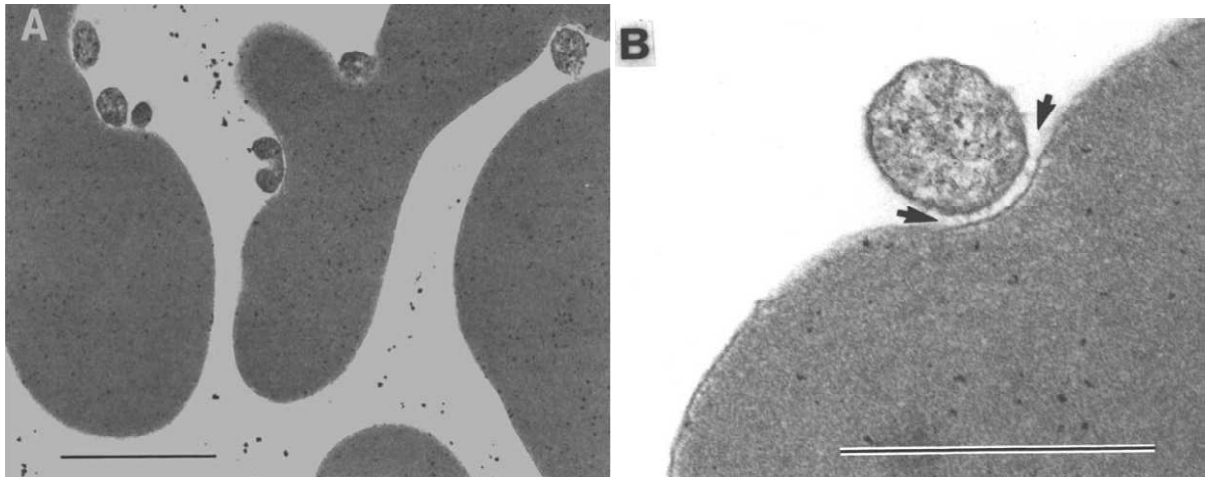


FIGURA 8 - HEMOPLASMA EM IMAGEM DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO. Sangue de macaco-de-cheiro (*Saimiri sciureus*). (A) Hemoplasmas localizados em depressões na superfície da membrana dos eritrócitos. Barra=1 μ m. (B) Fibrilas entre o hemoplasma e a depressão na superfície do eritrócito. Barra = 500nm

FONTE: Neimark *et al.*, 2002a

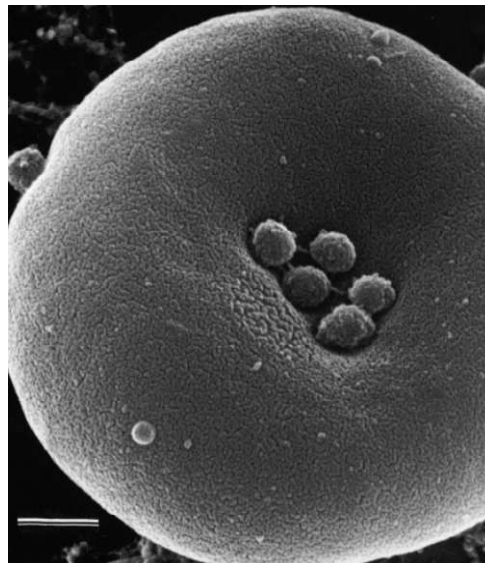


FIGURA 9 - HEMOPLASMA EM IMAGEM DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA. Sangue de carneiro com hemoplasmas na superfície da hemácia. Fibrilas são visíveis entre algumas bactérias e a membrana do eritrócito. Barra=0,5 μ m.

FONTE: Neimark; Hoff; Ganter, 2004

2.3.2 Ocorrência

Os hemoplasmas estão distribuídos mundialmente, infectando uma ampla variedade de vertebrados (MESSICK, 2004). Já foram descritos em aproximadamente 30 diferentes tipos de hospedeiros, mediante observações microscópicas de extensões sanguíneas, variando de peixes a primatas (TYZZER², 1942; WEINMAN³, 1944; KREIER⁴ *et al.*, 1981 *apud* NEIMARK; HOFF; GANTER, 2004). Embora esses hemoparasitas possam ser confundidos com artefatos de coloração ou inclusões eritrocíticas como corpúsculos de Pappenheimer, Heinz ou Howell-Jolly (grânulos de ferro, precipitados de hemoglobina oxidada e restos nucleares, respectivamente) (WEISS; WARDROP, 2010), é provável que a maioria dessas observações realmente tenham sido bactérias hemotrópicas, pois estas vêm sendo confirmadas por técnicas moleculares e por microscopia eletrônica (NEIMARK; HOFF; GANTER, 2004).

Como já mencionado, acreditava-se que uma espécie de hemoplasma que fosse detectado em um dado hospedeiro somente seria infectante para espécies estreitamente próximas (NEIMARK; KOCAN, 1997), porém muitos trabalhos têm demonstrado que a gama de hospedeiro é maior do que se pensava (NEIMARK *et al.*, 2001).

Em felinos são descritos três espécies principais de hemoplasmas, *Mycoplasma haemofelis*, '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' e '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' (WILLI *et al.*, 2007b; SYKES, 2010a, 2010b), mas também já foi identificada '*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*'-like (SYKES *et al.*, 2007).

Em cães, duas espécies são conhecidas, *Mycoplasma haemocanis* e '*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*' (KENNY *et al.*, 2004; SYKES *et al.*, 2005), mas a espécie '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*', comumente

² TYZZER, E.E. A comparative study of grahamellae, haemobartonellae, and eperythrozoon in small mammals. **Proc. Am. Philos. Soc.**, v. 85, p. 359–398, 1942.

³ WEINMAN, D. Infectious anemias due to *Bartonella* and related red cell parasites. **Trans. Am. Philos. Soc.**, v. 33, p. 243–338, 1944.

⁴ KREIER, J.P.; DOMINGUEZ, N.; KRAMPITZ, H.E.; GOTHE, R.; RISTIC, M. The haemotrophic bacteria: the families bartonellaceae and anaplasmataceae. In: STARR, M.P.; STOLP, H.; TRÜPER, H.G.; BALOWS, A.; SCHLEGEL, H.G. (Ed). **The Prokaryotes**. Berlin: Springer, 1981. p. 2189–2209.

encontrada em gatos, tem sido relatada (ZHUANG *et al.*, 2009; OBARA *et al.*, 2011).

Mycoplasma suis, *Mycoplasma wenyonii*, *Mycoplasma haemomuris*, *Mycoplasma coccoides*, 'Candidatus *Mycoplasma haemolamae*', 'Candidatus *Mycoplasma haemodidelphidis*', 'Candidatus *Mycoplasma haemozalophi*', 'Candidatus *Mycoplasma kahanei*' e 'Candidatus *Mycoplasma aoti*' foram identificados em suínos, bovinos, roedores, camundongos, alpacas, gambás, leão-marinho, macaco-de-cheiro e macaco-da-noite, respectivamente (NEIMARK; KOCAN, 1997, RIKIHISA *et al.*, 1997; NEIMARK *et al.*, 2001, 2002b; MESSICK *et al.*, 2002; NEIMARK; HOFF; GANTER, 2004; NEIMARK *et al.*, 2005; HOELZLE, 2008; VOLOKHOV *et al.*, 2010; BARKER *et al.*, 2011).

Mycoplasma ovis foi detectado primeiramente em ovinos, mas também já foi encontrado em caprinos e cervídeos (NEIMARK *et al.*, 2001, 2002b; NEIMARK; HOFF; GANTER, 2004; GRAZZIOTIN *et al.*, 2011). Em seres humanos, foi relatada infecção por *Mycoplasma haemofelis*-like (SANTOS *et al.*, 2008), *Mycoplasma ovis* (SYKES *et al.*, 2010), *Mycoplasma suis*, *Mycoplasma wenyonii* (YUAN *et al.*, 2009; CONGBIN *et al.*, 2010) e recentemente por uma nova espécie, 'Candidatus *Mycoplasma haemohominis*' (STEER *et al.*, 2011). Estes são apenas alguns exemplos da variedade de espécies que vêm sendo descritas e da possibilidade de infecção de mais de um tipo de hospedeiro pelo mesmo hemoplasma.

2.3.3 Patogenia

Anteriormente, todos os micoplasmas de animais que se conheciam eram parasitas de membranas mucosas de vertebrados. A reclassificação dos gêneros *Haemobartonella* e *Eperythrozoon* em *Mycoplasma* revelou uma forma de parasitismo ainda desconhecido para organismos da classe Mollicutes (NEIMARK; HOFF; GANTER, 2004).

Micoplasmas hemotrópicos são agentes causais de anemia infecciosa séria em várias espécies de mamíferos (WILLI *et al.*, 2007a). A infecção varia de assintomática a grave, com risco de óbito. O desenvolvimento de uma anemia hemolítica aguda ou de um quadro crônico depende da susceptibilidade do animal, da espécie de micoplasma envolvida, da rota de infecção e da dose do inóculo (MESSICK, 2004).

A infecção por micoplasmas hemotrópicos pode levar a uma hemólise

extravascular, ocorrendo principalmente no baço e fígado, mas também nos pulmões e medula óssea. Também pode ocorrer hemólise intravascular devido a um aumento na fragilidade osmótica das hemácias infectadas pelas bactérias (TASKER, 2010).

Hemoplasmas não são encontrados livres na natureza, dependendo de uma célula hospedeira para adquirirem compostos essenciais que não são capazes de produzir, como aminoácidos, ácidos graxos, colesterol e vitaminas (MESSICK, 2004). Para isso a bactéria se adere às hemácias, formando uma depressão na superfície da mesma, provocando dano à membrana da célula (WILLI *et al.*, 2007a).

Vários mecanismos foram propostos para explicar a patogenicidade de micoplasmas, como a produção bacteriana de radicais livres e enzimas, e a depleção de nutrientes ou precursores biossintéticos na célula parasitada. Além disso, a produção de autoanticorpos contra antígenos expressos pelos eritrócitos, devido à ligação da bactéria à membrana da célula hospedeira, desencadeia uma desordem imunológica (MESSICK, 2004).

Devido à falta de um sistema que permita o cultivo de hemoplasmas, é impossível obter células bacterianas isoladas e isso representa uma barreira para estudos *in vitro* e *in vivo* que forneçam um melhor entendimento de suas características biológicas vitais, assim como dos mecanismos patogênicos e imunogênicos. As técnicas baseadas em PCR fornecem uma visão básica sobre a diversidade filogenética e epidemiológica dos hemoplasmas, mas não auxiliam na compreensão da fisiologia desses micro-organismos, do mecanismo de infecção e de resposta imune do hospedeiro. Assim, não se sabe precisamente como é o mecanismo de adesão, replicação e de trocas metabólicas entre os hemoplasmas e as hemácias (HOELZLE, 2008).

2.3.3.1 Infecção aguda

A predisposição à infecção aguda é influenciada pela idade, doenças concomitantes, imunossupressão e estresse. Animais esplenectomizados também demonstram maior tendência à doença (NEIMARK *et al.*, 2001). Em gatos a hemoplasmosse aguda está associada à parasitemia massiva dos eritrócitos, causando severa anemia hemolítica, algumas vezes fatal. Ocorre redução brusca do hematócrito e sinais clínicos incluem palidez, letargia, fraqueza, taquicardia, taquipnéia, esplenomegalia, linfadenopatia e ocasionalmente icterícia (WILLI *et al.*,

2007a). Em cães, a infecção pode causar anemia severa, geralmente em animais esplenectomizados, imunossuprimidos ou com infecções concomitantes (NEIMARK *et al.*, 2001; MESSICK, 2003), mas ocorrendo também em animais não esplenectomizados (NORTH,1978; AUSTERMAN, 1979). Estes apresentam sinais clínicos como anorexia, letargia, perda de peso e febre e em casos severos pode levar o animal a óbito (MESSICK, 2003). Em suínos, causa febre, anorexia, depressão e doença hemolítica aguda. Ovinos demonstram palidez ou mucosas ictéricas causadas pela anemia e diminuição da tolerância ao exercício, enquanto que camelídeos apresentam anemia, hipoglicemia e sinais clínicos que incluem colapso agudo, perda de peso, depressão e letargia (MESSICK, 2004).

2.3.3.2 Infecção crônica

Em hospedeiros saudáveis, a hemoplasmosse raramente é fulminante, causando infecções crônicas com uma diversidade de sinais clínicos (NEIMARK *et al.*, 2001). Gatos que apresentam infecção crônica por hemoplasmas associada a infecções retrovirais podem desenvolver doença mieloproliferativa ou transformação neoplásica de células hematopoiéticas. Em cães pode ocorrer anemia leve, leucopenia e apatia (MESSICK, 2003). Em suínos, a baixa reprodutividade, morte embrionária, abortos, assim como perda de peso e maior incidência de infecções respiratórias e entéricas são associadas com infecção crônica por hemoplasma. Bovinos têm redução na produção de leite, perda de peso e baixa reprodutividade, enquanto que ovinos apresentam anemia leve, perda de peso, diminuição na produção de lã e intolerância a exercícios (MESSICK, 2004). Animais podem ser portadores crônicos por meses a anos, mesmo após tratamento com antibióticos (WILLI *et al.*, 2007a).

2.3.4 Hemoplasmas em primatas não humanos

Em relação aos primatas não humanos, hemoplasmas já foram identificados em algumas espécies como, macaco-de-cheiro (*Saimiri sciureus*), macaco cynomolgus (*Macaca fascicularis*) e macaco-da-noite (*Aotus trivirgatus*), sendo esses animais pertencentes criadouros de primatas ou macacos utilizados como animais de experimentação (AIKAWA; NUSSENZWEIG, 1972; PETERS;

MOLYNEUX; HOWELLS, 1974; ADAMS; LEWIS; BULLOCK, 1984; DILLBERGER *et al.*, 1994; CONTAMIN; MICHEL, 1999; BARNAUD; MICHEL; CONTAMIN, 2001).

Ainda com a denominação anterior, *Haemobartonella* sp. foi identificada em extensão sanguínea de macaco-de-cheiro (*Saimiri sciureus*), após realização de esplenectomia e inoculação de sangue de macaco infectado com *Plasmodium brasilianum* (AIKAWA; NUSSENZWEIG, 1972). Também foi descrito em macacos-de-cheiro de cativeiro que apresentavam anemia normocítica e normocrômica (ADAMS; LEWIS; BULLOCK, 1984). *Hemobartonella*-like foi identificado em sangue de macaco cynomolgus (*Macaca fascicularis*) levado das Filipinas para estudos sobre toxicidade nos Estados Unidos (DILLBERGER *et al.*, 1994).

