

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Rejane Barcelos Souza

LEVANTAMENTO DE MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS EM LOBOS-GUARÁ
(*Chrysocyon brachyurus*) DE VIDA LIVRE DO CERRADO BRASILEIRO

Porto Alegre

2021

REJANE BARCELOS SOUZA

LEVANTAMENTO DE MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS EM LOBOS-GUARÁ
(*Chrysocyon brachyurus*) DE VIDA LIVRE DO CERRADO BRASILEIRO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Comissão de Graduação do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. João Fábio Soares

Coorientadora: M^º Renata Fagundes
Moreira

Porto Alegre

2021

CIP - Catalogação na Publicação

Souza, Rejane Barcelos
LEVANTAMENTO DE MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS EM
LOBOS-GUARÁ (*Chrysocyon brachyurus*) DE VIDA LIVRE DO
CERRADO BRASILEIRO / Rejane Barcelos Souza. -- 2021.
32 f.
Orientador: João Fábio Soares.

Coorientadora: Renata Fagundes Moreira.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Biociências, Bacharelado em Ciências Biológicas,
Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Lobos-guará. 2. Preservação. 3. Micoplasma. 4.
Parasitas. I. Soares, João Fábio, orient. II.
Moreira, Renata Fagundes, coorient. III. Título.

REJANE BARCELOS SOUZA

LEVANTAMENTO DE MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS EM LOBOS-GUARÁ
(*Chrysocyon brachyurus*) DE VIDA LIVRE DO CERRADO BRASILEIRO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. João Fábio Soares

Coorientadora: Me. Renata Fagundes
Moreira

Aprovada em: Porto Alegre, _____, de _____, 2021.

BANCA EXAMINADORA:

Alessandra Peres Profa. Dra.
UFCSPA

Claudia Calegari Marques Profa. Dra.
UFRGS

João Fábio Soares Prof. Dr.
UFRGS

Dedico este trabalho ao meu pai Ibirá Souza (*in memoriam*) e à minha avó Lair Barcellos (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido José Renato, por me estimular a seguir em frente mesmo nos momentos em que eu tinha tudo para desistir.

À minha mãe Eva Regina, que sempre perguntava se podia vir me ver, pois se preocupava em não atrapalhar meus estudos, minha irmã Rosane que divide a sala de trabalho comigo e me dava as caronas para o Vale, meu filho Lucas e meu sobrinho Diego que estavam sempre por perto me dando aquele carinho gostoso.

Aos colegas de trabalho, que nunca desacreditaram de mim e sempre me estimularam a buscar conhecimento, em especial aos Médicos Veterinários Cláudia Faraco, Suzana Cheuiche, Irene Breitsameter, Nina Isabel, Eglete Pacheco, Luciane Vieira, Luciana Oliveira, Marianne Lamberts, Mauro Machado e meu amor amigo Fábio Teixeira.

Ao prof^o Marcelo Allievi, que me estimulou a fazer a capacitação de Agente Ambiental, então abri meus horizontes dentro da UFRGS.

Aos colegas de graduação, que em todos os momentos estavam ali para segurar na minha mão e me puxar para cima, mas muito em especial às pessoinhas que me proporcionaram os melhores anos da minha vida, com muita energia, balinhas de goma, risadas e carinho, um obrigadão especial à minha guriazinha Maria Eduarda, meu bebê Meyre Lúcia e nosso fiel escudeiro Giovanni Copello (Tiger). Vocês são imprescindíveis na minha vida.

À Taiana, minha professora, consultora, mestra, confidente e amiga, que desde o início cuidou para que eu superasse todas as minhas dificuldades e medos durante a graduação.

À prof^a Stella, por ter me apresentado ao prof^o João Fábio, com quem eu estreitei laços e passei minha graduação toda querendo trabalhar em seu laboratório, e que me acolheu com um imenso sorriso e movemos céus e terra para construir este material.

À doutoranda Renata, que aceitou me coorientar e ensinar a rotina do laboratório.

Agradeço ao projeto Onçafari e ao Instituto Pró-Carnívoros pelas amostras de sangue na pessoa do M^e. Med. Vet Joares A. May Jr.

E a todas as pessoas que de alguma forma, e em algum momento estiveram presentes e somaram para minha formação.

RESUMO

A incrível capacidade humana de ocupar as mais diferentes áreas do planeta nos coloca como principais causadores das alterações ambientais e climáticas, e estas induzem a proliferação de patógenos antrópicos nos mais diversos biomas. Estes patógenos compõem as relações interespecíficas em biomas extremamente vulneráveis, que podem facilitar o contato à medida que os níveis de antropização aumentam e a proximidade com os humanos aumenta. Conhecer sobre agentes que infectam populações silvestres, nos fornece informações imprescindíveis para ações com foco em saúde pública e conservação. A identificação de potenciais reservatórios selvagens para hemoparasitoses, contribui para a compreensão do ciclo destes patógenos, bem como o entendimento das enfermidades causadas por elas. Este estudo tem como objetivo avaliar a presença de hemoplasmas em lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) em uma área de preservação do Cerrado brasileiro. As condições destes lobos-guará (*C. brachyurus*) são importantes para corroborar estudos sobre animais de vida livre. A presença de infecção ou a exposição destes indivíduos aos micoplasmas hemotrópicos foram investigadas utilizando métodos moleculares. Para o presente estudo obtivemos amostras de sangue total de lobos-guará (*C. brachyurus*) de vida livre em uma reserva de preservação ecológica. Nas análises moleculares, as amostras apresentaram resultados negativos para qualquer micoplasma hemotrópico. Além disso, manter estudos frequentes e compilar dados é importante, para que se tenha mais informações para avaliar os possíveis patógenos que circulam entre os canídeos de vida livre. Com base nos resultados é provável que os hemoplasmas não circulem na população estudada ou ocorram em quantidades tão baixas que não foram detectadas. Entretanto pesquisas com um maior número de indivíduos e em outros biomas são fundamentais para a compreensão da relação entre os hemoplasmas e os canídeos silvestres.

Palavras-chave: Canídeo. Hemoparasitoses. Conservação.

