

**ESTUDO PIONEIRO PARA A DETERMINAÇÃO DE PADRÕES
CITOHEMATOLÓGICOS DA MEDULÁ ÓSSEA DE PRIMATAS *CEBUS*
APELLA.**

**PIONEER STUDY FOR DETERMINATION OF CYTOHEMATOLOGICAL
STANDARD OS PRIMATE BONE MARROW *CEBUS APELLA*.**

Lacy Cardoso de BRITO JUNIOR¹

Maria Eduarda de Sousa AVELINO²

Danielle Cristinne Azevedo FEIO³

José Augusto Pereira Carneiro MUNIZ⁴

Nota de Rodapé:

1. Professor Associado II, Laboratório de Patologia Geral - Imunopatologia e Citologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém – Pará. e-mail: lcdbrito@ufpa.br, lcdbrito2@gmail.com

2. Mestre, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém – Pará. e-mail: mdudasc@hotmail.com

3. Professora Doutora, Centro Universitário UNIFAMAZ, Belém – Pará. e-mail: daniellefeio@yahoo.com.br

4. Doutor, Centro Nacional de Primatas, Instituto Evandro Chagas, Ministério da Saúde, Belém – Pará. e-mail: japcmuniz@gmail.com

RESUMO

Objetivo. Sugerir parâmetros quantitativos para elementos medulares de *Cebus apella*. **Material e Métodos.** Foram estudados 06 animais, machos, com 2Kg e 5Kg, que passaram por contenção física e química para punção aspirativa de 1mL da medula óssea da tíbia de cada animal; confecção dos esfregaços; coloração hematológica e contagem de 500 células/lâmina (estudo duplo-cego). **Resultados.** Não houve diferença morfológica entre células hematopoiéticas de humanos e *Cebus apella*. A análise quantitativa mostrou série eritrocítica aumentada e séries granulocítica e linfomonoplasmocítica reduzidas em relação à humanos. **Conclusão.** Os resultados deste estudo pioneiro servem de apoio para futuras pesquisas com *Cebus apella*.

Palavras-chave: Medula óssea, Citologia, Hematologia, Primatas, *Cebus apella*.

ABSTRACT

Objective. Suggest quantitative parameters for *Cebus apella* medullary elements. **Material and Methods.** Six male animals were studied, with 2Kg and 5Kg, which underwent physical and chemical restraint for aspiration puncture of 1mL of the bone marrow of each animal's tibia; making smears; hematological staining and 500 cell / slide count (double-blind study). **Results.** There was no morphological difference between human hematopoietic cells and *Cebus apella*. Quantitative analysis showed an increased erythrocytic series and reduced granulocytic and lymphomonoplasmocytic series in relation to humans. **Conclusion.** The results of this pioneering study support future research with *Cebus apella*.

Key words: Bone marrow, Cytology, Hematology, Primates, *Cebus apella*.

INTRODUÇÃO.

O uso de modelos experimentais com primatas não-humanos, embora não sejam os mais comuns (KENEDDY et al., 1997; FLAIBAN, 2008), oferecem subsídios indispensáveis para o entendimento de diversos mecanismos fisiopatológicos e moleculares envolvidos no desenvolvimento de várias doenças humanas, principalmente em pesquisas pré-clínicas (THRALL, 2007; LIMA et al., 2014).

O uso destes animais geralmente é preterido para estudos relacionados à biologia e comportamento de primatas (FLAIBAN, 2008). Ficando assim uma grande lacuna em relação a parâmetros laboratoriais que possam delimitar o estados de saúde e doença dos mesmos (LIMA et al., 2014; ORTUNHO et al., 2014; RAMALHO et al., 2015).

Para Larsson et al. (1999), por exemplo, o macaco prego (*Cebus apella*) é um dos primatas não-humanos de maior importância para a pesquisa biomédica tanto como modelos biológico em pesquisa experimental de zoonoses, tuberculose, doença de Chagas, bem como para experimentos nutricionais relacionados ao metabolismo de ácidos graxos, níveis de colesterol e triglicérides. E ainda em pesquisas sobre doenças neurodegenerativas e neoplásicas.

