

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DIAGNÓSTICO DE HEMOPARASITAS EM FELÍDEOS
NEOTROPICAIS PROVENIENTES DE VIDA LIVRE NO BRASIL

BETINA METZGER

Botucatu – SP
2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DIAGNÓSTICO DE HEMOPARASITAS EM FELÍDEOS
NEOTROPICAIS PROVENIENTES DE VIDA LIVRE NO BRASIL

BETINA METZGER

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção do
título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Lucia Helena
O'Dwyer De Oliveira

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Nome do autor: Betina Metzger

Título: Diagnóstico de hemoparasitas em felídeos neotropicais provenientes de vida livre no Brasil.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Lucia Helena O`Dwyer de Oliveira
Presidente e Orientadora
Departamento de Parasitologia
Instituto de Biociências – IB – UNESP - Botucatu

Prof. Dr. Alessandro Francisco Talamini do Amarante
Membro
Departamento de Parasitologia
Instituto de Biociências – IB – UNESP - Botucatu

Profa. Dra. Katia Denise Saraiva Bresciani
Membro
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal
Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária – UNESP - Araçatuba

Data da Defesa: 20 de janeiro de 2009

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Sonia Creimer e Henrique

Metzger (in memoriam):

Pelo amor incondicional e apoio irrestrito que foram fundamentais na minha formação e na realização de tantos sonhos, como este!!!

Ao meu irmão Roniel Creimer Metzger

Pelo apoio fundamental e enorme carinho, sem os quais eu não teria chegado até aqui!

“Procure ser uma pessoa de valor, em vez de procurar ser uma pessoa de sucesso

O sucesso é consequência”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo e de todos, agradeço a D"us, por sempre me ajudar quando mais preciso e pela benção de ter uma família maravilhosa e amigos (as) excepcionais

Ao meu pai, pelo amor incondicional, pelo apoio – novamente incondicional – em todos os sonhos e desejos que tive, pela minha formação como ser humano e como profissional, por sempre ter confiado, acreditado e me compreendido. Um pai e amigo maravilhoso, um ser humano fantástico e incomum... e que faz muita falta a todos que tiveram a sorte de conhecê-lo!

À minha mãe, pelo apoio incondicional para que eu realizasse essa conquista, pelo enorme amor demonstrado, especialmente nestes últimos anos, pela confiança, por me encorajar nos momentos que fraquejei, por ser uma mãe maravilhosa e carinhosa, grande amiga e companheira, um exemplo de mulher e pessoa, guerreira, batalhadora, extremamente forte e otimista, enfim, por estar ao meu lado, acreditando e apoiando como mãe, melhor amiga e companheira!!!

Ao meu irmão Roniel, pelo seu fundamental apoio, sem o qual eu também não poderia estar realizando essa conquista e nem teria me tornado veterinária! Pelo grande apoio e carinho demonstrado em tantos outros importantes momentos de minha vida, por me encorajar, me escutar toda vez que preciso, tentar me compreender, dar bons conselhos. Finalmente, por ser um irmão e ser humano absolutamente encantador, com seu excelente humor, enorme otimismo e bondade... quem o conhece quer sempre tê-lo ao lado!

Ao meu irmão Ariel pelo grande apoio dado, especialmente no início deste estudo, quando nem sabia direito o que eu estava fazendo, por ser esse irmão que encanta a todos com seu jeito de menino alegre e inocente!

Ao meu irmão Daniel, um homem observador, de bem poucas e sábias palavras, pelo carinho e preocupação sempre demonstrados!

Ao meu irmão Michel, um homem que demonstra tranqüilidade no olhar e que sempre tem algo interessante a ensinar, pelo carinho e preocupação, além dos sábios conselhos!

Ao meu noivo João Paulo, pelo grande amor e carinho sempre demonstrados, pela enorme ajuda e apoio fundamentais durante essa fase e na compilação deste manuscrito, por ser um homem com tantas qualidades que eu admiro e amo tanto!

À minha orientadora Lucia, por ter me acolhido e acreditado em mim assim que me conheceu, por todos os conhecimentos transmitidos que, juntamente com os questionamentos e correções foram fundamentais para a realização deste estudo, pela dedicação, compreensão, apoio e carinho!

Ao professor e amigo Tadeu Gomes de Oliveira, por ter me estendido a mão em um momento crucial de minha vida, pelo convite em participar do "Projeto Gatos do Mato-Brasil" , pelo apoio fundamental para que esse estudo se realizasse e pela enorme ajuda na coleta de material biológico.

Ao professor João Pessoa Araújo Junior, por ter me acolhido em seu laboratório sem ao menos me conhecer, por ter acreditado e confiado em mim, por permitir o uso de seu laboratório, por sempre ter se disponibilizado quando tive dúvidas ou queria sugestões a respeito do estudo.

À professora Débora pelo auxílio na clonagem e pelos conhecimentos transmitidos, por sempre ter se disponibilizado a ajudar com um sorriso no rosto.

Ao professor Paulo Ribolla por permitir o uso de seu laboratório e por sempre ter se disponibilizado quando tive dúvidas a respeito do estudo.

À professora Teresa Cristina por permitir o uso de seu laboratório e equipamentos.

Ao professor Reinaldo, por ceder o analisador de imagens no início deste estudo e por sempre ter se disponibilizado quando tive dúvidas a respeito do estudo, com um sorriso no rosto.

À todos os outros docentes do Departamento de Parasitologia do IB, que sempre foram muito cordiais e simpáticos comigo!

À Cristiane Pereira, sua grande ajuda na coleta de material biológico foi absolutamente fundamental para a realização deste trabalho, pela fiel e preciosa amizade, pelos sábios conselhos e sugestões, inclusive para este estudo.

À querida amiga Karina Paduan dos Santos, seu enorme apoio e ajuda no laboratório foram extremamente fundamentais para a realização deste estudo, por todos os ensinamentos transmitidos de biologia molecular, pelas diversas sugestões e correções neste trabalho, pelo carinho e enorme paciência, por ser exemplo de dedicação e perseverança!

Ao querido amigo Thiago Batista pelos ensinamentos e enorme ajuda no laboratório de Virologia e Microbiologia (quando nem ao menos pipetar eu sabia direito) que foram absolutamente essenciais na realização deste trabalho, por todas as sugestões neste estudo, pelos conselhos profissionais, pelo carinho e gigantesca paciência, por ser um profissional admirável e amigo muito especial!

Ao amigo Adriano pela ajuda no laboratório, pelos conhecimentos transmitidos, pela paciência e amizade.

À grande amiga Karina Rodrigues dos Santos, sua ajuda foi essencial para que essa conquista se realizasse, por ter me apresentado à Lúcia, pelo enorme apoio e carinho demonstrados em diversos momentos, por ser essa pessoa e amiga tão especial e encantadora....., como sempre digo, o meu anjo na Unesp!

Aos muito amigos, muito queridos e também anjos na minha vida Thiago e Audrey, pelo enorme carinho, paciência, excelente humor e otimismo, fundamentais para que eu realizasse este estudo com muito mais alegria e tranquilidade, por terem me encorajado todas as vezes que eu precisei, por sempre terem me escutado com uma surpreendente paciência, pelos bons conselhos, por tentarem me tranquilizar toda vez que estava nervosa, pela preciosa e fiel amizade, por estarem ao meu lado...sempre!

À querida amiga Mariana, pelo enorme carinho e por viajar diversas vezes que percebeu minha necessidade de um colo amigo, sempre disposta a me escutar e apoiar, com sua alegria e bom humor contagiantes!

Às queridas amigas Ana Paula e Cátia, pelo grande carinho, pelas conversas e conselhos tão sábios e importantes e pelos diversos momentos de alegria e descontração!

Às queridas amigas Bruna, Bianca, Tati, Denise e Kátia pelos diversos momentos de descontração e alegria.

Aos técnicos Valdir, Bicho e Márcia por serem tão prestativos e pela contagiante alegria e bom humor, fundamentais em um ambiente de trabalho.

À Nilza, por ser tão prestativa toda vez que precisei.

À Sassa pelas conversas acolhedoras e pelo carinho demonstrado.

À Maria, Denise e José, sempre muito prestativos e atenciosos em tudo que precisei.

À Fapesp pelo apoio tão fundamental para a realização desse estudo e ao pessoal de apoio, localizado na Biblioteca, por toda a atenção e ajuda.

Ao pessoal da biblioteca, sempre tão atenciosos e prestativos.

A todas as outras pessoas, não menos importantes, que passaram por minha vida deixando um pouco de si e levando um pouco de mim.

Enfim, aos meus queridos gatos, Mel (in memorian), Felix e Talita, companheiros inestimáveis e adoráveis!

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Uso de puçá em exemplar de *Leopardus pardalis* fêmea localizada no Centro de Triagem de Animais Silvestres do IBAMA (CETAS/IBAMA) em São Luis, MA (fonte: Betina Metzger)..... 32
- FIGURA 2. Uso de cambão em exemplar de *Leopardus pardalis* fêmea localizada no Centro de Triagem de Animais Silvestres do IBAMA (CETAS/IBAMA) em São Luis, MA) (fonte: Betina Metzger)..... 33
- FIGURA 3. Uso de cambão em exemplar de *Leopardus pardalis* macho localizado no Centro de Triagem de Animais Silvestres do IBAMA (CETAS/IBAMA) em São Luis, MA) (fonte: Betina Metzger)..... 33
- FIGURA 4. Uso de caixa de contenção em exemplar de *Puma yagouaroundi* macho, um pouco antes do animal ser anestesiado, Zoológico Sargento Prata, Fortaleza, CE (fonte: Betina Metzger)..... 33
- FIGURA 5. Exemplar de *Leopardus tigrinus* adulto macho, logo após contenção química, no Zoológico Sargento Prata, Fortaleza, Ceará (fonte: Betina Metzger)..... 34
- FIGURA 6. Procedimento de venopunção da braquiocefálica de um exemplar de *Leopardus pardalis* localizado no Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS/IBAMA) em São Luis (MA) (fonte: Cristiane Pereira)..... 35
- FIGURA 7. Procedimento de coleta de gota de sangue capilar, para realização de esfregaço sanguíneo de ponta de orelha, em exemplar de *Puma yagouaroundi* localizado no Zoológico Sargento Prata, Fortaleza, CE (fonte: Cristiane Pereira)..... 36
- FIGURA 8. Exemplar de *Leopardus pardalis* fêmea em seu recinto, no Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS/IBAMA), São Luis (MA), após completa recuperação anestésica (fonte: Betina Metzger)..... 36
- FIGURA 9. Figura ilustrativa da ação das enzimas de restrição *Hae III* e *Eco RI* sobre os produtos amplificados de *Mycoplasma haemofelis* e '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' (fonte: Dr. Thiago Neves Batista)..... 42
- FIGURA 10. Exemplar de *Puma yagouaroundi* fêmea apresentando rarefação pilosa em grandes extensões do corpo. Animal localizado no Zoológico Sargento Prata em Fortaleza, Ceará (fonte: Betina Metzger)..... 51
- FIGURA 11. Exemplar de *Puma yagouaroundi* fêmea apresentando rarefação pilosa em grandes extensões do corpo com intensa infestação de pulgas. Animal proveniente do Zoológico Sargento Prata, Fortaleza, CE (fonte: Betina Metzger)..... 52
- FIGURA 12. Gamonte de *Hepatozoon* sp. em neutrófilo de um exemplar fêmea de

- Leopardus pardalis* (proveniente do Maranhão), visualizado em esfregaço sanguíneo corado por Giemsa a 10% (fonte: Betina Metzger)..... 52
- FIGURA 13. Aspecto microscópico de diversas inclusões eritrocitárias de piroplasmas (indicados pelas setas) em esfregaço sanguíneo, corado por Giemsa a 10% (aumento de 1000X), de um exemplar de *Puma concolor* juvenil, macho, recém capturado da natureza, proveniente de Minas Gerais (fonte: Betina Metzger)..... 53
- FIGURA 14. Visualização da amplificação dos produtos da PCR do fragmento do gene 18S rRNA de *Hepatozoon* sp., após eletroforese em gel de agarose. Colunas 1, 2, 3, 5 são positivas para *Hepatozoon* sp. Coluna 4 é uma amplificação negativa. PO é o controle positivo de *Hepatozoon* sp. NO é o controle negativo da reação. PM é o marcador de peso molecular (de 250 pares de base) (Invitrogen®)..... 54
- FIGURA 15. Visualização da amplificação dos produtos da PCR dos fragmentos do gene 18S rRNA de *Cytauxzoon* sp., *Babesia canis rossi* e *Babesia canis vogeli*, após eletroforese em gel de agarose. Coluna 1 é positiva para *Cytauxzoon* sp., colunas 2 e 3 são controles positivos respectivamente para *Babesia canis rossi* e *Babesia canis vogeli*. PM é o marcador de peso molecular, de 100 pares de base (Amersham, Biosciences®). NO é o controle negativo da reação..... 56
- FIGURA 16. Visualização da amplificação dos produtos da PCR dos fragmentos do gene 16S rRNA de hemoplasmas felinos após eletroforese em gel de agarose. Coluna de 1 a 4 são amplificações positivas para hemoplasmas felinos. PO é o controle positivo. NO é o controle negativo da reação. PM é o marcador de peso molecular, de 100 pares de base..... 57
- FIGURA 17. Foto do gel de agarose a 1,5% visualizado em transluminador ultra-violeta após a realização da RFLP- PCR nas sete amostras positivas para hemoplasmoses felina..... 58
- FIGURA 18. Visualização da amplificação dos produtos da NESTED- PCR da amostra referente a um exemplar de *Leopardus pardalis* após eletroforese em gel de agarose. Coluna 1 é uma amplificação de *Mycoplasma haemofelis*, coluna 2 é uma amplificação de 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' e coluna 3 é uma amplificação negativa de 'Candidatus Mycoplasma turicensis'. PO é o controle positivo de *Mycoplasma haemofelis*. NO₁, NO₂ e NO₃ são controles negativos de *Mycoplasma haemofelis*, 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' e 'Candidatus Mycoplasma turicensis', respectivamente. PM é o marcador de peso molecular, de 100 pares de base..... 59
- FIGURA 19. Relação filogenética dos isolados de *Hepatozoon* spp. detectados em felídeos neotropicais do Brasil, baseada nas variações da seqüência de

DNA do gene 18S rRNA. Filograma obtido usando o método de Kimura- NJ com 14 espécies/isolados de *Hepatozoon*. *Babesia rhodaini* foi escolhida como grupo externo. Os números ao lado dos “nodos” indicam índice de consistência dos ramos (“bootstrap”)..... 61

FIGURA 20. Relação filogenética do isolado de *Cytauxzoon felis* detectado em um exemplar juvenil macho de *Puma concolor*, proveniente de Minas Gerais, baseada nas variações da seqüência de DNA do gene 18S rRNA. Filograma obtido usando o método de Kimura- NJ com seis espécies/isolados de *Cytauxzoon* e três de *Babesia*. Os números ao lado dos “nodos” indicam índice de consistência dos ramos (“bootstrap”).....

62

FIGURA 21. Relação filogenética dos isolados de *Mycoplasma haemofelis* e ‘*Candidatus* *Mycoplasma haemominutum*’ detectados em felídeos neotropicais do Brasil, baseada nas variações da seqüência de DNA do gene 16S rRNA. Filograma obtido usando o método de Kimura- NJ com quatro isolados de *Mycoplasma haemofelis*, um de ‘*Candidatus* *Mycoplasma turicensis*’ e cinco de ‘*Candidatus* *Mycoplasma haemominutum*’, provenientes de gatos domésticos (*Felis catus*) e de diferentes espécies de felídeos neotropicais no Brasil. Os números ao lado dos “nodos” indicam índice de consistência dos ramos (“bootstrap”). MA= Maranhão..... 64

FIGURA 22. Infecções únicas e co-infecções entre os diferentes hemoparasitas encontrados em felídeos neotropicais nascidos em vida livre. Os números nos quadrados brancos representam o número de exemplares com infecções únicas para o hemoparasita indicado no respectivo círculo. Os números existentes nas interseções representam a quantidade de animais que tiveram co-infecções pelos hemoparasitas indicados nos círculos vizinhos. Somando-se o número total em cada círculo obtem-se a quantidade de felídeos diagnosticados positivos para o hemoparasita indicado no respectivo círculo 65

FIGURA 23. Representação das espécies de felídeos diagnosticadas positivas, para pelo menos um hemoparasito no grupo estudado. O eixo x representa as espécies de felídeos neotropicais que foram encontradas positivas para pelo menos um hemoparasito (Lp: *Leopardus pardalis*, Py: *Puma yagourandi*, Lw: *Leopardus wiedii*, Lt: *Leopardus tigrinus*, Pc: *Puma concolor*). O eixo y indica o número de animais positivos..... 68

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------|--|----|
| TABELA 1. | Lista dos felídeos neotropicais utilizados para a coleta de material biológico e diagnóstico de hemoparasitas. Os animais estão listados de acordo com a respectiva espécie, sexo, idade estimada, origem (Estado) e procedência (nascido em vida livre ou em cativeiro)..... | 31 |
| TABELA 2. | Espécies de piroplasmas, com seus respectivos números de acesso no GenBank, que foram utilizadas para o alinhamento, sendo este uma das etapas para a construção de oligonucleotídeos iniciadores que amplificam fragmentos da região do gene 18S r RNA, respectivos às sequências conservadas de <i>Babesia</i> spp., <i>Cytauxzoon</i> spp. e <i>Theileria</i> sp..... | 39 |
| TABELA 3. | Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores HBT-F e HBT-R..... | 40 |
| TABELA 4. | Seqüência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados na primeira fase da reação de Nested-PCR para hemoplasmas felinos..... | 43 |
| TABELA 5. | Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na Nested-PCR..... | 44 |
| TABELA 6. | Espécies de protozoários utilizados para construção da árvore filogenética de <i>Hepatozoon</i> spp. e seus respectivos números de acesso no GenBank..... | 47 |
| TABELA 7. | Espécies de protozoários utilizados para construção da árvore filogenética de <i>Cytauxzoon felis</i> e seus respectivos números de acesso no GenBank..... | 48 |
| TABELA 8. | Espécies de protozoários utilizados para construção da árvore filogenética de hemoplasmas felinos e seus respectivos números de acesso no GenBank..... | 48 |
| TABELA 9. | Ocorrência de hemoparasitas em felídeos neotropicais nascidos em vida livre, diagnosticados pela utilização de técnicas moleculares e pela técnica da visualização em esfregaço sanguíneo. Os animais estão listados em relação à espécie, sexo, idade estimada e origem..... | 55 |
| TABELA 10. | Freqüência de felídeos neotropicais infectados para pelo menos um hemoparasita, divididos de acordo com o sexo..... | 66 |
| TABELA 11. | Freqüência de felídeos neotropicais infectados para pelo menos um hemoplasma felino, divididos de acordo com o sexo..... | 66 |
| TABELA 12. | Freqüência de felídeos neotropicais infectados para pelo menos um hemoparasita, divididos de acordo com a idade..... | 67 |

| | | |
|------------|--|----|
| TABELA 13. | Freqüência de felídeos neotropicais infectados para pelo menos um hemoplasma felino, divididos de acordo com a idade..... | 67 |
| TABELA 14. | Freqüência de felídeos neotropicais infectados para pelo menos um hemoparasita, divididos de acordo com a espécie..... | 68 |
| TABELA 15. | Freqüência de felídeos neotropicais infectados para pelo menos um hemoplasma felino, divididos de acordo com a espécie dos felídeos... | 69 |
| TABELA 16. | Freqüência de felídeos neotropicais infectados para pelo menos um hemoparasita, divididos de acordo com a origem..... | 69 |
| TABELA 17. | Freqüência de felídeos neotropicais infectados para pelo menos um hemoplasma felino, divididos de acordo com o estado de origem..... | 70 |
| TABELA 18. | Freqüência de felídeos neotropicais infectados para pelo menos um hemoparasita diagnosticados nos exames de PCR e esfregaço sanguíneo..... | 70 |
| TABELA 19. | Freqüência de felídeos neotropicais infectados para pelo menos um hemoplasma diagnosticado, segundo o exame de PCR analisado..... | 71 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| RESUMO | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| 1. INTRODUÇÃO | 3 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 7 |
| 2.1. <i>Hepatozoon</i> spp. em felídeos | 8 |
| 2.2. Piroplasmas em felídeos | 14 |
| 2.2.1. <i>Babesia</i> spp. em felídeos..... | 15 |
| 2.2.2. <i>Cytauxzoon</i> spp. em felídeos..... | 16 |
| 2.3. Hemoplasmas em felídeos | 18 |
| 3. OBJETIVOS | 27 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 29 |
| 4.1. Animais | 30 |
| 4.2. Captura dos animais | 32 |
| 4.2.1. Contenção física dos animais..... | 32 |
| 4.2.2. Contenção química dos animais..... | 34 |
| 4.3. Exame clínico | 34 |
| 4.4. Coleta das amostras biológicas | 35 |
| 4.5. Reversão anestésica | 36 |
| 4.6. Diagnóstico parasitológico pela técnica de esfregaço sanguíneo | 37 |
| 4.7. Extração de DNA | 37 |
| 4.8. Diagnóstico molecular de <i>Hepatozoon</i> spp. | 37 |
| 4.8.1. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)..... | 37 |
| 4.9. Diagnóstico molecular de Piroplasmas | 38 |
| 4.9.1. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)..... | 38 |
| 4.10. Diagnóstico molecular de hemoplasmas | 40 |
| 4.10.1. Reação em Cadeia de Polimerase associada a Análise do Comprimento do Fragmento Polimórfico (PCR- RFLP)..... | 40 |

| | |
|--|-----------|
| 4.10.2. NESTED- PCR..... | 42 |
| 4.11. Eletroforese em gel de agarose..... | 45 |
| 4.12. Sequenciamento..... | 45 |
| 4.13. Análise filogenética..... | 46 |
| 4.14. Análise Estatística..... | 48 |
| 5. RESULTADOS..... | 50 |
| 5.1. Exame clínico e presença de ectoparasitas..... | 51 |
| 5.2. Diagnóstico parasitológico pela técnica de esfregaço sanguíneo..... | 52 |
| 5.3. Diagnóstico molecular de <i>Hepatozoon spp.</i>..... | 53 |
| 5.3.1. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)..... | 53 |
| 5.4. Diagnóstico molecular de Piroplasmas..... | 56 |
| 5.4.1. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)..... | 56 |
| 5.5. Diagnóstico molecular de hemoplasmas..... | 57 |
| 5.5.1. Reação em Cadeia da Polimerase associada à Análise do Comprimento do Fragmento Polimórfico (RFLP-PCR)..... | 57 |
| 5.5.2. NESTED- PCR..... | 59 |
| 5.6. Sequenciamento e Análise Filogenética..... | 60 |
| 5.6.1. <i>Hepatozoon sp.</i> | 60 |
| 5.6.2. <i>Cytauxzoon sp.</i> | 61 |
| 5.6.3. <i>Mycoplasma haemofelis</i> e ' <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> '..... | 62 |
| 5.7. Análise da interferência de possíveis fatores na frequência de infecções por hemoparasitas..... | 64 |
| 5.7.1. Sexo dos animais..... | 66 |
| 5.7.2. Idade dos animais..... | 66 |

| | |
|---|------------|
| 5.7.3. Espécies dos animais..... | 67 |
| 5.7.4. Estado de origem dos animais..... | 69 |
| 5.7.5. Sensibilidade entre a PCR e esfregaço sangüíneo para o diagnóstico dos hemoparasitas avaliados..... | 70 |
| 5.7.6. Sensibilidade diagnóstica entre PCR-RFLP e Nested-PCR para a detecção de <i>Mycoplasma haemofelis</i> e ' <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> '..... | 71 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 72 |
| 6.1 <i>Hepatozoon</i> sp..... | 73 |
| 6.2 Piroplasmas..... | 75 |
| 6.2.1 <i>Cytauxzoon felis</i> | 75 |
| 6.2.2 <i>Babesia</i> spp..... | 78 |
| 6.3 Hemoplasmas..... | 79 |
| 6.4 Análise da interferência de possíveis fatores na freqüência de infecções por hemoparasitas..... | 82 |
| 6.5 Considerações sobre a reintrodução dos felídeos neotropicais do presente estudo..... | 86 |
| 7. CONCLUSÕES | 89 |
| 8. BIBLIOGRAFIA..... | 91 |
| 9. ANEXOS..... | 104 |
| 10. TRABALHO CIENTÍFICO | 106 |

METZGER, B. **Diagnóstico de hemoparasitas em felídeos neotropicais provenientes de vida livre no Brasil**. Botucatu, 2009. 112p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O trabalho teve como objetivo investigar a ocorrência de *Hepatozoon* spp., piroplasmas e hemoplasmas em felídeos neotropicais nascidos em vida livre. Amostras sanguíneas foram colhidas de 11 *Leopardus pardalis*, 10 *Leopardus tigrinus*, oito *Puma yagouaroundi*, um *Leopardus wiedii* e um *Puma concolor*, provenientes dos Estados do Pará, Maranhão, Piauí, Ceará e Minas Gerais. Esfregaços sanguíneos foram realizados para observação dos hemoparasitas e a extração de DNA foi feita para utilização em técnicas moleculares. *Hepatozoon* spp. e piroplasmas foram diagnosticados pela Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e hemoplasmas felinos foram pesquisados pela PCR- RFLP e “Nested”-PCR. A caracterização molecular dos isolados obtidos foi feita após o sequenciamento e a análise filogenética. A ocorrência de pelo menos um hemoparasita diagnosticado pela técnica do esfregaço sanguíneo foi de 6,45% (2/31) e pela PCR foi de 45,16% (14/31), sendo observadas, 16,12% (5/31), 3,22% (1/31) e 38,70% (12/31) de infecções por *Hepatozoon* sp., *Cytauxzoon felis* e hemoplasmas (das espécies *Mycoplasma haemofelis* e/ou ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’), respectivamente. Foram encontradas infecções únicas e mistas nos felídeos. O diagnóstico positivo foi maior nos adultos (92,85%) ($p=0,007$) e na espécie *L. pardalis* (57,14% - 8/14). A detecção de *C. felis* em exemplar juvenil de *P. concolor*, recém capturado na natureza, indica sua presença na população de felídeos neotropicais de vida livre no Brasil. A caracterização molecular de *Hepatozoon* sp. em felídeos neotropicais e os relatos das infecções por este hemoparasita em *L. tigrinus* e por *M. haemofelis* e ‘*Candidatus M. haemominutum*’ em *P. yagouaroundi* são inéditos no mundo.

Palavras-chave: *Cytauxzoon felis*; Felídeos silvestres; Hemoparasitas; Micoplasmas hemotrópicos; PCR

METZGER, B. **Diagnosis of hemoparasites in wild caught neotropical felids from Brazil** Botucatu, 2009. 112p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the occurrence of *Hepatozoon* spp., piroplasms and hemoplasms in wild caught neotropical felids. Blood samples were drawn from 11 *Leopardus pardalis*, 10 *Leopardus tigrinus*, eight *Puma yagouaroundi*, one *Leopardus wiedii* and one *Puma concolor* coming from the States of Para, Maranhão, Piauí, Ceará and Minas Gerais. Blood smears were evaluated for parasites and DNA was extracted for molecular techniques. *Hepatozoon* spp. and piroplasms were diagnosed by Polymerase Chain Reaction (PCR) and feline hemoplasms were examined by both RFLP-PCR and Nested-PCR. Molecular characterization of the isolates obtained was performed after sequencing and phylogenetic analyses. The occurrence of at least one hemoparasite diagnosed by blood smear technique was 6.45% (2/31) and by PCR was 45.16% (14/31). Infections of *Hepatozoon* sp., *Cytauxzoon felis* and feline hemoplasms (from species *Mycoplasma haemofelis* and/or 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*') were observed, respectively, in 16.12% (5/31), 3.22% (1/31) and 38.70% (12/31) from the total of animals studied. Infections and co-infections were found among felids. The positive diagnosis were higher in adults (92.85%) ($p= 0,007$) and in *L. pardalis* (57.14% - 8/14). The detection of *C. felis* in a juvenile, recently wild caught *P. concolor*, indicates the presence of this piroplasm in the wild felid population of Brazil. The molecular characterization of *Hepatozoon* sp. in neotropical felids and the report of this hemoparasite infection in *L. tigrinus* as well as the report of *M. haemofelis* and 'Candidatus *M. haemominutum*' in *P. yagouaroundi* are novelties in the world.

Key words: *Cytauxzoon felis*; Feline hemotropic mycoplasmas; Hemoparasites; PCR; Wild felids

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A perda global da diversidade biológica afeta o bem estar de animais e de humanos. A destruição de habitats, somada à extinção de espécies animais e vegetais, tem levado a importantes modificações nos ecossistemas, como mudanças na relação patógeno-hospedeiro (ALLCHURCH, 2002). Alterações ambientais e climáticas podem romper o equilíbrio desta relação e permitir o surgimento de doenças em populações que mantinham uma convivência historicamente estável com os diferentes patógenos, sejam esses virais, bacterianos e/ ou parasitários (MUNSON et al., 2008).

Munson et al. (2008) demonstraram que eventos climáticos incomuns foram responsáveis pelo surgimento de uma alarmante epidemia provocada pela associação de babesiose e cinomose em leões do Serengeti, nos anos de 1994 e 2001. Ressalta-se que estes leões conviviam harmonicamente há 20 anos com quatro espécies de *Babesia*, além de *Hepatozoon felis* e o vírus da cinomose, que é endêmico nesses animais. Porém, períodos de seca mais extensos que o comum para a região, nos anos supramencionados, provocaram uma enorme infestação de carrapatos nos búfalos sobreviventes. Ao predarem estes animais, os leões se infestavam com um número incomum de carrapatos e, assim, se infectavam com uma carga parasitária elevada de *Babesia* spp. Isto provocou o surgimento de babesiose aguda nos animais já imunossuprimidos pelo vírus da cinomose, e ocasionou mortalidade em massa.