ABSTRACT

*The incredible human capacity to occupy the most different areas of the planet make us the greatest cause of environmental and climate changes, and that induce the proliferation of anthropogenic pathogens in the most diverse biomes. These pathogens make up interspecific relationships in extremely vulnerable biomes, which can facilitate contact as levels of anthropization increase and proximity to humans increases. Knowing about agents that infect wild populations provides us with essential information for actions focused on public health and conservation. The identification of potential wild reservoirs for hemoparasitosis informs us about the cycle of these pathogens, as well as the understanding of the diseases caused by them. This study aims to sample the sanitary conditions of maned wolves in a conservation area of the Brazilian Cerrado. The conditions of these maned wolves (*C. brachyurus*) are important to corroborate studies on free-living animals. The presence of infection or exposure of these individuals to hemotropic mycoplasmas will be investigated using molecular methods. For the present study, we obtained whole blood samples from free-living maned wolves in an ecological preservation reserve. In the molecular analyses, the samples were negative for any hemotropic mycoplasma. In addition, maintaining frequent studies and compiling data is important, so that more information is available to assess the possible pathogens that circulate among free-living canids. Based on the results, it is likely that hemoplasmas do not circulate in the studied population or occur in such low amounts that they were not detected. However, research with a greater number of individuals and in other biomes is essential for understanding the relationship between hemoplasms and wild canids.*

Keywords: *Canid. Hemoparasitosis. Conservation.*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

16S rRNA - 16S ribosomal RNA

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

DNA - ácido desoxirribonucleico

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

pb – pares de base

PCR – reação em cadeia polimerase

PF– *primer* (oligonucleotídeos iniciadores) *forward* (senso)

PR - *primer reverse*

ProtozooVet – Laboratório de Protozoologia e Rickettsioses Veteriais

RNA - ácido ribonucleico

rRNA - ácido ribonucléico ribossômico

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

LISTA DE SÍMBOLOS

® - marca registrada

μM - micromolar

dNTP - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

kg – quilogramas

mg – miligramas

mM – milimolar

ng – nanogramas

°C – graus Celsius

TM - trademark symbol

U – unidade

μL – microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	OBJETIVOS.....	16
2.1	Objetivo geral.....	16
2.2	Objetivos específicos.....	16
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1	Áreas de estudo e ética.....	17
3.2	Captura dos lobos-guará.....	17
3.3	Amostras biológicas.....	18
3.4	Extração de DNA.....	18
3.5	Análise molecular por PCR e RT-PCR para pesquisa de hemoplasmas.....	18
4	RESULTADOS.....	20
5	DISCUSSÃO.....	21
6	CONCLUSÃO.....	25
	REFERÊNCIAS.....	26

1 INTRODUÇÃO

O lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) (Illiger 1815) é o maior canídeo sul-americano e o único integrante do gênero *Chrysocyon* (Ordem: Carnívora; Família: Canidae). É distribuído na América do Sul ocorrendo no Brasil central, norte boliviano, sudeste paraguaio e ainda nordeste argentino (Figura 1) (SILVA; TALAMONI, 2004). No Brasil, atualmente ocorre na porção leste do bioma Pantanal, no Pampa, na Mata Atlântica (especificamente nos campos de altitude) e no Cerrado até a região de transição com a Caatinga (REIS *et al.*, 2006; DE PAULA *et al.*, 2013).

É uma espécie generalista, oportunista e possui hábitos solitários e noturno (DIETZ, 1984; DE PAULA *et al.*, 2013). O lobo-guará é uma espécie que varia sua dieta sazonalmente entre frutos pequenos, mamíferos de porte médio, aves, répteis e artrópodes. Com uma dieta abrangente (onivoridade), em alguns casos há a participação de matéria vegetal e de animais invertebrados, até a carnivoridade estrita, incluindo presas de grande porte. Em algumas épocas do ano, o consumo do fruto da lobeira (*Solanum lycocarpum*), um arbusto característico do Cerrado brasileiro, pode representar 40% ou mais do total da dieta da espécie (SANTOS; SETZ; GOBBI, 2003). Em sua dieta também há o consumo de carniças e animais domésticos, porém, são raras as predações de animais de criação de médio e grande porte (RODRIGUES, 2002; REIS *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2007).

No Brasil, de acordo com a Lista Nacional das Espécies Ameaçadas de Extinção, o lobo-guará se encontra na categoria de vulnerável (INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE, 2018) e está perto de estar quase ameaçado pela classificação da IUCN (União Internacional para Conservação da Natureza) (DE PAULA; DEMATTEO, 2015).

A necessidade de áreas amplas é alta e faz com que os lobos-guará inevitavelmente se exponham mais ao contato com os humanos e com os animais domésticos. Essa característica aumenta a sua interação e pode trazer ao lobo-guará problemas relacionados à caça, devido a predação de pequenos e médios animais de criação, além de doenças (contraídas dos animais domésticos), entre outros (RODRIGUES, 2002).

O abate de indivíduos devido retaliação à predação de aves domésticas é bastante considerável e talvez uma das ameaças mais significativas à espécie

(INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE, 2018). Levando em consideração que grande parte da distribuição dos indivíduos está localizada no bioma Cerrado o estado de conservação da espécie encontrada neste bioma reflete uma situação a nível de Brasil (FONSECA *et al.*, 1994; MYERS *et al.*, 2000). Nas últimas décadas o Cerrado brasileiro vem sofrendo com altas taxas de perda de biodiversidade, pressão causada pela expansão agrícola e pela ocupação humana (KLINK; MOREIRA, 2002). Essa pressão causa uma fragmentação das áreas e perda dos habitats, assim como o isolamento dos fragmentos, modifica a estrutura e os processos naturais das paisagens, provoca extinções locais e altera a composição e abundância das espécies, o que leva a perda da biodiversidade (BRASIL, [2021?]).

No Cerrado estima-se que a espécie ocorra em densidades mais elevadas, enquanto nos Pampas ou Campos Sulinos, estima-se que sua ocorrência seja muito baixa, com tamanho populacional inferior a 50 indivíduos maduros (DE PAULA *et al.*, 2013). Devido à baixa estimativa populacional da espécie, no estado do Rio Grande do Sul, o lobo-guará (*C. brachyurus*) é listado como Criticamente em Perigo (CR) de acordo com o Decreto Estadual N.º 51.797, de 8 de setembro de 2014, que declara as espécies da fauna silvestre ameaçadas de extinção no estado do Rio Grande do Sul (RIO GRANDE DO SUL, 2014).

Além disso, o lobo-guará é suscetível a diversos patógenos transmitidos por cães domésticos (*Canis lupus familiaris*), embora ainda se saiba pouco quanto à sua gravidade, o aumento do contato interespecífico favorece esta transmissão de parasitos e, a emergência de doenças. O risco epidemiológico pela transmissão de patógenos advindos do contato com animais domésticos, principalmente onde a zona de contato é grande, pode ser significativo para este canídeo (RODDEN; RODRIGUES; BESTELMEYER, 2004; INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE, 2018).