Hemoplasmas também foram responsáveis por infecção assintomática em macacos-de-cheiro de um criadouro da Guiana Francesa. Alguns desses animais apresentaram uma infecção patente, com anemia moderada e monocitose após esplenectomia (CONTAMIN; MICHEL, 1999; BARNAUD; MICHEL; CONTAMIN, 2001). Em posterior estudo filogenético com amostras de alguns dos macacos desse mesmo criadouro revelou-se a nova espécie '*Candidatus Mycoplasma kahanei*' (NEIMARK *et al.*, 2002a).

Eperythrozoon foi relatado em um macaco-da-noite (*Aotus trivirgatus*) de cativeiro, importado da Colômbia para o Reino Unido, onde foi esplenectomizado e infectado experimentalmente com *Plasmodium falciparum* (PETERS; MOLYNEUX; HOWELLS, 1974). Este caso foi confirmado molecularmente, sendo descrita a nova espécie de hemoplasma '*Candidatus Mycoplasma aoti*' (BARKER *et al.*, 2011).

Estes trabalhos sugerem que os macacos podem ser hospedeiros de micoplasmas hemotrópicos ou serem afetados por estes em algumas ocasiões, geralmente sendo detectados após a retirada do baço (AIKAWA; NUSSENZWEIG, 1972; PETERS; MOLYNEUX; HOWELLS, 1974; ADAMS; LEWIS; BULLOCK, 1984; CONTAMIN; MICHEL, 1999; BARNAUD; MICHEL; CONTAMIN, 2001). Alguns macacos desenvolveram uma leve anemia (CONTAMIN; MICHEL, 1999), enquanto outros morreram durante os episódios de anemia (DILLBERGER *et al.*, 1994). Na maioria dos casos de macacos-de-cheiro, foi observada uma redução moderada de hemácias durante a fase aguda da infecção, mas que foi rapidamente compensada (BARNAUD; MICHEL; CONTAMIN, 2001).

2.3.5 Hemoplasmas em seres humanos

Seres humanos podem ser assintomáticos ou apresentar variadas alterações clínicas como febre aguda, anemia e icterícia, principalmente neonatos (HU *et al.*, 2009; CONGBIN *et al.*, 2010). Um trabalho realizado na China relatou alta prevalência de infecções humanas naquele país, principalmente entre gestantes e recém-nascidos de mães positivas para hemoplasmas (HU *et al.*, 2009).

Em infecções latentes o paciente não apresenta sintomas ou sinais clínicos, com exceção de alguns indivíduos que relatam leve fadiga. O quadro agudo resulta em anemia imuno-hemolítica, icterícia e febre contínua. Em relação aos parâmetros laboratoriais, pode ocorrer redução da hemoglobina, aumento da bilirrubina total e indireta e reticulocitose (CONGBIN *et al.*, 2010). Recentemente foi descrito um caso de hemoplasmosse em uma paciente com neutropenia crônica, hemólise aguda e febre, causado pela nova espécie '*Candidatus Mycoplasmas haemohominis*' (STEER *et al.*, 2011).

Em 1992, pesquisadores brasileiros observaram micoplasmas no sangue de pacientes anêmicos com AIDS (DUARTE *et al.*, 1992) e mais recentemente, foram relatados dois casos em pacientes HIV positivos (DOS SANTOS *et al.*, 2008; TASKER *et al.*, 2010).

Um estudo epidemiológico sobre a prevalência de *M. suis* mostrou grande semelhança filogenética entre cepas encontradas em suínos, veterinários e outros funcionários que trabalhavam com os animais, sugerindo uma possível transmissão interespecíes (CONGBIN *et al.*, 2010). Outros trabalhos também relataram casos de infecção em veterinários e trabalhadores de fazendas (YUAN *et al.*, 2009; SYKES *et al.*, 2010). A ocorrência de hemoplasmas em pessoas que mantêm contato próximo com animais sugere a possibilidade de infecções zoonóticas (HU *et al.*, 2009; TASKER *et al.*, 2010), contudo, poucos são os relatos de hemoplasmosse em seres humanos, já que os sintomas clínicos são semelhantes aos de outras doenças e por isso pode ser facilmente confundida com outras doenças (CONGBIN *et al.*, 2010).

2.3.6 Transmissão

O modo de transmissão dos micoplasmas hemotrópicos ainda é pouco claro. Sabe-se que são transmitidos por vetores hematófagos, sendo esta a forma

proposta como natural de transmissão, mas também já foi observada a transmissão direta, descrita entre gatos, e a transmissão entre espécies (WILLI *et al.*, 2007a).

Em relação à transmissão via vetores artrópodes, suspeita-se que a hemoplasmose possa ser propagada por piolhos como *Polyplax spinulosa*, pulgas como *Ctenocephalides felis* e *Xenosylla cheopis* e carrapatos como *Ixodes ricinus*, *Ixodes ovatus* e *Rhipicephalus* sp. (MESSICK, 2004; WILLI *et al.*, 2007a; HOELZLE, 2008; SYKES, 2010b, TASKER, 2010). Certas espécies de mosquitos também parecem estar envolvidas na transmissão de hemoplasmas. A provável transmissão via vetores artrópodes ainda é reforçada pelo fato de que a prevalência da infecção varia em localidades onde ocorre o mesmo tipo de exposição, mas com diferentes graus de infestação por artrópodes (SYKES *et al.*, 2007) ou onde as temperaturas médias anuais são mais elevadas, com maior número de artrópodes hematófagos (WILLI *et al.*, 2007a). Apesar das evidências de transmissão via artrópodes, a infecção também é prevalente em regiões onde a ocorrência destes é incomum, logo outros meios de transmissão devem existir (WILLI *et al.*, 2007a; SYKES, 2010b, TASKER, 2010).

Experimentalmente a hemoplasmose pode ser propagada por inoculação via subcutânea, intravenosa, intraperitoneal e oral de sangue contaminado por hemoplasmas (WILLI *et al.*, 2007a; HOELZLE, 2008; TASKER, 2010). Já foram descritos casos de contágio através de transfusão sanguínea (WILLI *et al.*, 2006a; WILLI *et al.*, 2007a) e por transmissão vertical, durante a gestação, parto ou por meio da lactação (WILLI *et al.*, 2007a; HOELZLE, 2008; HU *et al.*, 2009; TASKER, 2010). Além disso, existe a possibilidade de contaminação de animais durante vacinação, aplicação de brincos de identificação e outros procedimentos nos quais ocorram sangramentos (MESSICK, 2004), ou ainda por instrumentos ou equipamentos médicos sem adequada esterilização (TASKER, 2010).

A presença de material genético de hemoplasmas em saliva, glândulas salivares e fezes de gatos dão evidências de uma provável transmissão direta entre esses animais, mediante mordidas e contato agressivo, o que também facilita a exposição a sangue contaminado (WILLI *et al.*, 2006a; WILLI *et al.*, 2007b; TASKER, 2010). A presença de hemoplasmas filogeneticamente semelhantes em diferentes espécies de hospedeiros sugere possível transmissão interespecíes, e nesse caso alguns animais podem desenvolver a doença enquanto outros atuam apenas como transmissores (WILLI *et al.*, 2007a).

2.3.7 Diagnóstico

Historicamente, devido à dificuldade de crescimento em meios de cultura, o diagnóstico de hemoplasmas era baseado na observação das estruturas em extensões sanguíneas coradas com corantes tipo Romanowsky (TASKER *et al.*, 2010). Nas lâminas, os hemoplasmas são visualizados geralmente associados à membrana das hemácias e algumas vezes soltos no plasma, que pode ocorrer devido à presença do anticoagente EDTA, que provoca sua dissociação da membrana (WEISS; WARDROP, 2010). Por isso a confecção da extensão sanguínea deve ser realizada imediatamente após a coleta do sangue (SYKES, 2010b). Algumas espécies só são observadas nas extensões durante a fase aguda, pois a bactéria desaparece e reaparece no decorrer da infecção (SYKES, 2010b). Além disso, hemoplasmas podem ser confundidos com precipitados de corante, pontilhados basófilos, corpúsculos de Howell-Jolly, Pappenheimer ou Heinz (NEIMARK; HOFF; GANTER, 2004; SYKES, 2010b).

O desenvolvimento de técnicas de PCR, mais sensíveis e capazes de diferenciar entre várias espécies de hemoplasmas, melhorou muito o diagnóstico destes parasitas e tem levado à identificação de várias espécies novas de *Mycoplasma* (TASKER *et al.*, 2010). Este método se baseia na detecção do gene 16S rRNA, no qual também pode ser utilizado material seco de extensões sanguíneas, apesar de menos sensível. A coleta de sangue para a realização da PCR deve ser feita antes da administração de antibióticos para evitar resultado falso negativo (SYKES, 2010b).

2.3.8 Tratamento

O tratamento de escolha para hemoplasmoses em gatos é a doxiciclina (10mg/kg/dia, via oral), por no mínimo duas semanas e transfusão de sangue, quando necessário. Como alternativa pode ser utilizada a enrofloxacin (5mg/kg/dia, via oral). A azitromicina não se mostrou efetiva no tratamento de felinos. Em casos de falha terapêutica com a utilização de antimicrobianos ou quando o diagnóstico é incerto, pode-se optar por associação de glicocorticóides, porém deve ser realizada

com cautela, já que pode causar a reativação de uma infecção latente. Para gatos, o tratamento só é indicado para aqueles com sinais clínicos e alterações laboratoriais. Para animais com PCR positiva, mas assintomáticos, não é recomendado, pois não há tratamento que reconhecidamente elimine o micro-organismo. Da mesma forma, não há terapia antimicrobiana que possa ser utilizada com segurança em potenciais doadores de sangue (SYKES, 2010b).

Em macacos-de-cheiro, o tratamento profilático com oxitetraciclina não foi efetivo na prevenção da infecção por hemoplasmas em animais de experimentação, enquanto que o derivado de arsênico, neoarsfenamina, foi utilizado com sucesso na cura de infecções agudas e crônicas (MICHEL; THOISY; CONTAMIN, 2000).

A doxiciclina também parece ser eficaz em seres humanos. No recente caso de anemia hemolítica infecciosa por hemoplasma, o paciente mostrou uma notável resposta clínica à doxiciclina. Após o tratamento por seis meses em associação com moxifloxacina, os resultados de PCR quantitativa, realizada para monitoramento da resposta ao tratamento, foram negativos para hemoplasmas (STEER *et al.*, 2011).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

Anualmente são coletadas, pela equipe de médicos veterinários do Refúgio Biológico Bela Vista da Usina Hidrelétrica de Itaipu, amostras dos animais em cativeiro, que são submetidas a análises laboratoriais para controle da manutenção da sanidade animal, realizados por recomendação do IBAMA nos animais do Criadouro de Animais Silvestres (registro no IBAMA nº 1286483) e Zoológico Roberto Ribas Lange (registro no IBAMA 598835), localizados em Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil. Além disso, algumas amostras são coletadas durante a investigação de alguma condição patológica.

Após a realização dos exames laboratoriais de rotina, os resíduos de sangue coletados com EDTA de todas as amostras de macacos, coletadas de outubro de 2007 a outubro de 2010, foram armazenados à temperatura de -70°C. Um total de 22 amostras foi analisado, 11 de bugio-preto (*Alouatta caraya*) e 11 de macaco-prego (*Cebus apella*). Além disso, lâminas de extensão sanguínea coradas com May-Grünwald-Giemsa, previamente utilizadas para análise morfológica no hemograma e conservadas em laminoteca, foram examinadas microscopicamente.

Conforme correio eletrônico do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA (ANEXO 1), a utilização do referido material prescinde de autorização, de acordo com o art. 10 da Instrução Normativa do IBAMA nº 154, de 01 de março de 2007. A utilização das amostras para a realização do presente projeto pesquisa foi autorizada pela Diretoria de Coordenação da Usina Hidrelétrica de Itaipu, em 19 de maio de 2011 (documento E/CD/017440/11) (ANEXO 2). Ademais, o projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, em reunião realizada dia 29 de junho de 2011 (protocolo nº 002/2011) (ANEXO 3).

Conforme o registro dos animais, os mesmos foram identificados quanto à espécie, idade, sexo e origem, conforme apresentado a seguir (QUADRO 1).

Identificação	Espécie	Idade	Sexo	Origem
M01	<i>Alouatta caraya</i>	Adulto	Macho	Vida livre
M02	<i>Cebus apella</i>	Adulto	Macho	Cativeiro (nascido em cativeiro)
M03	<i>Cebus apella</i>	Adulto	Macho	Cativeiro (nascido em cativeiro)
M04	<i>Alouatta caraya</i>	Adulto	Fêmea	Cativeiro (nascido em cativeiro)
M05	<i>Alouatta caraya</i>	Adulto	Macho	Cativeiro (origem vida livre)
M06	<i>Alouatta caraya</i>	Adulto	Fêmea	Cativeiro (origem vida livre)
M07	<i>Alouatta caraya</i>	Adulto	Fêmea	Cativeiro (nascido em cativeiro)
M08	<i>Cebus apella</i>	Adulto	Macho	Vida livre
M09	<i>Cebus apella</i>	Adulto	Macho	Vida livre
M10	<i>Cebus apella</i>	Adulto	Macho	Cativeiro (nascido em cativeiro)
M11	<i>Cebus apella</i>	Adulto	Macho	Cativeiro (nascido em cativeiro)
M12	<i>Cebus apella</i>	Adulto	Macho	Cativeiro (nascido em cativeiro)
M13	<i>Cebus apella</i>	Adulto	Fêmea	Vida livre
M14	<i>Alouatta caraya</i>	Adulto	Macho	Vida livre
M15	<i>Alouatta caraya</i>	Adulto	Macho	Vida livre
M16	<i>Alouatta caraya</i>	Adulto	Fêmea	Vida livre
M17	<i>Alouatta caraya</i>	Adulto	Fêmea	Cativeiro (nascido em cativeiro)
M18	<i>Alouatta caraya</i>	Adulto	Macho	Cativeiro (origem vida livre)
M19	<i>Alouatta caraya</i>	Adulto	Macho	Cativeiro (origem vida livre)
M20	<i>Cebus apella</i>	Adulto	Fêmea	Cativeiro (origem vida livre)
M21	<i>Cebus apella</i>	Adulto	Macho	Cativeiro (nascido em cativeiro)
M22	<i>Cebus apella</i>	Adulto	Macho	Cativeiro (nascido em cativeiro)

QUADRO 1 – IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PRIMATAS NÃO HUMANOS UTILIZADAS NO ESTUDO, CONFORME A ESPÉCIE, IDADE, SEXO E ORIGEM

FONTE: O autor (2011)

3.2 DADOS CLINICOS E LABORATORIAIS

Para cada amostra, dados referente a idade (jovem ou adulto), sexo e origem do animal (vida livre ou cativeiro), assim como os resultados dos hemogramas (número de hemácias por milímetro cúbico de sangue, hematócrito, hemoglobina, índices hematimétricos, número de leucócitos, valores absolutos e relativos de neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos) e de exames bioquímicos (glicose, proteína plasmática total,

proteína sérica total, albumina, cálcio e uréia), foram disponibilizados.