O conhecimento das infecções e causas de mortalidade de animais selvagens é de extrema importância por diversos fatores. Dentre estes, estariam a crescente preocupação com o bem estar da vida selvagem, principalmente em relação às espécies ameaçadas de extinção, o interesse nas doenças zoonóticas transmitidas por esses animais, o uso de animais selvagens pelos ecologistas para monitorar a poluição ambiental, além do interesse veterinário, não só para o benefício da vida selvagem e para a sua conservação, mas também devido às doenças que os animais selvagens podem transmitir aos animais domésticos e vice-versa (SIMPSON, 2000).

No Brasil, a principal causa para o declínio das populações de felídeos neotropicais, assim como de toda biodiversidade global, é a degradação, perda e fragmentação dos habitats naturais. Esse processo tem sido intensificado pela crescente urbanização, expansões agrícolas, criações extensivas de gado, exploração de madeira e minerais e construções de hidrelétricas (OLIVEIRA, 1998; OLIVEIRA, 2004).

De acordo com a “International Union for Conservation of Nature and Natural Resources” (IUCN), todas as oito espécies de felídeos neotropicais existentes no Brasil encontram-se ameaçadas de extinção em graus variados, seja a nível nacional, estadual ou regional (IUCN, 2008).

Por estarem no topo da cadeia trófica, os felinos são importantes agentes na manutenção da dinâmica das comunidades onde vivem (BERGER, 2007) e, desta forma, preservá-los significa preservar todas as outras espécies a eles subordinados.

O conhecimento das infecções que acometem felídeos neotropicais no Brasil ainda é escasso, apesar de alguns hemoparasitos como ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ e *Hepatozoon felis* já terem sido detectados (METZGER et al., 2008; WILLY et al., 2007c). Agentes infecto-parasitários podem estar contribuindo na morbidade e/ou mortalidade das populações desses animais, sejam de vida livre ou mantidas em cativeiro (FILONI et al., 2006).

O presente estudo faz parte de um projeto multidisciplinar de abrangência nacional denominado “Projeto Gatos do Mato – Brasil”. Esse projeto envolve diversas pesquisas, desenvolvidas em todos os biomas brasileiros, com a finalidade de aprofundar o conhecimento sobre a biologia, ecologia, nutrição, genética e sanidade dos felídeos neotropicais.

Um dos programas é o da reintrodução como ferramenta conservacionista importante para restabelecimentos populacionais (OLIVEIRA¹, 2008), sendo o diagnóstico de infecções parasitárias um dos objetivos do programa, a fim de evitar que exemplares reintroduzidos representem ameaça às populações de vida livre, por meio da introdução de patógenos.

¹ OLIVEIRA, T.G., Comunicação Pessoal, 2008.

Além disso, o estresse severo causado pela captura, translocação ou reintrodução pode romper o vital equilíbrio parasito-hospedeiro, colocando a vida do animal reintroduzido, e de outros carnívoros da comunidade, em risco (KETZ-RILLEY et al., 2003; PENZHORN, 2006).

O ciclo de transição entre a vida selvagem e a vida em cativeiro, e vice-versa (possibilitado pelos programas de reintrodução), apresenta desafios complexos e significativos para a saúde dos animais selvagens (ALLCHURCH, 2002). Assim, o estudo de hemoparasitas em felídeos neotropicais contribuirá de forma relevante para a realização de medidas eficazes de conservação e de manejo “in-situ” e “ex-situ”.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

Neste capítulo será abordada a revisão de literatura dos hemoparasitas que foram pesquisados no presente estudo.

2.1 *Hepatozoon* spp. em felídeos

O gênero *Hepatozoon* pertencente à família Hepatozoidae, filo Apicomplexa (LEVINE, 1984), compreende mais de 300 espécies de hematozoários que infectam leucócitos de mamíferos (46 espécies), eritrócitos de répteis (120 espécies) e o restante, aves e anfíbios (SMITH, 1996).

A infecção por *Hepatozoon* spp. em gatos domésticos (*Felis catus*) foi descrita primeiramente na Índia, por Patton (1908). Esse autor descreveu o agente como *Hepatozoon felis domestici*, já que não observou a cápsula característica do gamonte de *Hepatozoon canis*, originalmente descrito em cães por James (1905). Posteriormente, Wenyon (1926), visualizando a cápsula de *Hepatozoon* sp. nesses felídeos, afirmou que se tratava de *H. canis*, sendo a mesma espécie que infecta cães, raposas e outros animais selvagens.

Beaufils et al. (1998) observaram, assim como Patton (1908), diferenças morfológicas entre os gamontes de *Hepatozoon* spp. que infectam cães e gatos na França. Conseqüentemente, os autores sugeriram a possibilidade de diferentes espécies de *Hepatozoon* ocorrerem nesses últimos animais. No Brasil, Perez et al. (2004) relataram, pela primeira vez, o encontro de *Hepatozoon* sp. em felídeos domésticos no estado de São Paulo. Rubini et al. (2006), identificando molecularmente a espécie encontrada nesses mamíferos, verificaram que os isolados eram altamente relacionados com *H. canis* de cães, reforçando a afirmação de Wenyon (1926), na qual a espécie de *Hepatozoon* que infecta os felinos é a mesma que infecta os cães.

Apesar de todos esses relatos, uma nova espécie de *Hepatozoon*, geneticamente distinta de *H. canis*, foi identificada em gatos no sul da Espanha, num estudo envolvendo 330 animais, dos quais apenas dois apresentaram-se

positivos pela PCR (0,6%). Esses isolados demonstraram apenas 96% de similaridade genética com *H. canis* e foram submetidos ao GenBank como *Hepatozoon felis* (CRIADO-FORNELIO et al., 2006). Posteriormente, Ortuño et al. (2008) e Tabar et al. (2008) diagnosticaram a infecção em quatro gatos, tanto no norte da Espanha quanto em Barcelona, de um total de 25 (16%) e 100 felinos (4%), respectivamente. Os isolados obtidos de ambos estudos apresentaram 100% de similaridade genética com *H. felis* identificado por Criado-Fornelio et al. (2006).

Recentemente, Metzger et al. (2008) caracterizaram molecularmente, pela primeira vez, as espécies de *Hepatozoon* encontradas em felídeos neotropicais. Segundo estes resultados, os isolados de *Hepatozoon* em *Leopardus pardalis* e *Leopardus tigrinus* tinham 98% de similaridade genética em relação aos isolados de *Hepatozoon* (*H. felis*) encontrados em gatos domésticos na Espanha. Considerando que gatos infectados com *H. canis* foram também descritos molecularmente no Brasil (RUBINI et al., 2006), Metzger et al. (2008) sugeriram a possibilidade de mais de uma espécie de *Hepatozoon* infectar felídeos domésticos e selvagens.

Nos felídeos selvagens, a infecção por *Hepatozoon* spp. já foi relatada em *Panthera leo* (leão), *Panthera pardus* (leopardo) (BROCKLESBY e VIDLER, 1963; MCCULLY et al., 1975; AVERBECK et al., 1990), *Lynx rufus* (lince) (LANE e KOKAN, 1983; MERCER et al., 1988), *Acinonyx jubatus* (guepardo) (AVERBECK et al., 1990), *Otocolobus manul* (gato de pallas) (BARR et al., 1993), *Prionailurus bengalensis euptilura* (leopardo Tsushima), *Prionailurus bengalensis iriomotensis* (gato selvagem iriomonte) (KUBO et al., 2006), *L. pardalis* (jaguaririca) (MERCER et al., 1988; METZGER et al., 2008) e *L. tigrinus* (gato do mato pequeno) (METZGER et al., 2008).

Desde a primeira descrição de *Hepatozoon* spp. em gatos, pouco se sabe sobre a patogênese dessa infecção em felídeos. Até o presente, considera-se que tanto a patogênese quanto o ciclo de vida do hemoparasita nesses animais se assemelham aos de cães infectados por *H. canis* (BANETH et al., 1998b).

O ciclo de vida de *H. canis* envolve uma série de episódios que ocorrem tanto no hospedeiro vertebrado intermediário quanto no hospedeiro invertebrado definitivo (artrópode hematófago). Assim, o vertebrado ingere o carrapato infectado, ou partes dele, contendo o oocisto maduro. Este oocisto contém diversos esporocistos (57 a 129) que contém, por sua vez, de 7 a 8 esporozoítas. Sob a ação das enzimas digestivas do intestino, o oocisto se rompe, liberando os esporozoítas que penetram na parede intestinal, invadem células mononucleares e são disseminados pela circulação sanguínea e/ ou linfática para órgãos hemolinfáticos como medula óssea, baço, linfonodos, fígado, rins e pulmões. Nos tecidos desses órgãos, em um processo de merogonia, ocorre a formação de merontes (também denominados de esquizontes), e no seu interior, merozoítas se desenvolvem por divisão assexuada (BANETH et al., 2007).

Os merontes formados são considerados primários e podem formar dois tipos de merontes secundários: um contendo de 20 a 30 micromerozoítas (meronte em forma de “roda” ou “wheel-spoke meront”) e outro contendo até quatro macromerozoítas (BANETH, 2006; BANETH et al., 2007). Os macromerozoítas liberados podem invadir novas células hospedeiras formando novamente merontes, contendo macro ou micromerozoítas. Os micromerozoítas liberados podem invadir os leucócitos e/ou monócitos, ou alternativamente, produzir novas gerações de merontes. Os micromerozoítas, quando invadem os neutrófilos e /ou monócitos, sofrem um processo de gametogonia e se desenvolvem em gamontes. Nos tecidos desses órgãos alvos podem ocorrer também formações de pequenos cistos monozóicos de *H. canis*, contendo um único parasito. Entretanto, o papel destes cistos no ciclo de vida de *H. canis* ainda não foi bem elucidado (O`DWYER et al., 2004; BANETH, 2006; BANETH et al., 2007).

Os carrapatos se infectam durante o repasto sanguíneo, ao ingerirem neutrófilos e/ou monócitos contendo gamontes maduros. Os gamontes masculinos e femininos são morfológicamente indistinguíveis e se associam no intestino do carrapato. Após a formação de gametas e sua diferenciação, em um processo denominado gametogênese, ocorre a fertilização e a conseqüente formação do

zigoto. Este último se divide e o processo de esporogonia inicia-se tendo como resultado a formação de grandes oocistos que são liberados na hemocele do carrapato. Como os esporozoítas não migram para as glândulas salivares do carrapato, é necessário que estes sejam ingeridos pelo animal para que ocorra a infecção pelo agente (BANETH, 2006; BANETH et al., 2007).

Além da conhecida transmissão de *Hepatozoon* spp. pela ingestão do artópode hematófago infectado, um modo alternativo de transmissão do parasita é pela predação de um hospedeiro intermediário vertebrado, contendo cistos de *Hepatozoon*, por um outro hospedeiro intermediário, como descrito por Desser (1990). Segundo este autor, *Hepatozoon griseisciuri* forma pequenos cistos nos pulmões de *Sciurus vulgaris* (esquilo cinzento) e é capaz de infectar outros vertebrados que predam estes pequenos mamíferos.

De modo similar, em estudo recente no qual cães foram alimentados com roedores experimentalmente infectados com *Hepatozoon americanum*, observou-se gamontes desse agente em esfregaços sanguíneos e merontes em exames histológicos de músculo esquelético, 45 e 90 dias, respectivamente, após a ingestão de cistozoítas (JOHNSON et al., 2008). Cistozoítas são formas císticas encontradas nos tecidos de vertebrados infectados que fazem parte do ciclo de vida de algumas espécies de *Hepatozoon*, como *H. americanum* e *H. griseisciuri*. (DESSER 1990; SMITH et al., 1996; JOHNSON et al., 2008). Embora esse modo de transmissão ainda não esteja bem elucidado nos mamíferos, ele não deve ser descartado (BANETH et al., 2001; BANETH et al., 2007).

A infecção de *Hepatozoon* spp. em felídeos varia de sub-clínica e/ou branda a infecções agudas que podem levar ao óbito (CRAIG, 1984). Autores como McCully et al. (1975), Baneth et al. (1998b) e Beaufils (2004) relataram o aumento da patogenicidade de *Hepatozoon* spp. em gatos concomitante com a presença de doenças como babesiose, micoplasmoses hemotrópica felina e doenças imunossupressoras, como as causadas pelos vírus da imunodeficiência e da leucemia felina (respectivamente FIV e FeLV). Baneth et al. (1998b) sugeriram que *Hepatozoon* spp. são parasitas oportunistas que infectam felinos imunossuprimidos de uma forma mais eficiente do que os imunocompetentes e

que podem existir como uma infecção latente nos tecidos de gatos aparentemente saudáveis, sendo reativados sob condições de imunossupressão ou de stress.

Em felídeos selvagens, tanto *L. pardalis* no Brasil, quanto *L. rufus* nos Estados Unidos, não apresentaram qualquer sinal clínico de hepatozoonose (MERCER et al., 1988; METZGER et al., 2008). Entretanto, esquizontes no miocárdio, nos pulmões e nos músculos esqueléticos de *P. leo* foram relatados por McCully et al. (1975). Averbek et al. (1990) e Kubo et al. (2006) relataram que o órgão mais afetado por esquizontes em *P. pardus*, *A. jubatus*, *P. leo*, *P. bengalensis euphilura* e *P. bengalensis iriomotensis* foi o coração. Apesar dos achados histopatológicos, a patogenicidade de *Hepatozoon* sp. nos felídeos selvagens parece ser baixa, visto que são relatados reduzido número de parasitos e reação inflamatória discreta nos órgãos afetados (KUBO et al., 2006).

Dados de necropsia encontrados por Klopfer et al. (1973) em gatos ferais de Israel coincidem com os achados histopatológicos provenientes de outros estudos de *Hepatozoon* spp. em felídeos domésticos e selvagens, nos quais novamente o coração apresentou-se como local de predileção para merogonia (KLOPFER et al., 1973; AVERBECK et al., 1990).

Nos gatos domésticos, os sinais clínicos mais comumente descritos incluem pirexia, letargia, anorexia, estomatite, gengivite, perda de peso e secreção óculo-nasal (EWING, 1977; VAN AMSTEL, 1979). No entanto, esses três fatores: baixa prevalência da infecção nesses animais, achados clínicos não patognomônicos e presença de co-infecções, tornam difícil o diagnóstico. Conseqüentemente, a maioria dos sinais clínicos relatados em felinos naturalmente infectados por *Hepatozoon* spp. foram atribuídos à presença conjunta de outras patologias como insuficiência renal, micoplasmose hemotrópica felina, imunodeficiência viral felina e leucemia felina (BANETH et al., 1998b).

Em relação à prevalência da infecção por *Hepatozoon* spp. em felídeos selvagens, Averbek et al. (1990), utilizando o diagnóstico pelo esfregaço sanguíneo, relataram 100% de infecção em *P. leo* e *A. jubatus* (em um total de 131 animais, todos concomitantemente infectados com piroplasmas similares à *Theileria* sp.). Já, Kubo et al. (2006), utilizando o diagnóstico histopatológico,

relataram 56,7% da infecção em *P. bengalensis iriomotensis* e 14,3% em *P. bengalensis euptilura*. Mais recentemente, Metzger et al. (2008), utilizando o diagnóstico molecular da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), identificaram 36,36% de positividade do agente em *L. pardalis* e 10% em *L. tigrinus*.

A infecção por *Hepatozoon* sp. pode ser diagnosticada pela observação direta dos gamontes nos leucócitos, por meio de microscopia óptica em esfregaços sanguíneos, corados com Giemsa a 10% (ELIAS e HOMANS, 1988). Uma grande desvantagem dessa técnica é que nem sempre os gamontes são detectáveis porque a parasitemia pode ser intermitente, ou o número de gamontes circulantes ser muito baixo (BANETH et al., 1996).

A infecção também pode ser diagnosticada por meio de exames histopatológicos, pelo encontro de merontes e/ou outros estágios de desenvolvimento do parasita, no coração, fígado, baço, pulmões, rins, linfonodos, medula óssea e/ou músculos esqueléticos (MCCULLY et al., 1975; KUBO et al., 2006).

O teste sorológico de imunofluorescência indireta de anticorpos (“Indirect Fluorescent Antibody Test” ou IFAT), desenvolvido por Shkap et al. (1994), possui uma maior sensibilidade quando comparado com o exame direto do esfregaço sanguíneo (BANETH et al., 1996). A IFAT já foi usada para estudos epidemiológicos em Israel (BANETH et al., 1996) e no Japão (INOKUMA et al., 1999).

Um outro teste sorológico (“Enzyme Immunosorbent Assay” ou ELISA), o qual utiliza gamontes purificados de *H. canis* como antígeno foi descrito (GONEN et al., 2004). Embora não exista diferença entre ambos testes sorológicos (IFAT e ELISA) em termos de sensibilidade e especificidade, a ELISA não detectou anticorpos anti - *H. canis* em alguns cães parasitados com o agente (GONEN et al., 2004). O uso da sorologia é interessante no diagnóstico de animais com baixa parasitemia, no estágio inicial da infecção ou apresentando infecção crônica sem a apresentação de parasitemia (BANETH et al., 1998a). Deve-se salientar que a ausência de gamontes nos esfregaços sanguíneos de animais soropositivos para *H. canis* pode indicar parasitemia baixa, intermitente ou que a soroconversão

precedeu a aparição dos gamontes (MURATA et al., 1993; BANETH et al., 1996; BANETH e WEIGLER, 1997; BANETH et al., 1998a).

Recentemente, técnicas moleculares, como a PCR e o sequenciamento genético, têm sido utilizadas para o diagnóstico de *Hepatozoon* spp. e a determinação genética dos isolados obtidos. A principal vantagem dos métodos moleculares, em comparação com as demais técnicas existentes, é sua alta sensibilidade e especificidade na detecção do agente (BANETH et al., 2000; CRIADO-FORNELIO, 2003b; KARAGENK et al, 2006). Observa-se que diversos oligonucleotídeos têm sido descritos para amplificar regiões do gene 18S rRNA de diferentes isolados de *Hepatozoon* spp. (MATHEW et al., 2000; BANETH et al., 2003; RUBINI et al., 2005; CRIADO-FORNELIO et al., 2006). As técnicas moleculares têm sido responsáveis pelos avanços no estudo da taxonomia e na elucidação das relações genéticas entre as espécies do gênero *Hepatozoon*, além de complementarem informações previamente conhecidas sobre morfologia, morfometria e etiopatogenia do parasita, nas diferentes espécies animais (FORLANO et al., 2007).

2.2 Piroplasmas em felídeos

Piroplasmas são hematozoários pertencentes ao filo Apicomplexa. As duas principais famílias incluídas neste filo são: Theileriidae e Babesiidae. Esses hemoparasitas são transmitidos por carrapatos e parasitam principalmente mamíferos. Existem duas diferenças clássicas entre os gêneros *Theileria* e *Babesia*. As espécies do primeiro apresentam uma fase de multiplicação (chamada de esquizogonia) fora dos eritrócitos, além de transmissão transtestadial no ciclo de vida do vetor. As espécies de *Babesia* não apresentam esquizogonia, se multiplicam por divisão binária nos eritrócitos e a transmissão nos carrapatos é transovariana (LEVINE, 1984; UILENBERG, 2006). Abaixo será abordada a revisão de literatura dos piroplasmas mais encontrados em felídeos.

2.2.1 Babesia spp.

As espécies do gênero *Babesia*, pertencentes ao filo Apicomplexa, ordem Piroplasmida e família Babesiidae (LEVINE, 1984), são protozoários que parasitam o interior de eritrócitos de diversas espécies de animais domésticos e selvagens, além do homem e são transmitidos por invertebrados hematófagos (BANETH et al., 2004).

Relatos de espécies de *Babesia* em felídeos selvagens incluem: *Babesia felis* em *Felis ocreata* (gato selvagem do Sudão) (DAVIS, 1929), *Babesia cati* em *Felis catus* (gato selvagem indiano) (MUDALIAR et al., 1950), *Babesia Pantherae* em *P. pardus* (leopardos) (DENNIG e BROCKLESBY, 1972), *Babesia leo* em *P. leo* (leões) (PENZHORN et al., 2001) e *Babesia herpauri* em *P. yagouaroundi* (gato mourisco ou jaguarundi) (PENZHORN, 2006). Algumas espécies de *Babesia* spp. encontradas em *A. Jubatus* (guepardos), *L. rufus* (lincos) e *Panthera tigris* (tigres) não foram nomeadas (PENZHORN, 2006).

A infecção pode variar de assintomática, branda ou severa, dependendo da virulência da espécie de *Babesia* e da susceptibilidade do hospedeiro (BANETH et al., 2004).

Schoeman et al. (2001) sugeriram a possibilidade de gatos, provindos de áreas endêmicas da doença, contraírem a infecção quando jovens e se tornarem portadores sub-clínicos, num estado chamado de premunidade. Doenças imunossupressoras, como as causadas pelo vírus da imunodeficiência felina e da leucemia felina, além da micoplasmose hemotrópica felina, podem reativar a doença, exacerbando sua severidade e podendo causar o óbito do animal (SCHOEMAN et al., 2001; BANETH et al., 2004; PENZHORN, 2006).

Penzhorn (2006) citou também que a mortalidade por babesiose, devido a esta reativação, pode ser ocasionada por estresse severo, como em situações de captura de animais selvagens, translocações destes entre zoológicos ou Unidades de Conservação e reintroduções na natureza.

Os sinais clínicos descritos em gatos domésticos incluem anorexia, letargia, perda de peso, anemia regenerativa e ocasionalmente icterícia,

especialmente na fase aguda da doença. Estes são semelhantes aos sinais clínicos da micoplasmose hemotrópica felina, portanto o valor diagnóstico baseado somente no exame físico é limitado (SCHOEMAN et al., 2001).

Em relação aos felídeos neotropicais, pouco se sabe quanto à prevalência e patogenia da infecção por *Babesia* spp. Correia e Teixeira (2003) relataram a ocorrência de 10% de *Babesia* spp. em *L. tigrinus*, porém, somente 10 animais foram testados pela técnica de esfregaço sangüíneo, não tendo sido realizado o diagnóstico molecular.

2.2.2 Cytauxzoon spp.

C. felis é um piroplasma da família Theileriidae, transmitido por carrapatos, que infecta felídeos domésticos e selvagens e foi relatado inicialmente em gatos, em 1976, em Missouri (WAGNER, 1976). Este hematozoário ainda é considerado um agente infeccioso emergente em algumas regiões dos Estados Unidos (BIRKENHEUER et al., 2006).

Nos felinos domésticos, a infecção causada por este hemoparasita é aguda, caracterizada por febre, anorexia, anemia, icterícia e geralmente óbito após 19 a 21 dias de evolução (WAGNER et al., 1995). A taxa de mortalidade por cytauxzoonose geralmente atinge 100% dos animais infectados. No entanto, já foram descritos alguns casos clínicos de gatos parasitados assintomáticos, além de outros que, após receberem tratamento, sobreviveram (WALKER e COWELL, 1995; MEINKOTH et al., 2000). A infecção de gatos ferais assintomáticos, na Florida e no Tennessee, também foi relatada (HABER et al., 2007). Esses dados sugerem que os felinos podem agir como hospedeiros adicionais (MEINKOTH et al., 2000; HABER et al., 2007).

Os gatos se infectam com esporozoítas de *C. felis* durante o repasto sanguíneo do carrapato. No organismo do vertebrado, ocorre esquizogonia no interior de macrófagos de pulmões, baço, fígado e linfonodos (KIER et al., 1987). Os merozoítas que se formam rompem os macrófagos e penetram em outros macrófagos ou em eritrócitos. Nestes últimos, o agente, que neste momento passa

a ser denominado de piroplasma, apresenta formato de anel e se reproduz por divisão binária. Apesar dos piroplasmas romperem os eritrócitos, a esquizogonia é a fase mais patogênica da infecção e pode resultar na oclusão de vasos sanguíneos e doença sistêmica (KIER et al., 1987).

O carrapato *Dermacentor variabilis* é o único que foi demonstrado experimentalmente com a capacidade de transmitir *C. felis* de lincos americanos (*L. rufus*) para gatos (BLOUIN et al., 1984). O agente também foi observado em ninfas parcialmente engurgitadas de *Amblyomma americanum* em um felino doméstico que veio a óbito por cytauxzoonose. No entanto, não se sabe se os carrapatos estavam infectados antes do engurgitamento ou se ingeriram sangue com piroplasmas durante o repasto sanguíneo (BONDY Jr. et al., 2005).

A maioria dos relatos de infecção por *C. felis* em gatos, nos Estados Unidos, ocorre em áreas rurais próximas a áreas naturais, nas quais lincos e outros animais selvagens podem ser encontrados (REICHARD et al., 2008). Neste país, existe alta prevalência de lincos (*L. rufus*) infectados, sendo estes considerados hospedeiros naturais do hemoparasita. Geralmente, estes felídeos selvagens são capazes de sobreviver à fase de esquizogonia e desenvolvem parasitemia subclínica (BLOUIN et al., 1984). No entanto, já foi verificada a presença da doença com quadro fatal em um linco (*L. rufus*) (NIETFELD e POLLOCK, 2002) e em um tigre (*P. tigris*), procedente de cativeiro (GARNER et al., 1996).

Em outros felídeos selvagens como *Puma concolor coryi* (pantera), *Puma concolor stanleyana* (puma americano) e *Lynx pardinus* (lincos ibéricos) observaram-se infecções subclínicas pelo agente (ROSTEIN et al., 1999; MILLAN et al., 2007).

Observou-se um piroplasma muito semelhante a *C. felis*, denominado *Cytauxzoon manul* em *O. manul* (gato de pallas), na Mongólia. Quando felídeos domésticos foram infectados experimentalmente com *C. manul*, eles desenvolveram parasitemia apesar de não exibirem sinais clínicos. Além disso, verificou-se que a inoculação de *C. manul* não protegeu esses animais contra *C. felis* (JOYNER et al., 2007).

A confirmação do primeiro relato de *C. felis* no Brasil foi em 2007, pelo exame histopatológico, em dois exemplares de *P. leo* (uma leoa e seu filhote de seis meses), localizados no Zoológico de Volta Redonda, no Rio de Janeiro. Ambos animais vieram a óbito após apresentarem sinais clínicos de perda de peso, anemia, taquipnéia e nistagmo (PEIXOTO et al., 2007).

Em gatos domésticos brasileiros, o diagnóstico molecular do agente ocorreu em 2008, no Estado do Rio de Janeiro, em um animal co-infectado por '*Candidatus M. haemominutum*', o qual veio a óbito após uma semana do início do tratamento (MAIA et al., 2008).

Recentemente, André et al. (2009) verificaram a ocorrência de *C. felis*, pela PCR, em 12,5 % (9/72) de felídeos neotropicais assintomáticos localizados na Associação Mata Ciliar, em Jundiaí, no Brasil. Os animais infectados pertenciam às espécies *L. pardalis* (jaguaritica), *Puma concolor* (puma ou onça parda) e *Panthera onca* (onça pintada).

Carrapatos de *A. americanum*, *Amblyomma maculatum*, *Ixodes affinis*, além do já mencionado *D. variabilis*, foram encontrados nos gatos diagnosticados positivos, pela PCR, nos Estados Unidos (WEHINGER et al., 1995). Os ectoparasitas obtidos pelos estudos no Brasil foram: *Ctenocephalides canis* (pulgas), nos felídeos neotropicais em Jundiaí e, *Amblyomma cajennense*, nos leões em Volta Redonda. No entanto, a PCR não amplificou fragmentos do agente no DNA de nenhum destes artrópodes (PEIXOTO et al., 2007; ANDRE et al., 2009).

O diagnóstico molecular de *C. felis* deve sempre ser feito para confirmação do agente, já que sob microscopia óptica, não é possível distinguir este piroplasma de babesias pequenas (PENZHORN et al., 2001).

2.3 Hemoplasmas em felídeos

O agente etiológico responsável pela anemia infecciosa felina, conhecida até recentemente como hemobartonelose felina, foi inicialmente nomeado como *Haemobartonella felis*. Baseado em suas características e morfologia (parasita eritrocitário obrigatório, de pequeno diâmetro e transmitido por artrópodes hematófagos), esse agente foi originalmente classificado no gênero *Haemobartonella*, família Anaplasmataceae, ordem Rickettsiales. Foram reconhecidas, então, duas cepas de *H. felis*: “forma maior” ou “Ohio” e “forma menor” ou “Califórnia”. Além de distintas em relação ao tamanho que eram visualizadas sob microscopia óptica, distinguiam-se pela sua patogenicidade (BERENT et al., 1998; FOLEY et al., 1998).

Recentemente, porém, os avanços das técnicas moleculares possibilitaram o sequenciamento dos nucleotídeos do gene 16S rRNA de *H. felis* e verificou-se alta similaridade filogenética com organismos do gênero *Mycoplasma*. Observou-se, também, uma diferença genética de 15% entre as cepas de *H. felis*, revelando que elas são, portanto, duas espécies (RIKIHISA et al., 1997).

Essa fundamental informação, aliada às outras características do agente, como apresentar um genoma pequeno (entre 580 a 1330 kb), ausência de parede celular e de flagelo, resistência à penicilina e sensibilidade à tetraciclina, foi responsável pela transferência de *H. felis* para o gênero *Mycoplasma* (família Mycoplasmatacea, ordem Mollicutes). Assim, “Ohio” ou “forma maior” de *H. felis*, foi renomeada como *Mycoplasma haemofelis*, e “Califórnia” ou “forma menor” de *H. felis*, como ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ (FOLEY e PEDERSEN, 2001). O termo “Candidatus” indica classificação provisória e é mantido até a obtenção de informações taxonômicas completas (WILLI et al, 2007b).

