

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**ANTICORPOS EM ERITRÓCITOS E PLAQUETAS EM
CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Rangelia*
*vitalii***

TESE DE DOUTORADO

Raqueli Teresinha França

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

**ANTICORPOS EM ERITRÓCITOS E PLAQUETAS EM CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS POR *Rangelia vitalii***

Raqueli Teresinha França

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Patologia e Patologia Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção de grau de **Doutor em Medicina Veterinária**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sonia Terezinha dos Anjos Lopes

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**ANTICORPOS EM ERITRÓCITOS E PLAQUETAS EM CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS POR *Rangelia vitalii***

elaborado por
Raquel Teresinha França

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Medicina Veterinária

Comissão Examinadora:

Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Aleksandro Schafer da Silva, Dr. (UDESC)

Danieli Brolo Martins, Dr^a. (UFG)

Luis Antonio Sangioni, Dr. (UFSM)

Patrícia Wolkmer, Dr^a. (UNICRUZ)

Santa Maria, 03 de julho 2015

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo amor, carinho e apoio principalmente nos últimos meses.

A minha orientadora, Prof^a. Sonia, não tenho palavras pra agradecer todos os ensinamentos de Patologia Clínica Veterinária, pela oportunidade concedida em me orientar, por sempre me escutar, me dar conselhos e principalmente por acreditar em mim. Tenho muito orgulho de ter sido sua orientada.

Aos meus amigos, que são como irmãos, Guilherme L. Dornelles, Andressa Schafer, Rovaina Doyle, Cássia Bagolin, Marília T. Oliveira, João Pedro Scussel, Grasiela Rossi de Bastiani, Liomara Amaral e Paula Venter pelo companheirismo, pelos ensinamentos, pelas risadas, por toda ajuda e pela amizade durante todos esses anos.

Aos amigos Gabi e Jovani obrigada por estarem sempre presente.

A minha co-orientadora Dr^a. Micheli Pilatt, por toda ajuda prestada durante todas as etapas de elaboração desta tese e por sempre estar disposta a ajudar.

Ao meu amigo Márcio Machado Costa, pela ajuda em todos os momentos de dificuldades e pelos conselhos. Espero algum dia poder retribuir.

A equipe do LACVET-UFSM, em especial a professora Cinthia.

A Maria por toda ajuda durante o mestrado e doutorado.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro concedido, que foi indispensável para a realização do projeto de tese e tantos outros projetos.

Eu planejei cada caminho do mapa. Cada passo, ao longo da estrada. Oh, mais, muito mais que isso. Eu fiz do meu jeito.

(Frank Sinatra)

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

ANTICORPOS EM ERITRÓCITOS E PLAQUETAS EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Rangelia vitalii*

AUTORA: RAQUELI TERESINHA FRANÇA

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. SONIA TEREZINHA DOS ANJOS LOPES

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 03 de julho de 2015.

A rangelirose foi descrita pela primeira vez em 1908 e, apesar do tempo decorrido após sua descoberta, é uma doença reemergente. Até o momento foram relatados casos no Brasil, principalmente na região Sul do país, Argentina e Uruguai. Essa doença é causada pelo protozoário *Rangelia vitalii* que infecta somente canídeos domésticos e selvagens e possui como vetor o carrapato *Amblyomma aureolatum*. Os principais achados laboratoriais da infecção pelo *Rangelia vitalii* são anemia e trombocitopenia. Porém, os mecanismos envolvidos no desenvolvimento destes, ainda não estão completamente elucidados. Assim, o objetivo desse trabalho foi descrever uma revisão sobre a rangelirose desde o seu descobrimento até os dias atuais, e investigar o envolvimento do sistema imune na patogenia da anemia e trombocitopenia em cães com rangelirose, através da detecção de IgM e IgG na superfície de eritrócitos e plaquetas. Objetiva-se, também, avaliar a resposta regenerativa da anemia e trombocitopenia, através da determinação do percentual de reticulócitos e plaquetas reticuladas. Para tanto, foram utilizadas amostras de sangue de vinte cães da rotina hospitalar. Essas, foram coletadas de animais com idade entre 11 meses e 3 anos, machos e fêmeas, de diferentes raças. As amostras obtidas foram divididas em dois grupos, infectado e controle. O grupo infectado foi composto por amostras sanguíneas de 10 cães diagnosticados com rangelirose. O grupo controle foi formado por amostras sanguíneas provenientes de 10 cães clinicamente saudáveis, atendidos no HVU para realização de cirurgia eletiva. Os animais com rangelirose apresentaram trombocitopenia de grau moderado a severo e anemia normocítica normocrômica. Ainda, no grupo infectado foi observado aumento no percentual de plaquetas reticuladas e no percentual de anticorpo IgM ligado à superfície das plaquetas em relação ao grupo controle. Porém, para o anticorpo IgG ligado à superfície das plaquetas não foi observada diferença estatística entre os grupos. Não foi observada diferença significativa no percentual de reticulócitos e no percentual de anticorpos IgM e IgG ligados à superfície dos eritrócitos quando comparados ao grupo controle. Considerando-se os resultados apresentados nessa tese, foi possível concluir que durante a infecção por *Rangelia vitalii* ocorre ligação de anticorpo IgM na superfície de plaquetas. A ligação de anticorpos pode afetar tanto a função plaquetária, quanto levar a uma destruição precoce e acelerada dessas células pelo sistema fagocítico. Além disso, ocorre aumento no percentual de plaquetas reticuladas, indicando trombopoiese ativa. Ainda, conclui-se que anticorpos IgG e IgM não estão envolvidos na patogênese da anemia hemolítica na fase inicial da doença. No entanto, não se descarta a possibilidade do envolvimento de outros mecanismos que contribuam para a anemia e trombocitopenia observadas na rangelirose.

Palavras-chave: *Rangelia vitalii*. Anemia. Trombocitopenia. Imunoglobulinas. Plaquetas reticuladas.