3.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

3.3.1 Pesquisa microscópica de hemoplasmas

As extensões sanguíneas coradas por May-Grünwald-Giemsa, das amostras em estudo, que se encontravam na laminoteca do Laboratório Ambiental da Usina Hidrelétrica de Itaipu, foram percorridas cuidadosamente para a pesquisa de hemoplasmas. A observação foi realizada utilizando-se microscópio ótico Olympus CX31, equipado com objetiva de 100X de imersão a óleo. Realizou-se também a observação de uma das lâminas de sangue de macaco-prego em microscópio confocal Leica TCS SP5, equipado com objetiva HCX PL APO CS 100.0x1.40 óleo, no Instituto Carlos Chagas ICC/FIOCRUZ - Curitiba - Paraná.

3.3.2 Determinação molecular

3.3.2.1 Extração do DNA

O DNA de 100 µL das amostras de sangue com EDTA, mantidos a -70°C, foi extraído utilizando o kit comercial Quick-gDNATM MiniPrep (Zymo Research Corp., Orange, CA, USA), segundo as instruções do fabricante. Como controle positivo, foi utilizado amostra com hemoplasma previamente identificado.

3.3.2.2 Detecção de hemoplasmas por PCR

As amostras foram avaliadas por técnica de PCR tradicional utilizando iniciadores de amplo espectro para detecção de hemoplasmas. Os iniciadores, complementares a sequências do gene 16S rRNA, foram: senso 5'-ACG AAA GTC TGA TGG AGC AAT A-3' e antisenso 5'-ACG CCC AAT AAA TCC G(A/G)AT AAT-3', que amplificam um fragmento de 159 bp, conforme descrito por Jensen *et al.* (2001). A amplificação foi realizada conforme Sykes *et al.* (2010). Cada 50 µl da reação continha 1X tampão de reação, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada deoxinucleosídeo trifosfato (dNTP), 1 µM de cada iniciador, 2,5 unidades de *Taq* polimerase e 5 µl do

DNA molde. O protocolo no termociclador consistiu de 5 minutos de desnaturação a 95°C, seguidos por 45 ciclos de amplificação (1 minuto de desnaturação a 95 °C, 1 minuto de anelamento a 60°C e 30 segundos extensão a 72°C), realizado em termociclador Dyad thermocycler (MJ Research Inc., Waltham, MA, USA).

Como controle positivo utilizou-se DNA extraído de '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' e para o controle negativo utilizou-se água ultrapura. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2,5%, corados com brometo de etídeo e visualizados em transiluminador.

3.3.2.3 Sequenciamento do 16S rRNA

Para o sequenciamento das amostras, um fragmento do 16S rRNA de aproximadamente 1450 bp foi amplificado utilizando o iniciador 8F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') (SYKES *et al.*, 2005). Os sequenciamentos foram realizados mediante métodos automatizados (College of Biological Sciences ^{UC}DNA Davis Sequencing Facility, University of California, Davis, CA, USA).

As sequências encontradas dos hemoplasmas foram submetidas ao banco de dados do Genbank.

3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados clínicos e laboratoriais obtidos foram analisados usando os programas BioEstat 5.0 (AYRES *et al.*, 2007) e Epi Info 7 (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, ATLANTA, GA, EUA). As variáveis utilizadas foram espécie do macaco, sexo, origem do animal (vida-livre, cativo-proveniente de vida-livre ou cativo-nascido em cativo), infecção por hemoplasma e resultados dos exames hematológicos e bioquímicos.

Para a análise das variáveis nominais foi utilizado o teste do Qui-quadrado (com correção de Yates quando pelo menos uma das frequências esperadas fosse inferior a 5) ou o teste exato de Fisher (quando o tamanho da amostra fosse inferior a 20). Quando aplicável, o teste de Mann-Whitney foi usado para comparar as medianas dos valores hematológicos e bioquímicos entre animais positivos e negativos para hemoplasma. Parâmetros hematológicos e bioquímicos foram classificados como diminuídos ou aumentados de acordo com o intervalo de

referência estabelecido para cada espécie e foram analisados pelo teste exato de Fisher em associação com a infecção por hemoplasma. O nível de significância estatística foi estabelecido em 0,05.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

4.1.1 Pesquisa microscópica de hemoplasmas

Na análise microscópica das extensões sanguíneas coradas por May-Grünwald-Giemsa, foram encontradas estruturas compatíveis com micoplasmas hemotrópicos em 5 (22,72%) das 22 amostras. As estruturas eram basofílicas, predominantemente esféricas, mas também em forma de bastão, estando em cadeias ou individualmente sobre as hemácias (FIGURAS 10 e 11), conforme previamente descrito (NEIMARK *et al.*, 2001; MESSICK, 2004), e semelhante ao apresentado em imagens de publicações de Messick *et al.* (2000), Messick (2004), Hulme-Moir *et al.* (2010), Barker *et al.* (2011) (FIGURA 6) e Neimark *et al.* (2002a) (FIGURA 7). Este último trabalho mostra a imagem de extensão sanguínea de um macaco-de-cheiro (*Saimiri sciureus*), espécie pertencente à família Cebidae, a mesma do macaco-prego (NATIONAL PRIMATE RESEARCH CENTER, 2010).

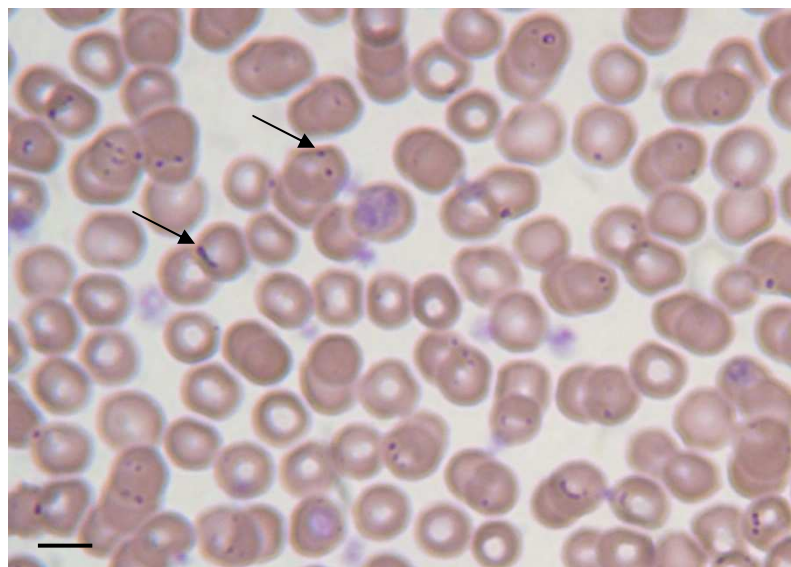


FIGURA 10 - EXTENSÃO SANGUÍNEA DE BUGIO-PRETO (*Alouatta caraya*). As setas indicam as estruturas basofílicas compatíveis com hemoplasmas sobre as hemácias. Coloração de May-Grünwald-Giemsa. Imagem de microscópio ótico Olympus CX31. Barra = 6µm
Fonte: Cubilla; Santos, (2010)

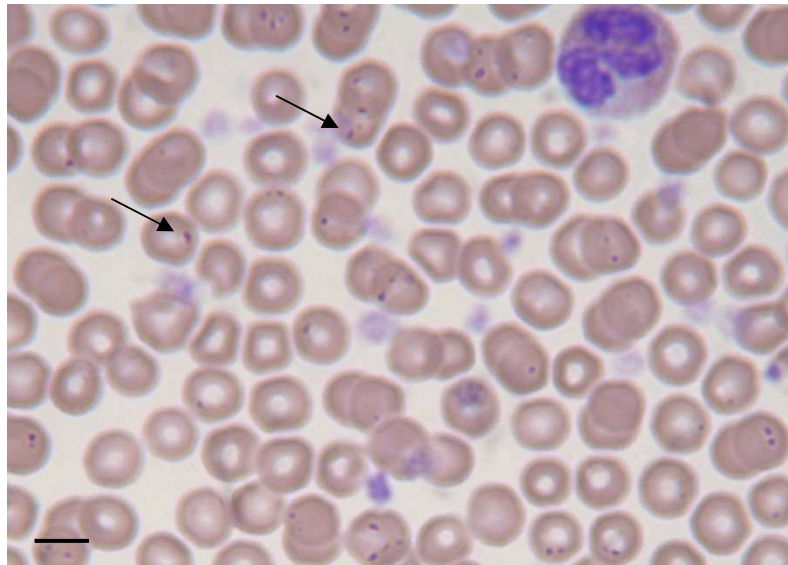


FIGURA 11 - EXTENSÃO SANGUÍNEA DE MACACO-PREGO (*Cebus apella*). As setas indicam as estruturas basofílicas compatíveis com hemoplasmas sobre as hemácias. Coloração de May-Grünwald-Giemsa. Imagem de microscópio ótico Olympus CX31. Barra = 6µm
Fonte: Cubilla; Santos, (2010)

Na observação de uma das lâminas em microscópio confocal, (FIGURA 12 e 13), foi possível visualizar as estruturas suspeitas em depressões na membrana do eritrócito, conforme descrito por vários autores (TANAKA *et al.*, 1965; AIKAWA; NUSSENZWEIG, 1972; MESSICK *et al.*, 2000; MESSICK *et al.*, 2002; NEIMARK *et al.*, 2002a; MESSICK, 2004). A imagem também foi capturada sequencialmente em diferentes profundidades (APÊNDICE 1). A leitura dessa sequência permitiu observar que a estrutura visualizada em um plano como esférica possivelmente teria a forma de bastão.

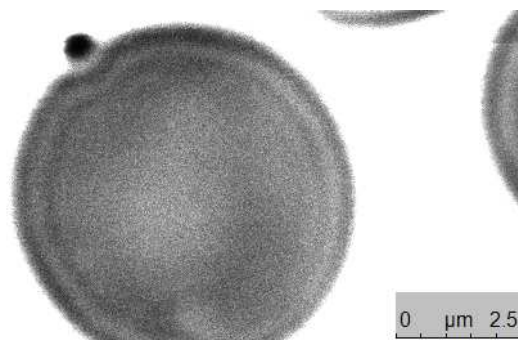


FIGURA 12 - IMAGEM DE MICROSCOPIA CONFOCAL DE ERITRÓCITOS DE MACACO-PREGO (*Cebus apella*). Extensão sanguínea corada com May-grünwald-Giemsa. Imagem confocal Leica TCS SP5 (100.0x1.40 óleo). Estrutura compatível com micoplasma hemotrópico em depressão na membrana do eritrócito.
Fonte: Soares; Cubilla, 2010

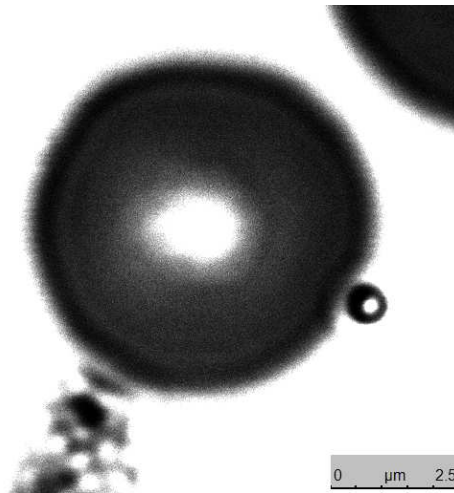


FIGURA 13 - IMAGEM DE MICROSCOPIA CONFOCAL DE ERITRÓCITOS DE MACACO-PREGO (*Cebus apella*). Extensão sanguínea corada com May-grünwald-Giemsa. Imagem confocal Leica TCS SP5 (100.0x1.40 óleo). Estrutura compatível com micoplasma hemotrópico em depressão na membrana do eritrócito.

Fonte: Soares; Cubilla, 2010

4.1.2 Determinação molecular

4.1.2.1 Detecção de hemoplasmas por PCR

Dez (45,45%) das 22 amostras foram positivas na PCR para hemoplasmas (FIGURA 14), incluindo 8 (72,73%) de 11 *Alouatta caraya* e 2 (18,18%) de 11 *Cebus apella*. Em 5 (50,00%) das 10 amostras positivas na PCR, foram visualizadas estruturas compatíveis com hemoplasmas na observação microscópica. Os resultados estão apresentados no quadro 2.



FIGURA 14 - GEL DE AGAROSE COM BROMETO DE ETÍDEO. Amplificações do gene 16S rRNA de micoplasmas hemotrópicos. PM corresponde a marcador de peso molecular de 100 pb. M1-M22 correspondem aos DNAs extraídos das 22 amostras de sangue de macacos

Identificação	Espécie	Análise microscópica	PCR
M01	<i>Alouatta caraya</i>	Positivo	Positivo
M02	<i>Cebus apella</i>	Negativo	Negativo
M03	<i>Cebus apella</i>	Negativo	Negativo
M04	<i>Alouatta caraya</i>	Positivo	Positivo
M05	<i>Alouatta caraya</i>	Negativo	Positivo
M06	<i>Alouatta caraya</i>	Negativo	Negativo
M07	<i>Alouatta caraya</i>	Negativo	Negativo
M08	<i>Cebus apella</i>	Negativo	Negativo
M09	<i>Cebus apella</i>	Negativo	Negativo
M10	<i>Cebus apella</i>	Negativo	Negativo
M11	<i>Cebus apella</i>	Negativo	Negativo
M12	<i>Cebus apella</i>	Negativo	Negativo
M13	<i>Cebus apella</i>	Negativo	Positivo
M14	<i>Alouatta caraya</i>	Negativo	Positivo
M15	<i>Alouatta caraya</i>	Negativo	Positivo
M16	<i>Alouatta caraya</i>	Negativo	Positivo
M17	<i>Alouatta caraya</i>	Negativo	Negativo
M18	<i>Alouatta caraya</i>	Positivo	Positivo
M19	<i>Alouatta caraya</i>	Positivo	Positivo
M20	<i>Cebus apella</i>	Negativo	Negativo
M21	<i>Cebus apella</i>	Negativo	Negativo
M22	<i>Cebus apella</i>	Positivo	Positivo

QUADRO 2 – RESULTADOS DA ANÁLISE MICROSCÓPICA E DA PCR PARA HEMOPLASMAS
 FONTE: O autor (2011)

4.1.2.2 Sequenciamento do 16S rRNA

As amostras positivas foram identificadas como '*Candidatus Mycoplasma kahanei*', apresentando 94% de identidade com o fragmento correspondente de '*Candidatus Mycoplasma kahanei*', cujo número de acesso no GenBank é AF38269.1.