Diante desse processo de reclassificação taxonômica, Sykes (2003) propôs a nova denominação desses organismos como micoplasmas hemotrópicos, ou hemoplasmas felinos. O termo da infecção também foi substituído e passou de hemobartonelose felina para micoplasmose hemotrópica felina (MHF).

Hemoplasmas são bactérias gram- negativas, pleomórficas, de diâmetro pequeno ($< 1\mu\text{m}$), que se aderem à superfície dos eritrócitos do hospedeiro (sem invadir a célula), podendo causar anemia (de branda e subclínica a severa e fatal). Possuem formato de cocos, bastonetes ou anelares, e sob microscopia óptica apresentam-se individuais, em pares ou em pequenos grupos formando cadeias. Ressalta-se que hemoplasmas não são cultivados “in vitro” (MESSICK, 2003; MESSICK, 2004; HARVEY, 2006).

Foi identificado por Willi et al. (2005) uma terceira nova espécie de hemoplasma felino em gatos domésticos na Suíça, denominada ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’.

Nesse mesmo ano, esses autores demonstraram grande homologia filogenética entre hemoplasmas felinos e hemoplasmas presentes em roedores e cães. Assim, ‘*Candidatus M. turicensis*’ demonstrou homologia genética de 92% com *Mycoplasma coccoides* e 90% com *Mycoplasma haemomuris* (ambos hemoplasmas de roedores). E ‘*Candidatus M. haemominutum*’ demonstrou homologia de 99% com *Mycoplasma haemocanis* e de 94% com ‘*Candidatus M. haemominutum*’, ambos hemoplasmas caninos (WILLI et al., 2005).

A análise filogenética de ‘*Candidatus M. turicensis*’ levou alguns autores a sugerirem a possibilidade de transmissão inter-espécie de hemoplasmas, entre roedores e felídeos. Entretanto, os estudos realizados acerca de hemoplasmas em roedores são poucos e inconclusivos até o momento (WILLI et al., 2007a).

As vias de transmissão dos micoplasmas hemotrópicos não são completamente conhecidas. Diversos estudos relatam que artrópodes hematófagos são os principais responsáveis pela transmissão do agente (CARNEY e ENGLAND, 1993; WILLI et al., 2007b). No Japão, o DNA de ‘*Candidatus M. haemominutum*’ foi detectado em carrapatos não ingurgitados de *Ixodes ovatus*, sugerindo-se uma possível transmissão transtadial de hemoplasmas felinos nessa espécie de carrapato (TAROURA et al., 2005). Além disso, a detecção de DNA de ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e ‘*Candidatus M. turicensis*’ na saliva e nas fezes de gatos experimentalmente infectados, durante sete semanas após a infecção, sugere que interações agressivas (brigas) entre os

animais também possibilitam a transmissão do agente na fase inicial da infecção (DEAN et al., 2005; WILLI et al., 2007a; WILLI et al., 2007b). Foi descartada a possibilidade de infecção a partir de outras interações, como o hábito de um gato lambe o outro ou compartilhar os mesmos vasilhames, pois a carga parasitária encontrada na saliva foi baixa (WILLI et al., 2007a).

Fatores de risco que predispõem os felinos para infecção incluem: sexo (macho), idade (animais mais velhos), abscessos por mordedura de gatos, infecções retrovirais, acesso à rua, estresse, presença de ectoparasitas, infecções intercorrentes e/ou neoplasias (TASKER et al., 2003a; WILLI et al., 2006a).

A anemia hemolítica causada pela infecção por hemoplasmas ocorre pela destruição extra-vascular dos eritrócitos parasitados pelo sistema fagocítico mononuclear (SFM) e, também pela lise intra-vascular, acarretada pela fragilidade osmótica que resulta da lesão direta do hemoplasma na membrana do eritrócito (MESSICK, 2004).

Os sinais clínicos da micoplasmose hemotrópica estão relacionados à espécie de hemoplasma envolvida, susceptibilidade e resposta imune do hospedeiro, além da fase da infecção (aguda ou crônica) (WILLI et al., 2007b).

A infecção aguda causada por *M. haemofelis* associa-se a intensa parasitemia dos eritrócitos e pode resultar em anemia hemolítica severa e fatal, inclusive em gatos imunocompetentes. Os sinais clínicos mais comuns em felídeos domésticos incluem anorexia, depressão, letargia, fraqueza, anemia, esplenomegalia, mucosas hipocoradas, febre intermitente, perda de peso, taquicardia, taquipnéia e óbito (HARVEY, 1984).

A anemia é classificada como regenerativa, macrocítica e hipocrômica, e é caracterizada por anisocitose, policromasia e aumento absoluto de reticulócitos (HARVEY e GASKIN, 1977). O pico de bacteremia, que acompanha febre e letargia, ocorre duas semanas após a infecção por *M. haemofelis* (TASKER et al., 2006b). Nem sempre há correlação inversa entre parasitemia e valor de hematócrito (TASKER et al., 2004; WILLI et al., 2006a) e alguns animais infectados demonstram episódios rápidos e cíclicos de elevada parasitemia (WILLI et al., 2007b).

Recentemente, Willi et al. (2006a) relataram que um gato com alta carga parasitária de *M. haemofelis* ($> 10^6$ cópias/ ml de sangue) permaneceu sem sinais clínicos da doença por todo período do experimento (até 124 dias pós infecção). Foi demonstrado que após a recuperação de felinos de uma severa anemia hemolítica resultante da infecção por *M. haemofelis*, não foram observados sinais clínicos de doença, inclusive na presença de elevada parasitemia. A explicação para esse fato seria a possível diferença individual de susceptibilidade dos felídeos frente à infecção por hemoplasmas (WILLI et al., 2007b).

De modo geral, a infecção por '*Candidatus M. haemominutum*' não causa anemia e resulta em mínimos sinais clínicos da doença, parecendo ser menos patogênica do que o *M. haemofelis* (FOLEY et al., 1998, WESTFALL et al., 2001). O pico de bacteremia ocorre geralmente 4 a 5 semanas após início da infecção e ainda não está claro sobre a ocorrência de episódios cíclicos de alta parasitemia após esse período (TASKER et al., 2006b). Deve-se ressaltar, no entanto, que relatos de anemia ocorreram em gatos infectados por '*Candidatus M. haemominutum*' e imunocomprometidos por retrovíroses ou por quimioterapia (GEORGE et al., 2002).

O potencial patogênico de '*Candidatus M. turicensis*' também parece depender de cofatores como imunossupressão ou co-infecção com outros hemoplasmas. Essa espécie de hemoplasma provocou anemia, de leve a moderada, nos diferentes felinos infectados experimentalmente. O pico da bacteremia ocorreu, também, duas semanas após início da infecção e ainda não está elucidado sobre a ocorrência de parasitemia cíclica (WILLI et al., 2006b).

Animais infectados com hemoplasmas podem permanecer portadores crônicos por meses a anos, inclusive se receberem antibioticoterapia específica. Esses portadores saudáveis representam uma fonte de infecção aos outros felídeos visto que a transmissão do agente ocorre, principalmente, através de artrópodes hematófagos (WILLI et al., 2006b).

Apesar de existirem poucos relatos acerca da reativação da infecção (FOLEY et al., 1998; FOLEY e PEDERSEN, 2001), alguns autores acreditam que a infecção crônica pode resultar em agudização quando os animais são

submetidos a condições de estresse ou por imunossupressão (BOBADE et al., 1988). Deve-se notar que nos estudos em que se administrou corticosteróide a gatos cronicamente infectados, ocorreu aumento da parasitemia e diminuição dos valores de hematócrito, mas não houve desenvolvimento de sinais clínicos de doença (BERENT, 2002).

Estudos recentes demonstram diferenças na indução do estado de portador pelas três espécies de hemoplasmas. Segundo relatos, a frequência de felinos portadores é maior quando infectados por '*Candidatus M. haemominutum*' (TASKER, 2006). A eliminação de hemoplasmas do organismo animal, espontaneamente ou resultante de tratamento, só foi observada, até o momento, em poucos animais infectados por '*Candidatus M. turicensis*' ou por '*Candidatus M. haemominutum*' (WILLI et al., 2005; WILLI et al., 2006a). Embora o tratamento com doxiciclina, enrofloxacina ou marbofloxacina seja efetivo em reduzir a parasitemia e os sinais clínicos da doença, ele geralmente não elimina a infecção por hemoplasma, especialmente por *M. haemofelis*. Relata-se também uma diferença entre as espécies de hemoplasmas quanto à resposta a antibioticoterapia (TASKER et al., 2006a; TASKER et al., 2006b; WILLI et al., 2006a).

Ainda existe pouco conhecimento sobre a micoplasmose hemotrópica em felídeos selvagens (HAEFNER et al., 2003). Porém, recentemente, um abrangente estudo realizado por Willi et al. (2007c) relatou o diagnóstico das três espécies de hemoplasmas, em infecções únicas ou coinfeções, em nove espécies de felídeos selvagens, incluindo sete espécies de felídeos neotropicais brasileiros. Esse estudo envolveu 257 exemplares de 16 espécies, provenientes de vida livre e de zoológicos, de três diferentes continentes (Europa, América do Sul e África). As espécies avaliadas foram: *L. pardinus* (lince ibérico), *Lynx lynx* (lince euroasiático), *Felis silvestris silvestris* (gato selvagem europeu), *P. leo* (leão), *A. jubatus* (guepardo), *P. pardus* (leopardo), *Panthera tigris altaica* (tigre siberiano), *Uncia uncia* (leopardo das neves), *Oncifelis geoffroyi* (gato do mato grande ou gato geofroi), *P. yagouaroundi* (gato mourisco ou jaguarundi), *Leopardus wiedii* (gato maracajá ou gato do mato médio), *L. pardalis* (jaguaririca), *L. tigrinus* (gato do

mato pequeno), *Oncifelis colocolo* (gato dos Pampas ou colocolo) e *P. concolor* (onça parda, puma ou suçuarana).

Os autores mencionados diagnosticaram a infecção em 37% dos animais avaliados. As espécies positivas foram: *L. pardinus*, *L. lynx*, *F. silvestris silvestris*, *P. leo*, além dos felídeos neotropicais brasileiros: *O. geoffroyi*, *L. wiedii*, *L. pardalis*, *L. tigrinus* e *P. concolor* (WILLI et al., 2007c).

A ocorrência da infecção por hemoplasmas foi significativamente maior em *P. leo* (leão) do Serengeti (98%), seguida pelos felídeos selvagens europeus (44% em *L. lynx*, 39% em *F. silvestris silvestris* e 37% em *L. pardinus*) Considerando-se os felídeos neotropicais brasileiros como um único grupo, os autores encontraram a menor prevalência de hemoplasmas, apenas 10%. Esse estudo verificou que a frequência de infecção por hemoplasmas foi significativamente diferente entre as espécies de felídeos selvagens, inclusive nos casos em que somente os felídeos neotropicais brasileiros eram incluídos nos cálculos. Notadamente, 57,14% (4/7) de *L. pardalis* foram positivos para '*Candidatus M. haemominutum*'. Além disso, a coinfeção entre as diferentes espécies de hemoplasmas foi muito maior em animais de vida livre (89% de coinfeção em *P. leo* do Serengeti) do que em animais mantidos em cativeiro (nascidos ou não em vida livre) (WILLI et al., 2007c).

Na análise dos resultados, os autores sugeriram haver diferença de susceptibilidade entre as diferentes espécies de felídeos selvagens, assim como o modo de vida, livre ou em cativeiro. Animais que vivem na natureza podem ter uma exposição maior a ectoparasitas, além de freqüentes interações agressivas (brigas), se comparados a felídeos que vivem em zoológicos. Dessa maneira, animais de vida livre apresentariam maior risco de infecção por hemoparasitas e retrovíroses (WILLI et al., 2007c).

Observou-se também que a espécie que apresentou maior taxa de infecção por hemoplasmas foi *P. leo* do Serengeti (98% dos animais infectados). Esses animais, além de viverem livres na natureza, apresentaram-se co-infectados também por *Babesia* spp. e organismos semelhantes a *Theileria* spp. ou *Cytauxzoon* spp., além da cinomose canina e imunodeficiência viral felina (FIV).

Estes resultados estão de acordo com a maior prevalência da infecção em gatos domésticos co-infectados por retrovíruses ou por outras hemoparasitoses (WILLI et al., 2007c).

Foram colhidos dados do exame clínico de nove *L. pardinus* (lince ibérico) diagnosticados positivos para hemoplasmas. Oito deles apresentaram-se clinicamente saudáveis e somente um exemplar de um ano de idade, infectado por ‘*Candidatus M. turicensis*,’ apresentou mucosas hipocoradas e anemia não regenerativa (hematócrito de 15%). Esse animal apresentava-se positivo também para *C. felis*. O exame desse exemplar, após 6 meses, demonstrou completa recuperação da anemia (WILLI et al., 2007c).

A infecção por hemoplasmas foi acompanhada de dois meses até dois anos em quatro *L. pardinus*. Em três exemplares, o diagnóstico pela PCR alternou-se nesse período: um animal infectado com ‘*Candidatus M. haemominutum*’ tornou-se negativo nos últimos cinco testes pela PCR; outro exemplar co-infectado com ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e *M. haemofelis* tornou-se negativo somente para esse último agente em amostra colhida dois meses após a primeira avaliação e, finalmente, outro felídeo tornou-se negativo para ambos agentes ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e *M. haemofelis* após 11 meses da primeira avaliação. Um dos animais avaliados não apresentou alteração de diagnóstico durante os 2 anos de acompanhamento (WILLI et al., 2007c).

Os autores ressaltam que o diagnóstico negativo de *M. haemofelis* no exemplar supra mencionado, ou em qualquer outro felídeo, não indica eliminação do agente e pode ocorrer devido às flutuações de parasitemia que são típicas dessa espécie de hemoplasma. No entanto, o resultado negativo, pela PCR, de ‘*Candidatus M. haemominutum*’ observado nos dois *L. pardinus* pode ser, de fato, resultante da eliminação do agente do organismo animal, visto que já foi observada a eliminação dessa espécie de hemoplasma em gatos domésticos (WILLI et al., 2007c).

A análise filogenética demonstrou que as três espécies de hemoplasmas diagnosticadas nesses felídeos selvagens apresentaram 97% de homologia em relação às mesmas espécies de hemoplasmas em gatos domésticos. Esse fato

sugere a possibilidade de transmissão (via artrópodes hematófagos) de isolados de hemoplasmas entre felinos domésticos e selvagens (WILLI et al., 2007c).

Até recentemente, o diagnóstico de micoplasmose hemotrópica baseava-se na visualização de hemoplasmas nos esfregaços sanguíneos. Entretanto, a sensibilidade deste método é baixa (< 20%), além da especificidade da técnica ser duvidosa, já que hemoplasmas são freqüentemente confundidos com precipitados de corantes ou corpúsculos de Howell- Jolly (TASKER e LAPPIN, 2002; TASKER et al., 2003b). O diagnóstico pelo esfregaço sanguíneo também pode resultar em muitos resultados falso-negativos, devido ao caráter cíclico de alguns hemoplasmas - notoriamente *M. haemofelis* - e pelo fato do corante de EDTA induzir o desprendimento do hemoparasita do eritrócito (TASKER e LAPPIN, 2002; SYKES, 2003).

Assim, o método de escolha para o diagnóstico de hemoplasmas, atualmente, é a PCR, visto que essa técnica é extremamente sensível e específica, capaz de amplificar fragmentos de DNA do parasita (TASKER e LAPPIN, 2002; WILLI et al., 2007b). Muitos PCR convencionais já foram descritos, inclusive a RFLP-PCR que permite a diferenciação entre as espécies *M. haemofelis* e '*Candidatus M. haemominutum*' pela ação de duas enzimas de restrição (CRIADO-FORNÉLIO et al., 2003a).

No entanto, '*Candidatus M. turicensis*' não é distinguida de *M. haemofelis* com as técnicas supracitadas. Assim, uma PCR em tempo real foi desenvolvida para diferenciar as três espécies de hemoplasmas (WILLI et al., 2006a). Porém, apesar dessa técnica ser vantajosa por ser quantitativa, altamente específica e ter pouco risco de contaminação com produtos prévios da PCR (WILLI et al., 2007b), ela permanece ainda cara e está restrita a apenas alguns laboratórios.

Como alternativa a PCR em tempo real, Fujihara et al. (2007) padronizaram uma Nested-PCR específica para cada espécie de hemoplasma. A Nested- PCR é uma reação em cadeia da polimerase (PCR) que amplifica uma seqüência interna de um fragmento previamente amplificado. Assim, ela consiste de uma PCR inicial seguida por outra PCR (Nested-PCR). Deve-se observar que a Nested-PCR é

mais sensível que a PCR na detecção de patógenos, como demonstrado por Cavalcante (2007).

É importante considerar que uma PCR (ou Nested-PCR) positiva deve ser interpretada em conjunto com os achados clínicos e laboratoriais, visto que animais cronicamente infectados podem não exibir quaisquer sinais clínicos da micoplasmose hemotrópica felina. Da mesma forma, resultados negativos de PCR (ou Nested-PCR) não excluem infecção crônica, pelo caráter cíclico da infecção (TASKER, 2006).

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Detectar a ocorrência de hemoparasitas em felídeos neotropicais nascidos em vida livre.

Objetivos específicos:

1- Detectar a presença dos hemoparasitas *Babesia* spp., *Cytauxzoon* spp., *Hepatozoon* spp., *Mycoplasma haemofelis*, 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' e 'Candidatus Mycoplasma turicensis' em espécies de felídeos neotropicais, por observação direta - em esfregaço sanguíneo - e por técnicas moleculares;

2- Caracterizar geneticamente os hemoparasitas encontrados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram examinados 31 exemplares de felídeos neotropicais das espécies *L. pardalis* (jaguaririca), *L. tigrinus* (gato do mato pequeno), *L. wiedii* (gato do mato médio ou gato maracajá), *P. yagouaroundi* (gato mourisco ou jaguarundi) e *P. concolor* (onça parda, puma ou suçuarana) procedentes dos Estados do Pará, Maranhão, Piauí, Ceará e Minas Gerais (Tabela 1).

A quase totalidade desses animais (30/31) nasceu em vida livre e é resultante de apreensões do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) nos Estados supramencionados. No momento de coleta, esses animais estavam distribuídos em diferentes locais: “Centro de Triagem de Animais Silvestres” (CETAS) do IBAMA em São Luis (MA), Zoológico Sargento Prata e Parque Eco-Point (ambos em Fortaleza, CE), Zoológico de Canindé (em São Francisco do Canindé, CE), Zoofit (em Santarém, PA) e Fundação Zôo – Botânica de Belo Horizonte (MG). Os animais localizados no CETAS de São Luis fazem parte de um programa de reintrodução de felinos na natureza. Este programa faz parte de um projeto multidisciplinar intitulado “Projeto Gatos do Mato-Brasil” e envolve diversas pesquisas que estão sendo desenvolvidas em todos os biomas brasileiros, com a finalidade de ampliar o conhecimento sobre a ecologia, biologia, nutrição, genética e sanidade dos felídeos neotropicais.

TABELA 1. Lista dos felídeos neotropicais utilizados para a coleta de material biológico e diagnóstico de hemoparasitas. Os animais estão listados de acordo com a respectiva espécie, sexo, idade estimada, origem (Estado) e procedência (nascido em vida livre ou em cativeiro).

| ESPÉCIE | SEXO | IDADE ESTIMADA | ORIGEM | PROCEDÊNCIA |
|---------------------------|-------|----------------|--------|-------------|
| <i>Leopardus pardalis</i> | Macho | Adulto | MA | Vida livre |
| <i>Leopardus pardalis</i> | Macho | Adulto | MA | Vida livre |
| <i>Leopardus pardalis</i> | Macho | Adulto | MA | Vida livre |
| <i>Leopardus pardalis</i> | Macho | Adulto | MA | Vida livre |
| <i>Leopardus pardalis</i> | Fêmea | Adulto | MA | Vida livre |
| <i>Leopardus pardalis</i> | Fêmea | Adulto | MA | Vida livre |
| <i>Leopardus pardalis</i> | Fêmea | Adulto | MA | Vida livre |
| <i>Leopardus tigrinus</i> | Macho | Juvenil | MA | Vida livre |
| <i>Leopardus tigrinus</i> | Fêmea | Juvenil | MA | Vida livre |
| <i>Puma yagouaroundi</i> | Fêmea | Adulto | MA | Vida livre |
| <i>Puma yagouaroundi</i> | Macho | Juvenil | MA | Vida livre |
| <i>Leopardus wiedii</i> | Fêmea | Adulto | MA | Vida livre |
| <i>Leopardus tigrinus</i> | Fêmea | Juvenil | PI | Vida livre |
| <i>Leopardus tigrinus</i> | Fêmea | Juvenil | PI | Vida livre |
| <i>Leopardus tigrinus</i> | Macho | Juvenil | PI | Vida livre |
| <i>Leopardus tigrinus</i> | Macho | Juvenil | PI | Vida livre |
| <i>Leopardus tigrinus</i> | Macho | Juvenil | PI | Vida livre |
| <i>Puma yagouaroundi</i> | Fêmea | Adulto | CE | Vida livre |
| <i>Puma yagouaroundi</i> | Fêmea | Adulto | CE | Vida livre |
| <i>Puma yagouaroundi</i> | Fêmea | Adulto | CE | Vida livre |
| <i>Puma yagouaroundi</i> | Fêmea | Adulto | CE | Vida livre |
| <i>Puma yagouaroundi</i> | Macho | Adulto | CE | Vida livre |
| <i>Puma yagouaroundi</i> | Macho | Adulto | CE | Vida livre |
| <i>Leopardus pardalis</i> | Fêmea | Adulto | CE | Vida livre |
| <i>Leopardus pardalis</i> | Fêmea | Adulto | CE | Vida livre |
| <i>Leopardus pardalis</i> | Macho | Adulto | CE | Vida livre |
| <i>Leopardus tigrinus</i> | Macho | Adulto | CE | Vida livre |
| <i>Leopardus tigrinus</i> | Macho | Adulto | CE | Vida livre |
| <i>Leopardus tigrinus</i> | Fêmea | Adulto | CE | Vida livre |
| <i>Puma concolor</i> | Macho | Juvenil | MG | Vida livre |
| <i>Leopardus pardalis</i> | Macho | Juvenil | PA | Cativeiro |

Nota: - MA = Maranhão, PI = Piauí, CE = Ceará, MG = Minas Gerais, PA = Pará.
 - Juvenil = animal com idade estimada menor do que 12 meses.

4.2 Captura dos animais

Além do objetivo específico de coleta de material para o presente estudo, os animais foram capturados e anestesiados com a finalidade de se realizar exame clínico, vermifugação e vacinação anual.

4.2.1 Contenção física dos animais

A contenção física foi precedida de jejum aproximado de 24 horas. Os animais foram capturados com auxílio de dardos anestésicos, cambões, puçás e/ou caixas de contenção.

O método utilizado de contenção física variou de acordo com os recintos. Na maioria das vezes usou-se o puçá para contenção física (Figura 1). Entretanto, alguns *L. pardalis* que se encontravam em gaiolas (temporariamente aguardando o término da construção de recintos próprios), foram contidos com o uso de cambão (Figuras 2 e 3). Dois *P. yagouaroundi* foram contidos com o uso de caixas de contenção (Figura 4).



FIGURA 1. Uso de puçá em exemplar de *Leopardus pardalis* fêmea localizada no Centro de Triagem de Animais Silvestres do IBAMA (CETAS/IBAMA) em São Luis, MA (fonte: Betina Metzger).



FIGURA 2. Uso de cambão em exemplar de *Leopardus pardalis* fêmea localizada no Centro de Triagem de Animais Silvestres do IBAMA (CETAS/IBAMA) em São Luis, MA (fonte: Betina Metzger).



FIGURA 3. Uso de cambão em exemplar de *Leopardus pardalis* macho localizado no Centro de Triagem de Animais Silvestres do IBAMA (CETAS/IBAMA) em São Luis, MA (fonte: Betina Metzger).



FIGURA 4. Uso de caixa de contenção em exemplar de *Puma yagouaroundi* macho, um pouco antes do animal ser anestesiado, Zoológico Sargento Prata, Fortaleza, CE (fonte: Betina Metzger).

4.2.2 Contenção química dos animais

Após adequada contenção física dos animais, estes foram anestesiados (Figura 5) com a combinação dos fármacos Cloridrato de Quetamina a 10% (Dopalen®, Agribands do Brasil Ltda., São Paulo), na dosagem de 10 mg/kg, e Cloridrato de Xilazina a 2% (Anasedan®, Agribands do Brasil Ltda., São Paulo), na dosagem de 2mg/kg, ambos utilizados pela via intramuscular. O volume das drogas aplicadas era inicialmente baseado no peso estimado de cada exemplar e, se necessário, era adicionado um maior volume de acordo com o peso real aferido após pesagem.



FIGURA 5. Exemplar de *Leopardus tigrinus* adulto macho, logo após contenção química, no Zoológico Sargento Prata, Fortaleza, Ceará (fonte: Betina Metzger).

4.3 Exame clínico

Após a imobilização química, os animais foram examinados e pesados. Os animais foram pesados e seu estado geral foi avaliado por meio da inspeção de pele e anexos, palpação abdominal, auscultação cárdio-pulmonar e inspeção da cavidade oral.

4.4 Coleta das amostras biológicas

Amostras sanguíneas de um a dois mL foram colhidas por meio da venopunção da jugular e/ou braquiocefálica (Figura 6), e transferidas a tubos contendo EDTA (BD, Vacutainer, New Jersey, USA). Imediatamente após a coleta de sangue, foram confeccionados esfregaços sanguíneos (quatro no total), tanto dessas amostras quanto dos vasos auriculares (ponta de orelha), obtidos com o auxílio de uma lanceta (figura 7). Os esfregaços foram posteriormente fixados em Metanol por 3 minutos e corados com Wright- Giemsa a 10% por 30 minutos.

As amostras sanguíneas foram identificadas e transportadas a uma temperatura de 4° C até a Universidade Estadual Paulista (IB/ Unesp - campus Botucatu) e armazenadas em freezer a - 20° C até o momento da extração do DNA.

Os ectoparasitas encontrados foram coletados e fixados em etanol 70%.



FIGURA 6. Procedimento de venopunção da braquiocefálica de um exemplar de *Leopardus pardalis* localizado no Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS/I BAMA) em São Luis, MA (fonte: Cristiane Pereira).



FIGURA 7. Procedimento de coleta de gota de sangue capilar, para realização de esfregaço sanguíneo de ponta de orelha, em exemplar de *Puma yagouaroundi* localizado no Zoológico Sargento Prata, Fortaleza, CE (fonte: Cristiane Pereira).

4.5 Reversão anestésica

Após o exame clínico e coleta de material biológico, os animais receberam os fármacos Yoimbina® e Doxapram®, ambos pela via intramuscular, com a finalidade de reversão e auxílio na recuperação anestésica, respectivamente. Os animais foram mantidos sob observação constante até completa recuperação anestésica (Figura 8).



FIGURA 8. Exemplar de *Leopardus pardalis* fêmea em seu recinto, no Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS/ IBAMA), São Luis (MA), após completa recuperação anestésica (fonte: Betina Metzger).

4.6 Diagnóstico parasitológico pela técnica de esfregaço sanguíneo

Dois esfregaços sanguíneos de sangue periférico e dois esfregaços de sangue capilar de cada exemplar foram examinados sob microscopia óptica, em aumento de 1000X, para o diagnóstico de hemoparasitos. A observação sistemática desses esfregaços foi feita aproximadamente em 100 campos microscópicos (SOARES et al., 2006). Foi usado o sistema computadorizado de análises (Leica®) para medir o hemoparasita encontrado, assim como para obter imagens.

4.7 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada incubando previamente o sangue com a enzima proteinase K durante 4 horas por 56° C (metodologia previamente descrita por RUBINI et al., 2005). Posteriormente, o DNA foi isolado a partir de alíquotas sanguíneas de 200µl, empregando o kit GFX® Genomic Blood DNA Purification (GE Healthcare), seguindo as recomendações do fabricante. Cada amostra de DNA foi eluída em 50 µl de tampão de TE.

4.8 Diagnóstico molecular de *Hepatozoon* spp.

4.8.1 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Um fragmento da região do gene 18S rRNA foi amplificado utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (ou “primers”) Hep F (5'-ATA-CAT-GAG-CAA-AAT-CTC-AAC-3') e Hep R (5'-CTT-ATT-ATT-CCA-TGC-TGC-AG-3') (INOKUMA et al., 2002), que correspondem às seqüências conservadas de *Hepatozoon* spp. A reação de amplificação foi realizada num total de 25 µl, contendo: 10 mM de Tris-HCl em ph 8.3, 50 mM de KCL, 1 mM de MgCl₂ (GE Healthcare), 0.2µl de dNTPs, 1.5 U de DNA taq polimerase (GE Healthcare), 1µM de cada primer e 5 ul do DNA extraído. O controle negativo da reação não continha DNA e o controle positivo usado foi um isolado de *Hepatozoon* sp. de cão doméstico no Brasil, diagnosticado por Rubini et al. (2005).

As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador Biometra thermal cycler (gradiente T), a 94°C por 3 minutos seguidos de 35 ciclos repetidos de 94°C por 1 minuto, 57°C por 2 minutos e 72°C por 2 minutos, seguidos por uma extensão final de 72°C por 7 minutos.