Além da similaridade neuroanatômica e neurofisiológica com humanos a escolha de primatas da espécie *Cebus apella*, como modelo biológico em pesquisa experimental em hematologia no Brasil, se dá principalmente em função de ser esta uma espécie que não apresenta limitação populacional, tendo pequena estatura, sendo fácil manejo e ainda pouco explorada (BRITO JÚNIOR et al., 1997; KALAITSIDIS et al., 1999; NAVARRO; PACHALY, 1994; BUSH et al., 1982; LARSSON et al., 1999; THRALL, 2007d; LIMA et al., 2014; ORTUNHO et al., 2014; RAMALHO et al., 2015).

Assim, diante da escassez de dados sobre parâmetros hematológicos de células da medula óssea em *Cebus apella* é que este estudo se propôs sugerir limites quantitativos aceitáveis para os elementos figurados da medula de animais dessa espécie mantidos em condições de cativeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

CARACTERÍSTICA AMOSTRAL. Foram estudados seis animais *Cebus apella*; machos; adultos; saudáveis, considerando-se os últimos exames laboratoriais (hematológicos e bioquímicos); com peso entre 2Kg e 5Kg; e temperatura retal entre 39°C e 41°C. Todos provenientes do Centro Nacional de Primatas (CENEP) / Instituto Evandro Chagas (IEC) / Ministério da Saúde (MS) após aprovação do projeto guarda-chuva pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Pará (Parecer CEPAL/UFPA : BIO008-11).

MANUSEIO E COLETA DE AMOSTRAS. Todos os animais foram colocados em privação de alimentação e água por oito horas antes dos procedimentos. Para obtenção do registro do código de identificação de cada animal, peso, sexo e coleta de amostras de medula óssea foi feita a contenção física dos mesmos (captura) com puçá e posterior contenção química através do protocolo de anestesia (CENP) com zoletil 0,1ml/Kg.

Em seguida os animais foram transferidos para uma sala de cirurgia da clínica veterinária do CENP e a coleta da medula óssea realizada com auxílio de agulha 40x12 e seringa 5ml através de punção aspirativa de aproximadamente 1mL da medula óssea da tíbia esquerda ou direita de cada animal. Posteriormente foi feita a confecção dos esfregaços em lâminas limpas e de borda fosca devidamente identificadas com o código de cada animal. Em seguida os animais ficaram em observação por três a cinco dias na clínica do CENP com dieta nutricional adequada para a recuperação total dos mesmos.

PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS. O material obtido em lâmina foi então submetido a secagem a temperatura ambiente, transporte, em suporte plástico para lâminas, até o Laboratório de Patologia Clínica Dr. Paulo C. Azevedo onde as mesmas foram coradas por método convencional com corante May-Grunwald®. Em

seguida as lâminas foram submetidas a leitura por dois observadores (estudo duplo-cego) para definições da: celularidade em objetiva de 4X, através da observação das espículas ósseas; série megacariocítica em objetivas de 10X; e das demais séries granulocítica, eritrocítica e linfomonoplasmocitária) em objetiva de 100X para a contagem diferencial de 500 células, conforme preconiza a Organização Mundial de Saúde (OMS) para o mielograma em humanos. Posteriormente foram estabelecidas as porcentagens para cada série hematológica (intervalos de segurança de mínimo e máximo para valores relativos); celularidade medular e relação granulócitos / eritrocitos.

ANÁLISE ESTATÍSTICA. Foram calculadas médias e intervalos de máximo e mínimo de cada constituinte hematológico medular obtidos a partir das contagens de 500 células em estudo duplo-cego.

RESULTADOS

Os valores de média e intervalos de máximo e mínimo relativos das contagens celulares de elementos figurados da medula óssea de *Cebus apella* são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Valores de média e intervalos de máximo e mínimo relativos das contagens celulares de elementos figurados da medula óssea de *Cebus apella*.