Doenças infecciosas podem ser particularmente importantes para grandes carnívoros, visto que muitas populações já estão severamente ameaçadas por diversos fatores (DEEM; EMMONS, 2005). Algumas doenças causadas por bactérias ou protozoários, principalmente doenças transmitidas por vetores, têm sido de interesse de pesquisadores em diversas espécies de animais silvestres em muitos biomas brasileiros (LABRUNA *et al.*, 2004; SZABÓ *et al.*, 2013; MELO *et al.*, 2016; DALL'AGNOL *et al.*, 2017). Das formas de transmissão de micoplasmas

hemotrópicos podemos citar o envolvimento de carrapatos, artrópodes, como insetos e mosquitos (DADDOW, 1981) e transmissão vertical (via placentária) (GIROTTOSOARES et al., 2016). O carrapato canino *Rhipicephalus sanguineus* é o vetor de *Haemobartonella canis*, atualmente conhecida como *Mycoplasma haemocanis* (SENEVIRATINA et al., 1973). Alguns autores relatam a detecção de *Mycoplasma haemofelis* e “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” em pulgas (*Ctenocephalides felis*) o que leva a hipótese delas como potencial vetor (SHAW et al., 2004; WOODS et al., 2005; LAPPIN et al., 2006). O risco de morbidade e mortalidade devido às doenças infecciosas são uma grande preocupação com relação à conservação de espécies silvestres, em especial as ameaçadas como os lobos-guará (DEEM; EMMONS, 2005).

Alguns estudos já foram realizados em relação ao lobo-guará, mas a maioria sobre a sua dieta. Entretanto, outros aspectos da biologia do animal permanecem pouco estudados. Aguirre (2009) destaca a necessidade de se desenvolver pesquisas para sabermos o papel dos canídeos selvagens como reservatórios. Desta maneira, é necessário conhecer mais sobre a ecologia, o comportamento e o impacto de doenças infecciosas nas populações de lobos-guará de vida livre em áreas de reserva de proteção e assim, melhor conservar esta espécie (RODRIGUES, 2002).

Figura 1 – Distribuição geográfica do Lobo-guará, *Chrysocyon brachyurus*



Fonte: De Paula *et al.* (2013).

Micoplasmas hemotrópicos, conhecidos também como hemoplasmas, refere-se ao grupo epitelial causador de inúmeras patologias (WILLI *et al.*, 2006). Originalmente conhecidas como *Haemobartonella* e *Eperythrozoon*, esses organismos foram reclassificados dentro do gênero *Mycoplasma*, como micoplasmas hemotrópicos, baseado em análises filogenéticas e em dados do sequenciamento do gene 16S ribossomal (16S rRNA), bem como, devido à grande semelhança das suas características moleculares e fenotípicas (pequeno tamanho do parasito, ausência de parede celular e flagelos) (NEIMARK *et al.*, 2001).

São geneticamente relacionadas às bactérias gram-positivas, das quais descendem provavelmente por evolução reductiva que lhes causou a perda de muitos genes. Em razão desta perda de genes, os hemoplasmas não possuem parede celular e comportam-se como gram-negativos (SANTOS, 2008). As bactérias do

gênero *Mycoplasma* são os menores organismos conhecidos capazes de auto-replicação. Os hemoplasmas são encontrados em todo mundo e foram previamente identificados em gatos e cães domésticos (BIONDO *et al.*, 2009). E, estudos relacionados à transmissão de micoplasmas hemotrópicos permanecem em lacuna e grande parte inconclusivos (BIONDO *et al.*, 2009).

A aplicação da PCR convencional foi decisiva para documentar novas implicações dessas bactérias na análise de dados e avaliações sanitárias. O sequenciamento deste gene permite uma identificação acertada entre as espécies de hemoplasmas caninos e felinos (OSTROWSKI, 2009). Estudos têm sido conduzidos no Brasil utilizando técnicas moleculares para a detecção de micoplasmas hemotrópicos em diversos mamíferos (BIONDO *et al.*, 2009).

As hemoplasmoses são de grande relevância na clínica veterinária, a depender da espécie do parasito e imunocompetência do hospedeiro, quanto pelo seu potencial zoonótico e de infecção em animais selvagens ameaçados de extinção. (Silva *et al.* 2016) explica que: o diagnóstico citológico de micoplasmas em esfregaço sanguíneo ainda é o método mais comumente utilizado. No entanto, dificilmente realizam-se esfregaços sanguíneos com sangue fresco, o que dificulta a visualização, visto que os micoplasmas se localizam na superfície das hemácias e são facilmente destacados destas pela presença do anticoagulante EDTA. O diagnóstico é feito pela visualização do agente infeccioso sobre a membrana eritrocitária ao exame do esfregaço sanguíneo.

O potencial zoonótico de hemoplasmas foi relatado após a identificação molecular de *Mycoplasma haemofelis* em profissionais da saúde e humanos imunossuprimidos, alguns com exposição frequente a animais infectados por hemoplasmas (DOS SANTOS *et al.*, 2008; STEER *et al.*, 2011; SYKES *et al.*, 2010). Tem-se o registro de um caso de *M. haemofelis* comunicado em paciente acometido pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) que convivia com gatos (DOS SANTOS *et al.*, 2008). Relatos sugerem que é possível que infecções zoonóticas possam ser causadas por hemoplasmas (TASKER *et al.*, 2010), o que reforça a necessidade de estudos. Embora sejam agentes infecciosos em animais, predominantemente, e existe uma possível associação entre micoplasmas hemotrópicos e doenças autoimunes (MESSICK, 2004).

Anteriormente, com base em testes moleculares, apenas cinco *Mycoplasma* spp. foram descritos como causadores de infecções em humanos: *Mycoplasma*

haemofelis-like (DOS SANTOS *et al.*, 2008), *Mycoplasma suis* - like (YANG *et al.*, 2000), *Mycoplasma ovis* (SYKES *et al.*, 2010), “*Candidatus Mycoplasma haemohominis*” (STEER *et al.*, 2011) e “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*” (MAGGI *et al.*, 2013).

A prevalência de casos de Micoplasmas hemotrópicos caninos no Brasil está relacionada aos casos isolados em cães. A maioria dos estudos aprofundados sobre micoplasmas aborda apenas a espécie felina (SILVA, 2016). Em gatos domésticos foram identificadas infecções por *Mycoplasma haemofelis*, ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ e ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’.

Com os avanços e conhecimentos científicos produzidos nos últimos anos, elucidar aspectos relevantes de seus mecanismos patogênicos ficou muito importante. São agentes oportunistas, infectando silenciosamente animais sadios e levando a manifestações clínicas, mas apenas em determinadas situações (FIRMINO, 2008).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a ocorrência de micoplasmas hemotrópicos em amostras de sangue de lobos-guarás de vida livre.

2.2 Objetivos específicos

Pesquisar espécies de hemoplasmas em *C. brachyurus*, por meio de PCR convencional para este grupo, e a presença de *Mycoplasma haemocanis* por meio de RT-PCR (Real Time PCR) específico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Nesta pesquisa foram analisadas 12 amostras de sangue total de lobos-guarás (*C. brachyurus*) de vida livre coletadas entre os anos de 2018 e 2021, as quais foram armazenadas em banco de amostras no Laboratório de Protozoologia e Rickettsioses Vetoriais – UFRGS. O sangue coletado foi analisado por ensaios de PCR convencional e RT-PCR para diferentes micoplasmas hemotrópicos (itens 3.4 e 3.5). As coletas foram realizadas em uma área de ecoturismo e conservação de fauna silvestre inserida no bioma Cerrado (item 3.1), a partir de capturas pela técnica box Trap (item 3.2), realizada pelos projetos de conservação (SISBIO nº 42093). O material biológico passou por congelamento (-20°C) até o momento do processamento.