4.9 Diagnóstico molecular de Piroplasmas

4.9.1 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

A PCR utilizada amplificou fragmentos da região do gene 18S r RNA, de 293 a 318 pares de base, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores Bab F (5'-TGACACAGGGAGGTAGT-3') e Bab R (5'- CAACAAAATAGAACCAAAG -3'). Esse fragmento corresponde às seqüências conservadas do DNA das espécies de piroplasmas descritas na tabela 2. Esses oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados exclusivamente para amplificarem fragmentos de *Babesia* spp., *Cytauxzoon* spp. e *Theileria* sp.

Para o desenho do par de oligonucleotídeos, as seqüências selecionadas foram alinhadas utilizando-se o programa Clustal X (THOMPSON et al., 1997). A seguir, com a utilização do programa “Integrated DNA Technology” (IDT)

(<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>) verificou-se a temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos, além da formação de possíveis dímeros e “hairpins”.

A reação de amplificação foi padronizada para um volume final de 25 µL, contendo: 1 x Go Taq Colorless Mastermix (Promega®), 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 1 µl MgCl₂ 50 mM (Invitrogen®), 5 µL da amostra de DNA extraído e água ultrapura (MilliQ®) q.s.p..

As reações de PCR foram realizadas usando o termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf®, EUA) com os ciclos de temperatura programados para 95 °C por 5 minutos, 52 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos, seguidos por 35 ciclos repetidos de 94°C por 30 segundos, 52 °C por 20 segundos e 72 °C por 20 segundos, com uma temperatura de extensão final de 72 °C por 7 minutos.

Em todas as reações foi utilizado um controle negativo através da substituição do DNA da amostra por água ultrapura (MilliQ®). O controle positivo consistiu de um isolado de *Babesia canis vogeli* de cão doméstico no Brasil, diagnosticado por Lopes (2008) e também de um isolado de *Babesia canis rossi*, cedido pelo Professor Adjunto João Pessoa Araújo Júnior, do Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências, Unesp-Botucatu. As amostras utilizadas como controle positivo foram previamente seqüenciadas geneticamente, confirmando a especificidade da técnica.

TABELA 2. Espécies de piroplasmas, com seus respectivos números de acesso no GenBank, que foram utilizadas para o alinhamento, sendo este uma das etapas para a construção de oligonucleotídeos iniciadores que amplificam fragmentos da região do gene 18S r RNA, respectivos às seqüências conservadas de *Babesia* spp., *Cytauxzoon* spp. e *Theileria* sp.

| Espécie | Nº Genbak | Espécie | Nº Genbak |
|------------------------------------|-----------|-----------------------------------|-----------|
| <i>Babesia canis vogeli</i> Brazil | AY371196 | <i>Babesia canis canis</i> Europa | AY072926 |
| <i>Babesia</i> Okinawa | AY077719 | <i>Babesia felis</i> | AF965742 |
| <i>Babesia canis vogeli</i> USA | AY371198 | <i>Babesia leo</i> | AF244912 |
| <i>Babesia canis vogeli</i> Egypt | AY371197 | Gato Brasil | EF636702 |

| | | | |
|-----------------------------------|----------|-----------------------------|----------|
| <i>Babesia canis canis</i> Russia | AY649326 | <i>Babesia felis</i> | AF244912 |
| <i>Babesia canis canis</i> Europa | AY072926 | <i>Babesia</i> sp. | AF244913 |
| <i>Babesia</i> sp. | AF244914 | <i>Babesia canis vogeli</i> | AY072925 |
| <i>Babesia rodhaini</i> | M87565.1 | <i>Babesia okinawa</i> | AY077719 |
| <i>Babesia gibsoni</i> | AF175300 | <i>Babesia canis canis</i> | AY072926 |
| <i>Babesia</i> sp. | AF396748 | <i>Babesia canis vogeli</i> | DQ439545 |
| <i>Babesia</i> sp. <i>okinawa</i> | AF271082 | <i>Theileria</i> sp. | DQ866842 |
| <i>Babesia</i> sp. <i>israeli</i> | AY272047 | <i>Cytauxzoon felis</i> | AF399930 |
| <i>Babesia microti</i> | AB071177 | <i>Cytauxzoon felis</i> | L19080 |

4.10 Diagnóstico molecular de hemoplasmas

4.10.1 Reação em Cadeia de Polimerase associada a Análise do Comprimento do Fragmento Polimórfico (PCR- RFLP)

A PCR-RFLP é uma PCR associada à ação de enzimas de restrição nos fragmentos amplificados.

A PCR utilizou os oligonucleotídeos iniciadores HBT-F e HBT-R (CRIADO-FORNELIO et al., 2003b), cujas seqüências estão descritas na Tabela 3. Essa reação amplificou fragmentos da região do gene 16S r RNA, de 595 pares de base (pb) para *M. haemofelis* e 618 pb para 'Candidatus *M. haemominutum*'.

TABELA 3. Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores HBT-F e HBT-R

| Oligonucleotídeos iniciadores | Seqüência (5'-3') |
|-------------------------------|----------------------------|
| HBT-F | ATA CGG CCC ATA TTC CTA CG |
| HBT-R | TGC TCC ACC ACT TGT TCA |

Fonte: Criado-Fornelio et al., 2003b.

A reação foi padronizada para um volume final de 50 µL com 1 x de Go Taq Green mastermix (Promega®), 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 10 µL de DNA extraído e água ultrapura (MilliQ®) q.s.p. O controle negativo da reação

não continha DNA e o controle positivo foi um isolado de *M. haemofelis* de gato doméstico no Brasil, cedido pelo Dr. Thiago Neves Batista, do Laboratório de Microbiologia do Instituto de Biociências da Unesp-Botucatu. O controle positivo foi previamente seqüenciado confirmando a especificidade da técnica.

As reações de PCR foram realizadas usando o termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf®, EUA) com os ciclos de temperatura programados para 94 °C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos repetidos de 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos e 72 °C também por 30 segundos. Além de um ciclo final de 72 °C por 10 minutos para a extensão final.

Após a PCR e a visualização dos produtos amplificados pela eletroforese, foi realizada uma digestão dos produtos amplificados com duas enzimas de restrição, com a finalidade de distinguir entre duas espécies de hemoplasmas felinos: *M. haemofelis* e 'Candidatus *M. haemominutum*' (CRIADO-FORNÉLIO et al, 2003b). As endonucleases utilizadas foram: *HaeIII* (Invitrogen®), que promoveu um corte de três fragmentos (92, 203 e 301 bp) em *M. haemofelis* e nenhum corte em 'Candidatus *M. haemominutum*', e a *EcoRI* (Invitrogen®), que cortou 'Candidatus *M. haemominutum*' em dois fragmentos (269 e 349 bp) e não cortou o *M. haemofelis* (figura 9).

Para se obter uma ação ideal de ambas as enzimas seguiu-se o protocolo proposto por Davis (1994) com modificações, adicionando-se a 15 µL de DNA extraído, 1µL da enzima e 1,6 µL do tampão 10X de cada enzima (Invitrogen®). Após homogeneização em vórtex as amostras foram mantidas em banho-maria a 37 °C por uma hora.

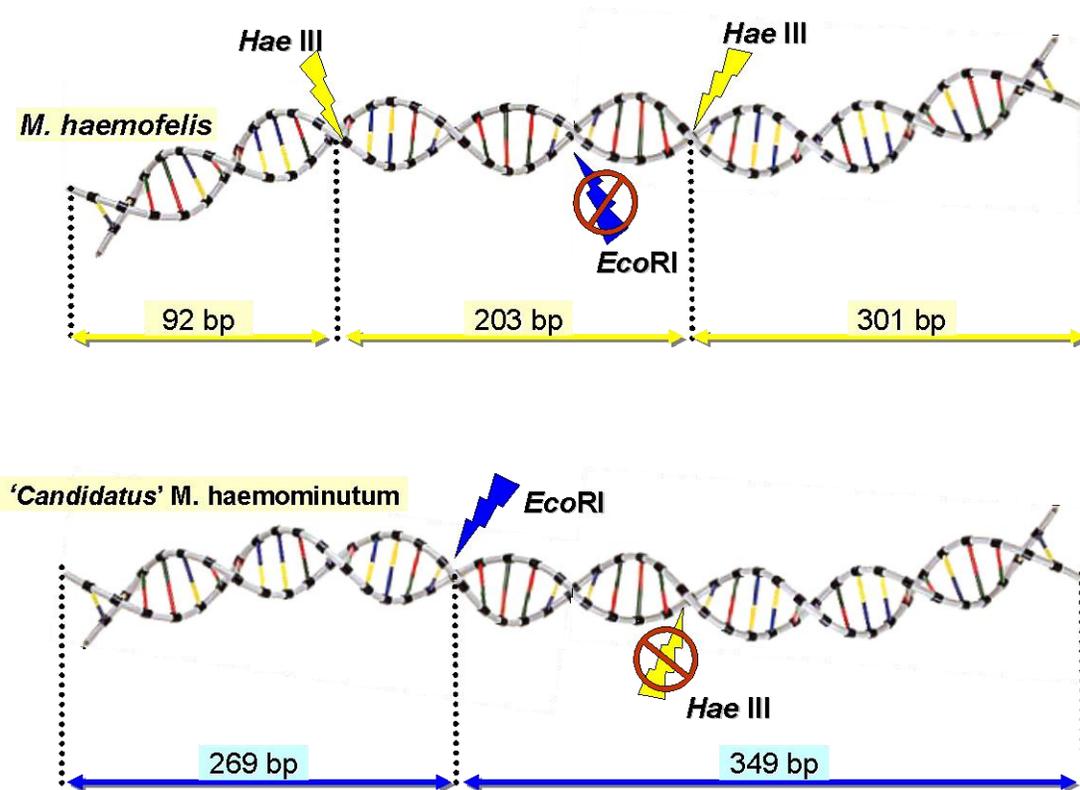


FIGURA 9. Figura ilustrativa da ação das enzimas de restrição *Hae* III e *Eco*RI sobre os produtos amplificados de *Mycoplasma haemofelis* e '*Candidatus* *Mycoplasma haemominutum*' (fonte: Dr. Thiago Neves Batista).

4.10.2 Nested- PCR

Com a finalidade de verificar a possível ocorrência de co-infecções pela espécie '*Candidatus M. turicensis*' que não pode ser diferenciada pela PCR- RFLP feita anteriormente foi feita uma Nested- PCR para cada uma das três espécies de hemoplasmas felinos, segundo protocolo descrito por Fujihara et al. (2007).

A PCR amplificou fragmentos da região do gene 16S r RNA, de 616 pares de base (pb) para *M. haemofelis*, 654 pb para '*Candidatus M. haemominutum*' e de 559 pb para '*Candidatus M. turicensis*'. Os oligonucleotídeos iniciadores usados na primeira reação da Nested- PCR estão descritos na Tabela 4.

TABELA 4. Seqüência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados na primeira fase da reação de Nested-PCR para hemoplasmas felinos.

| Oligonucleotídeos iniciadores | Seqüência (5- 3') |
|--------------------------------------|----------------------------|
| Mhfe F1 | TTA ATG CTG ATG GTA TGC CT |
| Mhfe R1 | TGC TTA ATT CCG AAA CTC CC |
| Mhmn F1 | GAT TAA TGC TGG TGG TAT GC |
| Mhmn R1 | CAT TGA ATT CCA GTA TCT CC |
| Mtrc F1 | GAA CTG TCC AAA AGG CAG TT |
| Mtrc R1 | TGA ATA GTA TTC GGC ACA AA |

Fonte: Fujihara et al., 2007.

A reação de amplificação foi realizada em 25 µl, contendo: 10 mM de Tris-HCl em pH 8,3; 50 mM de KCL; 2,5 µl de 10 X tampão; 1 U de DNA Taq polimerase (GE Healthcare); 4 µl de 2,5 mM de dNTP (trifosfato de desoxiribonucleotídeos); 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador; 2,5 µl do DNA extraído e água ultra-pura (MilliQ®) q.s.p. O controle negativo da reação não continha DNA e o controle positivo usado foi o mesmo isolado de *M. haemofelis* de gato doméstico previamente usado na PCR-RFLP.

As reações de PCR foram realizadas usando o termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf®, EUA) com os ciclos de temperatura programados para: 94 °C por 1 minuto, seguido por 30 ciclos repetidos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 2 minutos e 72 °C por 1 minuto, com uma temperatura de extensão final de 72°C por 5 minutos.

A Nested- PCR amplificou fragmentos de 272 pb para *M. haemofelis*, 403 pb para “Candidatus” *M. haemominutum* e de 319 pb para “Candidatus” *M. turicensis*. Os oligonucleotídeos iniciadores usados na Nested - PCR estão listados na Tabela 5.

TABELA 5. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na Nested-PCR

| Oligonucleotídeos iniciadores (Nested-PCR) | Seqüência (5- 3') |
|---|----------------------------|
| Mhfe F2 | GAT TAA TC CCC ATA GGA AG |
| Mhfe R2 | ACT ATC ATA ATT ATC CCT CG |
| Mhmn F2 | TAC TCT CTT AGT GGC GAA CG |
| Mhmn R2 | AAT CAA GGC TTA ATC ATT TC |
| Mtrc F2 | TAA TGT CCT ATA GTA TCC TC |
| Mtrc R2 | TGC TGT CAC TTA TTC AGA GG |

Fonte: Fujihara et al., 2007.

Essa reação teve um volume final de 25 μ l, sendo utilizado 0,5 μ l do produto amplificado pela PCR. Os componentes dessa reação foram iguais aos da primeira reação (PCR) diferenciando-se apenas pelos oligonucleotídeos iniciadores utilizados. A programação dos ciclos das temperaturas também foi igual ao da PCR.

Entretanto, os cuidados com a esterilização e a manipulação a fim de se evitar a contaminação com os produtos previamente amplificados (ou “amplicons”), que também é conhecida como “carry over”, foram muito mais exacerbados e rigorosos quando comparados aos cuidados da PCR.

As reações foram preparadas em sala específica para manipulação de reagentes da PCR, previamente esterilizada por 30 a 40 minutos (ao invés de 15 minutos), com o uso de ultravioleta e hipoclorito de sódio a 10% em todas superfícies e equipamentos utilizados. O tratamento com ultravioleta incluiu luvas de procedimento, tubos e microtubos de PCR, ponteiros de filtro e pipetas. Os produtos da PCR foram manipulados no interior de capela de fluxo laminar, previamente esterilizada como já descrito.

A manipulação de todos os reagentes e produtos da PCR foi feita com extrema cautela; microtubos contendo produtos de PCR permaneciam sempre tampados e eram abertos somente no momento da pipetagem. Após a manipulação com cada tubo, as luvas eram imediatamente borrifadas com

hipoclorito de sódio a 10% e secas com gases estéreis. Eram usados somente microtubos de 0,2 ul individuais e não em conjunto de oito (ou “strips”), como geralmente usado em outras reações. Os tubos contendo produto da PCR permaneciam dispostos bem distantes uns dos outros, e em suporte diferente do suporte contendo os novos microtubos. Cada reação continha um número reduzido de amostras (máximo de 15) possibilitando essa distância e uma maior cautela na manipulação.

Além disso, foram sempre utilizados três controles negativos que não continham DNA, cada qual referente a um par de oligonucleotídeo iniciador, para cada espécie de hemoplasma felino.

4.11 Eletroforese em gel de agarose

Alíquotas de 8 µl de cada produto obtido na amplificação pelas técnicas moleculares utilizadas foram analisadas em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio (1 µg/mL). A eletroforese ocorreu a 80V por 30 minutos em tampão de TAE e a visualização dos produtos se deu utilizando um transluminador UV. Os fragmentos amplificados foram estimados comparativamente com marcadores de DNA (peso molecular) de 100 pares de bases (Invitrogen®). Foram considerados positivos os fragmentos que apresentaram banda de tamanho específico e compatível com o produto amplificado por cada reação. As imagens obtidas foram documentadas utilizando-se equipamento de fotodocumentação (Major Science UVDI ®).

4.12 Sequenciamento

O restante dos produtos foi purificado utilizando-se a enzima ExoSAP® IT (GE Healthcare), de acordo com as recomendações do fabricante. A reação de purificação se deu em termociclador (Invitrogen®), durante 1 hora a 37° C seguido de 20 minutos a 80° C.

O sequenciamento dos produtos amplificados pela PCR foi feito usando o “ABI Prism BigDye® v.3.1 Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A reação de amplificação continha 4 µl de DNA purificado combinado com 3.2 pmol de oligonucleotídeo (sense ou anti-sense), juntamente com 2 µl de BigDye™ e 6 µl de tampão 5X (400 mM Tris-HCL ph 9,0, 10 mM MgCl₂), totalizando uma reação de volume final de 20 µl.

As reações de sequenciamento foram realizadas em termociclador Whatman Biometra® (T Gradient) com os ciclos de temperatura programados para: 40 ciclos de 96 ° C por 10 segundos, 50 ° C por 5 segundos, 60 ° C por 4 minutos, com rampa de 1 ° C/ segundo, como recomendado pelo fabricante.

Após a reação de sequenciamento, foi realizada a precipitação do DNA amplificado. Adicionou-se de 80 µl de isopropanol a 65% em cada reação, em seguida as amostras foram encubadas por 25 minutos em temperatura ambiente e centrifugadas à velocidade de 10.500 rpm por 20 minutos a 23 ° C. O isopropanol foi removido invertendo-se os tubos em papel toalha e adicionou-se 200 µl de etanol a 70%. As amostras foram encubadas por 5 minutos em temperatura ambiente e centrifugadas por mais 5 minutos à velocidade de 10.500 rpm a 23 ° C. Desprezou-se todo etanol com o auxílio de uma micropipeta e as amostras foram encubadas por 1 hora, para secagem completa, em temperatura ambiente e local escuro. Posteriormente, o DNA foi eluído em 2 µl de tampão de amostra contendo Hi-Di™ (Applied Biosystems) e Loading buffer (25 mM EDTA pH 8,0 contendo 50 mg/ml Blue Dextran; 5:1).

No momento prévio à aplicação no seqüenciador “ABI PRISM® 377 DNA Sequencer” (Applied Biosystems, EUA), as amostras foram aquecidas a 95 ° C por 5 minutos e rapidamente transferidas para o gelo. Pelo menos dois produtos de PCR de diferentes amplificações foram seqüenciados em duplicata em ambas direções para cada infecção.

4.13 Análise filogenética

As seqüências consensos foram obtidas através da análise das seqüências senso e antisenso utilizando o programa MERGER (<http://bioweb.pasteur.fr/segana/alignment/intro-uk.html>). O programa CLUSTAL W (THOMPSON et al., 1997) foi usado para o alinhamento. As seqüências foram submetidas à pesquisa de homologia com outras seqüências depositadas no GenBank, utilizando-se o programa BLASTn ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)). Posteriormente, as seqüências foram sujeitas a análise filogenética com o uso do software Molecular Evolutionary Genetics (MEGA, version 3.0) (KUMAR et al., 2004).

O método de Neighbor-Joining (NJ) foi usado para a construção da árvore filogenética (SAITOU e NEI, 1987) usando a distância gamma (modelo de parâmetro Kimura 2), com o parâmetro de gamma sendo $a = 1$. O teste de “bootstrap” com 1000 replicações foi aplicado para estimar a confiança dos “branching patterns” da árvore (FELSENSTEIN, 1985). Nodos com valores de “bootstrap” inferiores a 50% não foram mostrados já que eles não apóiam o teste.

Os isolados usados para construir a árvore filogenética de *Hepatozoon* sp., *Cytauxzoon felis* e hemoplasmas estão na Tabela 6, 7 e 8, respectivamente.

TABELA 6. Espécies de protozoários utilizados para construção da árvore filogenética de *Hepatozoon* sp. e seus respectivos números de acesso no GenBank.

| Espécie | Nº Genbak | Espécie | Nº Genbak |
|--|-----------|---|-----------|
| <i>Hepatozoon</i> sp. (Spain1-domestic cat) | AY 620232 | <i>Hepatozoon canis</i> (Brazil cat -1) | DQ 315565 |
| <i>Hepatozoon</i> sp. (Spain 2-domestic cat) | AY 628681 | <i>Hepatozoon canis</i> (Brazil cat -2) | DQ 315566 |
| <i>Hepatozoon canis</i> (Fukuoka) | AF 418558 | <i>Hepatozoon canis</i> (Brazil HEP-4) | DQ 198378 |
| <i>Hepatozoon canis</i> (Spain 1-fox) | AY 150067 | <i>Hepatozoon canis</i> (Brazil HEP-16) | DQ 198379 |
| <i>Hepatozoon americanum</i> | AF 176836 | <i>Hepatozoon</i> sp. (bank- vole 1) | AY 600626 |
| <i>Hepatozoon</i> sp. (Brazil1- <i>Hepatozoon</i> neotropical felid isolate 1) | EU 028344 | <i>Hepatozoon</i> sp. (bank- vole 2) | AY 600625 |
| <i>Hepatozoon</i> sp.(Brazil 2- <i>Hepatozoon</i> neotropical felid isolate 2) | EU 267606 | <i>Hepatozoon catesbiana</i> | AF 176836 |
| <i>Babesia rodhaini</i> | M 87565 | | |

TABELA 7. Espécies de protozoários utilizados para construção da árvore filogenética de *Cytauxzoon felis* e seus respectivos números de acesso no GenBank

| Espécie | Nº Genbak | Espécie | Nº Genbak |
|---|------------|---|------------|
| <i>Babesia felis</i> | AF244912 | <i>Cytauxzoon felis</i> - <i>Puma concolor</i> | EU376526.1 |
| <i>Babesia canis vogeli</i> | EF636702.1 | <i>Cytauxzoon</i> sp. - <i>Felis catus</i> | AY309956.1 |
| <i>Cytauxzoon felis</i> - <i>Leopardus tigrinus</i> | DQ382277.1 | <i>Babesia canis rossi</i> | DQ111760.1 |
| <i>Cytauxzoon felis</i> - <i>Panthera onca</i> | EU376527.1 | <i>Cytauxzoon felis</i> - <i>Leopardus pardalis</i> | EU376525.1 |

TABELA 8. Espécies de protozoários utilizados para construção da árvore filogenética de hemoplasmas felinos e seus respectivos números de acesso no GenBank

| Espécie | Nº Genbak | Espécie | Nº Genbak |
|--|------------|---|------------|
| ' <i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> ' - <i>Leopardus pardalis</i> | DQ825448.1 | ' <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ' – <i>Leopardus wiedii</i> | DQ825440.1 |
| <i>Mycoplasma haemofelis</i> - <i>Felis catus</i> Brazil | EU930823 | ' <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ' – <i>Leopardus tigrinus</i> | DQ825439.1 |
| ' <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ' - <i>Felis catus</i> – SA (South Africa) | AY150979.1 | | |

4.14 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada nos programas computacionais Minitab Release - versão 13.0 e GraphPad InStat - versão 3.06. As variáveis analisadas foram: sexo, idade, espécies de felídeos, origem (Estado) e sensibilidade diagnóstica entre as técnicas usadas.

Para tabelas de contingência 2 x 2 utilizou-se o Teste Exato de Fisher (quando a frequência esperada nas células foi < 5) ou o Teste de Qui-quadrado (quando a frequência esperada nas células foi ≥ 5). Para as tabelas de contingência 3 x 2 foi usado o Teste de Qui-quadrado. Em ambos os testes as diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Exame clínico e presença de ectoparasitas

O exame clínico revelou que 90,3% (28/31) dos animais não apresentaram sinais sugestivos de enfermidades, apresentando condições corpóreas consideradas de regulares a boas, pelames de aspectos saudáveis, mucosas oculares e orais normocoradas. Nesses animais foram observados apenas graus leves de deposição de tártaro e, em apenas um felídeo, a perda de um dente incisivo.

Entretanto, três animais (3/31- 0,7%) apresentaram os seguintes sinais clínicos; um exemplar de *P. yagouaroundi*, fêmea, adulta, proveniente do Ceará, apresentou mucosas hipocoradas e extensa rarefação pilosa (Figura 10); um outro exemplar de *P. yagouaroundi*, macho, adulto, proveniente do mesmo estado, apresentou intensa gengivite e por fim, um exemplar de *P. concolor*, macho, juvenil, recém capturado da natureza, proveniente de Minas Gerais, apresentou grau leve de desidratação, mucosas hipocoradas e má condição corpórea (magreza).

Em relação à presença de ectoparasitas, estes foram encontrados somente em 9,7% (3/31) dos exemplares. O *P. yagouaroundi* supramencionado e um exemplar da mesma espécie apresentaram infestações maciças por pulgas (Figura 11), além do exemplar de *P. concolor* que apresentou alta infestação por carrapatos. Os ectoparasitas não foram identificados.



FIGURA 10. Exemplar de *Puma yagouaroundi* fêmea apresentando rarefação pilosa em grandes extensões do corpo. Animal localizado no Zoológico Sargento Prata em Fortaleza, Ceará (fonte: Betina Metzger).



FIGURA 11. Exemplar de *Puma yagouaroundi* fêmea apresentando rarefação pilosa em grandes extensões do corpo com intensa infestação de pulgas. Animal proveniente do Zoológico Sargento Prata, Fortaleza, CE (fonte: Betina Metzger).

5.2 Diagnóstico parasitológico pela técnica de esfregaço sanguíneo

A observação do esfregaço sanguíneo sob microscopia óptica revelou que, dos 31 felídeos neotropicais examinados, somente dois animais apresentaram hemoparasitas (2/31-6,45%). Um exemplar (3,2%) de *L. pardalis* (fêmea adulta proveniente do Maranhão) apresentou um único gamonte de *Hepatozoon* sp. parasitando um leucócito. Esse gamonte foi encontrado em esfregaço de sangue capilar (proveniente de vaso auricular) e apresentava formato oval, citoplasma de aparência homogênea, cápsula visível e núcleo grande deslocado para uma das extremidades. Suas medidas foram: 7,43 μm de comprimento, 4,23 μm de largura e 26,95 μm de área (Figura 12).

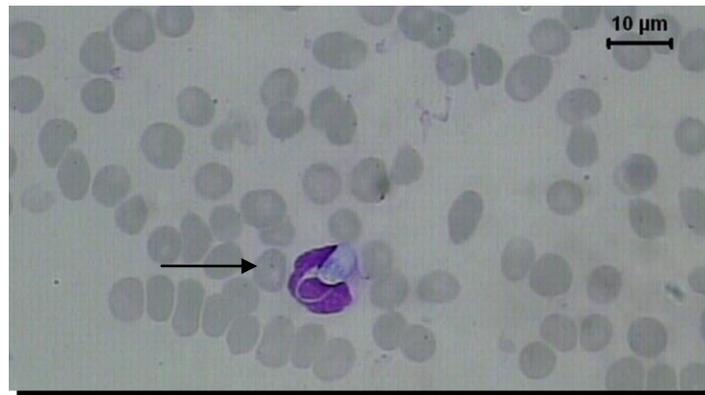


FIGURA 12. Gamete de *Hepatozoon* sp. em neutrófilo de um exemplar fêmea de *Leopardus pardalis* (proveniente do Maranhão), visualizado em esfregaço sanguíneo corado por Giemsa a 10% (fonte: Betina Metzger).

Outro exemplar, o macho juvenil de *P. concolor*, apresentou diversas inclusões eritrocitárias de piroplasmas (Figura 13) em esfregaço sanguíneo de veia jugular (nesse exemplar não foi realizado esfregaço de sangue capilar).

A pesquisa de organismos morfologicamente e tintorialmente sugestivos de hemoplasmas demonstrou-se negativa.

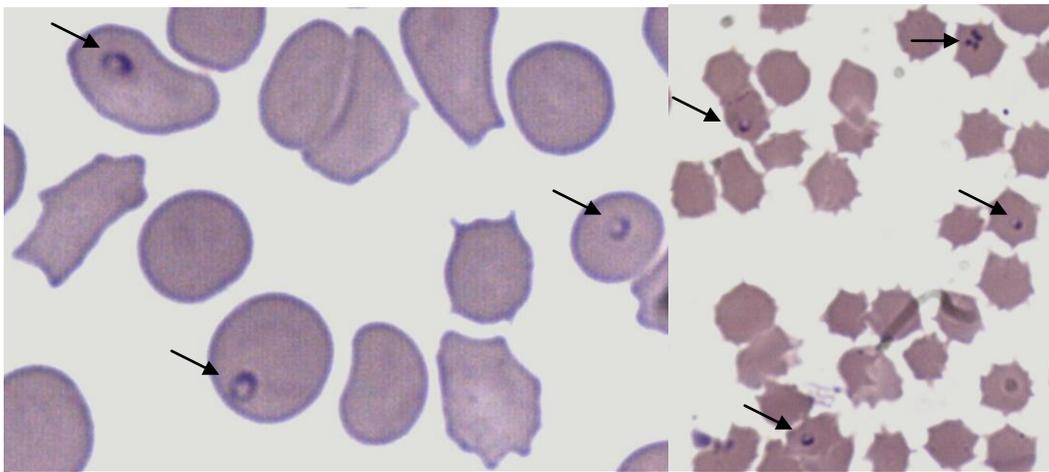


FIGURA 13. Fotomicrografia de diversas inclusões eritrocitárias de piroplasmas (indicados pelas setas) em esfregaço sanguíneo, corado por Giemsa a 10% (aumento de 1000X), de um exemplar de *Puma concolor* juvenil, macho, recém capturado da natureza, proveniente de Minas Gerais (fonte: Betina Metzger).