A espécie '*Candidatus Mycoplasma kahanei*' foi descrita por primeira vez em macacos-de-cheiro (*Saimiri sciureus*) do criadouro de primatas não humanos do Instituto Pasteur, na Guiana Francesa (NEIMARK *et al.*, 2002a). Neimark e colaboradores (2002) realizaram a caracterização filogenética desse hemoplasma após o relato da observação microscópica por Contamin e Michel (1999). Estes observaram que os macacos, que eram utilizados em pesquisas sobre a malária, desenvolviam anemia após esplenectomia, associada à presença de micro-organismos Gram negativos nas hemácias (CONTAMIN; MICHEL, 1999).

Não foram encontrados outros relatos dessa espécie de hemoplasma em outros hospedeiros em buscas realizadas no Pubmed e Genbank.

4.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As características referentes às amostras dos macacos encontram-se resumidas na Tabela 1.

TABELA 1 – CARACTERÍSTICAS DAS 22 AMOSTRAS DE MACACOS COM RESULTADOS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA HEMOPLASMAS POR PCR

Variável	Categoria	Número (%) de amostras		p-valor
		Positivos	Negativos	
Espécie	<i>Alouatta caraya</i>	8 (72,73)	3 (27,27)	$p_{Chi} = 0,0322$
	<i>Cebus apella</i>	2 (18,18)	9 (81,82)	
Sexo	Fêmea	3 (42,86)	4 (57,14)	$p_F = 1,0000$
	Macho	7 (46,67)	8 (53,33)	
Origem	Vida livre	5 (71,43)	2 (28,57)	$p_{Chi} = 0,0844$
	Cativeiro – origem vida livre	3 (60,00)	2 (40,00)	$p_F = 0,0427^{(1)}$
	Cativeiro – nascido em cativeiro	2 (20,00)	8 (80,00)	$p_F = 0,1718^{(2)}$

Fonte: O autor (2011)

Nota: p_{Chi} = p-valor do teste Qui-Quadrado.

p_F = p-valor do teste Exato de Fisher.

⁽¹⁾ Animal de vida livre e de cativeiro de origem de vida livre x nascido em cativeiro.

⁽²⁾ Animal de vida livre x cativeiro de origem de vida livre e nascido em cativeiro.

Dentre as 22 amostras analisadas, 10 (45,45%) tiveram resultado positivo para hemoplasma pelas técnicas de PCR. A infecção foi significativamente mais freqüente em *Alouatta caraya* (72,73%) do que em *Cebus apella* (18,18%) ($p_{Chi} = 0,0323$).

De acordo com os resultados, a infecção por hemoplasma não estava

associada ao sexo dos macacos investigados ($p_F=1,0000$). Em relação a origem, o número de animais infectados foi maior dentre aqueles que eram de vida livre e os de cativeiro capturados na natureza, quando comparados agrupadamente com os macacos nascidos e mantidos em cativeiro ($p_F=0,0427$).

Em estudos com animais silvestres, felinos de vida livre de três continentes apresentaram maior frequência de infecção por hemoplasmas do que os felinos silvestres de cativeiro (WILLI *et al.*, 2007b), assim como capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) de vida livre (80%) apresentaram maior ocorrência de infecção do que as de cativeiro (20%) (VIEIRA *et al.*, 2009). Animais de vida livre podem ter maior risco de infecção por hemoplasmas por estarem mais expostos a artrópodes hematófagos, além de terem maior atividade de combate do que animais que se encontram em um ambiente de cativeiro, como por exemplo, um jardim zoológico (WILLI *et al.*, 2007b). Animais domésticos que têm acesso ao exterior também apresentam maior risco de infecção do que os restritos ao ambiente interno de seus lares (WILLI *et al.*, 2006b; ROURA *et al.*, 2010).

Os dados hematológicos e bioquímicos referentes aos macacos *Alouatta caraya* estão apresentados nas tabelas 2 e 3 e aos *Cebus apella* nas tabelas 4 e 5. Os resultados foram classificados como alterados (diminuídos ou aumentados) utilizando como referência a faixa estabelecida para *Alouatta* sp. e *Cebus apella* saudáveis, em cativeiro no Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional (SANTOS, 1999) e no caso do valor de proteínas plasmáticas, não determinada para os bugios do CASIB, foi utilizada a faixa estabelecida para bugios-pretos (*Alouatta caraya*) de vida livre, adultos, aparentemente saudáveis, da região do Alto Rio Paraná - Paraná - Brasil (FLAIBAN *et al.*, 2008).

TABELA 2 – DADOS REFERENTES ÀS VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS DOS BUGIOS-PRETOS (*Alouatta caraya*), POSITIVOS E NEGATIVOS PARA HEMOPLASMA. MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS VALORES, FAIXA DE VARIAÇÃO (VALOR MÁXIMO E MÍNIMO ENCONTRADO), NÚMERO DE RESULTADOS ABAIXO E ACIMA DA FAIXA DE REFERÊNCIA.

(continua)

Variável	<i>Mycoplasma</i> spp.	Amostras analisadas/ total de amostras	Média ±DP	Faixa de variação	Número (%) de resultados		Valores de referência ⁽¹⁾	
					Diminuídos	Aumentados	Macho	Fêmea
Hemácias x10 ⁶ /mm ³	Positivo	8/8	3,54±0,75	2,40- 4,36	2(25,0)	0(0)	3,72-4,90	3,47-4,57
	Negativo	2/3	3,70±0,36	3,45- 3,96	1(50,0)	0(0)		
Hematócrito %	Positivo	8/8	42,87±4,70	35-49	0(0)	3(37,5)	30-44	32-41
	Negativo	2/3	40,00±1,41	39-41	0(0)	0(0)		
Hemoglobina g/dL	Positivo	8/8	12,95±1,36	11,44-15,58	0(0)	1(12,5)	10,04-13,96	9,05-12,41
	Negativo	2/3	11,32±0,85	10,72-11,92	0(0)	0(0)		
VCM μ ³	Positivo	8/8	125,12±23,91	92,63-166,66	0(0)	7(87,5)	72-102	81-98
	Negativo	2/3	108,66±14,40	98,48-118,84	0(0)	1(50,0)		
HCM μg	Positivo	8/8	38,31±10,07	27,17-55,83	0(0)	6(75)	25-31	23-29
	Negativo	2/3	30,81±5,29	27,07-34,55	0(0)	1(50,0)		
CHCM %	Positivo	8/8	30,34±2,74	26,29-33,88	1(12,5)	1(12,5)	27-36	27-32
	Negativo	2/3	28,27±1,12	27,48-29,07	0(0)	0(0)		

TABELA 2 – DADOS REFERENTES ÀS VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS DOS BUGIOS-PRETOS (*Alouatta caraya*), POSITIVOS E NEGATIVOS PARA HEMOPLASMA. MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS VALORES, FAIXA DE VARIAÇÃO (VALOR MÁXIMO E MÍNIMO ENCONTRADO), NÚMERO DE RESULTADOS ABAIXO E ACIMA DA FAIXA DE REFERÊNCIA.

(continuação)

Variável	<i>Mycoplasma</i> spp.	Amostras analisadas/ total de amostras	Média ±DP	Faixa de variação	Número (%) de resultados		Valores de referência ⁽¹⁾	
					Diminuídos	Aumentados	Macho	Fêmea
Leucócitos x10 ³ /mm ³	Positivo	8/8	10,06±2,83	5,60-14,00	1(12,5)	0(0)	7,2-14,7	
	Negativo	2/3	11,05±6,58	6,40-15,70	1(50,0)	1(50,0)		
Bastonetes %	Positivo	7/8	0,00±0,00	0,00-0,00	0(0)	0(0)	0-2	
	Negativo	2/3	0,00±0,00	0,00-0,00	0(0)	0(0)		
Bastonetes /mm ³	Positivo	7/8	0,00±0,00	0,00-0,00	0(0)	0(0)	0-288	
	Negativo	2/3	0,00±0,00	0,00-0,00	0(0)	0(0)		
Segmentados %	Positivo	7/8	40,14±13,11	29-64	3(42,8)	0(0)	35-68	
	Negativo	2/3	24,00±5,66	20-28	2(100,0)	0(0)		
Segmentados /mm ³	Positivo	7/8	4057,57±1469,42	2465-6300	2(28,6)	0(0)	2601-9794	
	Negativo	2/3	2466,00±953,18	1792-3140	1(50,0)	0(0)		
Eosinófilos %	Positivo	7/8	9,00±6,38	1-20	0(0)	3(42,8)	0-8	
	Negativo	2/3	5,00±2,83	3-7	0(0)	0(0)		
Eosinófilos /mm ³	Positivo	7/8	925,43±565,05	56-1700	0(0)	3(42,8)	0-899	
	Negativo	2/3	645,50±641,34	192-1099	0(0)	1(50,0)		

TABELA 2 – DADOS REFERENTES ÀS VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS DOS BUGIOS-PRETOS (*Alouatta caraya*), POSITIVOS E NEGATIVOS PARA HEMOPLASMA. MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS VALORES, FAIXA DE VARIAÇÃO (VALOR MÁXIMO E MÍNIMO ENCONTRADO), NÚMERO DE RESULTADOS ABAIXO E ACIMA DA FAIXA DE REFERÊNCIA.

Variável	<i>Mycoplasma</i> spp.	Amostras analisadas/ total de amostras	Média ±DP	Faixa de variação	Número (%) de resultados		Valores de referência ⁽¹⁾	
					Diminuídos	Aumentados	Macho	Fêmea
Basófilos %	Positivo	7/8	0,57±1,13	0-3	0(0)	1(14,3)	0-1	
	Negativo	2/3	1,50±0,71	1-2	0(0)	1(50,0)		
Basófilos /mm ³	Positivo	7/8	77,00±157,62	0-420	0(0)	2(28,6)	0-55	
	Negativo	2/3	142,50±20,51	128-157	0(0)	2(100,0)		
Linfócitos %	Positivo	7/8	44,86±9,82	29-59	0(0)	1(14,3)	22-53	
	Negativo	2/3	66,00±7,07	61-71	0(0)	2(100,0)		
Linfócitos /mm ³	Positivo	7/8	4779,14±1921,44	1629-7420	0(0)	2(28,6)	1559-6281	
	Negativo	2/3	7525,50±5121,57	3904-11147	0(0)	1(50,0)		
Monócitos %	Positivo	7/8	5,43±3,78	1-13	0(0)	4(57,1)	1-4	
	Negativo	2/3	3,50±3,53	1-6	0(0)	1(50,0)		
Monócitos /mm ³	Positivo	7/8	511,57±319,73	140-1105	0(0)	3(42,8)	35-68	
	Negativo	2/3	270,50±160,51	157-384	0(0)	0(0)		

Fonte: O autor (2011)

Nota: VCM = Volume Corpuscular Médio.

HCM = Hemoglobina Corpuscular Média.

CHCM = Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média.

⁽¹⁾ Valores de referência de bugios (*Alouatta* sp.), saudáveis, em cativeiro no Criadouro de Animais Silvestres da Usina Hidrelétrica de Itaipu - Foz do Iguaçu - Paraná - Brasil (SANTOS, 1999).

TABELA 3 – DADOS REFERENTES ÀS VARIÁVEIS HEMATOLOGICAS DOS MACACOS-PREGO (*Cebus apella*), POSITIVOS E NEGATIVOS PARA HEMOPLASMA. MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS VALORES, FAIXA DE VARIAÇÃO (VALOR MÁXIMO E MÍNIMO ENCONTRADO), NÚMERO DE RESULTADOS ABAIXO E ACIMA DA FAIXA DE REFERÊNCIA.

(continua)

Variável	<i>Mycoplasma</i> spp.	Amostras analizadas/ total de amostras	Média ±DP	Faixa de variação	Número (%) de resultados		Valores de referência ⁽¹⁾	
					Diminuídos	Aumentados	Macho	Fêmea
Hemácias x10 ⁶ /mm ³	Positivo	2/2	4,37±1,63	4,26-4,49	1(50,0)	0(0)	4,34-5,98	3,47-5,33
	Negativo	7/9	4,63±0,96	2,95-6,08	1(14,3)	1(14,3)		
Hematócrito %	Positivo	2/2	43,50±0,71	43-44	0(0)	0(0)	39-47	35-45
	Negativo	7/9	42,57±3,31	36-46	0(0)	0(0)		
Hemoglobina g/dL	Positivo	2/2	15,48±0,41	15,19-15,77	0(0)	0(0)	12,24-16,78	11,23-15,71
	Negativo	6/9	13,72±1,38	12,15-15,56	0(0)	0(0)		
VCM μ ³	Positivo	2/2	99,44±2,06	97,99-100,90	0(0)	1(50,0)	73-97	83-116
	Negativo	7/9	95,76±23,70	70,70-145,76	1(14,3)	1(14,3)		
HCM μμg	Positivo	2/2	35,38±0,37	35,12-35,65	0(0)	1(50,0)	23-32	26-38
	Negativo	6/9	31,01±6,52	22,10-41,76	1(16,7)	1(16,7)		
CHCM %	Positivo	2/2	32,07±5,33	28,30-35,84	1(50,0)	0(0)	30-36	27-37
	Negativo	6/9	30,64±1,69	28,65-33,33	2(33,3)	0(0)		

TABELA 3 – DADOS REFERENTES ÀS VARIÁVEIS HEMATOLOGICAS DOS MACACOS-PREGO (*Cebus apella*), POSITIVOS E NEGATIVOS PARA HEMOPLASMA. MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS VALORES, FAIXA DE VARIAÇÃO (VALOR MÁXIMO E MÍNIMO ENCONTRADO), NÚMERO DE RESULTADOS ABAIXO E ACIMA DA FAIXA DE REFERÊNCIA.