3.1 Área de estudo e ética

As amostras do presente estudo (n=12) são provenientes de capturas realizadas pelo projeto Onçafari, no hotel-fazenda Pousada Trijunção (14°38'38.3"S, 45°48'07.7"W), uma reserva de preservação ecológica com mais de 33 mil hectares e localizada na divisa da Bahia, Minas Gerais e Goiás, em uma região de ecótono no Cerrado.

O material utilizado no presente estudo foi destinado ao Laboratório de Protozoologia e Rickettsioses Vetoriais (ProtozooVet) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A avaliação do Comitê de Ética no Uso de Animais não se aplica, uma vez que, o laboratório não realiza atividades presenciais com animais vivos. Em contrapartida, os colaboradores, possuem autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (licença nº: 42093-1), além de respeitar o manejo dos indivíduos de acordo com os procedimentos éticos e o bem-estar dos animais (SIKES; GANNON, 2011).

3.2 Capturas dos lobos-guará

As capturas foram realizadas em uma mesma área utilizando-se do método box Trap, ocorreram de forma periódica para trabalho de monitoramento e ecologia do projeto de conservação de lobos-guarás no Cerrado, então foi possível o

fornecimento de amostras biológicas para o presente estudo. Técnica box Trap recomendada para carnívoros silvestres, é uma forma de captura considerada segura, impedindo que o animal sofra lesões.

Os lobos-guará foram avaliados pelo veterinário responsável, e apresentavam-se todos saudáveis no momento da coleta. Os indivíduos foram sedados com tiletamina zolazepam por via intramuscular, e foram todos soltos após os procedimentos na mesma área onde foram capturados.

3.3 Amostras biológicas

As coletas foram realizadas entre dezembro de 2018 e fevereiro de 2021, totalizando 12 amostras de 8 indivíduos diferentes, incluindo-se amostras de recapturas. Todas as amostras de sangue foram coletadas em tubos de coleta com EDTA (etilenodiaminotetracético tetrassódico) e estocadas sob congelamento (-20°C).

3.4 Extração de DNA

O volume de 200 µL de sangue foi utilizado para a extração de DNA utilizando o kit comercial PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA), conforme as recomendações do fabricante. As amostras que continham aproximadamente 200 ng/µL de DNA determinado em um espectrofotômetro (NanoDrop™) foram utilizadas diretamente para PCR ou tiveram o volume ajustado.

3.5 Análise molecular por PCR e RT-PCR para pesquisa de hemoplasmas

As amostras de DNA obtidas dos lobos-guará foram submetidas aos testes de PCR convencional e RT-PCR específico para micoplasmas.

Para a amplificação do gene 16s rRNA de hemoplasmas foi utilizado o protocolo descrito por CRIADO-FORNELIO *et al.* (2003) por PCR convencional, utilizando os *primers* HBT *Forward* 5'ATACGGCCCATATTCCTACG3' e HBT *Reverse* 5' TGCTCCACCACTTGTTCA 3', que amplifica uma região entre 595 e 620 pb. Na reação de PCR convencional utilizamos um controle positivo de '*Candidatus* Mycoplasma haemobos' e um controle negativo com água ultrapura UltraPure™

DNase/RNase-Free Distilled Water (Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA). As amplificações foram realizadas em um termociclador SimpliAmp™ Thermal Cycler (Applied Biosystem®, Foster City, CA, EUA). Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, posteriormente visualizados em um transiluminador LED Kasvi® (São José dos Pinhais, PR, Brasil).

A técnica de PCR em Tempo Real foi utilizada para a pesquisa específica de *Mycoplasma haemocanis* seguindo ensaio de Peters *et al.* (2008). Devido a similaridade genética entre as espécies *Mycoplasma haemofelis* (Mhf)/*Mycoplasma haemocanis* (Mhc) foram utilizados os pares de *primers Forward* 5'AGTGCTACAATGGC GAACACA3' e *Reverse* 5'TCCTATCCGAACTGAGACGAA3' e sonda específica 5'TGTGTTGCAAACCAGCGATGGT3' (FAM) que amplifica uma região de 80 pb. Na reação foi utilizado controle negativo com água ultrapura UltraPure™.

4 RESULTADOS

O DNA foi obtido para todas as 12 amostras de sangue em quantidade satisfatória após mensuração em espectrofotômetro de micro volume. Posteriormente, todas as amostras foram analisadas por ensaios de PCR convencional e RT-PCR para micoplasmas hemotrópicos. Nas análises moleculares, as 12 amostras foram negativas nas análises de PCR convencional para hemoplasmas, assim como, apresentaram resultado negativo no RT-PCR específico pra *M. haemocanis* e *M. felis*.

5 DISCUSSÃO

Até o momento, poucos estudos que investigam a presença de micoplasmas hemotrópicos em canídeos silvestres foram realizados. É sabido que animais de vida livre têm um maior risco de infecção por hemoplasmas por estarem mais expostos aos artrópodes hematófagos, devido ao seu comportamento agressivo e os frequentes combates, pelo contato com diferentes espécies de animais, bem como, com animais domésticos, isso os coloca em um grupo de risco (WILLI *et al.*, 2007a).

O gênero *Mycoplasma* spp. está amplamente distribuído em várias partes do mundo, seja nas Américas, Europa ou Sul da África (UILENBERG *et al.*, 1989), portanto monitorar estes animais de vida livre no Cerrado ou em qualquer outro bioma do país serve como proteção às espécies que vivem nestes habitats.

Apesar dos resultados negativos para micoplasmas hemotrópicos nesta região de conservação do Cerrado, estudos com estes indivíduos devem ser continuados em todos os biomas brasileiros, pois no Brasil, os estudos de prevalência de hemoplasmas caninos são escassos.

Os carrapatos são ectoparasitos de uma grande variedade de vertebrados, inclui-se o homem e podem ser vetores de importância médica na transmissão de doenças só ficam atrás dos mosquitos (PAROLA; RAOUL, 2001). Cesar (2008) diz que a doença transmitida pelo carrapato marrom (*Rhipicephalus sanguineo*) ao cão, é endêmica em várias regiões do país.

Mesmo não encontrando micoplasmas hemotrópicos nos lobos-guará (*C. brachyurus*) estudados, sabe-se que canídeos silvestres podem ser infestados por diversas espécies de carrapatos (LABRUNA *et al.*, 2005). No Brasil região do Cerrado, *Amblyomma tigrinum* é considerada uma das principais espécies que parasitam carnívoros silvestres. A presença desta espécie parasitando lobos-guará (*C. brachyurus*) indicam membros da ordem Carnívora como prováveis hospedeiros preferenciais para *Amblyomma tigrinum* (GUGLIELMONE *et al.*; 2000).