5.3 Diagnóstico molecular de *Hepatozoon* spp.

5.3.1 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Utilizando-se a PCR, das 31 amostras analisadas, 16,1% (5/31) foram positivas para *Hepatozoon* spp., inclusive a amostra do animal positivo no esfregaço sanguíneo (1/31). O fragmento de amplificação tinha aproximadamente 625 pares de bases (Figura 14). Dos cinco animais positivos, quatro (80% - 4/5) eram *L. pardalis* adultos (uma fêmea e um macho do Maranhão e duas fêmeas do Ceará) e um (20% - 1/5) era *L. tigrinus* (macho adulto do Ceará) (Tabela 9).

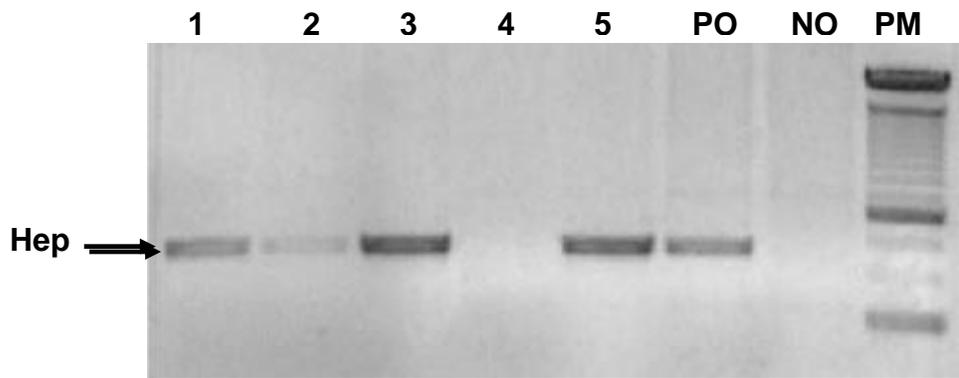


FIGURA 14. Visualização da amplificação dos produtos da PCR do fragmento do gene 18S rRNA de *Hepatozoon* sp., após eletroforese em gel de agarose. Colunas 1, 2, 3, 5 são positivas para *Hepatozoon* sp. Coluna 4 é uma amplificação negativa. PO é o controle positivo de *Hepatozoon* sp. NO é o controle negativo da reação. PM é o marcador de peso molecular (de 250 pares de base) (Invitrogen®).

TABELA 9. Ocorrência de hemoparasitas em felídeos neotropicais nascidos em vida livre, diagnosticados pela utilização de técnicas moleculares e pela técnica da visualização em esfregaço sanguíneo. Os animais estão listados em relação à espécie, sexo, idade estimada e origem.

| Espécie | Sexo | Idade | Origem | <i>Hemoplasmas Felinos Hepatozoon spp. Piroplasmas Hemoparasitas</i> | | | | |
|---------------------------|------|---------|--------|--|------------|-----|-----|-----------------------|
| | | | | PCR-RFLP | Nested-PCR | PCR | PCR | Esfregaço sanguíneo |
| <i>Leopardus pardalis</i> | M | Adulto | MA | - | Mhf | - | - | - |
| <i>Leopardus pardalis</i> | M | Adulto | MA | CMhm | CMhm | - | - | - |
| <i>Leopardus pardalis</i> | M | Adulto | MA | CMhm | CMhm | - | - | - |
| <i>Leopardus pardalis</i> | M | Adulto | MA | - | - | + | - | - |
| <i>Leopardus pardalis</i> | F | Adulto | MA | - | - | - | - | - |
| <i>Leopardus pardalis</i> | F | Adulto | MA | Mhf/ CMhm | Mhf/ CMhm | + | - | <i>Hepatozoon</i> sp. |
| <i>Leopardus pardalis</i> | F | Adulto | MA | Mhf/ CMhm | Mhf/ CMhm | - | - | - |
| <i>Leopardus wiedii</i> | F | Adulto | MA | - | Mhf | - | - | - |
| <i>Leopardus tigrinus</i> | M | Juvenil | MA | - | - | - | - | - |
| <i>Leopardus tigrinus</i> | F | Juvenil | MA | - | - | - | - | - |
| <i>Puma yagouarondi</i> | F | Adulto | MA | CMhm | CMhm | - | - | - |
| <i>Puma yagouarondi</i> | M | Juvenil | MA | - | - | - | - | - |
| <i>Leopardus tigrinus</i> | F | Juvenil | PI | - | - | - | - | - |
| <i>Leopardus tigrinus</i> | F | Juvenil | PI | - | - | - | - | - |
| <i>Leopardus tigrinus</i> | M | Juvenil | PI | - | - | - | - | - |
| <i>Leopardus tigrinus</i> | M | Juvenil | PI | - | - | - | - | - |
| <i>Leopardus tigrinus</i> | M | Juvenil | PI | - | - | - | - | - |
| <i>Puma yagouarondi</i> | M | Adulto | CE | - | - | - | - | - |
| <i>Puma yagouarondi</i> | M | Adulto | CE | - | Mhf | - | - | - |
| <i>Puma yagouarondi</i> | F | Adulto | CE | - | - | - | - | - |
| <i>Puma yagouarondi</i> | F | Adulto | CE | - | - | - | - | - |
| <i>Puma yagouarondi</i> | F | Adulto | CE | - | - | - | - | - |
| <i>Puma yagouarondi</i> | F | Adulto | CE | - | - | - | - | - |
| <i>Leopardus pardalis</i> | M | Adulto | CE | Mhf/ CMhm | Mhf/ CMhm | - | - | - |
| <i>Leopardus pardalis</i> | F | Adulto | CE | - | - | + | - | - |
| <i>Leopardus pardalis</i> | F | Adulto | CE | CMhm | CMhm | + | - | - |
| <i>Leopardus tigrinus</i> | M | Adulto | CE | - | Mhf | + | - | - |
| <i>Leopardus tigrinus</i> | M | Adulto | CE | - | - | - | - | - |
| <i>Leopardus tigrinus</i> | F | Adulto | CE | - | - | - | - | - |
| <i>Puma concolor</i> | M | Juvenil | MG | - | Mhf | - | + | Piroplasmas |
| <i>Leopardus pardalis</i> | M | Juvenil | PA | - | - | - | - | - |

Nota: - M = Macho; F = Fêmea
 - Juvenil = animal com idade estimada menor do que 12 meses.
 - MA = Maranhão, PI = Piauí, CE = Ceará, MG = Minas Gerais, PA = Pará.
 - Mhf = *Mycoplasma haemofelis*, CMhm = '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*'.

5.4 Diagnóstico molecular de Piroplasmas

5.4.1 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Utilizando-se a PCR, nas 31 amostras sanguíneas, somente uma (1/31; 3,2%) foi positiva para piroplasma (Tabela 9). Essa amostra pertence ao exemplar juvenil de *P. concolor* que também apresentou piroplasmas visualizados no esfregaço sanguíneo. Como o fragmento de amplificação tinha tamanho levemente maior do que o fragmento amplificado das amostras de *B. canis vogeli* e *B. canis rossi*, utilizadas como controles positivos, houve uma alta indicação de que se tratava de *Cytauxzoon* sp.. Deve ser ressaltado que os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR foram desenhados para amplificarem fragmentos de 293 a 318 pares de base, equivalentes, respectivamente, a *B.canis* e *Cytauxzoon* sp. (Figura 15).

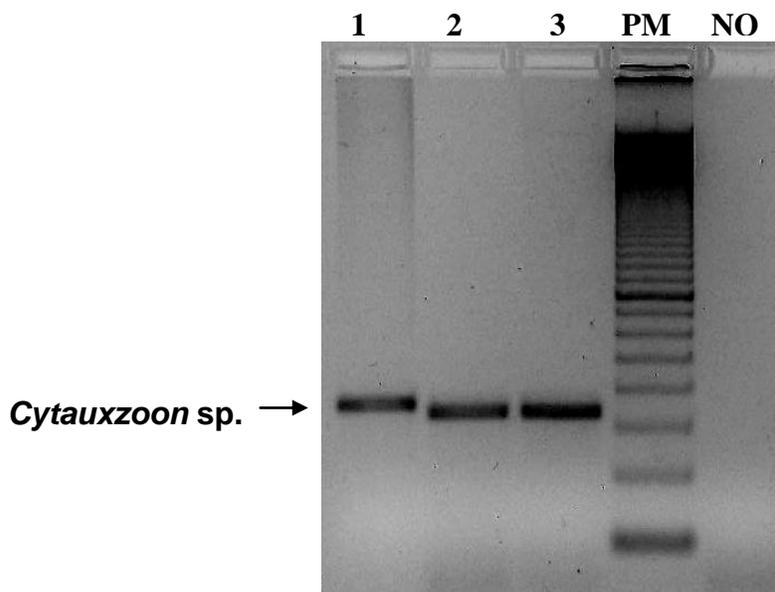


FIGURA 15. Visualização da amplificação dos produtos da PCR dos fragmentos do gene 18S rRNA de *Cytauxzoon* sp., *Babesia canis rossi* e *Babesia canis vogeli*, após eletroforese em gel de agarose. Coluna 1 é positiva para *Cytauxzoon* sp., colunas 2 e 3 são controles positivos, respectivamente, para *Babesia canis rossi* e *Babesia canis vogeli*. PM é o marcador de peso molecular, de 100 pares de base (Amersham, Biosciences®). NO é o controle negativo da reação.

5.5 Diagnóstico molecular de hemoplasmas

5.5.1 Reação em Cadeia da Polimerase associada à Análise do Comprimento do Fragmento Polimórfico (PCR- RFLP)

Pela técnica de PCR-RFLP foram diagnosticados sete animais positivos para hemoplasmas felinos (22,6% - 7/31), sendo seis *L. pardalis* (19,35% - 6/31) e um *P. yagouaroundi* (3,22% - 1/31). Dentre os seis *L. pardalis* (6/31) positivos, dois *L. pardalis* estavam também co-infectados com *Hepatozoon* sp. (Tabela 9). O fragmento amplificado tinha aproximadamente 650 pares de base (Figura 16).

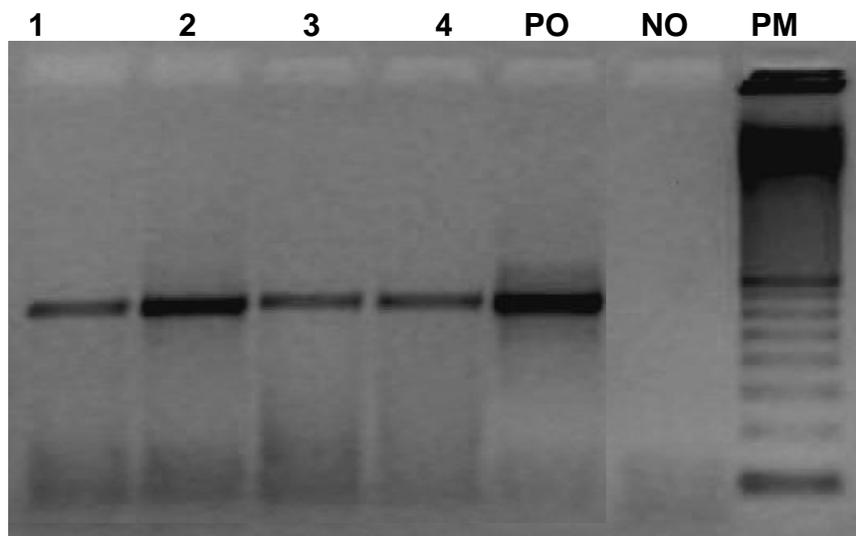


Figura 16. Visualização da amplificação dos produtos da PCR dos fragmentos do gene 16S rRNA de hemoplasmas felinos após eletroforese em gel de agarose. Coluna de 1 a 4 são amplificações positivas para hemoplasmas felinos. PO é o controle positivo. NO é o controle negativo da reação. PM é o marcador de peso molecular, de 100 pares de base.

A ação das enzimas *ECO*- R1 e *HAE* III nos produtos amplificados pela PCR revelou que, dos sete exemplares positivos (7/31- 22,5%), três *L. pardalis* (3/7- 42,86%) apresentavam co-infecção por ambos *M. haemofelis* e ‘*Candidatus M. haemominutum*’ (fragmentos amplificados sofreram a ação de ambas enzimas) e os outros quatro animais (três *L. pardalis* e um *P. yagouaroundi*) (4/7- 57,1%) apresentavam-se infectados somente com ‘*Candidatus M. haemominutum*’

(fragmentos amplificados sofreram ação exclusiva da *ECO R1*) (Figura 17; Tabela 9).

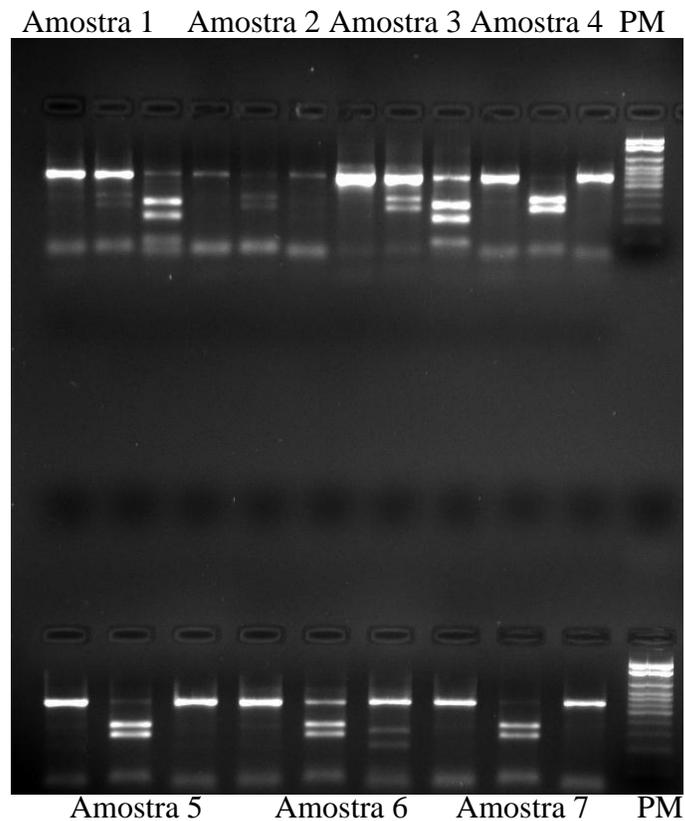


FIGURA 17. Foto do gel de agarose a 1,5% visualizado em transluminador ultra-violeta após a realização da PCR - RFLP nas sete amostras positivas para hemoplasmas felinos.

Na Figura 17 cada amostra é composta por 3 colunas, sendo que na primeira coluna de cada amostra encontra-se o produto de PCR sem ser submetido a ação das enzimas de restrição. Na segunda coluna visualiza-se o produto sob ação da enzima *ECO RI*, e na terceira coluna, sob ação da *HAE III*. Amostras 1, 3 e 6 observa-se ação de ambas *ECO RI* e *HAE III*, demonstrando co-infecção por *M. haemofelis* e '*Candidatus M. haemominutum*'. A ação exclusiva pela enzima *ECO R1* nas amostras 2, 4, 5 demonstra infecção única por '*Candidatus M. haemominutum*'. PM é o marcador de peso molecular de 50 pares de base (Invitrogen®).

5.5.2 Nested - PCR

Foram amplificados fragmentos de 283 e 374 pares de base, referentes respectivamente ao *M. haemofelis* e ao ‘*Candidatus M. haemominutum*’, em um total de 12 exemplares (12/31- 38,7%) (Figura 18; Tabela 9). Diagnosticou-se um exemplar de cada uma das espécies *L. pardalis*, *L. wiedii*, *L. tigrinus*, *P. yagouarondi* e *P. concolor* com infecção única por *M. haemofelis*; três *L. pardalis* e um *P. yagouarondi* com infecção única por ‘*Candidatus M. haemominutum*’; e três *L. pardalis* com co-infecção por ambos *M. haemofelis* e ‘*Candidatus M. haemominutum*’. Ressalta-se que a Nested - PCR diagnosticou e confirmou a natureza de todos os sete hemoplasmas diagnosticados anteriormente pela PCR - RFLP. Os outros cinco animais apresentaram infecção única por *M. haemofelis*. Nenhum animal apresentou-se infectado por ‘*Candidatus M. turicensis*’.

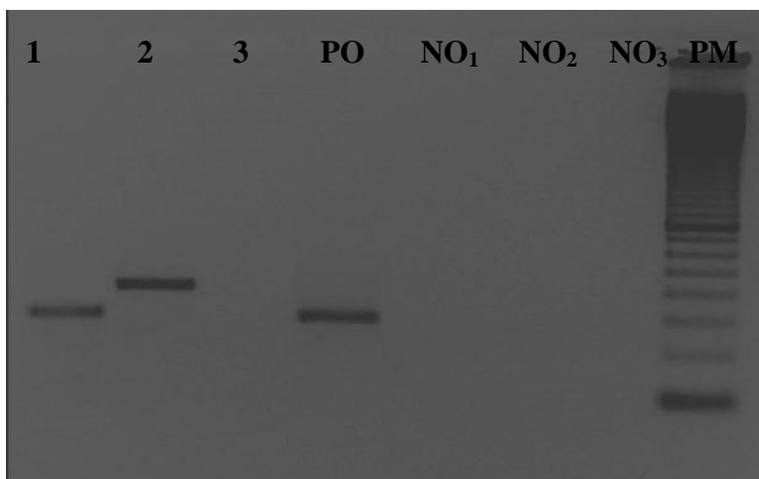


FIGURA 18. Visualização da amplificação dos produtos da NESTED- PCR da amostra referente a um exemplar de *Leopardus pardalis* após eletroforese em gel de agarose. Coluna 1 é uma amplificação de *Mycoplasma haemofelis*, coluna 2 é uma amplificação de “*Candidatus*” *Mycoplasma haemominutum* e coluna 3 é uma amplificação negativa de “*Candidatus*” *Mycoplasma turicensis*. PO é o controle positivo de *Mycoplasma haemofelis*. NO₁, NO₂ e NO₃ são controles negativos de *Mycoplasma haemofelis*, “*Candidatus*” *Mycoplasma haemominutum* e “*Candidatus*” *Mycoplasma turicensis*, respectivamente. PM é o marcador de peso molecular, de 100 pares de base.

5.6 Sequenciamento e Análise Filogenética

5.6.1 *Hepatozoon* sp.

Após o sequenciamento de todos os isolados encontrados, quatro isolados (três jaguatiricas e um gato do mato pequeno) apresentavam seqüências de *Hepatozoon* sp. idênticas entre elas. O outro isolado (da jaguatirica fêmea do Ceará, coincidentemente o mesmo animal em qual esfregaço sanguíneo foi encontrado o gamonte de *Hepatozoon* sp.), apresentou uma diferença de base representada pela transversão T – C para com os demais isolados.

A árvore construída (Figura 19), usando *Babesia rodhaini* como grupo externo, mostrou dois grupos irmãos. Um desses grupos demonstrou ser constituído pelos isolados de *H. canis* (*H. canis* de ambos cães e gatos domésticos e raposas), enquanto o outro grupo incluiu espécies de roedores, gatos domésticos e felídeos neotropicais.

As seqüências de nucleotídeos dos isolados de *Hepatozoon* dos felídeos neotropicais mostraram 98% de similaridade com as seqüências de *H. felis*, de gatos domésticos na Espanha, e tiveram seus números de acesso no GenBank registrados como: isolado-1 EU 28344 e isolado-2 EU 267606.

Esses isolados também apresentaram similaridade com os isolados de roedores na Espanha (“bank vole”) e com *H. americanum* de um cão nos Estados Unidos.

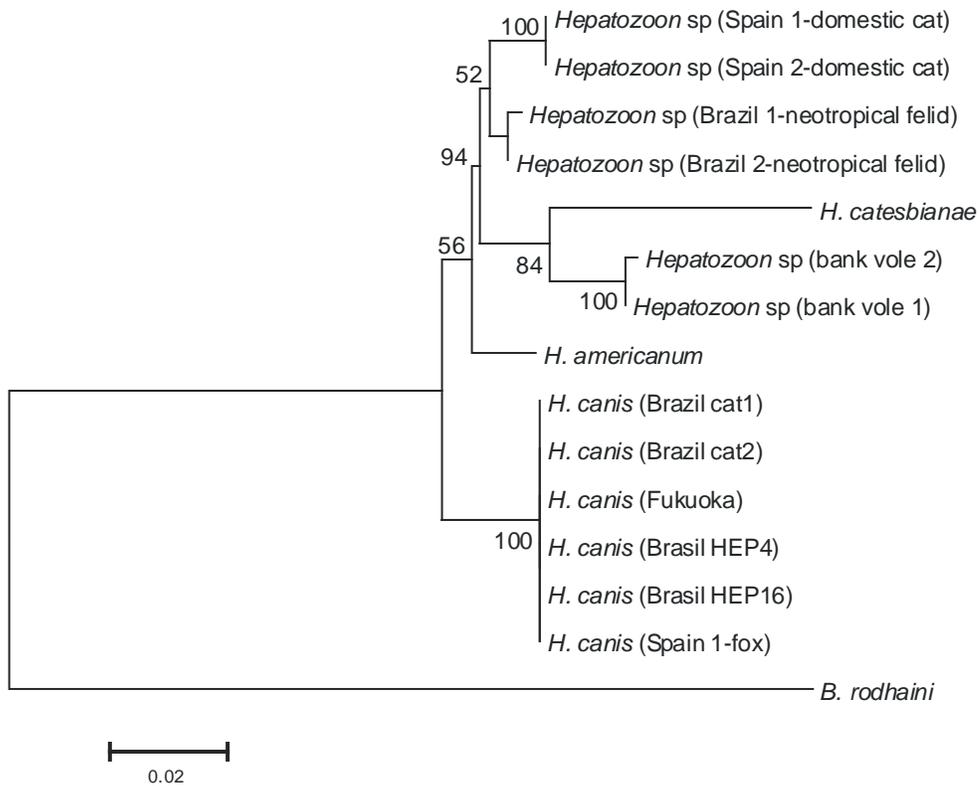


FIGURA 19. Relação filogenética dos isolados de *Hepatozoon* spp. detectados em felídeos neotropicais do Brasil, baseada nas variações da seqüência de DNA do gene 18S rRNA. Filograma obtido usando o método de Kimura- NJ com 14 espécies/isolados de *Hepatozoon*. *Babesia rodhaini* foi escolhida como grupo externo. Os números ao lado dos “nodos” indicam índice de consistência dos ramos (“bootstrap”).

5.6.2 *Cytauxzoon* sp.

O sequenciamento do produto amplificado da amostra de *P. concolor*, que se apresentou positivo em lâmina para piroplasmas, demonstrou ser *C. felis*.

A árvore construída (Figura 20) mostrou uma alta similaridade genética entre o isolado identificado nesse estudo e em diferentes amostras de *C. felis* identificadas no Brasil por André et al. (2009). Os isolados de *Cytauxzoon* spp. apresentaram-se em um ramo separado dos isolados de diferentes espécies de *Babesia*. Essa diferenciação entre esses piroplasmas já havia sido observada

durante a fase de amplificação dos produtos de PCR que apresentaram tamanhos diferenciados.

As seqüências de nucleotídeos do isolado de *C. felis* mostraram similaridade genética de 100% com a seqüência de *C. felis* de *P. onca*, 98% com *C. felis* de *L. tigrinus*, 97% com *C. felis* de um outro *P. concolor* e 91% com *C. felis* de um *F. catus*.

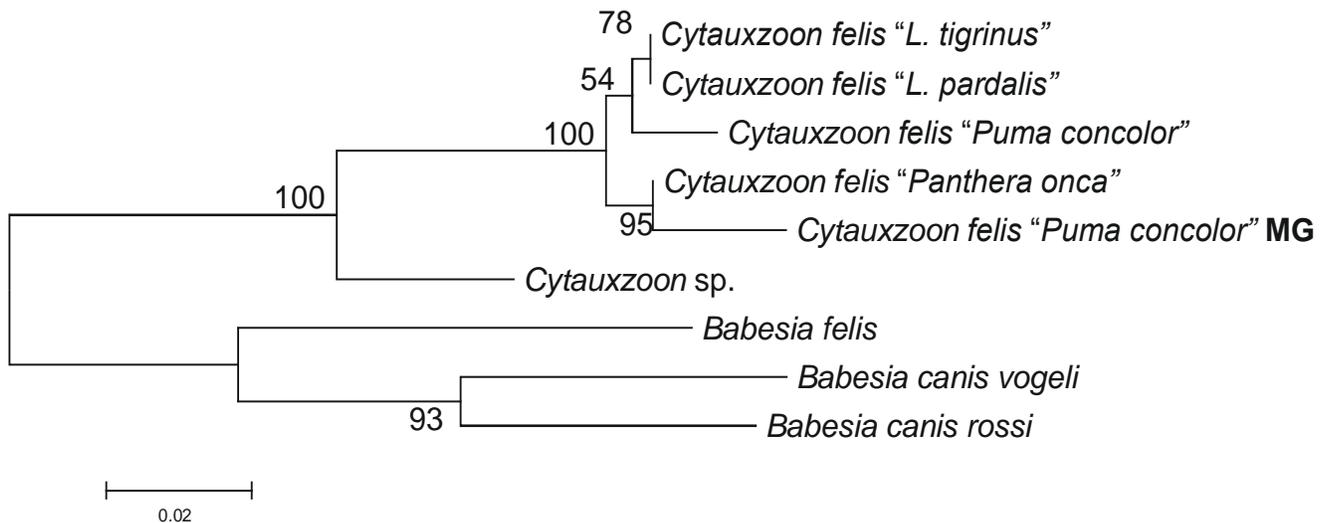


FIGURA 20. Relação filogenética do isolado de *Cytauxzoon felis* detectado em um exemplar juvenil macho de *Puma concolor*, proveniente de Minas Gerais, baseada nas variações da seqüência de DNA do gene 18S rRNA. Filograma obtido usando o método de Kimura- NJ com seis espécies/isolados de *Cytauxzoon* e três de *Babesia*. Os números ao lado dos “nodos” indicam índice de consistência dos ramos (“bootstrap”). MG= Minas Gerais.

5.6.3 *Mycoplasma haemofelis* e ‘Candidatus Mycoplasma haemominutum’

Foram seqüenciados cinco produtos provenientes de quatro felídeos positivos para hemoplasmas pela PCR- RFLP e/ou Nested- PCR: um *L. pardalis* proveniente do Maranhão, co-infectado por *M. haemofelis* e ‘Candidatus *M. haemominutum*’ (positivo por ambas técnicas moleculares), um *L. wiedii*, também

do Maranhão, infectado por *M. haemofelis* (positivo somente pela Nested-PCR), um *L. tigrinus*, proveniente do Ceará, infectado por *M. haemofelis* (positivo apenas pela Nested-PCR), e um *L. pardalis*, também do Ceará, infectado por 'Candidatus *M. haemominutum*' (positivo por ambas técnicas).

A árvore construída (Figura 21) mostrou que todos os isolados de *M. haemofelis* e a maioria de todos os isolados de 'Candidatus *M. haemominutum*' encontraram-se em ramos separados na árvore filogenética, com 100% de separação entre os ramos. Apenas um isolado de 'Candidatus *M. haemominutum*' de *L. pardalis* proveniente do Ceará apresentou-se separado dos demais ramos, e demonstrou maior similaridade genética com os isolados de *M. haemofelis*.

As seqüências de nucleotídeos dos isolados de *M. haemofelis* mostraram 100% de similaridade genética com um isolado de *M. haemofelis* de *F. catus* no Brasil, e 92% de similaridade genética com 'Candidatus *M. turicensis*' de um *L. pardalis*. O isolado de 'Candidatus *M. haemominutum*', proveniente de um *L. pardalis* do Maranhão, mostrou 94% de similaridade genética com o isolado de *F. catus* da África do Sul e 98% com 'Candidatus *M. haemominutum*' de um exemplar de *L. wiedii* e de *L. tigrinus*, ambos do Brasil. No entanto, o isolado de 'Candidatus *M. haemominutum*', proveniente de um *L. pardalis* do Ceará, mostrou similaridade genética de apenas 91% com 'Candidatus *M. haemominutum*', do *L. wiedii* e do *L. tigrinus* supramencionados e 87% de similaridade com o mesmo agente em *F. catus*. Esse isolado mostrou-se em um ramo separado dos demais da mesma espécie, demonstrando diferenças genéticas decorrentes de inserções e deleções não presentes nos demais isolados.

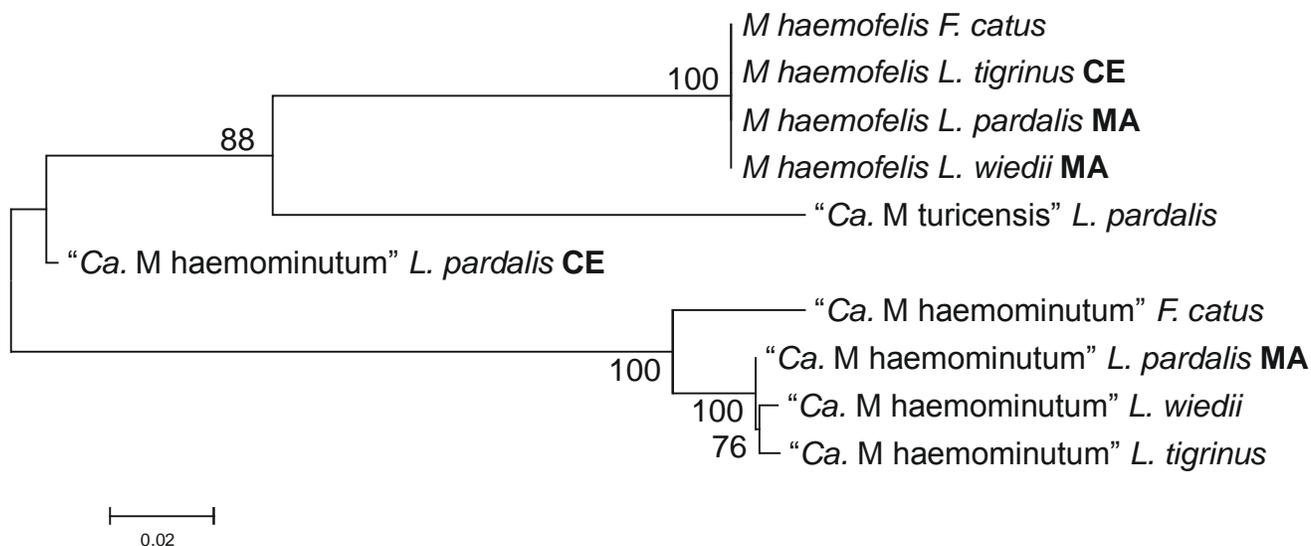


FIGURA 21. Relação filogenética dos isolados de *Mycoplasma haemofelis* e 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' detectados em felídeos neotropicais do Brasil, baseada nas variações da seqüência de DNA do gene 16S rRNA. Filograma obtido usando o método de Kimura- NJ com quatro isolados de *Mycoplasma haemofelis*, um de 'Candidatus Mycoplasma turicensis' e cinco de 'Candidatus Mycoplasma haemominutum', provenientes de gatos domésticos (*Felis catus*) e de diferentes espécies de felídeos neotropicais no Brasil. Os números ao lado dos "nodos" indicam índice de consistência dos ramos ("bootstrap"). MA= Maranhão, CE= Ceará.