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Postgraduate Program in Veterinary Medicine
Universidade Federal de Santa Maria

ANTIBODIES ERYTHROCYTE AND PLATELET IN DOGS NATURALLY INFECTED WITH *Rangelia vitalii*

AUTHOR: RAQUELI TERESINHA FRANÇA
ADVISER: Prof^a. Dr^a. SONIA TEREZINHA DOS ANJOS LOPES
Place and Date of Defense: Santa Maria, July 3th 2015

Rangeliosis was first described in 1908, despite the elapsed time after its discovery, it is a reemergent disease. So far they have been reported in Brazil, mainly in the southern region of the country, Argentina and Uruguay. Currently it is known that this disease only occurs in domestic and wild canids. Rangeliosis is caused by the protozoan *Rangelia vitalii*, transmitted to dogs by ticks *Amblyomma aureolatum*. The main laboratory findings of infection *Rangelia vitalii* are anemia and thrombocytopenia. The mechanisms involved in anemia and thrombocytopenia are still not well understood. Thus, the objective of this study was to describe a review of the rangeliosis since its discovery to the present day and investigate the involvement of the immune system in the pathogenesis of anemia and thrombocytopenia in dogs with *Rangelia vitalii* through the detection of IgM and IgG on the surface of erythrocytes and platelets, and also assess the regenerative response by determining percentage of reticulocytes and reticulated platelets. For this, blood samples from twenty dogs attended hospital routine were used. The samples were collected from animals aged 11 months and 3 years, male and female, of different breed. The samples were divided into two groups and infected control. The infected group was composed of 10 blood samples from dogs diagnosed with rangeliosis. The control group consisted of blood samples from 10 clinically healthy dogs, treated at the HVU for elective surgery. Animals with rangeliosis showed moderate to severe thrombocytopenia and normocytic normochromic anemia. In dogs infected with *Rangelia vitalii* there was an increase in the percentage of reticulated platelets and increase in IgM antibody percentage on the surface of platelets in the control group. Already, for IgG antibody bound to the surface of platelets was no statistical difference between the groups. There was no significant difference in the percentage of reticulocytes and not in IgM and IgG antibody attached to the surface of red blood cells compared to the control group. From these results, it is concluded during infection by *Rangelia vitalii* IgM antibody binding occurs on the surface of platelets. Antibody binding can affect both platelet function as lead to an early and rapid destruction of these cells by the phagocytic system is increased reticulated platelets, indicating active thrombopoietic. IgG and IgM antibodies are not involved in the pathogenesis of hemolytic anemia in the initial stage of the disease. However, do not rule out the possibility of involvement of other mechanisms that contribute to anemia and thrombocytopenia observed in rangeliosis.

Keywords: *Rangelia vitalii*. Anemia. Thrombocytopenia. Immunoglobulins. Reticulated Platelets.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Cão naturalmente infectado com <i>R. vitalii</i> , apresentando carrapatos <i>Amblyomma aureolatum</i> fixados na face interna da orelha.....	16
Figura 2.	Sinais clínicos apresentados por cães naturalmente infectado com <i>Rangelia vitalii</i> . A) icterícia, petéquias e equimoses na mucosa do abdômen e B) hematoquezia.....	17
Figura 3.	<i>Rangelia vitalii</i> no sangue de cães naturalmente infectados, interior de monócito (A) e de eritrócito (B). Panótico rápido, 100x.....	18
Figura 4.	Esfregaço sanguíneo de um cão com rangeliase apresentando discreta anisocitose e policromasia. Panótico rápido, 100x.....	108
Figura 5.	Esfregaço sanguíneo de um cão com rangeliase apresentando macroplaqueta (seta). Panótico rápido, 100x.....	109

ARTIGO

Figure. 1	Natural and experimental cases of <i>Rangelia vitalii</i> infection in dogs. Blood smears, rapid Panoptic staining: presence of <i>R. vitalii</i> inside erythrocytes (A), inside leukocytes (B), and (C and D) free in the plasma.....	58
Figure. 2	Natural case of <i>Rangelia vitalii</i> infection in a dog, lymph node, histopathology, HE. Presence of large numbers of zoites within the cytoplasm of endothelial cells of blood capillaries. Large numbers of plasma cells infiltrate this lymph node.....	58
Figure. 3	<i>Amblyomma aureolatum</i> , adult, State of Rio Grande do Sul, southern Brazil.....	59
Figure. 4	Natural cases of <i>Rangelia vitalii</i> infection in dogs, clinical signs. (A) Yellow discoloration of the oral mucosa (jaundice); (B) hyphema and epistaxis; (C) petechiae and echymoses	

	scattered throughout the oral mucosa, and mucosal pallor (anemia); (D) severe bleeding on the outer surface of the right pinna and on a venipuncture site on the right forelimb.....	59
Figure. 5.	Natural and experimental cases of <i>Rangelia vitalii</i> infection in dogs. Blood smears and bone marrow smears, rapid Panoptic stain: (A) large numbers of erythroid precursors in the bone marrow; erythrocyte agglutination, and presence of metarubricytes (B), plasma cells (C), e activated monocytes (D).....	60
Figure. 6	Natural case of <i>Rangelia vitalii</i> infection in a dog, spleen, gross pathology. Massive, diffuse splenomegaly.....	60
Figure. 7	Natural case of <i>Rangelia vitalii</i> infection in a dog: lymph node, gross pathology. The cut surface of this lymph node is wet and bulging and has multifocal to coalescing well-demarcated white foci.....	61
Figure. 8	Natural case of <i>Rangelia vitalii</i> infection in a dog: small intestine, gross pathology. The intestinal lumen is filled with large amounts of clotted blood.....	61

MANUSCRITO I

Figura 1	Esquema utilizado para identificar a população de plaquetas. <i>Dot-plot</i> de SSC (side scatter; granulosidade) versus FSC (forward scatter; tamanho celular) demonstrando a população de plaquetas em vermelho e as <i>beads</i> de 2µm em azul (A). Histograma demonstrando a intensidade de fluorescência no canal de detecção FL1 de uma amostra incubada com anticorpo anti-CD61 (marcador de plaquetas) conjugado com o fluoróforo FITC (linha tracejada), e de uma amostra negativa, não exposta ao anticorpo (cor cinza) (B). As análises foram realizadas no <i>software</i> Flowjo V10.....	82
Figura 2.	Gráficos em <i>dot plots</i> exemplificando <i>gate</i> na população de	

plaquetas não marcado (A) e amostra marcada com laranja de tiazol (RNA) (B). Intensidade de fluorescência representada por histograma, fluorescência negativa (cor cinza) e fluorescência positiva com ligação do laranja de tiazol ao RNA das plaquetas reticuladas (linha tracejada) (C). As análises foram realizadas no *software* Flowjo V10. Gráfico em *boxplot* apresentando mediana e desvio padrão do percentual de plaquetas reticuladas em cães controle e infectados naturalmente com *R.vitalii* (teste de Mann-Whitney – $**p<0,001$)..... 83