Além das espécies identificadas e colhidas, foi encontrada parasitando o lobo-guará (*C. brachyurus*) uma larva de *Rhipicephalus boophilus microplus* (ARRAIS, 2013). Artrópodes hematófagos têm sido propostos como meios naturais de transmissão de hemoplasmas (BERKENKAMP; WESCOTT, 1988).

No estudo de Carneiro (2015), dos 18 canídeos testados para a presença de micoplasmas hemotrópicos, seis lobos-guará (*C. brachyurus*), cinco raposas-do-

campo (*Lycalopex vetulus*), cinco cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*) e dois cachorros-vinagre (*Speothos venaticus*) testaram positivo para *M. haemocanis*, perfazendo um total de 100% dos 18 animais testados, provenientes de cativeiro em determinado Zoológico de Brasília, Distrito Federal, Brasil.

Em nossas análises obtivemos 100% das amostras negativas para micoplasmas, entretanto Carneiro (2015), apresenta em seu estudo animais positivos em uma área controlada como um Zoológico. Porém os resultados negativos do trabalho apresentado demonstram que os animais analisados não estavam até o momento em contato ou expostos a uma área com o vetor.

Em um estudo realizado no Chile, a espécie *M. haemocanis* é prevalente em raposas-de-Darwin (*Lycalopex fulvipes*) ameaçadas de extinção na Ilha de Chiloé. A origem da infecção, sua presença e dinâmica em populações permanecem inexploradas, mas os resultados indicaram que *M. haemocanis* é enzoótica na raposa-de-Darwin (*L. fulvipes*) e essa transmissão intraespecífica é predominante (CABELLO *et al.*, 2013). Considerando-se que os cães asselvajados são abundantes nas áreas rurais no Chile, incluindo áreas que possuem populações de raposas-de-Darwin (*L. fulvipes*), o papel do cão doméstico é importante ser considerado como reservatório e fonte de infecção para a raposa em um provável cenário (CABELLO *et al.*, 2013). Situação diferente da encontrada neste estudo, no qual os canídeos avaliados não se encontram no mesmo cenário. O propósito do trabalho está em fazer uma triagem dos lobos-guará (*C. brachyurus*) desta área de conservação e realizar um comparativo com os achados em outros trabalhos sobre canídeos, sendo que pouco se sabe sobre as hemoparasitoses nos canídeos do Cerrado.

Em estudo no Rio Grande do Sul, Brasil, resultados confirmam a presença de *Amblyoma aureolatum* e *Amblyoma tigrinum* como os principais ectoparasitos de canídeos silvestres deste estado (RUAS, 2005). Estudos estes que foram observados por Freire (1972), que relatou que os graxains, assim como os cães domésticos, representam os hospedeiros preferenciais para as espécies de ectoparasitos do gênero *Amblyoma*, parasitos de carnívoros, destacando-se a prevalência de *A. tigrinum*. Os animais capturados por Ruas (2005) em seu estudo, apresentavam os mesmos ectoparasitos, da espécie *A. aureolatum*, sendo o graxaim-do-mato (*Cerdocyon thous*) e graxaim-do-campo (*Lycalopex gymnocercus*). Estas informações vêm a corroborar o quanto o grau de exposição dos animais de

vida livre em áreas de matas rurais ou próximas à população em geral está vulnerável a ser infectada (ALMEIDA *et al.*, 2011). Mesmo diante desta maior exposição a vetores que ocorrem em ambiente rural os lobos foram negativos.

Foram encontrados micoplasmas hemotrópicos em felinos selvagens e em cativeiro (WILLI *et al.*, 2007b), onças-pintadas (*Panthera onca*) (FURTADO, 2010; CARNEIRO, 2015; MOREIRA, 2020) e gatos domésticos (SACRISTÁN *et al.*, 2019). Ainda, no estudo realizado por Carneiro (2015), foram analisadas 33 amostras de felinos selvagens, com um índice de 45,5% de positividade para hemoplasmas, sendo três onças-pintadas (*Panthera onca*), uma jaguatirica (*Leopardus pardalis*), dois gatos-palheiros (*Leopardus pajerus*), três onças pardas (*Puma concolor*), um gato-maracajá (*Leopardus wiedii*), um gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), quatro tigres-de-de-bengala (*Panthera tigris*), três jaguarundis (*Herpailurus yagouaroundi*) e dois leões-africanos (*Panthera leo*).

Apesar do resultado em felinos, no presente estudo, todas as amostras foram negativas para a presença de hemoplasmas. Os resultados negativos para esta população de lobos-guarás (*C. brachyurus*) do Cerrado, não sugere que não se deva permanecer em alerta, apenas infere que essa população não estava infectada no período em que as amostras foram coletadas e nem no momento das recapturas. Ao mesmo tempo, o fato de estarem em uma área de conservação ambiental sugere que ainda haja um possível isolamento entre os animais silvestres, lobos-guará (*C. brachyurus*) e os possíveis animais domésticos infectados nesta região. Sugere também não estar havendo contato com ectoparasitos, saliva ou mesmo sangue contaminados.

No caso do Cerrado, um estudo realizado por Machado (2004) utilizando imagens do satélite MODIS 2002, conclui que 55% do bioma já foi desmatado ou transformado pela ação humana. Estudos indicam que os lobos-guarás (*C. brachyurus*) precisam em torno de 22 km² - 115 km² para se estabelecer (RODRIGUES, 2002). Ao mesmo tempo, mesmo em unidades de conservação, a limitação espacial impõe limites aos seus números populacionais. Considerando informações geradas pelo modelo de viabilidade populacional (VORTEX), levando em consideração parâmetros biológicos e demográficos, inferiu-se que a espécie sofrerá uma redução populacional de, pelo menos, 29% nos próximos 21 anos (3 gerações).

Mais estudos devem ser realizados para este canídeo silvestre em todos os biomas brasileiros, pois estudos de hemoplasmas e outros patógenos em canídeos brasileiros são ainda escassos. Estudar o foco de transmissão de hemoplasmas em animais domésticos, para que assim se possa desvendar formas de ocorrência em animais silvestres. Dessa forma, para garantir a persistência destas populações o ideal é fazer o monitoramento (GITTLEMAN *et al.*; 2001). Assim como medidas de proteção devem ser tomadas, já que estes organismos são comprovadamente relacionados aos processos patológicos em vertebrados (CONRADO, 2014).

6 CONCLUSÃO

O estudo conclui que estes animais, desta região do Cerrado Brasileiro, não apresentam *Mycoplasma haemocanis* e nem outra espécie de micoplasma durante o período analisado.