(continuação)

Variável	<i>Mycoplasma</i> spp.	Amostras analisadas/ total de amostras	Média ±DP	Faixa de variação	Número (%) de resultados		Valores de referência ⁽¹⁾	
					Diminuídos	Aumentados	Macho	Fêmea
Leucócitos x10 ³ /mm ³	Positivo	2/2	8,30±0,42	8,00-8,60	0(0)	0(0)	4,5-10,8	
	Negativo	7/9	6,70±2,22	3,45-9,95	1(14,3)	0(0)		
Bastonetes %	Positivo	2/2	0,50±0,71	0,00-1,00	0(0)	0(0)	0-1	
	Negativo	6/9	0,67±0,82	0,00-2,00	0(0)	1(16,7)		
Bastonetes /mm ³	Positivo	2/2	43,00±60,81	0-86	0(0)	1(50,0)	0-68	
	Negativo	6/9	46,17±59,65	0-146	0(0)	2(33,3)		
Segmentados %	Positivo	2/2	59,50±34,65	35-84	0(0)	1(50,0)	29-68	
	Negativo	6/9	51,17±24,13	24-85	1(16,7)	2(33,3)		
Segmentados /mm ³	Positivo	2/2	5012,00±3128,24	2800-7224	0(0)	1(50,0)	1440-6823	
	Negativo	6/9	3610,33±1636,93	1392-6216	1(16,7)	0(0)		
Eosinófilos %	Positivo	2/2	6,00±8,48	0-12	0(0)	1(50,0)	0-7	
	Negativo	6/9	6,17±6,79	0-16	0(0)	2(33,3)		
Eosinófilos /mm ³	Positivo	2/2	480,00±678,82	0-960	0(0)	1(50,0)	0-551	
	Negativo	6/9	467,50±529,69	0-1293	0(0)	2(33,3)		

TABELA 3 – DADOS REFERENTES ÀS VARIÁVEIS HEMATOLOGICAS DOS MACACOS-PREGO (*Cebus apella*), POSITIVOS E NEGATIVOS PARA HEMOPLASMA. MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS VALORES, FAIXA DE VARIAÇÃO (VALOR MÁXIMO E MÍNIMO ENCONTRADO), NÚMERO DE RESULTADOS ABAIXO E ACIMA DA FAIXA DE REFERÊNCIA.

Variável	<i>Mycoplasma</i> spp.	Amostras analisadas/ total de amostras	Média ±DP	Faixa de variação	Número (%) de resultados		Valores de referência ⁽¹⁾	
					Diminuídos	Aumentados	Macho	Fêmea
Basófilos %	Positivo	2/2	1,00±1,41	0-2	0(0)	1(50,0)	0-1	
	Negativo	6/9	0,50±0,84	0-2	0(0)	1(16,7)		
Basófilos /mm ³	Positivo	2/2	80,00±113,14	0-160	0(0)	1(50,0)	0-58	
	Negativo	6/9	36,50±61,08	0-146	0(0)	2(33,3)		
Linfócitos %	Positivo	2/2	26,00±24,04	9-43	1(50,0)	0(0)	22-61	
	Negativo	6/9	32,17±14,39	11-53	1(16,7)	0(0)		
Linfócitos /mm ³	Positivo	2/2	2107,00±1885,15	774-3440	1(50,0)	0(0)	810-5482	
	Negativo	6/9	2393,17±1184,93	517-4080	1(16,7)	0(0)		
Monócitos %	Positivo	2/2	7,00±1,41	6-8	0(0)	2(100,0)	0-3	
	Negativo	6/9	9,33±10,93	1-31	0(0)	4(66,7)		
Monócitos /mm ³	Positivo	2/2	578,00±87,68	516-640	0(0)	2(100,0)	0-432	
	Negativo	6/9	733,50±782,53	84-2263	0(0)	3(50,0)		

Fonte: O autor (2011)

Nota: VCM = Volume Corpuscular Médio.

HCM = Hemoglobina Corpuscular Média.

CHCM = Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média.

⁽¹⁾ Valores de referência de macacos-prego (*Cebus apella*), saudáveis, em cativeiro no Criadouro de Animais Silvestres da Usina Hidrelétrica de Itaipu - Foz do Iguaçu - Paraná - Brasil (SANTOS, 1999).

TABELA 4 – DADOS REFERENTES ÀS DOSAGENS BIOQUÍMICAS DOS BUGIOS-PRETOS (*Alouatta caraya*), POSITIVOS E NEGATIVOS PARA HEMOPLASMA. MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS VALORES, FAIXA DE VARIAÇÃO (VALOR MÁXIMO E MÍNIMO ENCONTRADO), NÚMERO DE RESULTADOS ABAIXO E ACIMA DA FAIXA DE REFERÊNCIA.

Variável	<i>Mycoplasma</i> spp.	Amostras analisadas /total de amostras	Média ±DP	Faixa de variação	Número (%) de resultados		Valores de referência ⁽¹⁾
					Diminuídos	Aumentados	
Glicose mg/dL	Positivo	7/8	80,60±28,68	44,26-125,50	4(57,1)	1(14,3)	81,24-122,54
	Negativo	2/3	59,95±2,24	58,37-61,54	2(100,0)	0(0)	
Proteínas plasmáticas g%	Positivo	7/8	8,51±0,38	7,80-9,00	0(0)	4(57,1)	7,38-8,44 ⁽²⁾
	Negativo	2/3	7,60±0,85	7,00-8,20	1(50,0)	0(0)	
Proteínas totais g/dL	Positivo	7/8	6,80±2,56	1,62-9,55	1(14,3)	3(42,8)	5,85-7,49
	Negativo	2/3	7,81±0,74	7,29-8,34	0(0)	1(50,0)	
Albumina g/dL	Positivo	7/8	3,17±1,03	1,36-4,61	1(14,3)	0(0)	2,43-4,67
	Negativo	2/3	3,54±0,26	3,36-3,73	0(0)	0(0)	
Cálcio mg/dL	Positivo	5/8	8,48±1,00	7,38-9,72	2(40,0)	1(20,0)	7,99-9,39
	Negativo	2/3	7,55±2,25	5,96-9,14	1(50,0)	0(0)	
Ureia mg/dL	Positivo	4/8	53,56±22,55	30,57-83,41	0(0)	3(75,0)	24,84-42,98
	Negativo	2/3	43,73±4,28	40,70-46,76	0(0)	1(50,0)	

Fonte: O autor (2011)

⁽¹⁾ Valores de referência de bugios (*Alouatta* sp.), saudáveis, em cativeiro no Criadouro de Animais Silvestres da Usina Hidrelétrica de Itaipu - Foz do Iguaçu - Paraná - Brasil (SANTOS, 1999).

⁽²⁾ Valores de referência de bugios-pretos (*Alouatta caraya*) de vida livre, adultos, aparentemente saudáveis, da região do Alto Rio Paraná - Paraná - Brasil (FLAIBAN *et al.*, 2008).

TABELA 5 – DADOS REFERENTES ÀS DOSAGENS BIOQUÍMICAS DOS MACACOS-PREGO (*Cebus apella*), POSITIVOS E NEGATIVOS PARA HEMOPLASMA. MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS VALORES, FAIXA DE VARIAÇÃO (VALOR MÁXIMO E MÍNIMO ENCONTRADO), NÚMERO DE RESULTADOS ABAIXO E ACIMA DA FAIXA DE REFERÊNCIA.

Variável	<i>Mycoplasma</i> spp.	Amostras analisadas /total de amostras	Média ±DP	Faixa de variação	Número (%) de resultados		Valores de referência ⁽¹⁾
					Diminuídos	Aumentados	
Glicose mg/dL	Positivo	1/2	152,60	152,60-152,60	0(0)	1(100,0)	97,99-151,79
	Negativo	5/9	81,00±25,60	41,12-108,00	4(80,0)	0(0)	
Proteínas plasmáticas g%	Positivo	2/2	8,50±0,71	8,00-9,00	0(0)	1(50,0)	7,2-8,7
	Negativo	7/9	8,33±0,43	7,60-8,80	0(0)	2(28,6)	
Proteínas totais g/dL	Positivo	1/2	7,15	7,15-7,15	0(0)	0(0)	6,24-8,50
	Negativo	5/9	7,21±0,51	6,77-8,02	0(0)	0(0)	
Albumina g/dL	Positivo	1/2	2,96	2,96-2,96	1(100,0)	0(0)	3,45-5,27
	Negativo	4/9	3,70±0,94	2,71-4,84	2(50,0)	0(0)	
Cálcio mg/dL	Positivo	1/2	7,26	7,26-7,26	0(0)	0(0)	6,76-9,12
	Negativo	3/9	8,91±0,42	8,42-9,18	0(0)	0(0)	
Ureia mg/dL	Positivo	1/2	30,74	30,74-30,74	0(0)	0(0)	15,63-45,75
	Negativo	5/9	32,78±10,77	14,32-41,47	1(20,0)	0(0)	

Fonte: O autor (2011)

⁽¹⁾ Valores de referência de macacos-prego (*Cebus apella*), saudáveis, em cativeiro no Criadouro de Animais Silvestres da Usina Hidrelétrica de Itaipu – Foz do Iguaçu – Paraná – Brasil (SANTOS, 1999).

TABELA 6 – AMOSTRAS COM RESULTADOS ABAIXO E ACIMA DOS RESPECTIVOS VALORES DE REFERÊNCIA, AGRUPANDO-SE AS 22 AMOSTRAS DE MACACOS COM RESULTADOS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA HEMOPLASMA.

(continua)

Variável	<i>Mycoplasma</i> spp.	Amostras analizadas /total de amostras	nº (%) de resultados diminuídos	p-valor	nº (%) de resultados aumentados	p-valor
Hemácias x10 ⁶ /mm ³	Positivo Negativo	10 9	3(30.0) 2(22.2)	1,0000	0(0) 1(11.1)	0,4737
Hematócrito %	Positivo Negativo	10 9	0(0) 0(0)	1,0000	3(30.0) 0(0)	0,2105
Hemoglobina g/dL	Positivo Negativo	10 8	0(0) 0(0)	1,0000	1(10.0) 0(0)	1,0000
VCM μ3	Positivo Negativo	10 9	0(0) 1(11.1)	0,4737	8(80.0) 2(22.2)	0,0230
HCM μg	Positivo Negativo	10 8	0(0) 1(12.5)	0,4444	7(70.0) 2(25.0)	0,0843
CHCM %	Positivo Negativo	10 8	2(20.0) 2(25.0)	1,0000	1(10.0) 0(0)	1,0000
Leucócitos x103/mm3	Positivo Negativo	10 9	1(10.0) 2(22.2)	0,5820	0(0) 1(11.1)	0,4737
Bastonetes %	Positivo Negativo	9 8	0(0) 0(0)	1,0000	0(0) 1(12.5)	0,4706
Bastonetes /mm3	Positivo Negativo	9 8	0(0) 0(0)	1,0000	1(11.1) 2(25.0)	0,5765
Segmentado s %	Positivo Negativo	9 8	3(33.3) 3(37.5)	1,0000	1(11.1) 2(25.0)	0,5765
Segmentado s /mm3	Positivo Negativo	9 8	2(22.2) 2(25.0)	1,0000	1(11.1) 0(0)	1,0000
Eosinófilos %	Positivo Negativo	9 8	0(0) 0(0)	1,0000	4(44.4) 2(25.0)	0,6199
Eosinófilos /mm3	Positivo Negativo	9 8	0(0) 0(0)	1,0000	4(44.4) 3(37.5)	1,0000

TABELA 6 – AMOSTRAS COM RESULTADOS ABAIXO E ACIMA DOS RESPECTIVOS VALORES DE REFERÊNCIA, AGRUPANDO-SE AS 22 AMOSTRAS DE MACACOS COM RESULTADOS POSITIVOS E NEGATIVOS PARA HEMOPLASMA.

(conclusão)

Variável	<i>Mycoplasma</i> spp.	Amostras analisadas /total de amostras	nº (%) de resultados diminuídos	p-valor	nº (%) de resultados aumentados	p-valor
Basófilos %	Positivo	9	0(0)	1,0000	2(22.2)	1,0000
	Negativo	8	0(0)		2(25.0)	
Basófilos /mm ³	Positivo	9	0(0)	1,0000	3(33.3)	0,6372
	Negativo	8	0(0)		4(50.0)	
Linfócitos %	Positivo	9	1(11.1)	1,0000	1(11.1)	0,5765
	Negativo	8	1(12.5)		2(25.0)	
Linfócitos /mm ³	Positivo	9	1(11.1)	1,0000	2(22.2)	1,0000
	Negativo	8	1(12.5)		1(12.5)	
Monócitos %	Positivo	9	0(0)	1,0000	6(66.6)	1,0000
	Negativo	8	0(0)		5(62.5)	
Monócitos /mm ³	Positivo	9	0(0)	1,0000	5(55.5)	0,6372
	Negativo	8	0(0)		3(37.5)	
Glicoses mg/dL	Positivo	8	4(50.0)	0,2821	2(25.0)	0,4667
	Negativo	7	6(85.7)		0(0)	
Proteínas plasmáticas g%	Positivo	9	0(0)	1,0000	5(55.5)	0,3348
	Negativo	9	1(11.1)		2(22.2)	
Proteínas totais g/dL	Positivo	8	1(12.5)	1,0000	3(37.5)	0,5692
	Negativo	7	0(0)		1(14.3)	
Albumina g/dL	Positivo	8	2(25.0)	1,0000	0(0)	1,0000
	Negativo	6	2(33.3)		0(0)	
Cálcio mg/dL	Positivo	6	2(33.3)	1,0000	1(16.6)	1,0000
	Negativo	5	1(20.0)		0(0)	
Ureia mg/dL	Positivo	5	0(0)	1,0000	3(60.0)	0,2222
	Negativo	7	1(14.3)		1(14.3)	

Fonte: O autor (2011)

Nota: VCM = Volume Corpuscular Médio.

HCM = Hemoglobina Corpuscular Média.

CHCM = Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média.

Comparando-se as medianas dos resultados das análises hematológicas e bioquímicas de cada espécie de primatas separadamente, entre os animais com PCR positiva e negativa para hemoplasma, só houve diferença significativa nas distribuições de dois parâmetros da espécie *Alouatta caraya*. A mediana dos valores absolutos de neutrófilos segmentados (segmentados/mm³) foi maior em *Alouatta*

caraya infectados ($p=0,0396$) e o valor absoluto de linfócitos (linfócitos/mm³) foi maior em *Alouatta caraya* não infectados ($p=0,0404$). De forma semelhante, gatos com resultados positivos para '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*', foram menos propensos a apresentar linfocitose do que os gatos com resultados negativos (SYKES *et al.*, 2007).

Não houve diferenças significativas entre os resultados dos exames dos *Cebus apella* infectados e não infectados.

Ao agrupar os resultados das duas espécies de macacos, observou-se que, estatisticamente, os animais infectados por hemoplasmas apresentaram aumento do volume corpuscular médio (VCM) ($pF=0,0230$) (Tabela 6). O VCM elevado também foi relatado em gatos infectados com *Mycoplasma haemofelis* (SYKES *et al.*, 2008; TASKER *et al.*, 2009) e com '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' (SYKES *et al.*, 2008; SYKES, 2010a), podendo estar relacionado com a presença de macrocitose devido a uma indução da reposição de eritrócitos.

Não houve diferença estatisticamente significativa dos parâmetros bioquímicos analisados (glicose, proteínas plasmáticas, proteínas totais, albumina, cálcio e ureia), entre os animais infectados e não infectados.