- Figura 3. Gráficos em *dot plots* exemplificando *gate* na população de plaquetas não marcado (A), plaquetas marcadas com IgG (B) e IgM (C) em um cão com rangeliose. As análises foram realizadas no *software* Flowjo V10. Gráficos em *boxplot* apresentando mediana e desvio padrão de IgG (D) e IgM (E) em plaquetas de cães controle e naturalmente infectados com *R. vitalii* (teste de Mann-Whitney – $**p<0,001$) 84

MANUSCRITO II

- Figura 1. Esquema utilizado para identificar a população de eritrócitos *dot-plot* de SSC (side scatter; granulidade) versus FSC (forward scatter; tamanho celular) demonstrando a população de eritrócitos em vermelho e as *beads* de 7,3 μm em preto. As análises foram realizadas no *software* Flowjo V10..... 103
- Figura 2. Gráficos em *dot plots* exemplificando *gate* na população de eritrócitos não marcado (A) e amostra marcada com laranja de tiazol (RNA) a população que se projeta para frente da linha são os reticulócitos (B). Intensidade de fluorescência representada por histograma, fluorescência negativa (cor cinza) e fluorescência positiva com ligação do laranja de tiazol ao RNA dos reticulócitos (linha tracejada) (C). As análises foram realizadas no *software* Flowjo V10. Gráfico em *boxplot*

apresentando mediana e desvio padrão do percentual de reticulócitos em cães controle e infectados naturalmente com ***R.vitalii*** (teste de Mann-Whitney)..... 104

Figura 3. Gráficos em *dot plots* exemplificando *gate* na população de eritrócitos não marcado (A), eritrócitos marcado com IgG (B) e IgM (C). As análises foram realizadas no *software* Flowjo V10. Gráficos em *boxplot* apresentando mediana e desvio padrão do percentual de IgG (D) e IgM (E) em eritrócitos de cães controle e naturalmente infectados com ***R. vitalii*** (teste de Mann-Whitney)..... 105

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO I

Tabela 1. Valores de contagem de plaquetas em cães naturalmente infectados com <i>Rangelia vitalii</i>	81
--	----

MANUSCRITO II

Tabela 1 Eritrograma de cães naturalmente infectados com <i>Rangelia vitalii</i>	102
--	-----

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. ARTIGO	27
CANINE RANGELIOSIS DUE TO <i>RANGELIA VITALII</i>: FROM FIRST REPORT IN BRAZIL IN 1910 TO CURRENT DAY - A REVIEW.	27
ABSTRACT	29
INTRODUCTION	30
HISTORY	30
<i>Taxonomy, life cycle, morphology, and molecular phylogeny</i>	32
<i>Epidemiology</i>	34
<i>Clinical signs</i>	36
<i>Laboratory findings</i>	37
<i>Pathogenetic mechanisms: immune response and oxidative stress</i>	41
<i>Pathology</i>	42
<i>Diagnosis</i>	44
<i>Treatment</i>	46
CONCLUSIONS	47
REFERENCES	48
LEGENDS TO ILLUSTRATIONS	58
3. MANUSCRITO I	62
AUMENTO DE PLAQUETAS RETICULADAS E DETECÇÃO DE ANTICORPOS IGM E IGG LIGADOS À SUPERFÍCIE DE PLAQUETAS EM CÃES COM RANGELIOSE	62
RESUMO	63
ABSTRACT	64
INTRODUÇÃO	65
MATERIAL E MÉTODOS	67
<i>Desenho experimental</i>	67
<i>Coleta da amostra</i>	68
<i>Contagem de plaquetas</i>	Error! Bookmark not defined.
<i>Reação em Cadeia de Polimerase - PCR</i>	69
<i>Percentual de plaquetas reticuladas</i>	69
<i>Detecção de anticorpos na superfície de plaquetas</i>	70
<i>Análise Estatística</i>	70
RESULTADOS	71
<i>Avaliação clínica</i>	71
<i>Contagem de plaquetas</i>	71
<i>Determinação das plaquetas reticuladas</i>	71
<i>Detecção de anticorpos na superfície das plaquetas</i>	71
DISCUSSÃO	72
AGRADECIMENTO	76
COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA	76

REFERÊNCIAS	76
4. MANUSCRITO II.....	85
ANTICORPOS IGM E IGG NA SUPERFÍCIE DE ERITRÓCITOS E RESPOSTA A ANEMIA EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR <i>RANGELIA VITALII</i>.....	85
RESUMO	86
ABSTRACT	87
INTRODUÇÃO.....	88
MATERIAL E MÉTODOS	90
<i>Desenho experimental.....</i>	<i>90</i>
<i>Coleta de amostras.....</i>	<i>91</i>
<i>Eritrograma</i>	<i>91</i>
<i>Reação em cadeia de polimerase - PCR.....</i>	<i>92</i>
<i>Deteção de anticorpos na superfície de eritrócitos</i>	<i>92</i>
<i>Determinação do percentual de reticulócitos</i>	<i>93</i>
<i>Análise Estatística</i>	<i>93</i>
RESULTADOS	94
<i>Avaliação clínica</i>	<i>94</i>
<i>Eritrograma</i>	<i>94</i>
<i>Determinação do percentual de reticulócitos</i>	<i>94</i>
<i>Deteção de anticorpos na superfície de eritrócitos</i>	<i>95</i>
DISCUSSÃO.....	95
AGRADECIMENTO	97
COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA	98
REFERÊNCIAS	98
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	106
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de artigo e manuscritos, os quais se encontram nos itens ARTIGO e MANUSCRITOS. Essa tese de Doutorado está organizada seguindo a estrutura e apresentação de monografias, dissertações e teses (MDT) 2012. O item CONSIDERAÇÕES FINAIS, encontrado no final da tese, apresenta as interpretações discutidas sob um ponto de vista que buscou estabelecer uma conectividade entre os objetivos e resultados obtidos nos artigos contidos neste trabalho.