Resultados Mielogramas		
Séries Hematopoiéticas de <i>Cebus apella</i> (n=6)	Valores Relativos (%)	
Série Granulocítica	Mínimo	Máximo
Mieloblasto	0	0,3
Promielócito	0,7	1,7
Mielócito	0,7	3,3
Metamielócito	5,0	8,8
Bastonete	4,0	8,0
Segmentado	25,8	31,3
Eosinófilo	1,0	1,7
Basófilos	0,3	1,0
Total da Série	37,5	56,1
Série Eritrocítica		
Proeritroblasto	0	0,3
Eritroblasto Basofílico	5,3	8,5

Eritroblasto policromático	20,4	35,3
Eritroblasto ortocromático	1,0	1,7
Total da Série	26,7	48,5
Série Linfomonoplasmocítica		
Linfócitos	13,2	15,0
Monócitos	1,5	2,0
Plasmócitos	0,3	1,3
Total da Série	15,0	18,3
Série Megacariocítica		
Megacariócitos (células/campo)	1,0	3,0
Relação Granulócitos e Eritróblasatos		
R : G / E	0,8	2,0

A morfologia das células da medula óssea de primatas da espécie *Cebus apella*, para todas as séries analisadas (granulocítica, eritrocítica, linfomonoplasmocítica e megacariocítica), mostrou-se semelhante a morfologia das células da medula óssea de humanos.

DISCUSSÃO

As semelhanças neuroanatômicas e neurofisiológicas dos primatas não-humanos do “velho mundo” com humanos são muito grandes e por isto estes animais são muito utilizados em pesquisas nas áreas da medicina, toxicologia, imunologia, farmacologia, biologia, fisiologia e neurociências (HERDON; TIGGES, 2001; VIDEAN et al., 2008). Contudo, estas semelhanças não são as mesmas quando se trata de primatas não-humanos provenientes do “novo mundo” como o *Cebus apella*, ainda assim esses animais são os mais utilizados em pesquisa médicas no Brasil em função de sua estatura e disponibilidade sem limitação populacional (KENEDDY et al., 1997; WIRZ et al., 2008, FLAIBAN, 2008; NAVES et al., 2006; LIMA et al., 2014; THRALL, 2007).

A inexistência de parâmetros hematológicos medulares de primatas não-humanos da espécie *Cebus apella*, porém, ainda hoje é um fator limitante para o entendimento dos estados de saúde e doença desses animais, e para o seu uso em pesquisas experimentais (LIMA et al., 2014; ORTUNHO et al., 2014, RAMALHO et al., 2015). Assim, neste estudo nos detivemos a análise qualitativa (morfologia) e

quantidade de células hematológicas que compõem o ambiente medular de *Cebus apella* mantidos em cativeiros.

Neste sentido observamos que não existem diferenças qualitativas entre as células da medula óssea de *Cebus apella* e de humanos. Porém, o estudo quantitativo das células da medula óssea de *Cebus apella* mostrou existir uma redução numérica do total de elementos figurados das séries granulocítica e linfomonoplasmocítica, e aumento dos elementos figurados da série eritrocítica em relação a mielograma em humanos (OLIVEIRA et al., 2006; LEE et al., 2008; LEWANDOWSKI et al., 2012). Resultados semelhantes também foram também observados em relação a mielogramas de animais de pequeno porte como cães, gatos e ovelhas (GARCIA-NAVARO, 2005).

A mesma condição de aumento de hemácias, hemoglobina e hematócrito também já foi percebida por vários autores na literatura em hemogramas de sangue periférico de *Cebus apella* (NAVES et al., 2006; FAVARETO et al. 2016; MONTEIRO et al., 2016; WIRZ et al., 2008; OSPINA et al., 2009; BRITO JÚNIOR et al., 1997; RIVIELLO; WIRZ, 2001; LIMA et al., 2014; ORTUNHO et al., 2014, RAMALHO et al., 2015).

Ospina et al. (2009), por exemplo, trabalhando apenas com sangue periférico de *Cebus apella* sugerem em seus estudos que as diferenças hematológicas e bioquímicas observadas podem estar associadas a influência de fatores como dieta, sexo, idade, e estado fisiológico e condicionamento (cativeiro ou vida livre) do animal.

Flaiban (2008), Wirz et al. (2008) e Favareto et al. (2016), em seus estudos, analisando hemogramas de *Cebus apella* observaram que o total de leucócitos, linfócitos e neutrófilos foram mais numerosos em animais mais jovens e menor em animais mais velhos.