Alguns macacos-de-cheiro infectados por '*Candidatus Mycoplasma kahanei*' desenvolveram um quadro agudo com anemia moderada e as alterações observadas foram monocitose e eritrofagocitose. Isto ocorreu apenas após a remoção do baço e apesar da alta parasitemia, esses animais não apresentaram sinais clínicos de doença. Outros animais do grupo não manifestaram alterações e permaneceram com uma infecção latente mesmo após a esplenectomia, sugerindo que haja heterogeneidade na reatividade imune do hospedeiro frente à bactéria (CONTAMIN; MICHEL, 1999).

Certas espécies de hemoplasmas são conhecidas por causarem infecção crônica e assintomática em alguns animais e o desenvolvimento de um quadro anêmico parece estar condicionado a um estado de imunossupressão ou a presença de coinfeção (WILLI *et al.*, 2007a; SYKES, 2010a, 2010b; TASKER, 2010). A patogenicidade dessas espécies é controversa (SYKES, 2010b). Nesse sentido, é possível que diferentes cepas da mesma espécie tenham diferentes potenciais patogênicos (REYNOLDS; LAPPIN, 2007). Além disso, uma condição aguda depende da predisposição causada por fatores como idade e imunossupressão (TASKER, 2010).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em relação aos objetivos do referente trabalho, foi possível obter as seguintes conclusões:

- a) Observou-se a presença de micoplasmas hemotrópicos em extensões sanguíneas coradas de 5 (22,72%) das 22 amostras de primatas não humanos;
- b) Verificou-se a presença de micoplasmas hemotrópicos em 10 (45,45%) das 22 amostras primatas não humanos por técnicas moleculares;
- c) O sequenciamento das amostras revelou a presença da espécie '*Candidatus Mycoplasma kahanei*';
- d) Observou-se que os animais mais susceptíveis a infecção foram da espécie *Alouatta caraya* e os primatas não humanos de origem de vida livre ou capturado da natureza;
- e) Os macacos da espécie *Alouatta caraya* infectados com hemoplasmas apresentaram maiores valores absolutos de neutrófilos segmentados, enquanto que os não infectados tiveram maiores valores absolutos de linfócitos;
- f) Não houve diferenças significativas entre os resultados dos exames dos macacos da espécie *Cebus apella* infectados e não infectados;
- g) Ao agrupar os resultados das duas espécies de macacos, os animais infectados por hemoplasmas apresentaram aumento do volume corpuscular médio;
- h) Não houve diferença estatisticamente significativa de nenhum parâmetro bioquímico entre os animais infectados e não infectados.

Este é o primeiro estudo sobre a infecção por micoplasma hemotrópicos em primatas não humanos do gênero *Alouatta* e *Cebus* usando técnicas de PCR. Ademais, é a segunda vez que a espécie '*Candidatus Mycoplasma kahanei*' é relatada no mundo e mostra que ela é capaz de infectar macacos de outras espécies, além do *Saimiri sciureus*. Durante esse estudo também foi detectado '*Candidatus Mycoplasma kahanei*' em macacos da espécie *Ateles paniscus*, pertencentes ao Zoológico de São Paulo. Assim, a presença de hemoplasmas

filogeneticamente semelhantes em diferentes espécies de hospedeiros sugere possível transmissão interespecies (WILLI *et al.*, 2007a).

Como macacos podem ser hospedeiros de micoplasmas hemotrópicos ou serem afetados por eles (AIKAWA; NUSSENSWEIG, 1972; ADAMS; LEWIS; BULLOCK, 1984; DILLBERGER *et al.*, 1994; CONTAMIN; MICHEL, 1999; BARNAUD; MICHEL; CONTAMIN, 2001), estes agentes devem ser objetos de estudos em animais anêmicos ou imunossuprimidos.

Além disso, devido às semelhanças entre os seres humanos e os primatas não humanos (CASTRO, 2010) e a facilidade, já conhecida, de transmissão de micro-organismos entre esses dois mamíferos (BRASIL, 2005; VIRGINIA DEPARTMENT OF HEALTH, 2011), sugere-se a pesquisa de micoplasmas hemotrópicos em seres humanos e a investigação de infecções zoonóticas.

Em relação à transmissão, como já mencionado, estes animais são susceptíveis a micro-organismos veiculados por mosquitos e carrapatos (CATÃO-DIAS, 2001; BRASIL, 2005), artrópodes nos quais já foi detectado DNA de hemoplasmas (NEIMARK *et al.*, 2001, WILLI *et al.*, 2007a). Além disso, os macacos da espécie *Cebus apella*, assim como os *Alouatta caraya*, se alimentam ocasionalmente ou acidentalmente de artrópodes (SANTINI, 1983; NEVILLE *et al.*, 1988) e este fato deve ser investigado, já que existem relatos de contaminação por hemoplasma via oral (WILLI *et al.*, 2007a; HOELZLE, 2008; TASKER, 2010).

Além da necessidade de métodos de diagnósticos mais acessíveis e da padronização do tratamento, é imprescindível o estudo das formas de transmissão dos hemoplasmas para que métodos de prevenção possam ser estabelecidos. Os vetores devem ser melhor identificados e combatidos, assim como medidas de proteção individual devem ser adotadas, já que além da problemática envolvendo animais, existe a suspeita de que estes parasitas estejam relacionados a estados patológicos em seres humanos.

Maiores estudos sobre a patogenicidade dos hemoplasmas e suas diferentes espécies também são necessários, permitindo uma avaliação do prognóstico para determinado grupo de indivíduos e fornecendo medidas para assegurar a qualidade de vida dos mesmos.

Micoplasmas hemotrópicos já foram detectados em outras espécies em Foz do Iguaçu, como em um gato-maracajá de cativeiro (*Leopardus wiedii*) (GUIMARÃES, 2008), capivaras de vida livre e de cativeiro (*Hydrochaeris*

hydrochaeris) (VIEIRA *et al.*, 2009) e em cervídeos de cativeiro (*Blastocerus dichotomus*, *Mazama nana* e *Mazama americana*) (GRAZZIOTIN *et al.*, 2011). Também foi observado em um cão de companhia (CUBAS, Z.S. *et al.*, dados não publicados). Estes achados sugerem que os hemoplasmas possivelmente sejam endêmicos na região. Assim, a epidemiologia deste agente infeccioso precisa ser investigada.

O presente estudo deu origem a dois manuscritos a serem submetidos aos periódicos internacionais *Journal of Wildlife Diseases* e *Veterinary Microbiology*.

Os resultados e conclusões deste trabalho não representam a opinião da Usina Hidrelétrica de Itaipu.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M.R.; LEWIS, J.C.; BULLOCK, B.C. Hemobartonellosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) in a domestic breeding colony: case report and preliminary study. **Laboratory animal science**, n. 34, p. 82-85, 1984.
- AIKAWA, M.; NUSSENSWEIG, R. Fine structure of *Haemobartonella* sp. in the squirrel monkey. **The Journal of Parasitology**, v.58, n.3, p.628–630, 1972.
- AMARAL, P.J.S.; FINOTELO, L.F.M.; de OLIVEIRA, E.H.C.; PISSINATTI, A.; NAGAMACHI, C.Y.; PIECZARKA, J.C. Phylogenetic studies of the genus *Cebus* (Cebidae-Primates) using chromosome painting and G-banding. **BMC Evolutionary Biology**, v. 8, p.169, 2008.
- AURICCHIO, P. **Primatas do Brasil**. São Paulo: Terra Brasilis, 1995. 168 p.
- AUSTERMAN, J. W. Haemobartonellosis in a nonsplenectomized dog. **Veterinary Medicine & Small Animal Clinician**, n.74, p.954, 1979.
- AYRES, M.; AYRES-JUNIOR, M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S. **BioEstat: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas**. 5. ed. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, 2007. 364p.
- BARKER, E.N.; HELPS, C.R.; NEIMARK, H.; PETERS, I.R.; PETERS, W.; TASKER, S. A novel haemoplasma species identified in archived primate blood smears. **Veterinary Microbiology**, n. 149, p. 478-481, 2011.
- BARNAUD, A.; MICHEL, J.C; CONTAMIN, H. Hémobartonellose latente chez le singe écureuil (*Saimiri sciureus*), primate du Nouveau-Monde: étude menée au Centre de Primatologie de l'Institut Pasteur de la Guyane. **Revue de Médecine Vétérinaire**, n. 152, v. 12, p. 863-870, 2001.
- BIONDO, A.W.; SANTOS, A.P.; GUIMARAES, A.M.S.; VIEIRA, R.F.C.; VIDOTTO, O.; MACIEIRA, D.B.; ALMOSNY, N.R.P.; MOLENTO, M.B.; TIMENETSKY, J.; GONZÁLEZ, F.H.D.; MESSICK, J.B. A review of the occurrence of hemoplasmas (hemotropic mycoplasmas) in Brazil. **Revista brasileira de parasitologia veterinária**, v.18, n.3, p1-7, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância de epizootias em primatas não-humanos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 56 p.
- BROWN, A. D.; COLILLAS, O. J. Ecologia de *Cebus apella*. Anais do 1º Congresso Brasileiro de Primatologia, Belo Horizonte. 1983. In: MELLO M. T. de (ed.). **A Primatologia no Brasil**. Sociedade Brasileira de Primatologia, Belo Horizonte: Imprensa Universitária - Universidade Federal de Minas Gerais, 1984.
- CASTRO, P. Primatas como modelo experimental para vigilância em saúde, pesquisa e saúde pública. **Com Ciência: Revista Eletrônica de Jornalismo Científico**.

Disponível em: <<http://www.comciencia.br/comciencia/handler.php?section=8&edição=31&id=368>>. Acesso em: 05 out. 2010.

CATÃO-DIAS, J.L. Medicine. In: FOWLER, M.; CUBAS, Z.S. (Org). **Biology, Medicine and Surgery of South American Wild Animals**. 1. ed. Ames: Iowa State University Press, 2001. 536 p.

CONGBIN, Y.; AIBIN, L.; CONGLI, Y.; JUAN, X.; LANJUN, B.; WEIPING, Z.; ZHIBIAO, Y.; XIUGUO, H. Overexpression of complement receptor type I (CR1, CD35) on erythrocytes in patients with hemoplasma infection. **Microbiology and Immunology**, v.54, n.8, p.460-465, 2010.

CONTAMIN, H.; MICHEL, J. C. Haemobartonellosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*): antagonism between *Haemobartonella* sp. and experimental *Plasmodium falciparum* malaria. **Experimental Parasitology**, v. 91, n. 4, p. 297-305, 1999.

CUBILLA, M. P.; SANTOS, L.C. **Imagens digitais**. Foz do Iguaçu: Laboratório Ambiental, Itaipu Binacional, 2010.

de MORAES, W.; CUBILLA, M.P. **Primatas não humanos do Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional e Zoológico Roberto Ribas Lange**, Foz do Iguaçu: Refúgio Biológico Bela Vista, 2011.

DILLBERGER, J.E., LOUDY, D.E.; ADLER, R.R.; GASS, J.H. Hemobartonella-like parasites in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). **Veterinary Pathology**, v.31, p.301-307, 1994.

DOS SANTOS, A.P.; DOS SANTOS, R.P.; BIONDO, A.W.; DORA, J.M.; GOLDANI, L.Z.; DE OLIVEIRA, S.T.; GUIMARÃES, A.M. de S.; TIMENETSKY, J.; DE MORAES, H.A.; GONZÁLEZ, F.H.; MESSICK, J.B. Hemoplasma infection in HIV-positive patient, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, n.12, p. 1922-1924, 2008.

DUARTE, M. I.; OLIVEIRA, M. S.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; MARIANO, O. N.; TAKAKURA, C. F.; PAGLIARI, C.; CORBETT, C. E. *Haemobartonella*-like microorganism infection in AIDS patients: ultrastructural pathology. **The Journal of Infectious Diseases**, v.165, p.976-977, 1992.

FIRMINO, F. de P. **Estudo da infecção por hemoplasmas em felinos domésticos do Distrito Federal**. 2008. 67f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

FLAIBAN, K.K.M.C.; SPOHR, K.A.H.; MALANSKI, L.S.; SVOBODA, W.K.; SHIOZAWA, M.M.; HILST, C.L.S.; AGUIAR, L.M.; LUDWIG, G.; PASSOS, F.C.; NAVARRO, I.T.; LISBÔA, J.A.N.; BALARIN, M.R.S. Hematologic values of free-ranging black-and-gold howlers monkeys (*Alouatta caraya*) from the region of Upper Paraná River, Southern Brazil. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v.61, n.3, p.628-634, 2008.

FOLEY, J.E.; HARRUS, S.; POLAND, A.; CHOMEL, B.; PEDERSEN, N.C.

Molecular, clinical, and pathologic comparison of two distinct strains of *Haemobartonella felis* in domestic cats. **American Journal of Veterinary Research**, v.59, p.1581–1588, 1998.

FOLEY, J.E.; PEDERSEN, N.C. '*Candidatus* Mycoplasma haemominutum', a low-virulence epierthrocytic parasite of cats. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.815-817, 2001.

GRAZZIOTIN, A.L.; SANTOS, A.P.; GUIMARÃES, A.M.; MOHAMED, A.; CUBAS, Z. S.; OLIVEIRA, M.J.; SANTOS, L.C.; MORAES, W.; VIEIRA, R.F.; DONATTI, L.; BARROS FILHO, I.R.; BIONDO, A.W.; MESSICK, J.B. *Mycoplasma ovis* in captive cervids: prevalence, molecular characterization and phylogeny. **Veterinary Microbiology**, n.152, p.415-419, 2011.

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

GUIMARÃES, A.M.S. **Detecção de micoplasmas, bartonelas e vírus da leucemia felina em pequenos felídeos neotropicais mantidos em cativeiro no Refúgio Bela Vista, Foz do Iguaçu**. 129f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

HOELZLE, L.E. Haemotrophic mycoplasmas: Recent advances in *Mycoplasma suis*. **Veterinary Microbiology**, v. 130, p. 215-226, 2008.

HOLT, J.G., *et al.* (Ed). **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

HU, Z.; YIN, J.; SHEN, K.; KANG, W.; CHEN, Q. Outbreaks of hemotrophic mycoplasma infections in China. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 7, p.1139-1140, 2009.

HULME-MOIR, K.L.; BARKER, E.N.; STONELAKE, A.; HELPS, C.R.; TASKER, S. Use of real-time quantitative polymerase chain reaction to monitor antibiotic therapy in a dog with naturally acquired *Mycoplasma haemocanis* infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.22, p.582-587, 2010.

ITAIPU BINACIONAL. **Cultivando Água Boa**: biodiversidade, nosso patrimônio. Disponível em: <<http://www.cultivandoaguaboa.com.br/acao/nivel-1/biodiversidade-nosso-patrimonio>>. Acesso em: 15 out. 2011a.

ITAIPU BINACIONAL. **Laboratório ambiental**. Criado em: 05 abril 2010. Disponível em: <<http://www.itaipu.gov.br/meioambiente/laboratorio-ambiental>>. Acesso em: 25 set. 2011b.