As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS se referem somente às citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO e CONSIDERAÇÕES FINAIS desta tese.

Os artigos estão estruturados de acordo com as normas das revistas científicas para as quais foram submetidos:

Artigo 1: *Ticks and Tick-borne Diseases*

Manuscrito 1: *Ciência Rural*

Manuscrito 2: *Ciência Rural*

Os trabalhos descritos nesta tese foram desenvolvidos no Laboratório de Análises Clínicas Veterinária (LACVet) e Laboratório de Bioquímica e Estresse Oxidativo (BioOx) sob a coordenação da Prof^a. Sonia Terezinha dos Anjos Lopes e Prof^a. Cinthia Melazzo de Andrade.

1. INTRODUÇÃO

Rangelia vitalii (*R. vitalii*) é um protozoário do filo Apicomplexa, ordem Piroplasmida e família Babesiidae (SOARES et al., 2011). A doença causada pelo parasito *R. vitalii* é conhecida como rangeliase e denominada popularmente como peste do sangue, febre amarela dos cães ou Nambyuvú, que na língua tupi-guarani significa “orelhas que sangram”. Até o momento, essa infecção foi relatada em canídeos domésticos e selvagens (FIGHERA, 2007; FRANÇA et al., 2010; SOARES et al., 2014; SOARES et al., 2015; QUADROS et al., 2015).

A rangeliase foi descrita no Brasil, principalmente na região sul do país (CARINI, 1908; PESTANA, 1910; CARINI e MACIEL, 1914; KRAUSPENHAR et al., 2003; FRANÇA et al., 2010; LEMOS et al., 2012; SOARES et al., 2011), Argentina (EIRAS et al., 2014) e Uruguai (SOARES et al., 2015), ocorrendo com maior frequência nas épocas mais quentes do ano, onde há maior quantidade de vetores no ambiente. Os carrapatos *Amblyomma aureolatum* e *Rhipicephalus sanguineus* foram encontrados em cães infectados por *R. vitalii*, e acreditava-se que ambos estivessem envolvidos com a transmissão do protozoário (LORETTI e BARROS, 2005; FIGHERA, 2007). Porém, Soares et al. (2012) demonstraram que somente o *Amblyomma aureolatum* é capaz de transmitir esse protozoário aos cães (Figura 1). Outra forma de infecção ocorre através da inoculação de sangue de um cão portador do protozoário em um cão hígido (FIGHERA, 2007; DA SILVA et al., 2011). Cães jovens são mais frequentemente afetados, embora cães adultos também possam ser acometidos. Além disso, animais que vivem em áreas rurais são mais acometidos por essa enfermidade, por terem maior exposição ao vetor (LORETTI e BARROS, 2005; FIGHERA, 2007).



Figura 1. Cão naturalmente infectado com *R. vitalii*, apresentando carrapatos *Amblyomma aureolatum* fixados na face interna da orelha.

A doença espontânea tem evolução de alguns dias até três meses dependendo da forma de apresentação. A rangelirose apresenta-se de três formas: forma benigna, que geralmente passa despercebida pelo proprietário; forma hemorrágica, que é a forma mais comum de apresentação da doença, na qual os animais acometidos geralmente apresentam apatia, anorexia e emagrecimento progressivo, sangramento pela face externa e borda das orelhas e hematoquezia; e a forma grave que manifesta-se com sangramento interno, principalmente intestinal (PESTANA, 1910; CARINI e MACIEL, 1914). Os sinais clínicos da infecção estão relacionados com os achados de anemia e trombocitopenia que podem ser referidos como: membranas mucosas pálidas e ictéricas, febre intermitente, apatia, inapetência, desidratação, fraqueza, perda crônica de peso, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatia generalizada, edema de membros, petéquias nas mucosas, hematêmese, hematoquezia, sangramento persistente pelas narinas, cavidade oral, olhos, locais de punção venosa e superfície marginal e lateral das orelhas (PESTANA, 1910; KRAUSPENHAR et al., 2003; LORETTI e BARROS, 2005; FIGHERA et al., 2010; FRANÇA et al., 2010; DA SILVA et al., 2011) (Figura 2). Experimentalmente, estes sinais podem ser observados entre os dias cinco e quinze pós-inoculação (KRAUSPENHAR et al., 2003; DA SILVA et al., 2011).

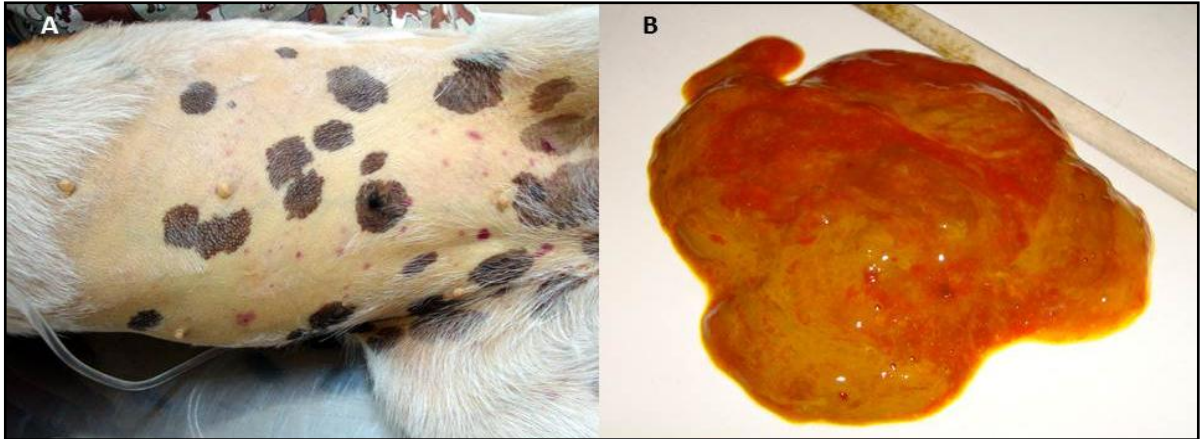


Figura 2. Sinais clínicos apresentados por cães naturalmente infectado com *Rangelia vitalis*. A) icterícia, petéquias e equimoses na pele do abdômen e B) hematoquezia.