Informações sobre a saúde de populações e a avaliação dos fatores de risco para infecção por patógenos são imprescindíveis pois espécies de hemoplasmas são comuns nas cidades brasileiras, mais estudos devem ser realizados em lobos-guarás (*C. brachyurus*) de diferentes regiões ao longo de sua distribuição. Além de estudos para identificar a infecção por micoplasmas hemotrópicos é necessário avaliar qual o nível de patogenicidade que esses microrganismos podem gerar em seus potenciais hospedeiros e o risco de transmissão interespecífico e intraespecífico.

Levantamento de micoplasmas hemotrópicos nas populações de lobos-guarás (*C. brachyurus*) em diversos biomas é um fator muito importante para que medidas de manejo e conservação sejam tomadas de forma efetiva a preservação desta da espécie.

REFERÊNCIAS

- AGUIRRE, A. A. **Wild canids as sentinels of ecological health: a conservation medicine perspective.** Parasites and Vectors, London, v. 2, p. 1-8, 2009. Supplement 1. DOI: 10.1186/1756-3305-2-S1-S7.
- ALMEIDA, A. P. *et al.* **Novos agentes de Ehrlichia e Hepatozoon infectando a raposa-do-mato (*Cerdocyon thirty*) no sudeste do Brasil.** 2011. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011. Disponível em: https://teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-20042012-103802/publico/ALINY_PONTES_ALMEIDA.pdf. Acesso em: 23 out. 2021.
- ARRAIS, R. C. **Ocorrência de patógenos transmitidos por carrapatos (*Anaplasma spp*, *Babesia spp*, *Ehrlichia spp*, *Hepatozoon spp* e *Rickettsia spp*) em lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e cães domésticos na região do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil.** 2013. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013. Disponível em: <https://bv.fapesp.br/pt/dissertacoes-teses/98525/ocorrencia-de-patogenos-transmitidos-por-carrapatos-anapla>. Acesso em: 3 nov. 2021.
- BERKENKAMP, S. D.; WESCOTT R, B. **Arthropod transmission of *Eperythrozoon coccoides* in mice.** Laboratory Animal Science, Joliet, v. 38, n. 4, p. 398-401, Aug. 1988.
- BIONDO, A. W. *et al.* **A review of the occurrence of hemoplasmas.** Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, São Paulo, v. 18, n. 3, p. 188-193, jul./set. 2009. DOI: 10.4322/rbpv.01803001.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **O bioma Cerrado.** Brasília, DF: MMA, [2021?]. Disponível em: <https://antigo.mma.gov.br/biomas/cerrado>. Acesso em: 4 nov. 2021.
- CABELLO, J. *et al.* **Survey of infectious agents in the endangered Darwin's fox (*Lycalopex fulvipes*): high prevalence and diversity of hemotrophic mycoplasmas.** Veterinary Microbiology, Amsterdam, v. 167, n. 3-4, p. 448-454, Dec. 2013. DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.09.034.
- CARNEIRO, F. T. **Estudo da infecção por hemoplasmas em canídeos e felídeos selvagens de cativeiro.** 2015. 30 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2015. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/handle/10482/21352>. Acesso em: 11 set. 2021.
- CESAR, M. F. G. **Ocorrência de *Ehrlichia canis* em cães sintomáticos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília e análise de variabilidade em regiões genômicas de repetição.** 2008. 57 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília,

Brasília, DF, 2008. Disponível em:
https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/3961/1/2008_MarianadeFatimaGoisCesar.pdf. Acesso em: 4 nov. 2021.

CONRADO, F. O. **Ocorrência e identificação de micoplasmas hemotrópicos (hemoplasmas) em roedores (*Rattus norvegicus*) do Passeio Público e Zoológico de Curitiba**. 2014. 109 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014. Disponível em:
<https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/38067/R%20-%20D%20-%20FRANCISCO%20DE%20OLIVEIRA%20CONRADO.pdf?sequence=3&isAllowed=y>. Acesso em: 10 out. 2021.

CRIADO-FORNELIO, A. *et al.* **Molecular studies on Babesia, Theileria and Hepatozoon in southern Europe: part I: epizootiological aspects**. Veterinary Parasitology, Amsterdam, v. 113, n. 3-4, p. 189-201, May 2003. DOI: 10.1016/S0304-4017(03)00078-5.

DADDOW KN. **The duration of the carrier state of *Eperythrozoon ovis* infection in sheep**. Aust Vet J 1981; 57(1): 49. Disponível em:
 <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-0813.1981.tb07091.x>>. Acesso em: 23 nov 2021.

DALL'AGNOL, B. *et al.* ***Rickettsia parkeri* in free-ranging wild canids from Brazilian pampa**. Transboundary and Emerging Diseases, Berlin, v. 65, n. 2, p. 224-230, Nov. 2017. DOI: 10.1111/tbed.12743.

DA SILVA, J. M.; BATES, J. M. **Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: a tropical savanna hotspot**. BioScience, [Washington, DC], v. 52, n. 3, p. 225-234, Mar. 2002. DOI: 10.1641/0006-3568(2002)052[0225:BPACIT]2.0.CO;2.

DEEM, S. L.; EMMONS, L. H. **Exposure of free-ranging maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) to infectious and parasitic disease agents in the Noël Kempff, Mercado National Park, Bolívia**. Journal of Zoo and Wildlife Medicine, Lawrence, v. 36, n. 2, p. 192-197, June 2005. DOI: 10.1638/04-076.1.

DE PAULA, R. C.; DEMATTEO, K. ***Chrysocyon brachyurus* (errata version published in 2016)**. Cambridge: IUCN, 2015. e.T4819A88135664. (The IUCN Red List of Threatened Species). Disponível em:
<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T4819A82316878.en>. Acesso em: 2 out. 2021.

DE PAULA, R. C. *et al.* **Avaliação do estado de conservação do Lobo-guará *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1815) no Brasil**. Biodiversidade Brasileira, Iperó, v. 3, n. 1, p. 146-159, 2013. Disponível em:
https://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/biodiversidade/fauna-brasileira/avaliacao-do-risco/carnivoros/lobo-guara_chrysocyon_brachyurus.pdf. Acesso em: 29 out. 2021.

DIETZ, M. J. **Ecology and social organization of the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*)**. City of Washington: Smithsonian Institution Press, 1984. 51 p. (Smithsonian Contributions to Zoology, v. 392). DOI: 10.5479/si.00810282.392.

FIRMINO, F. P. **Estudo da infecção por hemoplasmas em felinos domésticos**. 2008. 56 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2008. Disponível em: https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/3464/1/2008_FernandadePaulaFirmino.pdf Acesso em: 10 out. 2021.

FONSECA, G. A. B. R. *et al.* (ed.). **Livro vermelho dos mamíferos brasileiros ameaçados de extinção**. Belo Horizonte. Fundação Biodiversitas, 1994.

FREIRE, J. J. **Revisão das espécies da família Ixodidae**. Revista de Medicina Veterinária, São Paulo, v. 8, n. 1, p. 1-16, 1972.