ITAIPU BINACIONAL. **Refúgio Biológico Bela Vista**. Foz do Iguaçu, PR, 2011c. 1 folder.

ITAIPU BINACIONAL. **Relatório de sustentabilidade 2010**. Disponível em: < <http://>

[www.itaipu.gov.br / sites /default/files/2010_relatorio_sustentabilidade.pdf](http://www.itaipu.gov.br/sites/default/files/2010_relatorio_sustentabilidade.pdf)>. Acesso em: 15 out. 2011d.

ITAIPU BINACIONAL. **Reservas e refúgios**. Criado em: 05 abril 2010. Disponível em: <<http://www.itaipu.gov.br/meioambiente/reservas-e-refugios>>. Acesso em: 25 set. 2011e.

IUCN. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. **IUCN Red List of Threatened Species**. Versão 2011.2. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/>>. Acesso em: 22 dez. 2011.

JARACH, R.; RIBEIRO-DIAS, F. Mecanismos patogênicos de micoplasmas que podem desencadear ou exacerbar a artrite reumatóide. **Revista de Patologia Tropical**, v.33, n.2, p.149-168, jul-set, 2004.

JENSEN, W.A.; LAPPIN, M.R.; KAMKAR, S.; REAGAN, W.J. Use of a polymerase chain reaction assay to detect and differentiate two strains of *Haemobartonella felis* in naturally infected cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, p. 604-608, 2001.

KENNY, M.J.; SHAW, S.E.; BEUGNET, F.; TASKER, S. Demonstration of two distinct hemotropic mycoplasmas in French dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p.5397-5399, 2004.

MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. (Ed.). **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. 1. ed. Brasília: Ministério do Meio Ambiente; Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2008. v.2.

MESSICK, J. B. Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 33, n. 1, p. 2-13, 2004.

MESSICK, J.B. New perspectives about hemotropic mycoplasma (formerly, *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* species) infections in dogs and cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.33, p.1453–1465, 2003.

MESSICK, J.B.; BERENT, L.M.; EHRHART, E.J.; WASMER, C.C. Light and electron microscopic features of eperythrozoon-like parasites in a North American opossum (*Didelphis virginiana*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.31, n.2, p.240-243, 2000.

MESSICK, J.B.; WALKER, P.G.; RAPHEL, W.; BERENT, L.; SHI, X. '*Candidatus Mycoplasma haemodidelphis*' sp. nov., '*Candidatus Mycoplasma haemolamae*' sp. nov. and *Mycoplasma haemocanis* comb. nov., haemotropic parasites from a naturally infected opossum (*Didelphis virginiana*), alpaca (*Lama pacos*) and dog (*Canis familiaris*): phylogenetic and secondary structural relatedness of their 16S rRNA genes to other mycoplasmas. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.52, p.689-693, 2002.

MICHEL, J.C.; THOISY, B.; CONTAMIN, H. Chemotherapy of haemobartonellosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). **Journal of Medical Primatology**, v. 29, n.2, p.85–87, 2000.

MITTERMEIER, R.A; COIMBRA-FILHO, A.F.; VALLE, C.M.C. A conservação internacional de primatas, com ênfase nos primatas da Mata atlântica do Brasil, Anais do 1º Congresso Brasileiro de Primatologia, 1983. In: MELLO M. T. de (Ed.). **A Primatologia no Brasil**. Sociedade Brasileira de Primatologia, Belo Horizonte: Imprensa Universitaria - Universidade Federal de Minas Gerais, 1984.

MURRAY, R.G.E.; STACKEBRANDT, E. Taxonomic note: implementation of the provisional status *Candidatus* for incompletely described procaryotes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.45, p.186-187, 1995.

NATIONAL PRIMATE RESEARCH CENTER. University of Wisconsin-Madison. **Primate Info Net**. Última atualização: 18 novembro 2010. Disponível em:<<http://pin.primate.wisc.edu/factsheets>>. Acesso em: 10 mar. 2011.

NCBI TAXONOMY - National Center for Biotechnology Information. U.S. National Library of Medicine. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Tree&id=9479&lvl=3&p=mapview&p=has_linkout&p=blast_url&p=genome_blast&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>. Acesso em: 12 jan. 2012.

NEIMARK, H.; BARNAUD, A.; GOUNON, P.; MICHEL, J.C.; CONTAMIN, H. The putative haemobartonella that influences *Plasmodium falciparum* parasitaemia in squirrel monkeys is a haemotrophic mycoplasma. **Microbes Infection**, v.4, n.7, p.693-698, 2002a.

NEIMARK, H.; HOFF, B.; GANTER, M. *Mycoplasma ovis* comb. nov. (formerly *Eperythrozoon ovis*), an epierythrocytic agent of haemolytic anaemia in sheep and goats. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 54, p.365-371, 2004.

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**, v. 51, p. 891-899, 2001.

NEIMARK, H.; JOHANSSON, K-E; RIKIHISA, Y.; TULLY, J. G. Revision of haemotrophic *Mycoplasma* species names. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 683, 2002b.

NEIMARK, H.; KOCAN, K. M. The cell wall-less rickettsia *Eperythrozoon wenyonii* is a *Mycoplasma*. **FEMS Microbiology Letters**, n.156, p.287–291, 1997.

NEIMARK, H.; PETERS, W.; ROBINSON, B.L.; STEWART, L.B. Phylogenetic analysis and description of *Eperythrozoon coccoides*, proposal to transfer to the genus *Mycoplasma* as *Mycoplasma coccoides* comb. nov. and request for an

opinion. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p.1385-1391, 2005.

NEVILLE, M. K.; GLANDER, K.E.; BRAZA, F.; RYLANDS, A.B. The howling monkeys, Genus *Alouatta*, In: MITTERMEIER, R.A.; RYLANDS, A.B.; COIMBRA-FILHO, A.F.; FONSECA, G.A.B. da (Eds.). **Ecology and Behavior of Neotropical Primates**. V. 2. Contagem: Littera Maciel, 1988.

NORTH, D. C. Fatal haemobartonellosis in a non-splenectomized dog - a case report. **Journal of Small Animal Practice**, n.19, p.769-773, 1978.

OBARA, H.; FUJIHARA, M.; WATANABE, Y.; ONO, H.K.; HARASAWA, R.J. A feline hemoplasma, '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*', detected in dog in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 73, p. 841-843, 2011.

PETERS, W.; MOLYNEUX, D. H.; HOWELLS, R. E. *Eperythrozoon* and *Haemobartonella* in monkeys. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, n. 68, p. 47-50, 1974.

REYNOLDS, C.A.; LAPPIN, M.R. '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' infections in 21 client-owned cats. **Journal of the American Animal Hospital Association**., v. 43, p. 249-257, 2007.

RIKIHISA, Y.; KAWAHARA, M.; WEN, B.; KOCIBA, G.; FUERST, P.; KAWAMORI, F.; SUTO, C.; SHIBATA, S.; FUTOHASHI, M. Western immunoblot analysis of *Haemobartonella muris* and comparison of 16S rRNA gene sequences of *H. muris*, *H. felis*, and *Eperythrozoon suis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 823-829, 1997.

ROURA, X.; PETERS, I.R.; ALTET, L.; TABAR, M.D.; BARKER, E.N.; PLANELLAS, M.; HELPS, C.R.; FRANCINO, O.; SHAW, S.E.; TASKER, S. Prevalence of hemotropic mycoplasmas in healthy and unhealthy cats and dogs in Spain. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, p.270-274, 2010.

RYLANDS, A.B. Biology of the Cebidae. In: FOWLER, M.; CUBAS, Z. S. (Org). **Biology, Medicine and Surgery of South American Wild Animals**. 1. ed. Ames: Iowa State University Press, 2001. 536 p.

SANTINI, M. E. L. Observações sobre o comportamento social e reprodutivo do *Cebus apella* em cativeiro. Anais do 1º Congresso Brasileiro de Primatologia, Belo Horizonte. 1983. In: MELLO M. T. de (Ed.). **A Primatologia no Brasil**. Sociedade Brasileira de Primatologia, Belo Horizonte: Imprensa Universitaria - Universidade Federal de Minas Gerais, 1984.

SANTOS, A.P.; SANTOS, R.P.; BIONDO, A.W.; DORA, J.M.; GOLDANI, L.Z.; OLIVEIRA, S.T.; GUIMARÃES, A.M.S.; TIMENETSKY, J.; MORAES, H.A.; GONZÁLEZ, F.H.; MESSICK, J.B. Hemoplasma infection in HIV-positive patient, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, p. 1922-1924, 2008.

SANTOS, L. C. dos. **Laboratório Ambiental**. Cascavel: Edunioeste, 1999. 341 p.

SOARES, M. J; CUBILLA, M. P. **Imagens confocal**. Curitiba: Instituto Carlos Chagas, 2010.

STEER, J.A.; TASKER, S.; BARKER, E.N.; JENSEN, J.; MITCHELL, J.; STOCKI, T.; CHALKER, V.J.; HAMON, M. A novel hemotropic mycoplasma (hemoplasma) in a patient with hemolytic anemia and pyrexia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 53, p.147- 151, 2011.

SYKES, J. E. Feline hemotropic mycoplasmas. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 40, p.1157-1170, 2010a.

SYKES, J. E. Feline hemotropic mycoplasmas. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 20, p.62-69, 2010b.

SYKES, J.E.; BALL, L.M.; BAILIFF, N.L.; FRY, M.M. 'Candidatus Mycoplasma haematoparvum', a novel small haemotropic mycoplasma from a dog. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 27-30, 2005.

SYKES, J.E.; DRAZENOVICH, N.L.; BALL, L.M.; LEUTENEGGER, C.M. Use of conventional and real-time polymerase chain reaction to determine the epidemiology of hemoplasma infections in anemic and nonanemic cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, p. 685–693, 2007.

SYKES, J.E.; LINDSAY, L.L.; MAGGI, R.G.; BREITSCHWERDT, E.B. Human co-infection with *Bartonella henselae* and two hemotropic mycoplasma variants resembling *Mycoplasma ovis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 3782-3785, 2010.

SYKES, J.E.; TERRY, J.C.; LINDSAY, L.L.; OWENS, S.D. Prevalences of various hemoplasma species among cats in the United States with possible hemoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 232, p. 372-379, 2008.

TANAKA, H.; HALL, W.T.; SHEFFIELD, J.B.; MOORE, D.H. Fine structure of *Haemobartonella muris* as compared with *Eperythrozoon coccoides* and *Mycoplasma pulmonis*. **Journal of Bacteriology**, v.90, p.1735- 1749, 1965.

TASKER, S. Haemotropic mycoplasmas: what's their real significance in cats? **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 12, p.369-381, 2010.

TASKER, S.; PETERS, I.R.; MUMFORD, A.D.; DAY, M.J.; GRUFFYDD-JONES, T.J.; DAY, S.; PRETORIUS, A.M.; BIRTLES, R.J.; HELPS, C.R.; NEIMARK, H. Investigation of human haemotropic *Mycoplasma* infections using a novel generic haemoplasma qPCR assay on blood samples and blood smears. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, p. 1285-1292, 2010.

TASKER, S.; PETERS, I.R.; PAPASOULIOTIS, K.; CUE, S.M.; WILLI, B.; HOFMANN-LEHMANN, R.; GRUFFYDD-JONES, T.J.; KNOWLES, T.G.; DAY, M.J.; HELPS, C.R. Description of outcomes of experimental infection with feline

haemoplasmas: copy numbers, haematology, Coombs' testing and blood glucose concentrations. **Veterinary Microbiology**, v.139, p.323-332, 2009.

VASCONCELOS, P.F. da C. Febre amarela. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.2, p. 275-293, 2003.

VENABLE, J.H.; EWING, S.A. Fine-structure of *Haemobartonella canis* (Rickettsiales: Bartonellaceae) and its relation to the host erythrocyte. **The Journal of Parasitology**, v. 54, p. 259-268, 1968.

VIEIRA, R.F.; MOLENTO, M.B.; DOS SANTOS, L.C.; MORAES, W.; CUBAS, Z.S.; SANTOS, A.P.; GUIMARAES, A.M.; MOHAMED, A.; BARROS FILHO, I.R.; BIONDO, A.W.; MESSICK, J.B. Detection of a novel hemoplasma based on 16S rRNA gene DNA in captive and free-ranging capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*). **Veterinary Microbiology**, v.139, p.410-413, 2009.

VIRGINIA DEPARTMENT OF HEALTH. **Guidelines for investigating bites and other exposures from nonhuman primates**. Atualizado em: dez. 2011. Disponível em: <<http://www.vdh.state.va.us/epidemiology/DEE/otherzoonosis/documents/nonhumanprimate/Primate%20Guidelines.pdf>>. Acesso em: 19 dez. 2011.

VOLOKHOV, D.V.; NORRIS, T.; RIOS, C.; DAVIDSON, M.K.; MESSICK, J.B.; GULLAND, F.M.; CHIZHIKOV, V.E. Novel hemotrophic mycoplasma identified in naturally infected California sea lions (*Zalophus californianus*). **Veterinary Microbiology**, v. 149, p. 262-268, 2010.

WEISS, D.J.; WARDROP, K.J.(Ed.). **Schalm's Veterinary Hematology**. 6 ed. Ames: Blackwell Publishing, 2010.

WILLI, B.; BORETTI, F.S.; BAUMGARTNER, C.; TASKER, S.; WENGER, B.; CATTORI, V.; MELI, M.L.; REUSCH, C.E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Prevalence, risk factor analysis, and follow-up of infections caused by three feline hemoplasma species in cats in Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 961-969, 2006a.

WILLI, B.; BORETTI, F.S.; TASKER, S.; MELI, M.L.; WENGI, N.; REUSCH, C.E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. From *Haemobartonella* to hemoplasma: molecular methods provide new insights. **Veterinary Microbiology**, n. 125, p.197-209, 2007a.

WILLI, B.; FILONI, C.; CATAO-DIAS, J.L.; CATTORI, V.; MELI, M.L.; VARGAS, A.; MARTINEZ, F.; ROELKE, M.E.; RYSER-DEGIORGIS, M.P.; LEUTENEGGER, C.M.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Worldwide occurrence of feline hemoplasma infections in wild felid species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 1159–1166, 2007b.

WILLI, B.; TASKER, S.; BORETTI, F.S.; DOHERR, M.G.; CATTORI, V.; MELI, M.L.; LOBETTI, R.G.; MALIK, R.; REUSCH, C.E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Phylogenetic analysis of "*Candidatus Mycoplasma turicensis*" isolates from pet cats in the United Kingdom, Australia, and South Africa, with analysis of risk factors for

infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 12, p. 4430-4435, 2006b.