Geralmente o diagnóstico de rangeliose é presuntivo, feito com base no histórico do animal, quadro clínico e resposta favorável à terapia. O parasito pode ser observado em vacúolos parasitóforos intra-citoplasmáticos em células endoteliais de capilares sanguíneos de diversos tecidos, livre no sangue e no interior de eritrócitos e leucócitos (FRANÇA et al., 2014) (Figura 3). Em um estudo realizado com cães naturalmente infectados foi possível a visualização do parasito em 71,4% dos animais que apresentavam sinais clínicos da doença (FRANÇA et al., 2010).

Outra forma de diagnóstico da doença pode ser realizada por punção aspirativa por agulha fina (PAAF) seguida de avaliação citológica de esfregaços ou biópsia incisional do baço, dos linfonodos e da medula óssea (FIGHERA, 2007). O parasito intracelular é encontrado na citologia e histologia em células endoteliais de capilares sanguíneos a partir de amostras colhidas durante a necropsia (LORETTI e BARROS, 2004). Ainda, o diagnóstico pode ser feito através da reação em cadeia de polimerase (PCR) (SOARES et al., 2011).

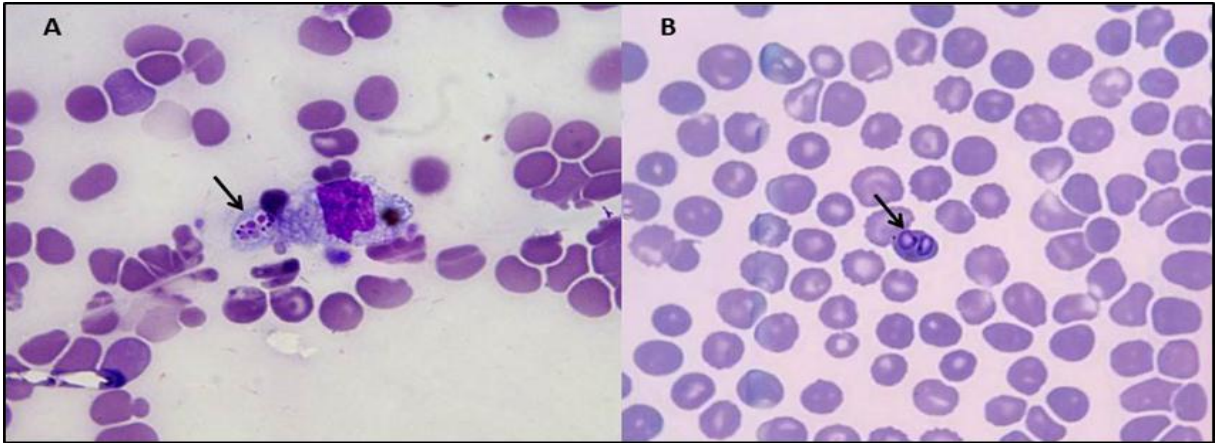


Figura 3. *Rangelia vitalii* no sangue de cães naturalmente infectados, interior de monócito (A) e de eritrócito (B). Panótico rápido, 100x.

Em relação aos exames laboratoriais, o leucograma dos cães acometidos pela doença pode apresentar contagem total de leucócitos dentro dos valores de normalidade, leucopenia e leucocitose, e, em alguns casos, a leucocitose pode se apresentar na forma de reação leucemoide. A leucocitose, quando presente, ocorre devido ao aumento no número de neutrófilos, bastonetes, metamielócitos e linfócitos (FIGHERA, 2007; FIGHERA et al., 2010; FRANÇA et al., 2010). As alterações morfológicas em leucócitos incluem presença de linfócitos atípicos e reativos, plasmócitos e monócitos ativados (FIGHERA et al., 2010; FRANÇA et al., 2010; FRANÇA et al., 2013). Nenhum teste bioquímico auxilia diretamente no diagnóstico da rangeliase, entretanto, a realização dessas provas é parte do protocolo de avaliação do paciente, sendo útil para diagnóstico diferencial (FIGHERA, 2007). Na infecção experimental, foi observado aumento na atividade da alanina aminotransferase, creatinoquinase e aspartato aminotransferase. Não foram observadas alterações séricas na gama-glutamilttransferase, ureia e creatinina (COSTA et al., 2012).

A anemia observada em cães com rangeliase é do tipo macrocítica hipocrômica, no entanto, também já foram relatadas anemias normocítica normocrômica e macrocítica normocrômica (FIGHERA et al., 2010; FRANÇA et al., 2010). Acredita-se que a anemia possa ser causada por hemólise intravascular (ciclo intraeritrocitário do parasito) ou extravascular (imunomediada) (DA SILVA et al., 2011). Na avaliação morfológica do esfregaço sanguíneo de cães acometidos pela doença comumente observa-se anisocitose, policromasia, metarrubricitemia,

corpúsculos de Howell-Jolly, aglutinação de eritrócitos e esferocitose. Quando realizada a contagem de reticulócitos pode se observar reticulocitose, dependendo do tempo de desenvolvimento da anemia (FIGHERA et al., 2010; FRANÇA et al., 2013). Animais com rangeliase apresentam redução na relação mielóide:eritroide causada pelo aumento na linhagem eritroide (FRANÇA et al., 2013). Os achados laboratoriais, geralmente encontrados em cães naturalmente infectados, são compatíveis com anemia hemolítica imunomediada extravascular (FIGHERA et al., 2010; FRANÇA et al., 2010).

A anemia hemolítica imunomediada (AHIM) ocorre quando os eritrócitos ou precursores eritroides da medula óssea são destruídos através do mecanismo de hipersensibilidade tipo II (WEISS e WARDROP, 2010). A reação de hipersensibilidade é caracterizada pela fixação de anticorpos na superfície da célula, receptores celulares, membrana basal, lâmina basal ou substâncias intracelulares. Esse tipo de hipersensibilidade tem como resultado a destruição da célula ou do tecido (PEDERSEN, 1999; ZACHARY e MCGAVIN, 2013).