FURTADO, M. M. **Estudo epidemiológico de patógenos circulantes nas populações de onça-pintada e animais domésticos em áreas preservadas de três biomas brasileiros: Cerrado, Pantanal e Amazônia**. 2010. 282 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-05102012-134828/publico/MARIANA_M_FURTADO.pdf. Acesso em: 15 out. 2021.

GIROTTO-SOARES A, *et al.* '**Candidatus Mycoplasma haemobos**': **Transplacental transmission in dairy cows (*Bos taurus*)**. Vet Microbiol 2016; 195: 22-24. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1984-29612019022>> Acesso em: 23 nov 2021.

GITTLEMAN, J. L. *et al.* **Canivore conservation**. Cambridge: Cambridge University Press, 2001. Disponível em: bin/wxis.exe/?IscScript=QUV.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=003669. Acesso em: 8 nov. 2021.

GUGLIELMONE, A. A. *et al.* ***Amblyomma tigrinum* (Acari: Ixodidae) in relation to phytogeography of central-northern Argentina with note on hosts and seasonal distribution**. Experimental & Applied Acarology, Amsterdam, v. 24, n; 12, p. 983-989, 2000. DOI: 10.1023/a:1010775528628.

GUGLIELMONE, A. A. *et al.* **Ticks (Ixodidae) on humans in South America**. Experimental & Applied Acarology, Amsterdam, v. 40, n. 2, p. 83-100, 2006. DOI: 10.1007/s10493-006-9027-0.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. Diretoria de Pesquisa, Avaliação e Monitoramento da Biodiversidade. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção: volume II: mamíferos**. Brasília, DF: ICMBio, 2018. Disponível em: https://www.gov.br/icmbio/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/publicacoes-diversas/livro_vermelho_2018_vol2.pdf. Acesso em: 28 out. 2021.

KLINK, C. A.; MOREIRA, A. G. **Past and current human occupation, and land use.** *In*: OLIVEIRA, S.; MARQUIS, R. J. (ed.). The Cerrado of Brazil. New York: Columbia University Press, 2002. cap. 5, p. 69-88. Disponível em: http://lerf.eco.br/img/publicacoes/2002_12%20The%20Cerrados%20of%20Brazil.pdf#page=78. Acesso em: 4 nov. 2021.

LABRUNA, M. B. *et al.* **Rickettsia species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of Sao Paulo, Brazil, where Brazilian Spotted Fever is endemic.** Journal of Clinical Microbiology, Washington, DC, v. 42, n. 1, p. 90-98, Jan. 2004. DOI: 10.1128/JCM.42.1.90-98.2004.

LABRUNA, M. B. *et al.* **Ticks (Acari: Ixodida) on wild carnivores in Brazil.** Experimental & Applied Acarology, Amsterdam, v. 36, n. 1, p. 149-163, 2005. DOI: 10.1007/s10493-005-2563-1.

LAPPIN MR, *et al.* **Prevalence of *Bartonella* species, haemoplasma species, *Ehrlichia* species, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Neorickettsia risticii* DNA in the blood of cats and their fleas in the United States.** J Feline Med Surg 2006; 8(2):85-90. Disponível:<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfms.2005.08.003>>. PMID:16290092. Acesso em: 23 nov 2021.

MACHADO, R. B. *et al.* **Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro.** Brasília, DF: Conservação Internacional, 2004. Relatório técnico não publicado. Disponível em: https://jbb.ibict.br/bitstream/1/357/1/2004_%20Conservacao%20Internacional_%20estimativa_desmatamento_cerrado.pdf. Acesso em: 1 out. 2021.

MAGGI, R. G. *et al.* **Co-infection with *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae* and *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* in a veterinarian.** Parasites & Vectors, London, v. 6, p. 1-10, Apr. 2013. Art. 103. DOI: 10.1186/1756-3305-6-103.

MELO, A. L. T. *et al.* **A survey of tick-borne pathogens in dogs and their ticks in the Pantanal biome, Brazil.** Medical and Veterinary Entomology, Oxford, v. 30, n. 1. p. 112-116, Oct. 2015. DOI: 10.1111/mve.12139.

MESSICK, J. B. **Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights on pathogenic potential.** Veterinary Clinical Pathology, Baton Rouge, v. 33, n. 1, p. 2-13, Mar. 2004. DOI: 10.1111/j.1939-165X.2004.tb00342.x.

MOREIRA, R. F. **Hemocitários e ectoparasitos em onças-pintadas de vida livre do bioma pantanal.** 2020. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2020. Texto parcial. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/213269/001117120.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 10 set. 2021.

MYERS, N. *et al.* **Biodiversity hotspots for conservation priorities.** Nature, London, v. 403, n. 6772, p. 853-858, Feb. 2000. DOI: 10.1038/35002501.

NEIMARK, H. *et al.* **Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of ‘*Candidatus Mycoplasma haemofelis*’, ‘*Candidatus Mycoplasma haemomuris*’, ‘*Candidatus Mycoplasma haemosuis*’ and ‘*Candidatus Mycoplasma wenyonii*’.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, London; v. 51, pt. 3, p. 891-899, May 2001. DOI: 10.1099/00207713-51-3-891.

OSTROWSKI, M. A. B. **Detecção de micoplasmas hemotrópicos pelo método de reação em cadeia da polimerase em cães de Curitiba.** 2009. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/47424/R%20-%20D%20-%20MARCO%20ANTONIO%20BEUTING%20OSTROWSKI.pdf?sequence=1&isAllo wed=y>. Acesso em: 28 out. 2021.

PAROLA, P.; RAOULT, T. D. **Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat.** Clinical Infectious Diseases, Chicago, v. 32, n. 6, p. 897-928, Mar. 2001. DOI: 10.1086/319347.

PETERS, I. R. *et al.* **The prevalence of three species of feline haemoplasmas in samples submitted to a diagnostics service as determined by three novel real-time duplex PCR assays.** Veterinary Microbiology, Amsterdam, v. 126. n. 1-3, p. 142-150, Jan. 2008. DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.06.017.

REIS, N. R. *et al.* (ed.). **Mamíferos do Brasil.** Londrina: [s.n.], 2006. 437 p. Disponível em: <http://www.uel.br/pos/biologicas/pages/arquivos/pdf/Livro-completo-Mamiferos-do-Brasil.pdf>. Acesso em: 29 out. 2021.

RIO GRANDE DO SUL. Decreto Estadual nº 51.797, de 08 de setembro de 2014. Declara as espécies da fauna silvestre ameaçadas de extinção do Rio Grande do Sul. **Diário Oficial do Estado do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, n. 173, 9 set. 2014. Disponível em: <http://www.legislacao.sefaz.rs.gov.br/Site/Document.aspx?inpKey=233283&inpCodDipositive=&inpDsKeywords=51797>. Acesso em: 30 ago. 2021.