YUAN, C. L.; LIANG, A.B.; YAO, C.B.; YANG, Z.B.; ZHU, J.G.; CUI, L.; YU, F.; ZHU, N.Y.; YANG, X.W.; HUA, X.G. Prevalence of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) infection in swine and swine-farm workers in Shanghai, China. **American Journal of Veterinary Research**, v.70, p. 890-894, 2009.

ZACHARY, J. F.; BASGALL, E. J. Erythrocyte membrane alterations associated with the attachment and replication of *Eperythrozoon suis*: a light and electron microscopic study. **Veterinary Pathology**, v. 22, p. 164-170, 1985.

ZHUANG, Q.J.; ZHANG, H.J.; LIN, R.Q.; SUN, M.F.; LIANG, X.J.; QIN, X.W.; PU, W.J.; ZHU, X.Q. The occurrence of the feline "*Candidatus* *Mycoplasma haemominutum*" in dog in China confirmed by sequence-based analysis of ribosomal DNA. **Tropical Animal Health and Production**, v. 41, p. 689–692, 2009.

DOCUMENTOS CONSULTADOS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

_____. **NBR 6024:** Informação e documentação: numeração progressiva das seções de um documento: apresentação. Rio de Janeiro, 2003.

_____. **NBR 6027:** Informação e documentação: sumário: apresentação. Rio de Janeiro, 2003.

_____. **NBR 6028:** Informação e documentação: resumo: apresentação. Rio de Janeiro, 2003.

_____. **NBR 10520:** Informação e documentação: citações em documentos: apresentação. Rio de Janeiro, 2002.

_____. **NBR 14724:** Informação e documentação: trabalhos acadêmicos: apresentação. 3.ed. Rio de Janeiro, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Normas de apresentação tabular.** 3. ed. Rio de Janeiro, 1993.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (UFPR). Sistema de Bibliotecas. **Citações e Notas de Rodapé.** Curitiba: Ed. UFPR, 2007.

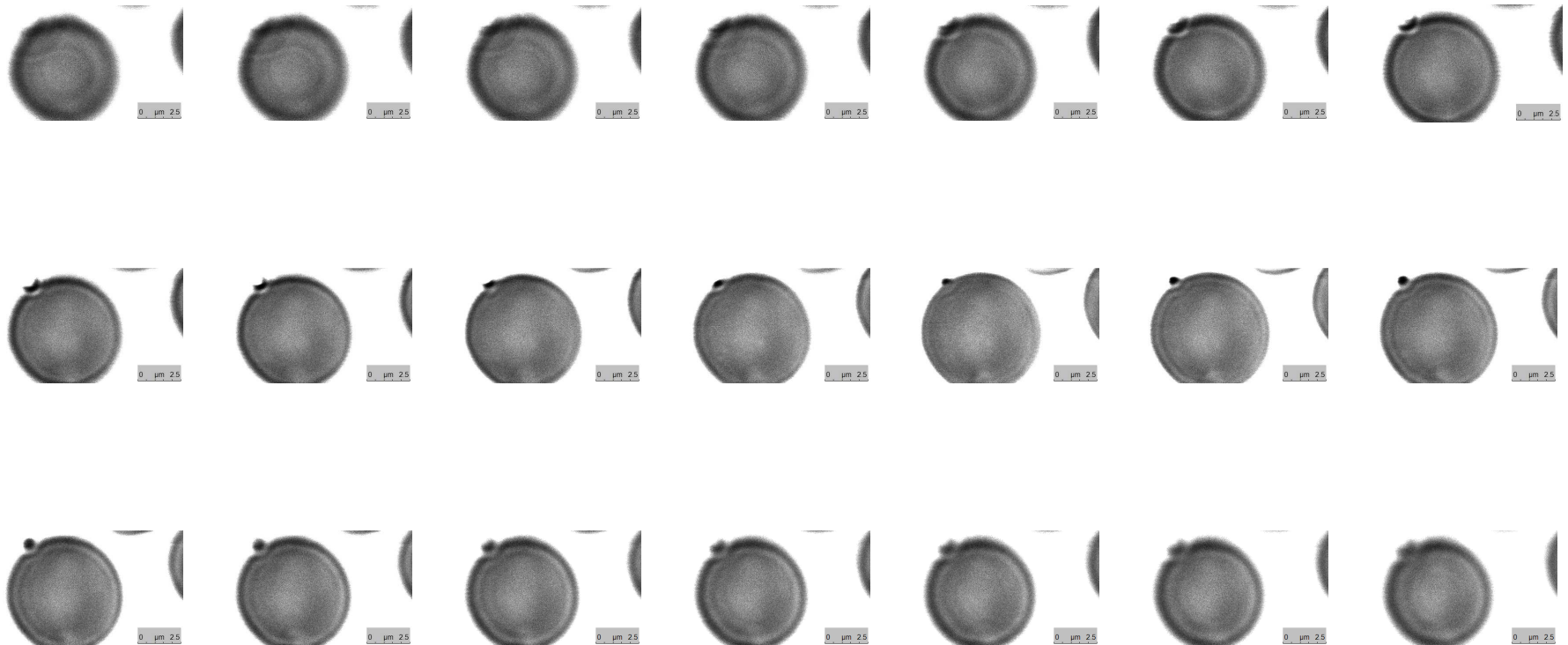
_____. **Referências.** Curitiba: Ed. UFPR, 2007.

_____. **Teses, dissertações, monografias e outros trabalhos acadêmicos.** Curitiba: Ed. UFPR, 2007.

APÊNDICE

APÊNDICE 1 - Sequência de imagens de microscopia confocal de eritrócitos de macaco-prego (*Cebus apella*) com estrutura compatível com micoplasma hemotrópico em depressão na membrana do eritrócito. Extensão sanguínea corada com May-grünwald-Giemsa. Imagem confocal Leica TCS SP5 (100.0x1.40 óleo) 71

APÊNDICE 1 - Sequência de imagens de microscopia confocal de eritrócitos de macaco-prego (*Cebus apella*) com estrutura compatível com micoplasma hemotrópico em depressão na membrana do eritrócito. Extensão sanguínea corada com May-grünwald-Giemsa. Imagem confocal Leica TCS SP5 (100.0x1.40 óleo)



ANEXOS

ANEXO 1 - Autorização da Hidrelétrica de Itaipu para realização da pesquisa.....	73
ANEXO 2 - Consulta realizada ao IBAMA	76
ANEXO 3 - Autorização do Comitê de ética	78

ANEXO 1 – Autorização da Hidrelétrica de Itaipu para realização da pesquisa



E/CD/017440/11
Usina Hidrelétrica de Itaipu,
19 de maio de 2011

Usina Hidrelétrica de Itaipu - Brasil
Avenida Tancredo Neves, 6731
85866-900 Foz do Iguaçu, PR
Telefone: + 55 (45) 3520-5505
Fax: + 55 (45) 3520-5346

Asunción - Paraguay
Calle de la Residenta, 1075
CC-6919-ASU Asunción, Paraguay
Teléfono: +595 (21) 248-1000
Fax: +595 (21) 248-1669

www.itaipu.gov.br

Senhor ALEXANDER WELKER BIONDO
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular E Molecular
Departamento de Medicina Veterinária ▢ Setor de Ciências Agrárias
Universidade Federal do Paraná - UFPR
Rua dos Funcionários, 1540
Curitiba, PR

PROJETO DE PESQUISA - MICHELE PIRES CUBILLA

Prezado senhor,

Em atenção à correspondência enviada em 26.04.2011 pela Sra. Michelle Pires Cubilla, solicitando autorização para a utilização de sangue de macacos para a realização de projeto de pesquisa intitulado "Estudo da Ocorrência de Micoplasmas Hemotrópicos em Primatas Não-Humanos", sob é com satisfação que informamos que será possível atender esta importante iniciativa de pesquisa.

Esclarecemos que esta parceria está sujeita aos seguintes compromissos a serem cumpridos pela Universidade Federal do Paraná:

- I. Apresentar previamente à ITAIPU seguro de vida da pesquisadora para o período em que estiver desenvolvendo atividades de pesquisa nas dependências da ITAIPU Binacional.
- II. Arcar com os custos decorrentes do deslocamento, estadia, alimentação e outras despesas pessoais da pesquisadora.
- III. Redigir relatórios para a ITAIPU, não só no final, mas também durante a execução do projeto.
- IV. Incluir na dissertação a seguinte citação: "O resultado deste trabalho não reflete a opinião da ITAIPU".
- V. Apresentar à ITAIPU uma cópia do documento científico antes da divulgação (p.ex., entrega de monografia à banca examinadora ou submissão de artigo a



E/CD/017440/11

Usina Hidrelétrica de Itaipu,
19 de maio de 2011

Usina Hidrelétrica de Itaipu - Brasil
Avenida Tancredo Neves, 6731
85866-900 Foz do Iguaçu, PR
Telefone: + 55 (45) 3520-5505
Fax: + 55 (45) 3520-5346

Asunción - Paraguay
Calle de la Residenta, 1075
CC-6919-ASU Asunción, Paraguay
Teléfono: +595 (21) 248-1000
Fax: +595 (21) 248-1669
www.itaipu.gov.br

revista científica), com antecedência de pelo menos duas semanas.

VI. A redação de artigos científicos deverá ser feita de forma consensual entre a Universidade Federal do Paraná e a ITAIPU Binacional.

VII. A ITAIPU deve ser citada em todas as publicações e apresentações relativas a este projeto e devem constar como co-autores os empregados que prestaram contribuição científica relevante para a pesquisa.

Para esclarecimentos e planejamento das atividades, pedimos que entre em contato com o médico veterinário ZALMIR SILVINO CUBAS, indicado como supervisor deste projeto, pelo telefone (45) 3520-5616 ou pelo e-mail zalmir@itaipu.gov.br

Atenciosamente,



Nelton Miguel Friedrich
Diretor de Coordenação

CENTRO DE ESTUDOS E PESQUISAS - LABORATÓRIO AMBIENTAL
Registro no CRF-9 nº 8282

Av. Tancredo Neves, 6731 CEP 85866-900, Fone: (45) 3520-5252 Foz do Iguaçu - PR

DECLARAÇÃO

Eu, LEONILDA CORREIA DOS SANTOS, CRF-9 nº 1773, Responsável Técnica pelo Laboratório Ambiental da Itaipu Binacional, declaro para os devidos fins, que a farmacêutica bioquímica MICHELLE PIRES CUBILLA, Mestranda no Curso de Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, da UFPR, com o projeto intitulado "Estudo da Ocorrência de Micoplasmas Hemotrópicos em Primatas Não-Humanos"; utilizará para a execução do referido projeto, amostras provenientes de resíduos de laboratório que foram coletadas para controles anuais de manutenção da sanidade animal perante o IBAMA. Informo que as amostras são provenientes de animais do Criadouro de Animais Silvestres da Itaipu Binacional (Registro no IBAMA nº 1286483) e do Zoológico Roberto Ribas Lange (Registro no IBAMA nº 598835).

Foz do Iguaçu, 15 de dezembro de 2010.

Leonilda C. dos Santos
Div. Ecossistema Terrestre
Itaipu Binacional



Leonilda Correia dos Santos
CRF-PR nº 1773
Fone (45)3520-6920
e.mail: leonilda@itaipu.gov.br

ANEXO 2 – Consulta realizada ao IBAMA



Mic Pires <micpires@gmail.com>

IBAMA - Serviços On-line

Atendimento Sisbio <atendimento.sisbio@icmbio.gov.br>**28 de abril de 2011 10:45**

Para: "Michelle P. Cubilla" <micpires@gmail.com>

Prezada Michelle,

A coleta/transporte de material microbiológico prescinde de autorização quando realizada fora de unidade de conservação federal, conforme art. 10 da IN 154/07 (disponível em www.icmbio.gov.br/sisbio - menu legislação). É suficiente uma carta de doação da sobra do sangue de macaco da pessoa detentora deste material, mencionando a origem (autorização do Sisbio ou do próprio zoológico) do material.

Cordialmente,

Helena K. Boscolo

 Coordenação do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (Sisbio)
 Inovação na Gestão Pública

 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
 Diretoria de Conservação da Biodiversidade
 Coordenação Geral de Pesquisa
www.icmbio.gov.br/sisbio

Antes de imprimir esta mensagem, avalie a real necessidade. Pense no seu compromisso com o meio ambiente e nos custos envolvidos.
 Reduza, Reúse, Recicle!

Em 28 de abril de 2011 10:36, Michelle P. Cubilla <micpires@gmail.com> escreveu:

Bom dia,

Sou aluna de mestrado da UFPR e gostaria de saber se é necessário autorização do IBAMA para a pesquisa de micro-organismos (bactérias) em resíduos de sangue que sobraram de outras análises laboratoriais realizadas para profilaxia e controle de sanidade de macacos de zoológicos. Caso seja necessário, como devo cadastrar?

 Atenciosamente,
 Michelle Pires.

----- Mensagem encaminhada -----

De: IBAMA/SAC Cadastro Técnico Federal <ctf.formulario.sede@ibama.gov.br>

Data: 28 de abril de 2011 10:14

Assunto: IBAMA - Serviços On-line

Para: micpires@gmail.com

Prezado(a) senhor(a),

A(s) solicitação(ões) nº930305 do tipo "SISBIO" teve a seguinte resposta:
 O Sisbio está sob a gestão do ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Favor encaminhar a sua dúvida para o seguinte endereço: atendimento.sisbio@icmbio.gov.br

Cordialmente,

Rayldo Simeão dos Reis

Coordenação do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (Sisbio)
Inovação na Gestão Pública

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
Diretoria de Conservação da Biodiversidade
Coordenação Geral de Pesquisa
www.icmbio.gov.br/sisbio

Por favor, não responda a esta mensagem. Caso necessite entrar em contato conosco novamente, ligue para [\(61\) 3316-1677](tel:(61)3316-1677) ou utilize o Formulário de Solicitação de Auxílio dos Serviços On-Line do Ibama no link abaixo:

Formulário de Solicitação de Auxílio

Atenciosamente,
Central de Serviços
IBAMA

ANEXO 3 – Autorização do Comitê de ética



Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Agrárias
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA SCA

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo no. 002/2011, referente ao projeto “Estudo da ocorrência de micoplasma hemotrópico em primatas não-humanos”, sob a responsabilidade de Michelle Pires Cubilla, na forma que foi apresentado, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias, em reunião realizada dia 29 de junho de 2011.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 002/2011, regarding the project “Estudo da ocorrência de micoplasma hemotrópico em primatas não-humanos”, in charge of Michelle Pires Cubilla, in the terms it was presented, was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Universidade Federal do Paraná (Federal University of the State of Paraná, Southern Brazil) during session on June, 2011.

Curitiba, 29 de junho de 2011.

Geraldo Camilo Alberton
Presidente

Patrick Schmidt
Vice-Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais
Setor de Ciências Agrárias
Universidade Federal do Paraná