As propriedades físicas dos eritrócitos os tornam passíveis de serem envolvidos nas reações de hipersensibilidade do tipo II, pois sua superfície contém um arranjo complexo de antígenos de grupos sanguíneos que podem torná-los alvos de anticorpos, como ocorre comumente nos casos de reação transfusional ou doença hemolítica. Além disso, as propriedades bioquímicas dos eritrócitos podem torná-los propensos a absorver substâncias como fármacos ou componentes antigênicos de agentes infecciosos ou tumores. Nesses casos, os eritrócitos podem se tornar alvo direto, devido à alteração de proteínas de superfície causadas pela substância, em tal grau que essas proteínas são reconhecidas como estranhas ou indiretamente atingidas se existir resposta humoral às substâncias próprias (ZACHARY e MCGAVIN, 2013).

A anemia hemolítica imunomediada pode ser classificada em duas categorias, primária ou secundária. Na AHIM primária idiopática não há nenhuma doença subjacente, evidência recente do uso de fármaco, ou administração de vacinas. Os anticorpos são considerados autoanticorpos verdadeiros e possuem ligação específica para um autoantígeno na membrana dos eritrócitos. Devido à isso, a anemia é classificada como anemia hemolítica autoimune (AHAI) verdadeira, sendo que o termo anemia hemolítica imunomediada não se aplica nesses casos. Por outro lado, a AHIM secundária ocorre quando há uma razão subjacente para a ligação de

imunoglobulinas nos eritrócitos. Esse tipo de anemia pode ocorrer como um fenômeno secundário na doença neoplásica, ou quando anticorpos possuem especificidade para agentes infecciosos ou drogas que estão associados à superfície dos eritrócitos (WEISS e WARDROP, 2010).

Existem inúmeros gatilhos para o desencadeamento da AHIM em cães, sendo as doenças infecciosas importantes desencadeadores. Em particular doenças transmitidas por artrópodes, dentre essas destacam-se a babesiose, erliquiose, leishmaniose, rickettsioses e, possivelmente, anaplasiose e bartonelose. Estes organismos estabelecem interação única com o sistema imune do hospedeiro que pode resultar numa variedade de fenômenos imunomediados secundários que não estão diretamente relacionados com a infecção (WEISS e WARDROP, 2010; NELSON e COUTO, 2010).

A anemia hemolítica imunomediada surge do desenvolvimento de anticorpos IgG ou IgM dirigidos contra a membrana dos eritrócitos. O grau de lise dos eritrócitos depende do tipo e da quantidade de anticorpos que se ligam à célula, e do envolvimento de fixação do complemento. A maioria dos casos de AHIM são resultado da ligação da IgG e do complemento aos eritrócitos (McCULLOUGH, 2003; GERSHWIN, 2010). A IgG possui dois locais de ligação ao antígeno (monoméricos) e geralmente não pode aglutinar diretamente os eritrócitos, a não ser que uma grande quantidade de anticorpo esteja presente. Quando uma molécula de IgG se liga ao eritrócito, ele é fagocitado por macrófagos que possuem múltiplos receptores para a porção de fragmento constante (FC) da molécula de IgG. Esses macrófagos são encontrados principalmente no baço, desse modo, a eritrofagocitose ativa resulta em esplenomegalia. Com o aumento na produção de imunoglobulinas, mais moléculas são ligadas aos eritrócitos, ocorrendo eritrofagocitose no fígado, o que resulta em hepatomegalia. Já, a IgM é uma molécula grande pentamérica que aglutina eritrócitos. A molécula de IgM ligada ao eritrócito pode permitir a ligação da serina C1, e a cascata do complemento é ativada. Após ativação do complemento, a IgM pode se descolar e se ligar a outros eritrócitos. O complexo eritrócito-IgM pode se ligar ao complemento e ser fagocitado por macrófagos no fígado (McCULLOUGH, 2003).

A ativação do sistema de complemento e a ligação das proteínas do complemento nos eritrócitos desempenham papéis fundamentais na AHIM. O complemento pode causar lise intravascular imediata ou lise extravascular com

produção de esferócitos. A C1 entra na cascata do complemento e, através de uma série de reações enzimáticas, gera o “complexo de ataque à membrana” (C8C9C5bC6C7) que se liga à membrana dos eritrócitos. Esse complexo de ataque à membrana resulta na formação de poros na membrana dos eritrócitos permitindo o fluxo de água e eletrólitos, que causam inchaço e lise celular na circulação (lise osmótica). O complexo C3b quando ligado na membrana do eritrócito pode ocasionar a lise dessas células ou fagocitose parcial de sua membrana por macrófagos localizados no baço, produzindo esferócitos (McCULLOUGH, 2003; WEISS e WARDROP, 2010).

Desconhece-se o mecanismo patogênico envolvido no desenvolvimento de hemorragias observadas durante o parasitismo por *R. vitalii*. A ocorrência de hemorragias em diferentes órgãos e tecidos e o sangramento através dos orifícios naturais e pele que recobre as orelhas são achados relativamente comuns na rangeliase. A coagulação intravascular disseminada (CID) tem sido sugerida como um dos mecanismos patogênicos envolvidos na ocorrência dessas hemorragias. Uma evidência morfológica de CID na infecção por *R. vitalii* é a presença de microtrombos na luz de arteríolas, capilares e vênulas observados ao microscópio de luz e a ocorrência de depósitos de fibrina no lúmen dos vasos sanguíneos visualizados através da microscopia eletrônica de transmissão. Sugere-se que essa coagulopatia de consumo seja desencadeada pela lesão endotelial, causada pela replicação continuada desse parasito intracelular em vacúolos parasitóforos, promovendo a ruptura do endotélio dos capilares sanguíneos. Além disso, a ocorrência do patógeno no sangue circulante pode levar à formação de imunocomplexos, que também atuariam diretamente a cascata de coagulação. Esses imunocomplexos circulantes causariam lesão endotelial estimulando a agregação plaquetária (LORETTI e BARROS 2004).