5.7 Análise da interferência de possíveis fatores na freqüência de infecções por hemoparasitas

No presente trabalho observou-se que 45,16% (14/31) dos felídeos neotropicais examinados apresentaram-se infectados por pelo menos um dos hemoparasitas estudados (Tabela 9). Dos exemplares diagnosticados positivos, 42,85% (6/14) apresentaram-se co-infectados com mais de um hemoparasita (Figura 22).

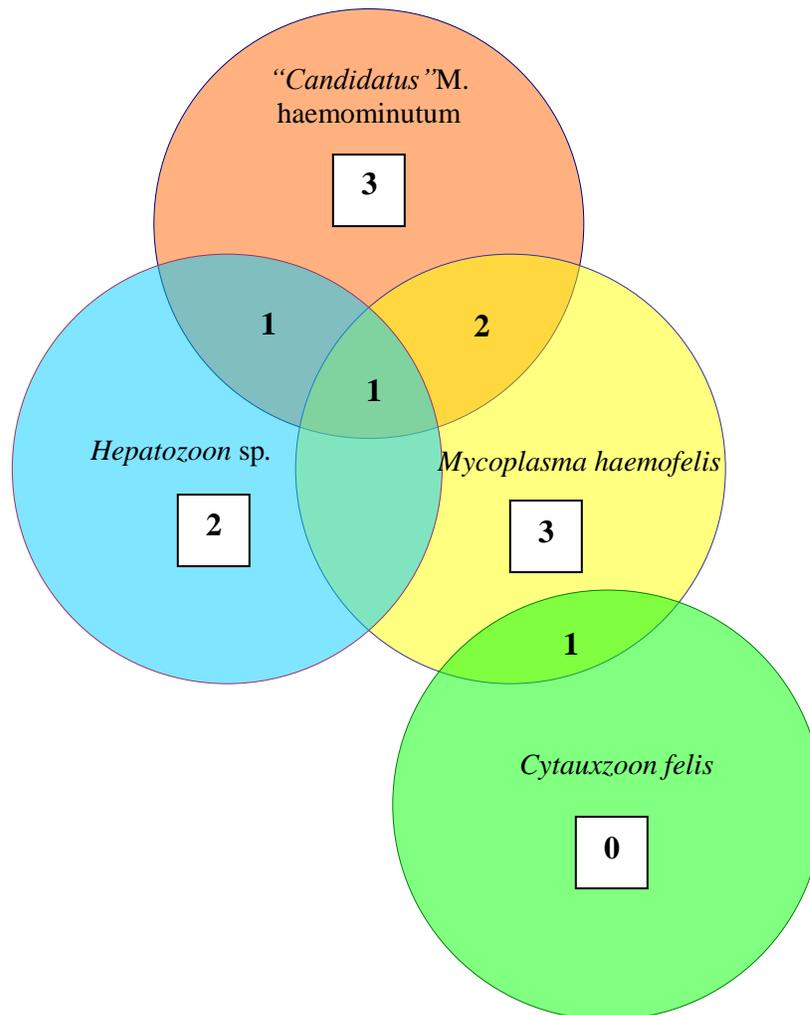


FIGURA 22. Infecções únicas e co-infecções entre os diferentes hemoparasitas encontrados em felídeos neotropicais nascidos em vida livre. Os números nos quadrados brancos representam o número de exemplares com infecções únicas para o hemoparasita indicado no respectivo círculo. Os números existentes nas interseções representam a quantidade de animais que tiveram co-infecções pelos hemoparasitas indicados nos círculos vizinhos. Somando-se o número total em cada círculo obtem-se a quantidade de felídeos diagnosticados positivos para o hemoparasita indicado no respectivo círculo.

Seguem abaixo as análises dos possíveis fatores que podem influenciar na frequência de infecção pelos hemoparasitas estudados:

5.7.1 Sexo dos animais

Ao se comparar a frequência de felídeos infectados, para pelo menos um hemoparasita, não houve diferença significativa em relação ao sexo (Tabela 10).

TABELA 10. Frequência de felídeos neotropicais infectados para pelo menos um hemoparasita, divididos de acordo com o sexo.

| | SEXO | |
|----------|--------------|--------------|
| | Macho | Fêmea |
| Positivo | 50% (8/16) | 40% (6/15) |
| Negativo | 50% (8/16) | 60% (9/15) |
| Total | 100% (16/16) | 100% (15/15) |

Nota: Teste de qui-quadrado= 0,313, $p=0,576$

Também não se verificou diferença em relação ao sexo, quando foram utilizados apenas os felídeos infectados para pelo menos um hemoplasma felino (Tabela 11).

TABELA 11. Frequência de felídeos neotropicais infectados para pelo menos um hemoplasma felino, divididos de acordo com o sexo.

| | SEXO | |
|----------|---------------|---------------|
| | Macho | Fêmea |
| Positivo | 43,75% (7/16) | 33,3% (5/15) |
| Negativo | 56,25% (9/16) | 66,7% (10/15) |
| Total | 100% (16/16) | 100% (15/15) |

Nota: - Teste Exato de Fisher, $p=0,7160$

- Hemoplasmas felinos diagnosticados: *Mycoplasma haemofelis* e 'Candidatus' *Mycoplasma haemominutum*

5.7.2 Idade dos animais

Na Tabela 12 notou-se diferença significativa ($p=0,007$) no diagnóstico de felídeos infectados em relação à idade.

TABELA 12. Frequência de felídeos neotropicais infectados para pelo menos um hemoparasita, divididos de acordo com a idade.

| | IDADE | |
|----------|----------------------------|-------------------------|
| | Adultos | Juvenis |
| Positivo | 61,9% (13/21) ^a | 10% (1/10) ^b |
| Negativo | 38,1% (8/21) | 90% (9/10) |
| Total | 100% (21/21) | 100% (10/10) |

Nota: - Teste de qui-quadrado= 7,369, $p= 0,007$

- a,b – letras distintas entre as colunas indicam diferença estatística significativa.

Ao se avaliar somente a frequência de felídeos infectados para hemoplasmas felinos, também se observou uma diferença significativa entre os felinos adultos e juvenis, ou seja, de 52,4% contra 10%, respectivamente (Tabela 13).

TABELA 13. Frequência de felídeos neotropicais infectados para pelo menos um hemoplasma felino, divididos de acordo com a idade.

| | IDADE | |
|----------|----------------------------|-------------------------|
| | Adultos | Juvenis |
| Positivo | 52,4% (11/21) ^a | 10% (1/10) ^b |
| Negativo | 47,6% (10/21) | 90% (9/10) |
| Total | 100% (21/21) | 100% (10/10) |

Nota: - Teste Exato de Fisher, $p= 0,0464$

- a,b – letras distintas entre as colunas indicam diferença estatística significativa.

- Hemoplasmas felinos diagnosticados: *Mycoplasma haemofelis* e 'Candidatus' *Mycoplasma haemominutum*

5.7.3 Espécies dos animais

Na Tabela 14 estão apresentadas as frequências dos animais infectados, separados de acordo com a espécie dos felídeos. Deve ser ressaltado que somente as espécies *L. pardalis*, *L. tigrinus* e *P. yagouaroundi* foram avaliadas, tendo em vista que as outras espécies presentes no estudo (*P. concolor* e *L. wiedii*) não apresentaram número suficiente para análise comparativa.

TABELA 14. Frequência de felídeos neotropicais infectados para pelo menos um hemoparasita, divididos de acordo com a espécie.

| | ESPÉCIE | | |
|----------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|
| | <i>Leopardus pardalis</i> | <i>Leopardus tigrinus</i> | <i>Puma yagouarondi</i> |
| Positivo | 81,8% (9/11) ^a | 10% (1/10) ^b | 25% (2/8) ^b |
| Negativo | 18,2% (2/11) | 90% (9/10) | 75% (6/8) |
| Total | 100% (11/11) | 100% (10/10) | 100% (8/8) |

Nota: - Teste de qui-quadrado= 12,360, $p= 0,002$

- a,b – letras distintas entre as colunas indicam diferença estatística significativa.

Verificou-se diferença significativa ($p= 0,002$) entre a frequência de infecção em *L. pardalis* (81,8%) e as espécies *L. tigrinus* (10%) e *P. yagouarondi* (25%). No entanto, não houve diferença na frequência de infecção entre as espécies *L. tigrinus* e *P. yagouarondi*.

A Figura 23 representa, em valor absoluto, as espécies de felídeos infectadas para pelo menos um hemoparasita.

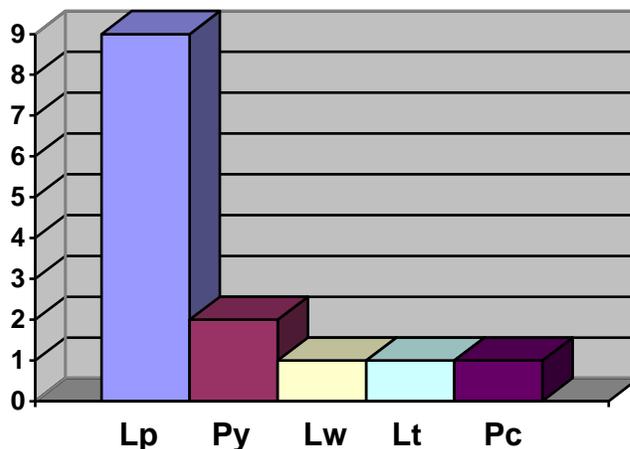


FIGURA 23. Representação das espécies de felídeos diagnosticadas positivas, para pelo menos um hemoparasita no grupo estudado. O eixo x representa as espécies de felídeos neotropicais que foram encontradas positivas para pelo menos um hemoparasita (Lp: *Leopardus pardalis*, Py: *Puma yagouarondi*, Lw: *Leopardus wiedii*, Lt: *Leopardus tigrinus*, Pc: *Puma concolor*). O eixo y indica o número de animais positivos.

Quando se comparou apenas a infecção por hemoplasmas felinos, também ocorreu diferença significativa entre a frequência de infecção em *L. pardalis* (63,6%) e as espécies *L. tigrinus* (10%). Porém, não houve diferença das espécies *L. pardalis* (63,6%) e *L. tigrinus* (10%) em relação a *P. yagouaroundi* (25%) (Tabela 15).

TABELA 15. Frequência de felídeos neotropicais infectados para pelo menos um hemoplasma felino, divididos de acordo com a espécie dos felídeos.

| | ESPÉCIE | | |
|----------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| | <i>Leopardus pardalis</i> | <i>Leopardus tigrinus</i> | <i>Puma yagouaroundi</i> |
| Positivo | 63,6% (7/11) ^a | 10% (1/10) ^b | 25% (2/8) ^{ab} |
| Negativo | 36,4% (4/11) | 90% (9/10) | 75% (6/8) |
| Total | 100% (11/11) | 100% (10/10) | 100% (8/8) |

Nota: - Teste de qui-quadrado= 7,110, $p=0,029$

- a,b – letras distintas entre as colunas indicam diferença estatística significativa.

- Hemoplasmas felinos diagnosticados: *Mycoplasma haemofelis* e 'Candidatus' *Mycoplasma haemominutum*

5.7.4 Origem dos animais

Na Tabela 16 estão descritas as frequências dos animais infectados, separados de acordo com o local de origem (Estado).

Na avaliação estatística, observou-se diferença na frequência dos felídeos infectados nos Estados do Maranhão e Piauí, de 66,7% (8/12) e 0% (0/5), respectivamente. Em relação ao Estado do Ceará, este não apresenta diferença significativa em relação aos Estados do Maranhão e Piauí.

TABELA 16. Frequência de felídeos neotropicais infectados para pelo menos um hemoparasita, divididos de acordo com a origem.

| | ESTADO | | |
|----------|---------------------------|-----------------------|----------------------------|
| | Maranhão | Piauí | Ceará |
| Positivo | 66,7% (8/12) ^a | 0% (0/5) ^b | 41,7% (5/12) ^{ab} |
| Negativo | 33,3% (4/12) | 100% (5/5) | 58,3% (7/12) |
| Total | 100% (12/12) | 100% (5/5) | 100% (12/12) |

Nota: - Teste de qui-quadrado= 6,425, $p=0,04$

- a,b – letras distintas entre as colunas indicam diferença estatística significativa.

Ao se utilizar apenas felídeos infectados para pelo menos um hemoplasma felino (Tabela 17), não houve diferença significativa entre os estados do Maranhão, Piauí e Ceará.

TABELA 17. Frequência de felídeos neotropicais infectados para pelo menos um hemoplasma felino, divididos de acordo com o estado de origem.

| | ESTADO | | |
|----------|--------------|------------|--------------|
| | Maranhão | Piauí | Ceará |
| Positivo | 58,3% (7/12) | 0% (0/5) | 41,7% (4/12) |
| Negativo | 41,7% (5/12) | 100% (5/5) | 58,3% (8/12) |
| Total | 100% (12/12) | 100% (5/5) | 100% (12/12) |

Nota: Teste de qui-quadrado= 5,285 , $p= 0,071$

5.7.5 Sensibilidade entre a PCR e o esfregaço sanguíneo para o diagnóstico dos hemoparasitas avaliados

Na tabela 18 pode-se notar diferença significativa ao se avaliar a frequência dos animais infectados diagnosticados pela técnica do esfregaço sanguíneo e pela PCR. A PCR mostrou-se significativamente mais sensível do que a técnica do esfregaço sanguíneo no diagnóstico dos hemoparasitas ($p= 0,001$).

TABELA 18. Frequência de felídeos neotropicais infectados para pelo menos um hemoparasita diagnosticados nos exames de PCR e esfregaço sanguíneo.

| | TESTES | |
|----------|----------------------------|--------------------------|
| | PCR | Esfregaço Sanguíneo |
| Positivo | 45,2% (14/31) ^a | 6,5% (2/31) ^b |
| Negativo | 54,8% (17/31) | 93,5% (29/31) |
| Total | 100% (31/31) | 100% (31/31) |

Nota: - Teste Exato de Fisher, $p= 0,0010$

- a,b – letras distintas entre as colunas indicam diferença estatística significativa.

5.7.6 Sensibilidade diagnóstica entre PCR-RFLP e Nested-PCR para a detecção de *Mycoplasma haemofelis* e 'Candidatus *M. haemominutum*'

Na Tabela 19 estão descritas as freqüências dos animais infectados para pelo menos uma das seguintes espécies de hemoplasmas: *M. haemofelis* e 'Candidatus *M. haemominutum*'; separados de acordo com a PCR utilizada. Ressalta-se que não foi considerada a espécie 'Candidatus *M. turicensis*' nessa análise porque a PCR- RFLP utilizada não distingue esse hemoplasma.

Observou-se que não houve diferença significativa em relação à sensibilidade diagnóstica entre as técnicas PCR- RFLP e Nested-PCR.

TABELA 19. Freqüência de felídeos neotropicais infectados para pelo menos um hemoplasma diagnosticado, segundo o exame de PCR analisado.

| | TESTES | |
|----------|---------------|---------------|
| | RFLP-PCR | NESTED-PCR |
| Positivo | 22,6% (7/31) | 38,7% (12/31) |
| Negativo | 77,4% (24/31) | 61,3% (19/31) |
| Total | 100% (31/31) | 100% (15/15) |

Nota: - Teste de qui-quadrado= 1,897, $p=0,168$

- Hemoplasmas felinos diagnosticados: *Mycoplasma haemofelis* e 'Candidatus' *Mycoplasma haemominutum*

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Como o presente trabalho está inserido no protocolo epidemiológico e sanitário do “Programa de Reintrodução” do “Projeto Gatos do Mato – Brasil”, os resultados obtidos neste estudo além de auxiliarem nas decisões sobre a reintrodução de cada exemplar, contribuirão para um melhor conhecimento da ocorrência de hemoparasitas em felídeos neotropicais no Brasil e também para a realização de um Plano de Manejo e de Conservação, “in- situ” e “ex-situ”, para estes animais

Este trabalho é pioneiro em diversos aspectos: realizou-se a primeira caracterização molecular de *Hepatozoon* sp. em felídeos neotropicais do Brasil e foi feito o primeiro relato da infecção por esse hemoparasita em *L. tigrinus* (Metzger et al., 2008).

O estudo também culminará no primeiro relato da infecção por *M. haemofelis* e ‘*Candidatus* *M. haemominutum*’ em *P. yagouaroudi* e por *M. haemofelis* em *P. concolor*. O hemoparasita *C. felis* foi relatado pela primeira vez no Estado de Minas Gerais, em exemplar de *P. concolor*.

6.1 *Hepatozoon* sp.

A ocorrência da infecção por *Hepatozoon* sp. nos felídeos neotropicais do presente estudo, utilizando-se a PCR como técnica diagnóstica, foi de 16,12% (5/31).

Esta ocorrência concorda com a relatada em gatos ferais do Norte da Espanha (16% - 4/25), por Ortuno et al. (2008). No entanto, Baneth et al. (1998) e Criado-Fornélio et al. (2006), também utilizando a PCR, reportaram dados diferentes em gatos domésticos em Israel e na Espanha, de 0,57% (7/1229) e 0,6% (2/330), respectivamente.

Apenas uma amostra foi positiva na técnica da visualização em esfregaço sanguíneo para *Hepatozoon* sp. (3,2% - 1/31). Morfologicamente, o gamonte encontrado assemelhou-se ao gamonte de *H. canis*, encontrado por Beaufils et al.

(1996). Entretanto, seu formato oval e regular, com cápsula visível e citoplasma homogêneo, diferenciou-se dos gamontes observados por Beaufilets et al. (1998) e por Beaufilets (2004), em gatos domésticos na França. Estes autores relataram gamontes com formato irregular, assemelhando-se a um feijão, com citoplasma aparentemente granuloso e cápsula pouco visível. Ressalta-se que os autores mencionados não caracterizaram molecularmente a espécie de *Hepatozoon* encontrada.

O gamonte visualizado no presente estudo foi morfológicamente semelhante, porém menor, do que o observado em gatos domésticos no Brasil, por Perez et al. (2004). Lane e Kokan (1983) encontraram gamontes em lince (*L. rufus*) que também foram maiores em comprimento, porém menores em largura, do que o gamonte encontrado no presente estudo.

A baixa sensibilidade demonstrada pela técnica do esfregaço sanguíneo foi reportada em diversos trabalhos (LANE e KOKAN, 1983; MERCER et al., 1988; BANETH et al., 1998). A comparação dos resultados obtidos entre as duas técnicas mencionadas mostra claramente a enorme sensibilidade diagnóstica e a consequente vantagem da PCR sobre a técnica do esfregaço sanguíneo (CRIADO-FORNÉLIO et al., 2006; METZGER et al., 2008; ORTUNO et al., 2008).

Como visto anteriormente, a transmissão de *Hepatozoon* em felídeos não está totalmente elucidada. A elevada ocorrência nos felídeos silvestres deste estudo, em contraste com a baixa ocorrência do hemoparasita em gatos domésticos, como descrito por Baneth et al. (1998) e por Criado-Fornélio et al. (2006), leva a especulação de que a maior exposição a carrapatos na natureza e /ou a ingestão de predadores intermediários, contendo cistos de *Hepatozoon* em seus tecidos, podem influenciar na epidemiologia do agente.

Outros autores já sugeriram que a predação e, inclusive outros vetores como *Pulex* sp., podem estar envolvidos na transmissão do hemoparasita (LANDAU et al., 1972; NORDGREN e CRAIG, 1984; SMITH, 1996). Beaufilets (2004) observou que a maioria das infecções por *Hepatozoon* spp. em gatos domésticos também ocorreram em animais com livre acesso à rua.

A ausência de sinais clínicos nos exemplares estudados está de acordo com resultados obtidos tanto em felídeos selvagens norte-americanos quanto em gatos domésticos (MERCER et al., 1988; CRIADO-FORNÉLIO et al., 2006). Kubo et al. (2006) sugerem que a patogenicidade de *Hepatozoon* sp. nos felídeos selvagens é baixa visto que foram observados poucos esquizontes e uma discreta reação inflamatória nos órgãos afetados.

A análise filogenética dos isolados de *Hepatozoon* sp. obtidos neste estudo indicou monofilia do gênero, como sugerido também em outros trabalhos (MATHEW et al., 2000; CRIADO-FORNÉLIO et al., 2006). Os resultados do sequenciamento demonstraram que as espécies de *Hepatozoon* encontradas nos felídeos neotropicais são altamente relacionadas (98% de homologia genética) com a espécie observada em gatos domésticos na Espanha, a qual foi submetida ao Genbank como *H. felis* (CRIADO-FORNÉLIO et al., 2006). O trabalho também sugeriu a possibilidade de cepas diferentes da mesma espécie de *Hepatozoon* existirem em uma mesma região geográfica, já que duas cepas de *Hepatozoon* sp. foram obtidas de dois exemplares de *L. pardalis*, provenientes do mesmo Estado.

Como gatos domésticos infectados com *H. canis* foram observados no Brasil (RUBINI et al., 2006), os dados filogenéticos sugerem que mais de uma espécie de *Hepatozoon* pode infectar felídeos em geral. No entanto, mais estudos devem ser realizados com o objetivo de identificar as espécies de *Hepatozoon* em felídeos domésticos e selvagens e assim, elucidar as relações filogenéticas de *Hepatozoon* spp. nos diferentes mamíferos. O significado clínico e epidemiológico dos isolados de *Hepatozoon* sp. encontrados nos felídeos neotropicais devem ser investigados.

6.2 Piroplasmas

6.2.1 Cytauxzoon felis

A ocorrência de piroplasmas, diagnosticados pela técnica da visualização em esfregaço sanguíneo e pela PCR, foi de 3,22% (1/31). Um único exemplar

juvenil de *P. concolor*, com idade estimada menor do que três meses, proveniente de Minas Gerais, foi diagnosticado positivo. O sequenciamento do isolado obtido identificou o agente como *C. felis*.

Verificou-se uma ocorrência superior (12,5% - 9/72), pela PCR, da infecção por *C. felis* em um recente estudo, que incluiu diversas espécies de felídeos neotropicais no Brasil. *P. concolor*, além de *L. tigrinus* e *P. onca* foram as espécies diagnosticadas positivas (ANDRE et al., 2009).

Como as inclusões eritrocitárias de *Cytauxzoon* spp., sob microscopia óptica, são facilmente confundidas com trofozoitos de pequenas babesias (PENZHORN, 2001), a identificação de *C. felis* ocorreu somente após o sequenciamento. Além disso, a PCR utilizada pode amplificar fragmentos de *Cytauxzoon* spp., *Babesia* spp. e *Theileria* sp.

Inclusões eritrocitárias de piroplasmas foram encontradas em inúmeros campos do esfregaço sanguíneo (realizado a partir da venopunção da jugular) demonstrando alta parasitemia. Visualizaram-se, inclusive, tétrades (cruz de Malta) que são típicas de algumas espécies de pequenas babesias felinas, como *B. felis* e *B. leo* (BOURDEAU, 1996; PENZHORN et al., 2001).

O felídeo da pesquisa apresentou sinais clínicos de desidratação, magreza e mucosas hipocoradas. A presença deste último é um achado comum nas infecções agudas por micoplasmose hemotrópica felina, babesiose e cytauxzoonose (SYKES, 2003; WILLI et al., 2007). Nota-se que, como o animal estava também co-infectado por *M. haemofelis*, não é possível dizer se os sinais clínicos mencionados foram resultantes exclusivamente de uma das infecções ou da co-infecção.

Sinais clínicos similares de perda de peso, mucosas hipocoradas, depressão, além de anemia, foram observados em uma leoa (*P. leo*) e na sua cria, no Zoológico Municipal de Volta Redonda (RJ). Estes animais foram diagnosticados com *C. felis*, pela PCR, semanas antes de seus óbitos (PEIXOTO et al., 2007). Em contraste, todos os felídeos neotropicais diagnosticados positivos para *C. felis*, por André et al. (2009), apresentavam-se assintomáticos no momento da coleta de sangue.

O exemplar também apresentou infestação de carrapatos, os quais não foram coletados. Relata-se o encontro de pulgas de *C. canis*, que não apresentavam DNA de *C. felis*, em felídeos neotropicais no Brasil infectados por este agente (ANDRE et al., 2009).

A análise filogenética do isolado de *C. felis* mostrou uma alta similaridade genética com amostras de *C. felis* de: *P. onca* (100%), *L. tigrinus* (98%), *P. concolor* (97%) e *F. catus* (91%).

Como visto, a análise filogenética demonstrou homologia genética entre o isolado obtido do felídeo neotropical e isolado obtido de gatos domésticos, reforçando a possibilidade de transmissão do agente, via artrópodes hematófagos, entre esses felídeos. Levando-se isto em consideração, juntamente com o fato de que a infecção em gatos domésticos geralmente resulta em doença aguda e fatal (HOSKINS, 1991), não há indicação de reintrodução na natureza de felídeos neotropicais infectados, até que mais estudos sejam realizados sobre a prevalência de *C. felis* em felídeos domésticos e silvestres no Brasil. Felídeos selvagens podem agir como reservatórios ou portadores crônicos do agente, inclusive após tratamento, assim como ocorre com lince (*L. rufus*) (REICHARD et al., 2008) Conseqüentemente, a soltura de felídeos silvestres infectados com *C. felis* implica a transmissão do agente e a mortalidade de gatos domésticos que vivem nas áreas domiciliadas do entorno das Unidades de Conservação.

A ocorrência de *C. felis* em um *P. concolor* extremamente jovem, infestado de carrapatos, capturado à margem de uma estrada vicinal, no mesmo dia em que foi colhido sangue para os diagnósticos supramencionados, indica a ocorrência deste agente em outros felídeos neotropicais de vida livre no Estado de Minas Gerais. Apesar de não ser totalmente descartada a possibilidade deste animal ter fugido de cativeiro (de alguma coleção particular ilegal), a observação de exemplares de *P. concolor* próximos às fazendas de ovinos da região foi relatada (SAUT², 2008).

A confirmação molecular de *C. felis* em felídeos silvestres e domésticos é recente no Brasil. Até o momento, a infecção em gatos domésticos só foi

² SAUT, J.P.E., Comunicação Pessoal, 2008.

notificada em 2008, pela PCR, no Estado do Rio de Janeiro, em um animal que veio a óbito após uma semana de tratamento (PEIXOTO et al., 2007; MAIA et al., 2008; ANDRE et al., 2009).

Devido ao pouco conhecimento sobre a epidemiologia deste hemoparasita no Brasil e pela técnica do esfregaço sanguíneo não distinguir entre os diferentes piroplasmas (BIRKENHEUER et al., 2006), sugere-se que o diagnóstico molecular de *Cytauxzoon* spp. seja incorporado rotineiramente diante de quaisquer suspeitas de infecções por hemoparasitas em felídeos, silvestres e domésticos, em todas as regiões do país.

6.2.2 Babesia spp.

A ausência de infecção por *Babesia* spp. nos felídeos neotropicais avaliados foi inesperada. Aguardavam-se diagnósticos positivos já que felídeos provenientes de vida livre, por apresentarem maior exposição a artrópodes hematófagos, poderiam ter mais possibilidades de se infectarem com este piroplasma, quando comparados a animais de cativeiro, como relatado por Bosman et al. (2007) em leões de vida livre na África do Sul.

Entretanto, sabe-se que carrapatos não podem transmitir *Babesia* spp. e/ou *Theileria* spp. logo que se fixam na pele do animal, já que os esporozoítas devem amadurecer antes de se tornarem infectantes. Assim, a transmissão do hemoparasita só ocorre poucos dias após o carrapato ter se fixado na pele do animal (UILENBERG, 2006).

O hábito dos felídeos se lambem com frequência, possivelmente retirando os ectoparasitas que encontrarem, pode limitar o tempo de permanência desses artrópodes reduzindo assim a efetiva transmissão do agente. Nota-se também que há poucos relatos sobre infestações de carrapatos em gatos domésticos no Brasil (ARAGÃO e FONSECA, 1961). Além disso, animais cronicamente infectados por *Babesia* spp. podem apresentar parasitemias em nível inferior à sensibilidade da PCR, o que é demonstrado em estudos nos quais os animais foram negativos na PCR e positivos na Nested-PCR (CAVALCANTE, 2007).