Para Flaiban et al. (2008) e Ribeiro et al. (2015) em seu estudo de comparação dos valores de leucócitos totais de animais de cativeiro com os de vida livre, observaram que aqueles que estavam condicionados a um ambiente restrito, uma rotina, contato e manipulação do homem, apresentavam contagem de leucócitos totais mais baixas que aqueles de vida livre, sugerindo que os animais adaptados à contenção possuem menor efeito do estresse na contagem de leucócitos. Sugerindo ainda que é

possível que o medo da captura e da aproximação do homem, nos animais de vida livre, resulte em liberação de adrenalina e isto influencie nos resultados do leucograma.

Favareto et al. (2016) e Monteiro et al. (2016), por sua vez, observaram que a resposta à excitação ou fuga tem influência no leucograma, onde estes autores observaram que estas condições podem elevar até ao dobro da quantidade de leucócitos associado ao aumento de neutrófilos e linfócitos, independente de tratar-se de animais de vida livre ou cativo.

Já para Naves et al. (2006) a diferença de sexo define também diferenças estatísticas nos valores de leucócitos, neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos entre fêmeas e machos.

Em nossos estudos, porém, o tipo de vida dos animais (cativo ou de vida livre), a dieta adotada e o sexo destes não foram utilizados como parâmetros de diferenciação para o quantitativo de células presentes na medula óssea de *Cebus apella*.

CONCLUSÃO

O uso frequente de *Cebus apella* em estudos experimentais com drogas de efeito carcinogênico ou citotóxico no Brasil reforçam a necessidade de estudos sobre as características da medula óssea destes animais, assim, os resultados deste estudo pioneiro servirão de apoio para embasar futuras pesquisas nessas áreas.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Pará (UFPA) e a Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisas (FAPESPA) pelo apoio financeiro com concessão de Bolsa de Iniciação Científica a Maria Eduarda de Sousa Avelino quando de sua iniciação científica.

REFERÊNCIAS

- BRITO JÚNIOR, L. C.; MUNIZ, J. C. P. C.; MARTINS, N. Y.; AZEVEDO, P. S. R. Valores hematológicos do macaco prego, *Cebus apella* (L., 1758), reproduzido e mantido em cativeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.19, n.5, p.188-192, 1997.
- BUSH, M.; CUSTER, R. S.; WHITLA, J. C.; SMITH, E. E. Hematologic values of captive golden lion tamarins (*Leontopithecus rosalia*): variations with sex, age, and health status. **Laboratory Animal Science**, Memphis, v.32, n.3, p.294-297, 1982.
- FAVARETO, A. D.; COSTA, M. M.; GRUMANN, M. R.; MOTTA, A. C.; SILVA FILHO, J. R.; SILVA, Z.; DUDA, N. C. B.; SILVA NUNES, N. J.; VALLE, S. F. Perfil hematológico e bioquímico de macacos-prego (*Cebus spp.*) mantidos em cativeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.38, n.4, p.406-412, 2016.
- FLAIBAN, K. K. M. C.; SPOHR, K. A. H.; MALANSKI, L. S.; SVOBODA, W. K.; SHIOZAWA, M. M.; HILST, C. L. S.; AGUIAR, L. M.; LUDWIG, G.; PASSOS, F. C.; NAVARRO, I. T.; BALARIN, M. R. S.; LISBOA, J. A. N. Hematologic values of free-ranging *Cebus cay* and *Cebus nigritus* in Southern Brazil. **International Journal of Primatology**, v.5 p.1375-1382, 2008.
- GARCIA-NAVARO, C. E. K. (2ª ed.) **Manual de Medicina Veterinária**. São Paulo: Livraria Varela, 2005. p. 101-108.
- HERDON, J. G.; TIGGES, J. Hematologic and blood biochemical variables of captive chimpanzees: cross-sectional and longitudinal analyses. **Laboratory Animal Science**, v.51, n.1, p.60-62, 2001.
- KALAITSIDIS, F.; LUTZ, H.; PRYCE, C. R. Hematology and serum chemistry values in capture goeldi's monkeys (*Callimico goeldii*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.30, n.3, p.372-376, 1999.

KENNEDY, R. C.; SHEARER, M. H.; WILLIAM, H. Nonhuman primata models to evaluate vaccine safety and immunogenicity. **Vaccine**, v.15, n.6, p.903-908, 1997.