De acordo com Figuera (2007), na rangeliase é possível observar trombocitopenia de grau leve a moderado. Já em outro estudo, com cães naturalmente infectados, foi observada severa trombocitopenia (FRANÇA et al., 2010). Na infecção experimental por *R. vitalii* foi observada severa trombocitopenia, presença de macroplaquetas no esfregaço sanguíneo e, na avaliação da medula óssea, os megacariócitos encontravam-se aumentados, além de diminuição na agregação plaquetária, não ocorrendo alteração nos tempos de protrombina e trombolastina parcial ativada. Assim, é possível que ocorra trombocitopenia severa

na fase aguda da infecção e que os tempos de coagulação não influenciem na patogênese da doença. Dano à medula óssea também foi descartado como uma das causas de trombocitopenia, pois observa-se aumento no número de megacariócitos (PAIM et al., 2012a). A trombocitopenia não é o único mecanismo envolvido na doença, pois trombocitopenia foi demonstrada através da redução da agregação plaquetária que pode estar relacionada com a redução da liberação da adenosina difosfato (ADP) (PAIM et al., 2012b).

A trombocitopenia imunomediada (TIM) é uma condição caracterizada pela destruição imunomediada das plaquetas e pode ser classificada em primária ou secundária. A TIM algumas vezes ocorre juntamente com a AHIM, condição conhecida como Síndrome de Evans. A TIM é classificada como secundária quando há uma clara associação entre trombocitopenia e uma condição subjacente, como neoplasias, agentes infecciosos, drogas e outras doenças imunomediadas. Muitos agentes infecciosos como vírus, bactérias, fungos e protozoários são associados à TIM, alguns dos quais também podem causar trombocitopenia por outros mecanismos (ZACHARY e MCGAVIN, 2013).

O aumento de imunoglobulinas associadas à superfície das plaquetas em pacientes com patologias suportam o envolvimento de componente imunológico à trombocitopenia, no entanto, isso pode ser evidência insuficiente para concluir que o distúrbio subjacente deva ser considerado causa definitiva de TIM secundária (WEISS e WARDROP, 2010). A patogenia da TIM causada por agentes infecciosos geralmente é multifatorial ou de causa desconhecida. A TIM associada à infecção pode ser causada por reação cruzada de anticorpos, produção de autoanticorpos induzida por bactérias, exposição de antígenos ocultos na membrana plaquetária pelo organismo, ligação de anticorpos contra o agente infeccioso ligado à membrana plaquetária ou indução de imunocomplexos que se aderem à membrana plaquetária (STOCKHAM e SCOTT, 2011). Os anticorpos podem estar ligados às plaquetas por complexo imune através do complemento, receptores FC para IgG em espécies com receptores Fcγ nas plaquetas, ou através de interações inespecíficas (WEISS e WARDROP, 2010).

A trombocitopenia causada por agentes infecciosos pode ser decorrente de diferentes combinações como, supressão na produção de plaquetas, alteração na distribuição das plaquetas, aumento do consumo, destruição imunomediada e não imunomediada. Riquetsioses são causas infecciosas comuns de trombocitopenia,

mas sua patogênese é mal compreendida. Na erliquiose aguda acredita-se que a trombocitopenia seja imunomediada (WEISS e WARDROP, 2010). Mecanismos imunológicos podem contribuir para trombocitopenia na infecção por *Anaplasma phagocytophilum* (BEXFIELD, et al., 2005) e *Rickettsia rickettsii* (GRINDEM et al., 1999). A destruição imunomediada de plaquetas provavelmente contribui para a trombocitopenia, a qual ocorre comumente em cães com histoplasmose, babesiose e leishmaniose (WEISS e WARDROP, 2010).

Paim et al. (2013), em um estudo com cães infectados experimentalmente com *R. vitalii*, observaram diminuição nas concentrações da proteína total sérica, da albumina, da α -2 globulina e β -2 globulina acompanhados de aumento na α -1 globulina e γ -globulina nos animais infectados. Além de aumento na proteína C reativa, na α -glicoproteína ácida e nas imunoglobulinas como IgG, IgA, IgM e IgE. Com base nesses resultados, os autores concluíram que a infecção por *R.vitalii* provoca alterações no proteinograma e aumento nos níveis das proteínas de fase aguda e imunoglobulinas. Provavelmente, o aumento nesses parâmetros ocorra para combater o parasito indiretamente (através da ativação de células) e/ou diretamente (ataque ao parasito).

O teste de antiglobulina direta (Teste de Coombs) tem sido realizado rotineiramente em laboratórios veterinários. No entanto, a sensibilidade é relativamente baixa e varia de 48 - 58% quando realizado pelo método padrão do tubo. A citometria de fluxo é considerada atualmente o teste laboratorial mais específico e sensível para detectar anticorpos ligados à superfície das plaquetas em cães com anemia e trombocitopenia (CHABANNE et al., 2000). Estudos demonstraram sensibilidade de 92% para o diagnóstico de anemia hemolítica imunomediada (WEISS e WARDROP, 2010; STOCKHAM e SCOTT, 2011). Os resultados são influenciados significativamente pelo uso de reagentes policlonais IgG específicos (KUCINSKIENE, et al., 2005). Estudo realizado em cães demonstrou que a maioria dos animais possuíam anticorpos IgG ligado aos eritrócitos. Em contrapartida, poucos apresentavam anticorpos IgM (WILKERSON, et al., 2000; QUIGLEY, et al., 2001; MORLEY, et al., 2008).

Na anemia hemolítica imunomediada geralmente observam-se esferócitos. Porém, essas células nem sempre estarão presentes, pois os esferócitos podem não se acumular no sangue se sua velocidade de formação for menor que sua velocidade de remoção (STOCKHAM e SCOTT, 2011). Sendo assim, a detecção de

anticorpos ligados aos eritrócitos pode ser útil na avaliação de pacientes com suspeita de anemia hemolítica imunomediada, auxiliando na seleção do tratamento adequado (MORLEY, et al., 2008). Na infecção por *Babesia canis canis* e *Babesia canis vogeli*, Carli et al. (2009) evidenciaram que em animais infectados por *Babesia canis canis* não foram encontrados anticorpos ligados a membrana dos eritrócitos, diferindo dos achados encontrados em infecções por *Babesia canis vogeli*, que demonstraram anticorpos ligados a membrana dos eritrócitos IgG e IgM. Os resultados descritos na infecção por *Babesia canis vogeli* sugerem que há um mecanismo imunomediado envolvido na patogênese da anemia hemolítica durante a infecção por este protozoário.