No Brasil, a prevalência da infecção por *Babesia* spp. em felídeos neotropicais ou domésticos ainda é desconhecida devido à escassez de relatos. Contudo, ela parece ser baixa, como descrito por Carneiro (2007), que diagnosticou, pela PCR, somente 0,69% (1/144) de infecção por *B. canis vogeli* em gatos domésticos provenientes de áreas rurais e urbanas, do Estado de São Paulo e do Distrito Federal. Neste trabalho, é interessante notar que foram observados cinco gatos com estruturas semelhantes a piroplasmas pelo esfregaço sanguíneo, porém apenas um foi diagnosticado positivo pela PCR (CARNEIRO, 2007).

Correia e Teixeira (2003) relataram a ocorrência de 10% (1/10) de *Babesia* spp. em *L. tigrinus* na Fundação Parque Zoológico de São Paulo (SP), entretanto, os animais foram testados exclusivamente pela técnica do esfregaço sanguíneo. Infelizmente, esses resultados geram dúvidas porque, como visto na pesquisa de Carneiro (2007) e em outros relatos, a especificidade da técnica do esfregaço é baixa, possibilitando diagnósticos falso-positivos. Assim, piroplasmas podem ser confundidos com corpúsculos de Howell-Jolly, artefatos de técnicas, precipitados de corantes, ponteados basófilos e *Cytauxzoon* spp. (PENZHORN et al., 2001; SCHOEMAN et al., 2001).

Outras pesquisas devem ser realizadas, utilizando-se principalmente a PCR, a fim de elucidar a prevalência e o significado clínico de *Babesia* spp. em felídeos neotropicais e domésticos, no Brasil.

6.3 Hemoplasmas

A ocorrência da infecção por hemoplasmas nos felídeos neotropicais avaliados, pela Nested-PCR, foi de 38,7% (12/31). Do total dos animais estudados, 16,12% (5/31) apresentaram infecção por *M. haemofelis* (sendo que um destes animais estava co-infectado por *Hepatozoon* sp. e outro, por *C. felis*); 12,90% (4/31) apresentaram infecção por 'Candidatus *M. haemominutum*' (um deles também estava co-infectado por *Hepatozoon* sp.) e 9,67% (3/31) apresentaram co-infecção por duas espécies de hemoplasmas, *M. haemofelis* e

'*Candidatus M. haemominutum*' (a co-infecção por *Hepatozoon* sp. mostrou-se novamente presente em um dos felídeos) (Tabela 9 e Figura 22).

Os dados obtidos concordam com o relato de Willi et al. (2007c), no qual foram diagnosticados pela PCR em tempo real, 37% (96/257) de felídeos infectados por hemoplasmas. Os animais examinados incluíram felídeos neotropicais brasileiros (de sete espécies), leões do Serengeti, lincos (ibéricos e euroasiáticos) e gatos selvagens europeus.

Entretanto, a infecção por hemoplasmas no estudo mencionado, quando somente os felídeos neotropicais brasileiros foram avaliados, reduziu-se para apenas 15,11% (13/86). Nota-se que todos os felídeos neotropicais foram provenientes da Fundação Parque Zoológico de São Paulo e se dividiam entre: 51,16 % (44/86) de animais nascidos em cativeiro e 48,83 % (42/86) de animais nascidos em vida livre (WILLI et al., 2007c).

Acredita-se que a diferença entre a ocorrência da infecção apontada no presente estudo (38,7% - 12/31) e no de Willi et al. (2007c) (15,11% - 13/86) decorre de um ou mais fatores. Entre eles, estariam: condições geoclimáticas dos Estados (favorecendo ou não a população de ectoparasitas), procedências dos felídeos (nascimento em cativeiro ou em vida livre), suscetibilidade à infecção por cada espécie animal, idades e/ou sexos dos exemplares examinados. Os fatores que podem influenciar na infecção por hemoparasitas, inclusive por hemoplasmas, serão abordados detalhadamente, um pouco mais adiante.

Observou-se uma elevada ocorrência (75% - 9/12) de infecções por uma única espécie de hemoplasma (infecção única) quando comparada à ocorrência de infecções por mais de uma espécie de hemoplasma (co-infecção) (25% - 3/12) (Figura 22). Ressalta-se que não foram diagnosticadas infecções por '*Candidatus M. turicensis*' em nenhum dos animais avaliados.

Somando infecções únicas e co-infecções, verificaram-se ocorrências similares de *M. haemofelis* (66,66% - 8/12) e de '*Candidatus M. haemominutum*' (58,33% - 7/12). Estes resultados são bem distintos dos aferidos por outros autores. Willi et al. (2007c) reportaram apenas 15,38% (2/13) de infecções por *M. haemofelis* enquanto '*Candidatus M. haemominutum*' e '*Candidatus M. turicensis*'

representaram, respectivamente, 76,92% (10/13) e 7,69% (1/13) do total de infecções por hemoplasmas nos felídeos neotropicais brasileiros. Em gatos domésticos, no Reino Unido, as infecções por '*Candidatus M. haemominutum*' (17% - 73/426) foram superiores quando comparadas às infecções por *M. haemofelis* (1,6% - 7/426) e por '*Candidatus M. turicensis*' (2,3% - 10/426) (TASKER et al., 2003a).

A análise filogenética demonstrou que os isolados de *M. haemofelis* apresentaram 100% de similaridade genética com o isolado de *M. haemofelis* de um gato doméstico (*F. catus*) no Brasil e 92% de similaridade genética com '*Candidatus M. turicensis*' de um *L. pardalis*. O isolado de '*Candidatus M. haemominutum*', proveniente de um *L. pardalis* do Maranhão, mostrou 94% de similaridade genética com o isolado de *F. catus* da África do Sul e 98% com '*Candidatus M. haemominutum*' de um exemplar de *L. wiedii* e de *L. tigrinus*, ambos do Brasil.

Nota-se que um isolado de '*Candidatus M. haemominutum*' proveniente de um exemplar de *L. pardalis* do Ceará, mostrou homologia genética de apenas 91% com '*Candidatus M. haemominutum*' dos supramencionados exemplares de *L. wiedii* e de *L. tigrinus* e somente 87% de similaridade com o mesmo agente em *F. catus*. Esse isolado mostrou-se em um ramo separado dos demais da mesma espécie, demonstrando diferenças genéticas decorrentes de inserções e deleções de nucleotídeos, não presentes nos demais isolados.

A homologia genética entre os isolados de *M. haemofelis* e '*Candidatus M. haemominutum*' que infectam gatos domésticos e silvestres sugere a transmissão indireta, via artrópodes hematófagos, de hemoplasmas entre esses felídeos.

Não foram observados sinais clínicos em nenhum dos felídeos infectados, com exceção do já citado exemplar de *P. concolor* (co-infectado por *M. haemofelis* e *C. felis*), o qual apresentou desidratação, magreza e mucosas hipocoradas. Willi et al. (2007c) também relataram um lince ibérico, de um ano de idade, com sinais clínicos de mucosas hipocoradas e anemia. O animal em questão estava co-infectado por '*Candidatus M. turicensis*' e, coincidentemente, por *C. felis*. Tanto o

P. concolor do presente trabalho quanto o lince reportado por Willi et al. (2007c) não apresentaram mais sinais clínicos em uma avaliação posterior.

Outros estudos devem ser realizados sobre as infecções por hemoplasmas felinos, principalmente elucidando o potencial de felídeos silvestres agirem como reservatórios ou portadores crônicos desses hemoparasitas.

6.4 Análise da interferência de possíveis fatores na frequência de infecções por hemoparasitas

Neste estudo procurou-se avaliar alguns fatores que poderiam interferir na prevalência das infecções por hemoparasitas. No entanto, o fato de ter estudado um grupo reduzido de felídeos devido às dificuldades inerentes de se trabalhar com animais silvestres, reforça-se a necessidade de futuras pesquisas com maior enfoque nas variáveis relatadas.

Os fatores estudados foram avaliados individualmente, porém não se pode descartar a correlação existente entre eles, além de outros fatores que também serão abordados e discutidos, os quais interferem direta ou indiretamente na relação hospedeiro, agente e ambiente.

Em relação ao fator sexo, não foram observadas diferenças significativas quando comparadas as frequências de felídeos infectados para pelo menos um hemoparasita e para pelo menos um hemoplasma felino (Tabela 10 e Tabela 11). Dados semelhantes foram relatados em 96 felídeos selvagens infectados por hemoplasmas (WILLI et al. 2007c).

Quanto à idade, notou-se uma diferença significativa no diagnóstico de felídeos infectados por hemoparasitas ($p=0,007$) (Tabela 12). O mesmo ocorreu ao se avaliar a quantidade de felídeos infectados para pelo menos um hemoplasma felino, no qual se verificou diferença ($p=0,0464$) entre os felinos adultos e juvenis, de 52,4% e de 10%, respectivamente (Tabela 13).

Acredita-se que há maior probabilidade dos felídeos mais velhos terem maior tempo de exposição a artrópodes hematófagos infectados do que felídeos mais jovens, lembrando-se que os hemoparasitas avaliados não são, geralmente,

eliminados do organismo. Além disso, no caso específico de hemoplasmas, como a transmissão também pode ocorrer através da saliva de animais infectados (WILLI et al., 2007a), é sugerido que os felídeos mais velhos, especialmente os provenientes de vida livre, tenham mais tempo para vivenciarem uma quantidade maior de interações agressivas (brigas), se comparados aos felídeos jovens.

Quando foram aferidas as espécies de felídeos infectadas, observou-se diferença significativa ($p=0,002$) na ocorrência de infecção em *L. pardalis* (81,8%) e nas espécies *L. tigrinus* (10%) e *P. yagouaroundi* (25%). No entanto, não houve diferença na frequência de infecção entre as espécies *L. tigrinus* e *P. yagouaroundi* (Tabela 14) (Figura 23). Essa diferença também foi notada quando se avaliou a ocorrência de pelo menos um hemoplasma felino, entre *L. pardalis* (63,6%) e *L. tigrinus* (10%) (Tabela 15).

Os resultados obtidos indicam que os exemplares da espécie *L. pardalis* são mais suscetíveis à infecção por hemoparasitas do que as outras espécies de felídeos examinadas. Dados semelhantes foram obtidos por Willi et al. (2007c), segundo os quais a ocorrência de infecção por hemoplasmas em *L. pardalis* foi de 85,71% (6/7) e em *L. tigrinus* foi de apenas 9,09% (3/33). De acordo com estes autores, diferenças também foram demonstradas nas outras espécies de felídeos selvagens.

Já foi relatado que a susceptibilidade de cada espécie de felídeo, juntamente com o ambiente e o estado imunológico do animal podem estar contribuindo para a infecção por hemoplasmas (WILLI et al., 2007c). Gatos domésticos também apresentam diferença de susceptibilidade, assim, animais sem raça definida apresentam maior frequência de infecção do que gatos de raça (WILLI et al., 2007b)

Em relação ao Estado de origem dos animais, observou-se diferença significativa ($p=0,04$) no que diz respeito aos felídeos infectados para pelo menos um hemoparasita, nos Estados do Maranhão e Piauí, de 66,7% (8/12) e 0% (0/5), respectivamente (Tabela 16). Quanto ao Estado do Ceará, este não apresenta diferença em relação aos Estados do Maranhão e Piauí.

Ao se avaliar os dados climáticos e ambientais dos três Estados nordestinos, segundo informações fornecidas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), observa-se que: o noroeste do Maranhão (34% do Estado) é úmido em, ao menos, nove meses do ano e é representado pelo bioma Amazônia; a região central (65% do Estado) é semi-úmida (com 4 a 5 meses secos) e é constituída pelo bioma Cerrado e o restante (1%) do Estado é formado pela Caatinga (semi-árido, com 6 a 8 meses secos) (IBGE, 2008a; IBGE, 2008b) (ANEXO 1).

O Piauí tem 63% de seu território representado pelo bioma Caatinga (clima semi-árido) e o restante, pelo Cerrado (clima semi-úmido). Finalmente, 100% do Ceará é constituído pela Caatinga, com exceção de uma pequena área, ao sul de Fortaleza, com clima úmido e semi-úmido. Todos esses três Estados são considerados quentes, com temperaturas maiores do que 18 °C em todos os meses do ano (IBGE, 2008a; IBGE, 2008b) (anexo 1)

Lahille (1905) e Bennet (1974) já descreveram que regiões com temperaturas entre 21,1 °C e 36,6 °C e umidade acima de 70% propiciam a eclosão de ovos de carrapatos ao se comparar com regiões de clima frio e de baixa umidade. Recentemente, Bosman et al. (2007) sugeriram que a taxa de umidade anual pode ter influenciado na ocorrência de infecção por *Babesia felis* em guepardos na Namíbia (5%) e leões na África do Sul (50%).

Diversos estudos sobre a infecção de hemoplasmas em gatos domésticos demonstraram que esses hemoparasitas são mais freqüentes em regiões de clima quente (LOBETTI et al., 2004; LURIA et al., 2004; TASKER et al., 2004). Este fato implica que outros artrópodes hematófagos, além das pulgas, podem ser responsáveis pela transmissão de hemoplasmas nos diferentes países (WILLI et al., 2007c).

Diante de todos esses dados e dos resultados obtidos, sugere-se que o Maranhão é o Estado que propicia melhores condições geoclimáticas à população de ectoparasitas, apesar de se desconhecer estudos sobre a prevalência destes na região. Esta observação apóia o resultado encontrado, pois uma maior

população de artrópodes hematófagos pode influenciar na frequência de infecção de hemoparasitas nos felídeos.

A observação de que o clima e o ambiente de cada Estado, ou região, interferem indiretamente nas infecções está mais relacionado aos felídeos de vida livre porque, normalmente, animais de cativeiro são submetidos ao manejo preventivo contra ectoparasitas. Sabe-se que a quase totalidade dos felídeos do estudo nasceu em vida livre e provavelmente se expôs aos invertebrados hematófagos, inclusive de espécies desconhecidas, na natureza. Resultantes de apreensões pelo IBAMA, estes felídeos se encontram, atualmente, em cativeiro nos Estados já mencionados.

Reforça-se que o manejo preventivo contra ectoparasitas (e animais domésticos que possibilitam a transmissão indireta desses invertebrados) nas instituições mantenedoras de animais selvagens é extremamente relevante para evitar a presença de infecções por hemoparasitas. Entretanto, quando ocorre um bom manejo, os animais em cativeiro têm uma menor exposição a vetores do que em vida livre e assim, menor probabilidade de infecções parasitárias.

Observou-se similar e adequado manejo preventivo em todas as instituições incluídas neste estudo com apenas uma exceção (um dos Zoológicos no Ceará). Além disso, somente três felídeos examinados (3/31) apresentaram artrópodes hematófagos e destes três animais, somente um mostrou-se infectado por um dos agentes avaliados. Diante desses dados, o manejo preventivo contra ectoparasitas não foi incluído individualmente na análise dos fatores que influenciam na infecção por hemoparasitas nos exemplares avaliados.

Em relação à sensibilidade diagnóstica, reporta-se diferença significativa ($p=0,001$) ao se avaliar os animais diagnosticados positivos pela técnica do esfregaço sanguíneo (6,5%- 2/31) e pela PCR (45,2% -14/31), sendo esta significativamente mais sensível.

Ao se aferir os animais infectados para pelo menos uma das espécies de hemoplasmas diagnosticadas (*M. haemofelis* e '*Candidatus M. haemominutum*'), de acordo com a PCR utilizada, observou-se que não houve diferença significativa

em relação à sensibilidade diagnóstica entre as técnicas PCR- RFLP e Nested-PCR.

Segundo Willi et al. (2007b), a PCR- RFLP não amplifica ou não distingue a espécie '*Candidatus M. turicensis*'. Apesar deste hemoplasma não ter sido diagnosticado (pela Nested-PCR) em nenhum dos felídeos avaliados, sugere-se que mais estudos sejam realizados sobre a sensibilidade e a especificidade da PCR-RFLP em detectar esse agente. Caso seja comprovada sua sensibilidade no diagnóstico desse hemoplasma, indica-se o uso desta técnica, ao invés da Nested-PCR, devido às limitações desta, em especial a possibilidade (e facilidade) de contaminação com produtos previamente amplificados.

6.5 Considerações sobre a reintrodução dos felídeos neotropicais do presente estudo

Com o processo generalizado de degradação ambiental, pelo qual populações animais e vegetais são depauperadas ou extirpadas, a reintrodução pode ser uma futura ferramenta conservacionista para diversas espécies ameaçadas de extinção na natureza (OLIVEIRA³, 2008). O termo englobaria: reintrodução ("stricto- senso"), translocação, reforço/suplementação e conservação/introdução benigna (IUCN, 2008).

No Brasil, reintroduções totalmente informais, inclusive de felídeos, vêm sendo realizadas aleatoriamente, implicando sérios riscos à conservação (OLIVEIRA⁴, 2008). Entre estes riscos, salienta-se a introdução de um novo agente infeccioso na natureza acarretando possíveis morbidades e mortalidades na população animal. Isto pode ocorrer, inclusive, quando espécies nativas, procedentes de fora da região de soltura, são reintroduzidas. Ressalta-se também que portadores assintomáticos de agentes infecciosos, quando expostos a diversas condições estressantes, fisiológicas ou comportamentais, podem ter suas infecções reativadas, tornarem-se doentes, re-excretarem partículas infecto-

³ OLIVEIRA, T.G., Comunicação Pessoal, 2008.

⁴ OLIVEIRA, T.G., Comunicação Pessoal, 2008.

parasitárias no ambiente e transmiti-las, direta ou indiretamente, a novos hospedeiros (FILONI et al., 2006).

É imprescindível, portanto, que a reintrodução seja criteriosamente planejada evitando-se assim, impactos negativos na natureza. No âmbito da veterinária, é importante realizar avaliações epidemiológicas e sanitárias nos exemplares destinados a reintrodução e nos de vida livre que se localizam nas regiões de soltura. Paralelamente a estas avaliações, é importante que seja feito um estudo populacional dos felídeos da região destinada a reintrodução para que se compreenda a representatividade do exemplar capturado em relação à população de sua espécie.

Quanto aos felídeos incluídos neste trabalho, quando levamos em consideração somente os hemoparasitas avaliados, observam-se três situações distintas a respeito da possível reintrodução desses animais:

- felídeos infectados com um ou mais hemoparasitas, os quais não foram diagnosticados na população em vida livre: representam risco de transmitir, diretamente ou indiretamente, esses hemoparasitas e acarretar a morbidade e/ou mortalidade dos felídeos e de outros carnívoros de vida livre da comunidade.

- felídeos infectados com um ou mais hemoparasitas diagnosticados presentes também na população em vida livre: têm o risco de reativação da infecção, desenvolvimento da doença e até mesmo o óbito quando reintroduzidos. Esta reativação pode ocorrer pelo estresse de: captura, translocação, interações agressivas com outros exemplares (brigas), fome, entre outros e pode tornar o felídeo mais suscetível a contrair, inclusive, outras infecções.

- felídeos com ausência de qualquer um dos hemoparasitas estudados: são suscetíveis a adquirir infecções por esses agentes desde que eles também estejam presentes na população de vida livre. Além disso, um felídeo silvestre não infectado por nenhum agente infecto-parasitário (o que é muito improvável) pode ser mais suscetível a apresentar doença aguda quando exposto a um patógeno, em comparação com outros felídeos infectados por diversos agentes. Relata-se, por exemplo, que a reintrodução criteriosa de cervos do Pantanal com ausência de

infecções por patógenos, dentre os avaliados, resultou em alta mortalidade dos animais (DUARTE⁵, 2007).

Como visto, em todas as situações mencionadas há limitações que podem interferir no sucesso da reintrodução. Estudos multidisciplinares específicos além de protocolos clínicos e epidemiológicos, continuamente elaborados e melhorados, podem aumentar progressivamente a capacidade preditiva da reintrodução de felídeos silvestres.

A reintrodução dos felídeos neotropicais exige um elevado custo financeiro e extenso período, ambos destinados para: obtenção de pessoal qualificado, capacitação comportamental de cada felídeo, equipamentos de radio-telemetria e de captura fotográfica, construção de recintos para adaptação na região de soltura, captura de felídeos de vida livre para avaliação de patógenos na população, monitoramento do felídeo reintroduzido por longo período no ambiente, diversos diagnósticos laboratoriais, obtenção de financiamento através de parcerias com empresas e governo, aquisição de licenças do IBAMA, além de projetos de estudos específicos. Devido ao custo e ao tempo exigidos, o sucesso obtido pela reintrodução irá demonstrar se esta é uma ferramenta conservacionista viável para os felídeos neotropicais no Brasil.

De acordo com todos os resultados obtidos até o momento, considera-se precipitado indicar a reintrodução de qualquer um dos felídeos neotropicais até que outros estudos, já mencionados, sejam realizados. Somente ao término de todas as avaliações, será decidido o destino (soltura na natureza ou permanência em cativeiro) de cada um desses animais.

⁵ DUARTE, J.M.B., Comunicação Pessoal, 2007.

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

De acordo com as metodologias empregadas e os resultados obtidos, foi possível concluir que:

1- Felídeos neotropicais das espécies *L. pardalis* e *L. tigrinus* são susceptíveis às infecções por *Hepatozoon* sp. Estas duas espécies de felídeos, juntamente com as espécies *L. wiedii*, *P. yagouaroundi* e *P. concolor*, são susceptíveis também às infecções por hemoplasmas (das espécies *M. haemofelis* e/ou 'Candidatus *M. haemominutum*'). *P. concolor* apresentou-se susceptível também ao agente *C. felis*.

2- Co-infecções entre duas espécies de hemoplasmas felinos, *M. haemofelis* e 'Candidatus *M. haemominutum*', foram observadas, assim como co-infecções por duas ou mais espécies de hemoparasitas.

3- Não foram observadas infecções por *Babesia* spp. e nem por 'Candidatus *M. turicensis*' em nenhum dos felídeos estudados.

4- Exemplos de *L. pardalis* apresentaram, aparentemente, susceptibilidade maior às infecções pelos hemoparasitas do que exemplos de *L. tigrinus*.

5- Apesar de não ser possível determinar se os felídeos adquiriram as infecções quando estavam em vida livre ou quando passaram para o cativeiro, existe grande probabilidade das infecções terem sido adquiridas quando os animais ainda estavam na natureza.

8. BIBLIOGRAFIA

8. BIBLIOGRAFIA

ALLCHURCH, A. Zoological Parks in endangered species recovery and conservation. In: AQUIRRE, A. A.; OSTFELD, R. S.; TABOR, G. M.; HOUSE, C.; PEARL, M. C. *Conservation Medicine: Ecological Health in Practice*. New York: Oxford University Press, 2002. p. 276-281.

ANDRÉ, M. R.; ADANIA, C. H.; MACHADO, R. Z.; ALLEGRETTI, S. M.; FELIPPE, P. A. N.; SILVA, K. F.; NAKAGHI, A. C. H.; DAGNONE, A. S. Molecular detection of *Cytauxzoon* spp. in asymptomatic brazilian wild captive felids. *J. Wildl. Dis.*, v. 45(1), in press, 2009.

ARAGÃO, H.; FONSECA, F. Notas de Ixodologia. VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 59, n. 2, p. 115-148, 1961.

AVERBECK, G. A.; BJJORK, K. E.; PACKER, C.; HERBST, L. Prevalence of hematozoans in lions (*Panthera leo*) and cheetah (*Acinonyx jubatus*) in Serengeti National Park and Ngorongoro Crater, Tanzania. *J. Wildl. Dis.*, v. 26, p. 392-394, 1990.

BANETH, G. *Hepatozoon canis* infection. In: GREENE, C. E. (Eds). *Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat*. Philadelphia: W.B Saunders, 2006. p. 698-704.

BANETH, G.; WEIGLER, B. Retrospective case- control study of hepatozoonosis in dogs in Israel. *J. Vet. Int. Med.*, v.11, p. 365-370, 1997.

BANETH, G.; SHKAP, V.; PRESENTEY, B. Z.; PIPANO, E. *Hepatozoon canis*: the prevalence of antibodies and gamonts in dogs in Israel. *Vet. Res. Commun.*, v. 20, p. 41-46, 1996.

BANETH, G.; SHKAP, V.; SAMISH, M.; PIPANO, E.; SAVITSKY, I. Antibody response to *Hepatozoon canis* in experimentally infected dogs. *Vet. Parasitol.*, v. 74, p. 299-305, 1998a.

BANETH, G.; AROCH, I.; TAL, N.; HARRUS, S. *Hepatozoon* species infection in domestic cats: A retrospective study. *Vet. Parasitol.*, v. 79, p. 123-133, 1998b.

BANETH, G.; BARTA, J. R.; SHKAP, V.; MARTIN, D. S.; MACINTIRE, D. K.; VINCENT-JOHNSON, N. Genetic and antigenic evidence supports the separation of *Hepatozoon canis* and *Hepatozoon americanum* at the species level. *J. Clin. Microb.*, v. 38, p. 1298-1301, 2000.

BANETH, G.; SAMISH, M.; ALEKSEEV, E.; AROCH, I.; SHKAP, V. Transmission of *Hepatozoon canis* to dogs by naturally-fed or percutaneously-injected *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *J. Parasitol.*, v. 87, p. 606-611, 2001.

BANETH, G.; MATHEW, J. S.; SHKAP, V.; MACINTIRE, D. K.; BARTA, J. R.; EWING, S. A. Canine hepatozoonosis: two disease syndromes caused by separate *Hepatozoon* spp. *Trends in Parasitol.*, v. 19, p. 27-31, 2003.

BANETH, G.; KENNY, M. J.; TASKER, S.; ANUG, Y.; SHKAP, V.; LEVY, A.; SHAW, S. E. Infection with a proposed new subspecies of *Babesia canis*, *Babesia canis* subsp. *presentii*, in domestic cats. *J. Clin. Microb.*, v. 42, p. 99-105, 2004.

BANETH, G.; SAMISH, M.; SHKAP, V. Life cycle of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae) in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dog (*Canis familiaris*). *J. Parasitol.*, v. 93, p. 283-299, 2007.

BARR, S. C.; BOWMAN, D. D.; PHILLIPS, L. G.; BARR, M. C. *Trypanosoma manulis* n. sp. from the Russian pallas cat *Felis manul*. *J. Euk. Microbiol.*, v. 40, p. 233-237, 1993.

BEAUFILS, J. P. Observation clinique: un cas d'hépatozoonose chez un chat. *N. Prac. Vet.*, p. 547, 2004.

BEAUFILS, J. P.; GRANEL, J. M.; JUMELLE, P. Hépatozoonose chez le chien et chez le renard: épidémiologie, Clinique et traitement. *Prat. Méd. Chir. Anim. Comp.*, v. 31, p. 243-253, 1996.

BEAUFILS, J. P.; GRANEL, J. M.; JUMELLE, P. *Hepatozoon* spp. Parasitemia and feline leukemia virus infection in two cats. *Fel. Pract.*, v. 26, p. 10-13, 1998.

BENNETT, G. F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina: Ixodidae). II. Influence of temperature, humidity and light. *Acarologia*, v. 16, p. 250-257, 1974.

BERENT, L. M.; MESSICK, J. B.; COPPER, S. K. Detection of *Haemobartonella felis* in cats with experimentally induced acute and chronic infections, using a polymerase chain reaction assay. *Am. J. Vet. Res.*, v. 59, p. 1215-1220, 1998.

BERENT, L. M. *Haemobartonella felis* (*Mycoplasma haemofelis*): *Molecular Diagnostics and Genomic Studies*. 2002.124f. Tese (Doutorado). University of Illinois, Urbana-Champaign, USA.

BERGER, K. M. Carnivore livestock conflicts: effects of subsidized predator control and economic correlates on the sheep industry. *Conserv. Biol.*, v. 20, n. 3, p. 751-761, 2007

BIRKENHEUER, A. J.; LE, J. A.; VALENZISI, A. M.; TUCKER, M.D.; LEVY, M.G.; BREITSCHWERDT, E.B. *Cytauxzoon felis* infection in cats in the mid-Atlantic states: 34 cases (1998-2004). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 228, p. 568-571, 2006

BLOUIN, E. F.; KOCAN, A. A.; GLENN, B. L.; KOCAN, K. M. Transmission of *Cytauxzoon felis* Kier, 1979 from bobcats, *Felis rufus* (Schreber), to domestic cats by *Dermacentor variabilis* (Say). *J. Wildl. Dis.*, v. 20, n. 3, p. 241-242, 1984.

BOBADE, P.A., NASH, A.S., ROGERSON, P. Feline haemobartonellosis: clinical, haematological and pathological studies in natural infections and the relationship to infection with feline leukaemia virus. *Vet. Record*, v. 122, p. 32-36, 1988.

BONDY Jr., P. J.; COHN, L. A.; TYLER, J. W.; MARSH, A. E. Polymerase chain reaction detection of *Cytauxzoon felis* from field-collected ticks and sequence analysis of the small subunit and internal transcribed spacer 1 region of the ribosomal RNA gene. *J. Parasitol.*, v. 91, p. 458-461, 2005.

BOURDEAU, P. Les babésioses félines. *Le Point Veterinaire*. v. 27, n. 173, p. 43-49, 1996.

BOSMAN, A. M.; PENZHORN, V. B. L. Occurrence of *Babesia felis* and *Babesia leo* in various wild felid species and domestic cats in Southern Africa, based on reverse line blot analysis. *Vet. Parasitol.*, v. 144, p. 33-38, 2007.

BROCKLESBY, D. W.; VIDLER, B. O. Some new host records for *Hepatozoon* species in Kenya. *Vet. Record*, v. 75, p. 1265, 1963.

CARNEIRO, M. P. *Estudo da ocorrência da infecção por Babesia spp. e Hepatozoon spp. em gatos domésticos (Felis domesticus) no Brasil*. 2007. 66f. Dissertação (mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

CARNEY, H. C.; ENGLAND, J. J. Feline hemobartonellosis. *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.*, v. 23, n. 1, p. 79-90, 1993.