RODDEN, M.; RODRIGUES, F.; BESTELMEYER, S. Maned-wolf (*Chrysocyon Brachyurus*) (Illiger, 1815). In: HOFFMANN, M.; SILLERO-ZUBIRI, C. (ed.). **Canids: foxes, wolves, jackals and dogs.** Gland, Switzerland, Cambridge, UK: IUCN/SSC, Canid Specialist Group, 2004. part. 2, cap. 3, seção 3.3, p. 38-43. (Status Survey and Conservation Action Plan). Disponível em: <https://www.carnivoreconservation.org/files/actionplans/canids.pdf>. Acesso em: 30 ago. 2021.

RODRIGUES, F. H. G. **Biologia e conservação do lobo-guará na Estação Ecológica de Águas Emendadas, DF.** 2002. 96 f. Tese (Doutorado em Ecologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.47749/T/UNICAMP.2002.227350>. Acesso em: 19 set. 2021.

RODRIGUES, F. H. G. *et al.* **Feeding habits of the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) in the brazilian cerrado.** Mastozoológia Neotropical, Mendoza, v. 14, n. 1, p. 37-51, 2007. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/26572487_Feeding_habits_of_the_maned_wolf_Chrysocyon_brachyurus_in_the_Brazilian_Cerrado. Acesso em: 29 out. 2021.

RUAS, J. L. **Caracterização da fauna parasitária do *Pseudalopex gymnocercus* (graxaim-do-campo) e do *Cerdocyon thous* (graxaim-do-mato) na região do Rio Grande do Sul.** 62 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

Disponível em:

<https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/10013/000589575.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 4 nov. 2021.

SACRISTÁN, I. *et al.* **Assessing cross-species transmission of hemoplasmas at the wild-domestic felid interface in Chile using genetic and landscape variables analysis.**

Scientific Reports, London; v. 9, n. 1, art. 16816, Nov. 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-53184-4.

SENEVIRATNA P, *et al.* **Transmission of *Haemobartonella canis* by the dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*.** Res Vet Sci 1973; 14(1): 112-114. Disponível

em:<[http://dx.doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)33950-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0034-5288(18)33950-X)>. PMID:4736045. Acesso em: 23 nov 2021.

SANTOS, A. P. *et al.* **Hemoplasma infection in HIV-positive patient, Brazil.**

Emerging Infectious Diseases; Atlanta, v. 14, n. 12, p. 1922-1924, Dec. 2008. DOI: 10.3201/eid1412.080964.

SANTOS, E. F.; SETZ, Z. F.; GOBBI, N. **Diet of the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*), and its role in seed dispersal on a cattle ranch in Brazil.** Journal of Zoology, London, v. 260, n. 2, p. 203-208, 2003. DOI: 10.1017/S0952836903003650.

SHAW SE, *et al.* **Pathogen carriage by the cat flea *Ctenocephalides felis* (Bouché) in the United Kingdom.** Vet Microbiol 2004; 102(3-4): 183-188.

Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.06.013>>. PMID:15327793. Acesso em: 23 nov 2021.

SILVA, A. T. **Avaliação hematológica, bioquímica, clínica e diagnóstico molecular de agentes de micoplasmas hemotrópicos em cães domésticos oriundos de abrigos da Região Metropolitana do Rio de Janeiro.** 2016. 87 f.

Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016. Disponível em:

<https://tede.ufrj.br/jspui/bitstream/jspui/1430/2/2016%20-%20Aline%20Tonussi%20da%20Silva.pdf>. Acesso:1 out. 2021.

SILVA, J. A.; TALAMONI, S. A. **Core area and centre of activity of maned wolves, *Chrysocyon brachyurus* (Illiger) (Mammalia, Canidae), submitted to supplemental feeding.** Revista Brasileira de Zoologia, Curitiba, v. 21, n. 2, p.3 91-

395, jun. 2004. DOI: 10.1590/S0101-81752004000200038.

STEER, J. A. *et al.* **A novel hemotropic Mycoplasma (hemoplasma) in a patient with hemolytic anemia and pyrexia.** *Clinical Infectious Diseases*, Oxford, v. 53, n. 11, p. e147-e151, Dec. 2011. Disponível em: DOI: 10.1093/cid/cir666.

SYKES, J. E. *et al.* **Human coinfection with *Bartonella henselae* and two hemotropic mycoplasma variants resembling *Mycoplasma ovis*.** *Journal of Clinical Microbiology*; Washington, DC, v. 48, n. 10, p. 3782-3785, Oct. 2010. DOI: 10.1128/JCM.01029-10.

SYKES, J. E. **Feline hemotropic mycoplasmas.** *Veterinary Clinics of North America: small animal practice*, Philadelphia, v. 40, n. 6, p. 1157-1170, Nov. 2010. DOI: 10.1016/j.cvsm.2010.07.003.

SZABÓ, M. P. J. *et al.* **Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil.** *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, Lausanne, v.3, n.27, p. 1-9, July. 2013. DOI: 10.3389/fcimb.2013.00027.

TASKER, S. *et al.* **Investigation of human haemotropic *Mycoplasma* infections using a novel generic haemoplasma qPCR assay on blood samples and blood smears.** *Journal of Medical Microbiology*, Edinburgh, v. 59, pt. 11, p. 1285-1296, Nov. 2010. DOI: 10.1099/jmm.0.021691-0.

UILENBERG, G. *et al.* **Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature.** *Veterinary Quarterly*, The Hague, v. 11, n. 1, p. 33-40, Jan. 1989. DOI: 10.1080/01652176.1989.9694194.

WILLI, B. *et al.* **From *Haemobartonella* to hemoplasma: molecular methods provide new insights.** *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 125 n. 3-4, p.197-209, Dec. 2007a. DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.06.027.

WILLI, B. *et al.* **Prevalence, risk factor analysis, and follow-up of infections caused by three feline hemoplasma species in cats in Switzerland.** *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, DC, v. 44, n.3, p. 961-969, Mar. 2006. DOI: 10.1128/JCM.44.3.961-969.2006.

WILLI, B. *et al.* **Worldwide occurrence of feline hemoplasma infections in wild felid species.** *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, DC, v. 45, n. 4, p. 1159-1166, Apr. 2007b. DOI: 10.1128/JCM.02005-06.

WOODS JE, *et al.* **Evaluation of experimental transmission of *Candidatus Mycoplasma haemominutum* and *Mycoplasma haemofelis* by *Ctenocephalides felis* to cats.** *Am J Vet Res* 2005; 66(6): 1008-1012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2460/ajvr.2005.66.1008>>. PMID:16008224. Acesso em:23 nov 2021.

YANG, D. *et al.* **Prevalence of *Eperythrozoon* spp. infection and congenital eperythrozoonosis in humans in Inner Mongolia, China.** *Epidemiology and Infection*, Cambridge, v. 125, n. 2, p. 421-426, Oct. 2000. DOI: 10.1017/s0950268899004392.