LARSSON, M. H. M.; BIRGEL, E. H.; BENESI, F. J.; BIRGEL JÚNIOR, E. H.; LAZARETTI, P.; FEDULO, J. D. L.; LARSSON JÚNIOR, C. E.; MOLINA, S. R.; GUERRA, P. P. C. A.; PRADA, C. S. Hematological values of *Cebus apella* anesthetized with ketamine. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.36, n.3, p.131-135, 1999.

LEE, S. H.; ERBER, W. N.; PORWIT, A.; TOMONAGA, M.; PETERSON, L. C. ICSH guidelines for the standardization of bone marrow specimens and reports. **International Journal of Laboratory Hematology**, v.30, p.349–364, 2008.

LEWANDOWSKI, K.; KOWALIK, M. M.; PAWLACZY, R.; ROGOWSKI, J.; HELLMANN, A. Microscopic examination of bone marrow aspirate in healthy adults – comparison of two techniques of slide preparation. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 34, p.254–261, 2012.

LIMA C. B. D.; DOS SANTOS K. M. M.; DE ALMEIDA H. M.; NASCIMENTO C. B.; JÚNIOR A. M. C.; RIZZO M. S. Avaliação do perfil hematológico, bioquímico e esfregaço de sangue periférico com vistas ao perfil sanitário em primatas do gênero *Cebus* mantidos em cativeiro. **Se-mina: Ciências Agrárias**, v.35, p.1847-1854, 2014.

MONTEIRO, F. O. B.; MONTEIRO, M. V. B.; SCOFIELD, A.; WHITEMAN, C. W.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Hematological and biochemistry evaluation in Capuchin monkeys from the illegal captivity. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.10, n.1, p.92 -97, 2016.

NAVES, E. A.; FERREIRA, F. A.; MUNDIM, A. V.; GUIMARÃES, E. C. Valores hematológicos de macaco prego (*Cebus apella* - Linnæus, 1758) em cativeiro. **Bioscience Journal**, v.22, n.2, p.125-131, 2006.

OLIVEIRA, R. A.; PEREIRA, J.; BEITLER, B. (1ª Ed.) **Mielograma e imunofenotipagem por citometria de fluxo em hematologia: prática e interpretação**. Rio de Janeiro: Roca. 2006. p. 440.

ORTUNHO, V. V.; LOBO R. R.; CARVALHO G. S. P.; DOS REIS V. D.
Hemoparasita em um casal de Bugios (*Alouata caraya*) criados em cativeiro. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.8, p.65-72, 2014.

OSPINA, P. A. S.; LI, O. E.; TRIBENÑO, D. H.; CAHUA J. U. Valores hematológicos del Machín negro (*Cebus apella*) mantenido en cativeiro. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru**, v.20, n.1, p.47-52, 2009.

RAMALHO, C. A.; GUIMARÃES, R. A. A.; CAVALCANTE, T. A.; STIPP, D. T.; GUERRA, R. R. Identificação de enterobactérias em macacos-prego-galego (*Sapajus flavius*) mantidos em cativeiro no estado da Paraíba. **Biotemas**, v.28, p.177-180, 2015.

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

RIVIELLO, M. C.; WIRZ, A. Hematology and blood chemistry of *Cebus apella*, in relation to sex and age. **Journal of Medical Primatology**, v.30, p.308-312, 2001.

THRALL M. A. Hematologia de Mamíferos: Animais de Laboratório e Espécies Variadas, In: Thrall, M. A.; Campbell, T. W.; De-nicola, D.; Fettman, M. J.; Lassen, E. D.; Rebar, A.; Weiser, G. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 1ª ed. São Paulo : Rocca, 2007, 201-214p.

VIDEAN, E. N.; FRITZ, J.; MURPHY, J. Effects of again on hematology and serum clinical chemistry in chimpanzees (*pan troglodytes*). **American Journal of Primatology**, v.70, p.327-338, 2008.

WIRTZ, A.; TRUPPA, V.; RIVIELLO, J. Hematological and plasma biochemical values for captive tufted capuchin monkeys (*Cebus paella*). **American Journal of Primatology**, v.70, p.463-472, 2008.