CAVALCANTE, G. G. *Aspectos clínicos e epidemiológicos das infecções por Babesia bovis, Babesia bigemina e Anaplasma marginale em bezerros da raça Nelore no Estado de São Paulo*. 2007. 121f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

CORRÊA, S. H. R.; TEIXEIRA, R. H. F. Ocorrência de *Haemobartonella felis* e *Babesia* sp. em felinos neotropicais cativos na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. In: *Congresso de Zoológicos do Brasil, 27, 2003, Bauru. Anais...* Bauru: Brasil, 2003.

CRAIG, T.M. Hepatozoonosis. In: GREENE, C.E. (Eds). *Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat*. Philadelphia: W.B Saunders, 1984. p. 771-779.

CRIADO-FORNELIO, A.; MARTINEZ-MARCOS, A.; BULING-SARANA, A.; BARBA-CARRETERO, J. C. Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats from southern Europe: a molecular study. *Vet. Microbiol.*, v. 93, p. 307–317, 2003a.

CRIADO-FORNELIO, A.; MARTINEZ-MARCOS, A.; BULLING-SARANA, A.; BARBA-CARRETERO, J. C. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history. *Vet. Parasitol.*, v. 114, p. 173-194, 2003b.

CRIADO-FORNELIO, A.; RUAS, J. L.; CASADO, N.; FARIAS, N. A. R.; SOARES, M. P.; BRUM, J. G. W.; BERNE, M. E. A.; BULING-SARAÑA, A.; BARBA-CARRETERO, J. C. New molecular data on mammalian *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Adeleorina) from Brazil and Spain. *J. Parasitol.*, v. 92, n. 1, p. 93-99, 2006.

DAVIS, L. J. On a piroplasm of the Sudanese wild cat (*Felis ocreata*). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 22, p. 523-534, 1929.

DAVIS, D. S.; ROBINSON, R. M.; CRAIG, T. M. Naturally occurring hepatozoonosis in a coyote. *J. Wildl. Dis.*, v. 14, p. 244–246, 1978.

DAVIS, L. G.; KUEHL, W. M.; BATTEY, J. F. Restriction endonucleases and methylases. In: *Basic methods in molecular biology*. 2ed. Appleton & Lange, Paramount Publishing Business and Professional Group, 1994, p. 87-95.

DEAN, R.; HELPS, C. R.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; TASKER, S. Use of real-time PCR to detect *M. haemofelis* and 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*' in the saliva and salivary glands of haemoplasma-infected cats. In: *BSAVA Congr. British Small Animal Veterinary Association*, Gloucester, United Kingdom, 2005. *Proceedings...* Gloucester, United Kingdom, 2005. p. 554.

DENNIG, H. K.; BROCKLESBY, D. W. *Babesia pantherae* new species, a piroplasm of the leopard *Panthera pardus*. *Parasitol.*, v. 64, p. 525-532, 1972.

DESSER, S. S. Tissue "cyst" of *Hepatozoon griseisciuri* in the grey squirrel, *Sciurus carolinensis*: the significance of these cysts in species of *Hepatozoon*. *J. Parasitol.*, v. 76, p. 257-259, 1990.

ELIAS, E.; HOMANS, P. A. *Hepatozoon canis* infection in dogs: clinical and haematological findings treatment. *J. Small Anim. Pract.*, v. 29, p. 55-62, 1988.

EWING, G. O. Granulomatous cholangiohepatitis in a cat due to a protozoan parasite resembling *Hepatozoon canis*. *Fel. Pract.*, v. 7, p. 37-40, 1977.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, v. 39, p. 783–791, 1985.

FILONI, C.; DIAS, J. L. C.; DURIGON, E. L.; JORGE, R. S. P. Exposição de felídeos selvagens a agentes infecciosos selecionados. In: *X Congresso e XV Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens*, 2006, São Pedro. *Anais...*São Pedro: Brasil, 2006.

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. *Am. J. Vet. Res.*, v. 59, p. 1581-1588, 1998.

FOLEY, J. E.; PEDERSEN, N.C. 'Candidatus Mycoplasma haemominutum', a low-virulence epierthrocytic parasite of cats. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 51, p. 815–817, 2001.

FORLANO, M. D.; TEIXEIRA, K. R. S.; SCOFIELD, A.; ELISEI, C.; YOTOKO, K. S. C.; FERNANDES, K. R.; LINHARES, G. F. C.; EWING, S. A.; MASSARD, C. L. Molecular characterization of *Hepatozoon* sp. from Brazilian dogs and its phylogenetic relationship with other *Hepatozoon* spp. *Vet. Parasitol.*, v. 145, p. 21-30, 2007.

FUJIHARA, M.; WATANABE, M.; YAMADA, T.; HARASAWA, R. Occurrence of 'Candidatus Mycoplasma turicensis' infection in domestic cats in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 69 (10), p. 1061-1063, 2007.

GARNER, M. M.; LUNG, N. P.; CITINO, S.; GREINER, E. C.; HARVEY, J.W.; HOMER, B. L. Fatal cytauxzoonosis in a captive-treated White Tiger (*Panthera tigris*). *Vet. Pathol.*, v. 33, n. 1, p. 82-86, 1996.

GEORGE, J. W.; RIDEOUT, B. A.; GRIFFEY, S. M.; PEDERSEN, N. C. Effect of preexisting FeLV infection or FeLV and feline immunodeficiency virus coinfection on pathogenicity of the small variant of *Haemobartonella felis* in cats. *Am. J. Vet. Res.*, v. 63, p. 1172–1178, 2002.

GONEN, L.; STRAUSS-AYALI, D.; SHKAP, V.; VINCENT-JOHNSON, N.; MACINTIRE, D. K.; BANETH, G. An enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Hepatozoon canis*. *Vet. Parasitol.*, v. 122, p. 131-139, 2004.

HABER, M. D.; TUCKER, M. D.; MARR, H. S.; LEVY, J. K.; BURGESS, J.; LAPPIN, M. R.; BIRKENHEUER, A. J. The detection of *Cytauxzoon felis* in apparently healthy free-roaming cats in USA. *Vet. Parasitol.*, v. 146, p. 316-320, 2007.

HAEFNER, M.; BURKE, T. J.; KITCHELL, B. E.; LAMONT, L. A.; SCHAEFFER, D. J.; BEHR, M.; MESSICK, J. B. Identification of *Haemobartonella felis* (*Mycoplasma haemofelis*) in captive nondomestic cats. *J. Zoo Wildl. Med.*, v. 34, p. 139–143, 2003.

HARVEY, J. W.; GASKIN, J.M. Experimental feline haemobartonellosis. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, v. 13, p. 28–38, 1977.

HARVEY, J. W. Haemobartonellosis. In: GREENE, C. E. *Infectious diseases of the dog and cat*. 3. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2006. chap.31 p. 252-265.

HOSKINS, J.D. Canine haemobartonellosis, canine hepatozoonosis and feline cytauxzoonosis. *Vet. Clin. N. Am. Small Anim. Pract.*, v. 21, p. 129–140, 1991.

IBGE. Mapa de Biomas e Vegetação. *Comunicação Social*. 21. mai. 2004 Disponível em: [HTTP://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_impressao.php?id_noticia=169](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_impressao.php?id_noticia=169)>, 2004. Acesso em: 15 dez. 2008a.

IBGE. Diretoria de Geociências, Coordenação de Recursos Naturais e Estudos Ambientais. Disponível em: <[HTTP://www.ibge.gov.br/ibgeteen/atlasescolar/mapas_pdf/brasil_clima.pdf](http://www.ibge.gov.br/ibgeteen/atlasescolar/mapas_pdf/brasil_clima.pdf)> Acesso em: 15 dez. 2008b.

INOKUMA, H.; OHNO, K.; YAMAMOTO, S. Serosurvey of *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* infection in dogs in Yamagushi Prefecture, Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 61, p. 1153-1155, 1999.

IUCN. Red list of threatened species. Disponível em: <www.iucn.org/redlist>. Acesso em: 15 dez. 2008.

JAMES, S.P. A new *Leucocytozoon* of dogs. *Br. Med. J.*, v.1, p.1361, 1905.

JOHNSON, E. M.; ALLEN, K. E.; PANCIERA, R. J.; LITTLE, S. E.; EWING, S. A. Infectivity of *Hepatozoon americanum* cystozoites for a dog. *Vet. Parasitol.*, v.154, p.148-150, 2008.

JOYNER, P. H.; REICHARD, M. V.; MEINKOTH, J. H.; MILNE V. E.; CONFER, W.; KOCAN, A. A.; HOOVER, J. P. Experimental infection of domestic cat (*Felis domesticus*) with *Cytauxzoon manul* from Pallas' cats (*Otocolobus manul*). *Vet. Parasitol.*, v. 146, p. 302- 306, 2007.

KARAGENC, T. I.; PASA, S., KIRLI, G.; HOSGOR, M.; BILGIC, H. B.; OZON, Y. H.; ATASOY, A.; EREN, H. A parasitological, molecular and serological survey of *Hepatozoon canis* infection in dogs around the Aegean coast of Turkey. *Vet. Parasitol.*, v. 135, p. 113-119, 2006.

KETZ-RILLEY, C. J.; REICHARD, M. V.; VAN DEN BUSSCHE, R. A.; HOOVER, J. P.; MEINKOTH, J.; KOKAN, A. A. An Intraerythrocytic small piroplasm in wild caught pallas's cats (*Otocolobus manul*) from Mongolia. *J. Wildl. Dis.*, v. 39, n. 2, p. 424-430, 2003.

KIER, A. B.; WAGNER, J. E.; KINDEN, D. A. The pathology of experimental cytauxzoonosis. *J. Comp. Pathol.*, v. 97, p. 415– 429, 1987.

KLOPFER, U.; NOBEL, T. A.; NEUMANN, F. Hepatozoon-like parasite (schizonts) in the myocardium of domestic cat. *Vet. Pathol.*, v. 10, p. 185-190, 1973.

KUBO, M.; MIYOSHI, N.; YASUDA, N. Hepatozoonosis in two species of Japanese wild cat. *J. Parasitol.*, p. 833- 837, 2006.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA 3. Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.*, v. 5, p. 150–163, 2004.

LAHILLE, F. Contribution a l'étude des Ixodidés de la Republique Argentine. *An. Minist. Agric.*, v. 2, p. 1-166, 1905.

LANDAU, I.; MICHAEL, J. C.; CHABAUD, A. G. Cycle biologique d' *Hepatozoon domerquei*; discussion sur les caracteres fondamentaux d'un cycle de coccidie. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, v. 38, p. 250–270, 1972.

LANE, J. R.; KOKAN, A. Hepatozoon infection in bobcats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 183, n. 11, p.323-1324, 1983.

LEVINE, N. D. Nomenclatural corrections and new taxa in the apicomplexan protozoa. *Trans. Am. Microsc. Soc.*, v. 103, p. 195-206, 1984.

LOBETTI, R. G.; TASKER, S. Diagnosis of feline haemoplasma infection using a real-time PCR assay. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, v. 75, p. 94–99, 2004.

LOPES, V. V. A. *Estudo parasitológico e molecular da infecção por Babesia spp. em cães de áreas rurais do Estado de São Paulo*. 2006. 61f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

LURIA, B. J.; LEVY, J. K.; LAPPIN, M. R.; BREITSCHWERDT, E. B.; LEGENDRE, A. M.; HERNANDEZ, J. A.; GORMAN, S. P.; LEE, I. T. Prevalence of infectious diseases in feral cats in northern Florida. *J. Feline Med. Surg.*, v. 6, p. 287–296, 2004.

MAIA, L. M. P.; SILVA, A. V.; CÔRREA, R. G. B.; SOUZA, A. M.; GRECO, G. M.; ALMOSNY, N. R. P.; CERQUEIRA, A. M. F. *Cytauxzoon felis* and 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' co-infection in a domestic cat (*Felis catus*) in Rio de Janeiro State, Brazil. In: *Xv Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária – II*

Seminário de Parasitologia Veterinária dos Países do Mercosul, 2008, Curitiba. *Anais...* Curitiba: Brasil, 2008

MATHEW, J. S.; VAN DEN BUSSCHE, R. A.; EWING, S. A.; MALAYER, J. R.; LATHA, B. R.; PANCIERA, R. J. Phylogenetic relationships of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) base on molecular, morphologic, and life-cycle characters. *J. Parasitol.*, v. 86, p. 366-372, 2000.

MCCULLY, R. M.; BASSON, P. A.; BIGALKE, R. D.; DE-VOS, V.; YOUNG, E. Observations on naturally acquired hepatozoonosis of wild carnivores and dogs in the Republic of South Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, v. 42, p.117-134, 1975.

MEINKOTH, J. H.; KOCAN, A. A.; WHITWORTH, L.; MURPHY, G.; FOX, J. C.; WOODS, J. P. Cats surviving natural infection with *Cytauxzoon felis*: 18 cases (1997–1998). *J. Vet. Intern. Med.*, v. 14, p. 521-525, 2000.

MERCER, S. H.; JONES, L. P.; RAPPOLE, J. H.; TWEDT, D.; LAACK, L. L.; CRAIG, T. M. *Hepatozoon* sp. in wild carnivores in Texas. *J. Wildl. Dis.*, v.24, p. 574-576, 1988.

MESSICK, J. B. New perspectives about Hemotrophic mycoplasma (formerly, *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* species) infections in dogs and cats. *Vet. Clin. N. Am. Small Anim. Pract.*, v. 33, p. 1453–1465, 2003.

MESSICK, J. B. Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. *Vet. Clin. Pathol.*, v. 33, p. 2–13, 2004.

METZGER, B.; PADUAN, K. S.; RUBINI, A. S.; OLIVEIRA, T. G.; PEREIRA, C.; O'DWYER, L. H. The first report of *Hepatozoon* sp. (Apicomplexa: Hepatozoidae) in neotropical felids from Brazil. *Vet. Parasitol.*, v. 152, p. 28-33, 2008.

MILLAN, J.; NARANJO, V.; RODRÍGUEZ, A.; LA LASTRA, J. M. P.; MANGOLD, A. J.; LA FUENTE, J. Prevalence of infection and 18S rRNA gene sequences of *Cytauxzoon* species in Iberian Lynx (*Lynx pardinus*) in Spain. *Parasitol.*, v. 134, p. 995-1001, 2007.

MUDALIAR, S. V.; ACAHRY, G. R.; ALWAR, V. S. On a species of *Babesia* in an Indian wild cat. *Ind. Vet. J.*, v. 26, p. 391-395, 1950.

MUNSON, L.; TERIO, K. A.; KOCK, R.; MLENGEYA, T.; ROELKE, M. E.; DUBOVI, E.; SUMMERS, B.; SINCLAIR, A. R. E.; PACKER, C. Climate extremes promotes fatal co-infections during canine distemper epidemics in African lions. *Plos One*, v. 3, n. 6, e.2545, 2008.

MURATA, T.; INOUE, T. M.; TATEYAMA, S.; TAURA, Y.; NAKAMA, S. Vertical transmission of *Hepatozoon canis* in dogs. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 55, p. 867-868, 1993.

NIETFELD, J. C.; POLLOCK, C. Fatal cytauxzoonosis in a free-ranging bobcat (*Lynx rufus*). *J. Wildl. Dis.*, v. 38, n. 3, p. 607-610, 2002.

NORDGREN, R. M.; CRAIG, T. M. Experimental transmission of the Texas strain of *Hepatozoon canis*. *Vet. Parasitol.*, v. 16, p. 207– 214, 1984.

O'DWYER, L. H.; SAITO, M. E.; HASEGAWA, M. Y.; KOHAYAGAWA, A. Tissue stages of *Hepatozoon canis* in naturally infected dogs from Sao Paulo State, Brazil. *Parasitol. Res.*, v. 94, n. 3, p. 240-242, 2004.

OLIVEIRA, T. G. Impacto das atividades humanas nos carnívoros no Estado do Maranhão. *Pesquisa em foco*. v. 6, p. 67-77, 1998.

OLIVEIRA, T. G. The little spotted cat *Leopardus tigrinus* in Amazonia: unraveling a myth. *Cat News Int. J. Cat Res. Conservation*. v. 41, p.29-32, 2004.

ORTUÑO, A.; CASTELLA, J.; CRIADO-FORNELIO, A.; BULING, A., BARBA-CARRETERO, J. C. Molecular detection of a *Hepatozoon* species in stray cats from a feline colony in North-eastern Spain. *Vet. Journal*, v.177, p.134-135, 2008.

PATTON, W. S. The hemogregarines of mammals and reptiles. *Parasitol.*, v. 1, p. 318-321, 1908.

PEIXOTO, P. V.; SOARES, C. O.; SCOFIELD, A.; SANTIAGO, C. D.; FRANA, T. N.; BARROS, S. S. Fatal cytauxzoonosis in captive-reared lions in Brazil. *Vet. Parasitol.*, v. 145, p. 383-387, 2007.

PENZHORN, B. L., Babesiosis of wild carnivores and ungulates. *Vet Parasitol.*, v. 138, p. 11-21, 2006.

PENZHORN, L. B.; KJEMTRUP, A. M.; LOPES-REBOLLAR, L. M.; CONRAD, P. A. *Babesia leo* n. sp. from lions in Kruger National Park, South Africa, and its relation to other small piroplasms. *J. Parasitol.*, v. 87, p. 681-685, 2001.

PEREZ, R. R.; RUBINI, A. S.; O'DWYER, L. H. The first report of *Hepatozoon spp.* (Apicomplexa, Hepatozoidae) in domestic cats from São Paulo state, Brazil. *Parasitol. Res.*, v. 94, p. 83-85, 2004.

REICHARD, M. V.; BAUM, K. A.; CADENHEAD, S. C.; SNIDER, T. A. Temporal occurrence and environmental risk factors associated with cytauxzoonosis in domestic cats. *Vet. Parasitol.*, v. 152, p. 314-320, 2008.

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*. *J. Clin. Microbiol.*, v. 35, p. 823–829, 1997.

ROTSTEIN, D. S.; TAYLOR, S. K.; HARVEY, J. W.; BEAN, J. Hematologic effects of cytauxzoonosis in Florida panthers and Texas cougars in Florida. *J. Wildl. Dis.*, v. 35, n. 3, p. 613-617, 1999.

RUBINI, A. S.; PADUAN, K. S.; CAVALCANTE, G. G.; RIBOLLA, P. E. M.; O'DWYER, L. H. Molecular identification and characterization of canine *Hepatozoon* species from Brazil. *Parasitol. Res.*, v. 97, p. 91-93, 2005.

RUBINI, A. S.; PADUAN, K. S.; PEREZ, R. R.; RIBOLLA, P. E. M.; O'DWYER, L. H. Molecular characterization of feline *Hepatozoon* species from Brazil. *Vet. Parasitol.*, v. 137, p. 168-171, 2006.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol.*, v. 4, p. 406-425, 1987.

SCHOEMAN, T.; LOBETTI, R. G.; JACOBSON, L. S.; PENZHORN, B.L. Feline babesiosis: signalment, clinical pathology and concurrent infections. *S. Afr. Vet. Ver.*, v. 72, p. 4-11, 2001.

SHKAP, V.; BANETH, G.; PIPANO, E. Circulating antibodies to *Hepatozoon canis* demonstrated by immunofluorescence. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 6, p. 121-123, 1994.

SIMPSON V. R. Veterinary advances in the investigations of wildlife diseases in Britain. *Res. Vet. Sci.*, v. 69, p. 11-16, 2000.

SMITH, T. G. The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). *J. Parasitol.*, v. 82, p. 565-585, 1996.

SOARES, A. L.; SOUZA, A. D.; FELICIANO, E. A.; RODRIGUES, A. F. S. F.; DÁGOSTO, M.; DAEMON, E. Avaliação ectoparasitológica e hemoparasitológica em cães criados em apartamentos e casas com quintal na cidade de Juiz de Fora, MG. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 15, p. 13-16, 2006.

SYKES, J. E. Feline hemotropic mycoplasmosis (feline hemobartonellosis). *Vet. Clin. N. Am. Small Anim. Pract.*, v. 33, p. 773-789, 2003.

TABAR, M. D.; ALTET, L.; FRANCINO, O.; SÁNCHEZ, A.; FERRER, L.; ROURA, X. Vector-borne infections in cats: Molecular study in Barcelona area (Spain). *Vet. Parasitol.*, v. 151, p. 332-336, 2008.

TAROURA, S.; SHIMADA, Y.; SAKATA, Y.; MIYAMA, T.; HIRAOKA, H.; WATANABE, M.; ITAMOTO, K.; OKUDA, M.; INOKUMA, H. Detection of DNA of 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' and *Spiroplasma* sp. in unfed ticks collected from vegetation in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 67, p. 1277-1279, 2005.

TASKER, S. Current concepts in feline haemobartonellosis. *In Practice*, v. 28, p. 136–141, 2006.

TASKER, S.; LAPPIN, M. R. *Haemobartonella felis*: recent developments in diagnosis and treatment. *J. Feline Med. Surg.*, v. 4, p. 3–11, 2002.

TASKER, S.; BINNS, S. H.; DAY, M. J.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; HARBOUR, D. A.; HELPS, C. R.; JENSEN, W. A.; OLVER, C. S.; LAPPIN, M. R. Use of a PCR assay to assess the prevalence and risk factors for *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*' in cats in the United Kingdom. *Vet. Rec.*, v. 152, p. 193–198, 2003a.

TASKER, S.; HELPS, C. R.; DAY, M. J.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; HARBOUR, D. A. Use of real-time PCR to detect and quantify *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*' DNA. *J. Clin. Microbiol.*, v. 41, p. 439–441, 2003b.

TASKER, S.; BRADDOCK, J. A.; BARAL, R.; HELPS, C. R.; DAY, M. J.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; MALIK, R. Diagnosis of feline haemoplasma infection in Australian cats using a real-time PCR assay. *J. Feline Med. Surg.*, v. 6, p. 345–354, 2004

TASKER, S.; CANEY, S. M.; DAY, M. J.; DEAN, R. S.; HELPS, C. R.; KNOWLES, T. G.; LAIT, P. J.; PINCHES, M. D.; GRUFFYDD-JONES, T. J. Effect of chronic feline immunodeficiency infection, and efficacy of marbofloxacin treatment, on 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*' infection. *Microbes Infect.*, v. 8, p. 653–661, 2006a.

TASKER, S.; CANEY, S. M.; DAY, M. J.; DEAN, R. S.; HELPS, C. R.; KNOWLES, T. G.; LAIT, P. J.; PINCHES, M. D.; GRUFFYDD-JONES, T. J. Effect of chronic FIV infection, and efficacy of marbofloxacin treatment, on *Mycoplasma haemofelis* infection. *Vet. Microbiol.*, v. 117, p. 169–179, 2006b.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, v. 24, p. 4876–4882, 1997.

UILENBERG, G. *Babesia* – A historical overview. *Vet. Parasitol.*, v. 138, p. 3–10, 2006.

VAN AMSTEL, S. Hepatozoonosis in a kat. *J. S. Afr. Med. Assoc.*, v. 50, p. 215–216, 1979.

WAGNER, J. E. A fatal citauxzoonosis-like disease in domestic cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 168, p. 585–588, 1976.

WAGNER, J. E.; FERRIS, D. H.; KIER, A. B.; WIGHTMAN, S. R.; MARING, E.; MOREHOUSE, L. G.; HANSEN, R. D. Experimental induced citauxzoonosis-like disease in domestic cats. *Vet. Parasitol.*, v. 6, p. 305-311, 1995.

WALKER, D. B.; COWELL, R. L. Survival of a domestic cat with naturally acquired cytauxzoonosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 206, n. 9, p. 1363-1365, 1995.

WENYON, C. M. *Protozoology: A Manual for Medical Men, Veterinarians and Zoologists*. v.2. London: Balliere, Tindall and Cox, 1926, 1563p.

WEHINGER, K. A.; ROELKE, M. E.; GREINER, E. C. Ixodid ticks from panthers and bobcats in Florida. *J. Wildl. Dis.*, v. 31, n. 4, p. 480-485, 1995.

WESTFALL, D. S.; JENSEN, W. A.; REAGAN, W. J.; RADECKI, S. V.; LAPPIN, M. R. Inoculation of two genotypes of *Hemobartonella felis* (California and Ohio variants) to induce infection in cats and the response to treatment with azithromycin. *Am. J. Vet. Res.*, 62, 687–691, 2001.

WILLI, B.; BORETTI, F. S.; CATTORI, V.; TASKER, S.; MELI, M. L.; REUSCH, C.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Identification, molecular characterization, and experimental transmission of a new hemoplasma isolate from a cat with hemolytic anemia in Switzerland. *J. Clin. Microbiol.*, v. 43, p. 2581-2585, 2005.

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. *J. Clin. Microbiol.*, v. 44, p. 961–969, 2006a.

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. *J. Clin. Microbiol.*, v. 44, p. 4430–4435, 2006b.

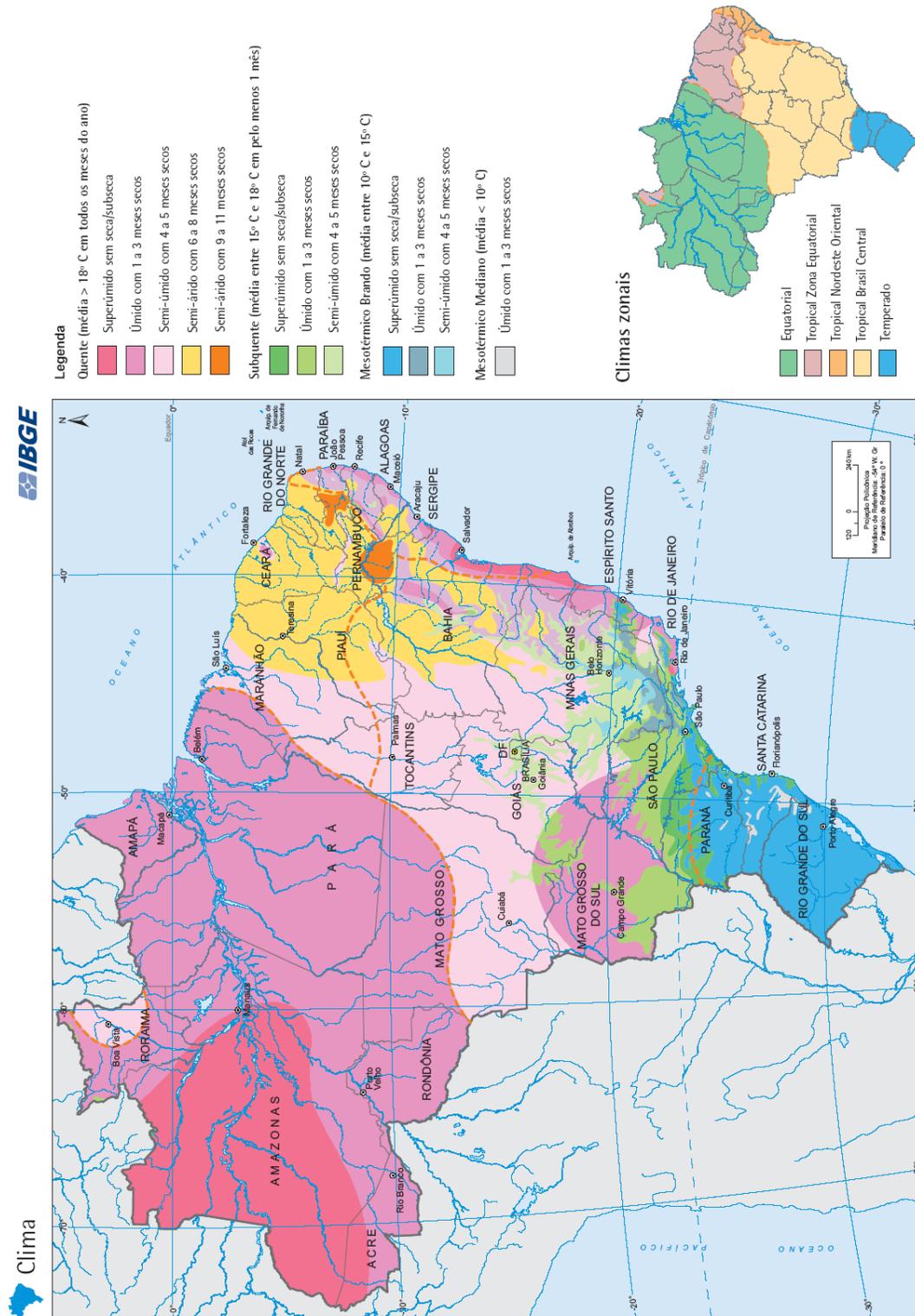
WILLI, B.; BORETTI, F. S.; MELI, M. L.; BERNASCONI, M. V.; CASATI, S.; HEGGLIN, D.; PUORGER, M.; NEIMARK, H.; CATTORI, V.; WENGI, N.; REUSCH, C. E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Realtime PCR investigation of potential vectors, reservoirs and shedding patterns of feline hemotropic mycoplasmas. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 73, p. 3798–3802, 2007a.

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. *Vet. Microbiol.*, v. 125, p. 197-209, 2007b.

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. *J. Clin. Microbiol.*, v. 45, p. 1159–1166, 2007c.

ANEXO 1. Modelo metodológico de classificação de climas no Brasil

fonte: [HTTP://www.ibge.gov.br/ibgeteen/atlasescolar/mapas_pdf/brasil_clima.pdf](http://www.ibge.gov.br/ibgeteen/atlasescolar/mapas_pdf/brasil_clima.pdf)



10. TRABALHO CIENTÍFICO

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)