Estudo realizado por Terrazzano et al. (2006) que avaliou a presença de anticorpos anti-plaquetas em cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*, os autores demonstraram a presença de IgM e IgG na membrana das plaquetas, indicando que a trombocitopenia está relacionada com componentes imunomediados. Em outro estudo realizado por Cortese et al. (2011) foram detectados anticorpos IgM, IgG, ou IgM e IgG em 50% dos cães infectados naturalmente com *Leishmania infantum*, em 60% dos cães infectados por *Ehrlichia canis* e em 80% dos cães com infecção concomitante. O maior percentual de imunoglobulinas nos cães com infecção concomitante indicam desregulação imunológica, sendo esse um critério útil quando se consideram estratégias terapêuticas em cães.

De acordo com Waner et al. (2000), na infecção experimental por *Ehrlichia canis*, no dia dez pós-inoculação, 50% dos animais do estudo apresentaram IgG ligadas às plaquetas. Este estudo adiciona evidências conclusivas de que a reação imunológica às plaquetas ocorre na fase precoce da erliquiose monocítica canina. Devido à resposta heterogênea na aparência dos anticorpos ligados às plaquetas, também concluíram que outros mecanismos não imunes podem estar envolvidos na destruição das plaquetas. Cães infectados experimentalmente com *Babesia gibsoni* apresentam aumento nas imunoglobulinas ligadas às plaquetas, esse aumento transitório ocorreu durante um período de duas semanas, coincidindo com a diminuição da contagem de plaquetas (WILKERSON, et al., 2001). Resultados semelhantes foram observados em cães experimentalmente infectados com *Ehrlichia canis* e *Rickettsia rickettsii*, em que os níveis de imunoglobulinas ligadas às

plaquetas foram elevados durante um período de 20 dias, o que correspondeu com a duração da trombocitopenia (GRINDEM, et al., 1999).

A resposta regenerativa para a anemia baseia-se na liberação acelerada de eritrócitos imaturos (reticulócitos) da medula óssea para a circulação, sob influência da eritropoietina. Os reticulócitos contêm restos de complexo de Golgi, ribossomos e mitocôndrias. Quando há evento hemorrágico ou hemolítico observa-se reticulocitose periférica. No entanto, para que ocorra resposta medular adequada podem ser necessários no mínimo cinco dias (COWGILL et al., 2003).

A contagem manual de reticulócitos é relativamente imprecisa e possui baixa acurácia, apresentando coeficiente de variação de 8% a 23%. O uso da citometria de fluxo é o método com maior acurácia para a estimativa de reticulócitos (WEISS, 2002). A citometria de fluxo utiliza grande variedade de fluorocromos, detecta reticulócitos utilizando fluorescência de ambos RNA e DNA. Estes fluorocromos são o laranja de tiazol ou auramina, que são empregados para a contagem de reticulócitos. Essa metodologia conta pelo menos 10.000 células. O uso da citometria de fluxo para enumeração de reticulócitos diminui o erro de amostragem e aumenta a precisão devido ao grande número de células contadas em relação ao método manual. As desvantagens incluem contagem de reticulócitos falsamente elevadas devido à interferência de inclusões em eritrócitos, como corpúsculo de Howell-Jolly, parasitas e metarrubricitos. Outra desvantagem é relacionada com despesa de formação técnica, pois este equipamento requer mão-de-obra qualificada para seu manuseio (RILEY et al., 2001; COWGILL et al., 2003).

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos dos megacariócitos, apresentam formato discoide e são anucleadas (WEISS e WARDROP, 2010). Participam do complexo sistema de manutenção da hemostasia junto com a parede vascular, os fatores de coagulação e o sistema fibrinolítico (STOCKHAM e SCOTT, 2011). São produzidas através da fragmentação de pseudópodos da membrana citoplasmática dos megacariócitos. Estima-se que um megacariócito produza de 1.000 a 3.000 plaquetas (KAUSHANSKY, 2008), o que é um mecanismo altamente eficiente e dinâmico, pois os megacariócitos são relativamente escassos na medula óssea e a quantidade de plaquetas no sangue periférico é elevada (JUNT et al., 2007).

Plaquetas reticuladas são plaquetas jovens e possuem conteúdo de RNA citoplasmático aumentado. Esse conteúdo de RNA permite a detecção dessas células com o emprego da citometria de fluxo, do mesmo modo que o conteúdo de

RNA dos reticulócitos é utilizado para avaliar eritropoiese. Essas células têm sido quantificadas para avaliar a trombopoiese em cães e equinos (RUSSELL et al., 1997; WEISS, 2002; STOCKHAM e SCOTT, 2011). Quando há destruição periférica das plaquetas, a porcentagem de plaquetas reticuladas circulante aumenta (WEISS e WARDROP, 2010).

Os mecanismos envolvidos na anemia e trombocitopenia encontrados na rangeliose ainda não estão bem elucidados, acredita-se que a anemia na rangeliose possa ser causada por hemólise intra ou extravascular. As causas de trombocitopenia podem estar relacionadas com sequestro esplênico, consumo, coagulação intravascular disseminada (CID) ou trombocitopenia imunomediada. A resposta da medula óssea à anemia é bem descrita, em relação à regeneração em casos de trombocitopenia a avaliação da resposta limita-se à colheita de medula óssea. Sendo assim, para avaliar a presença de plaquetas jovens no sangue periférico determina-se a presença de plaquetas reticuladas. Neste sentido, buscou-se investigar a ligação de anticorpos na superfície de eritrócitos e plaquetas, e avaliar a resposta medular para a anemia e trombocitopenia em cães naturalmente infectados com *Rangelia vitalii*.

2. ARTIGO

Canine rangeliosis due to *Rangelia vitalii*: from first report in Brazil in 1910 to current day - A review.

Raquel T. França, Aleksandro S. Da Silva, Alexandre P. Loretti, Cinthia M. Mazzanti,
Sonia T. Lopes

Artigo publicado no periódico

Ticks and Tick-borne Diseases, Volume 5, Issue 5, September 2014, Pages 466–474

Canine rangellosis due to *Rangelia vitalii*: from first report in Brazil in 1910 to current day - A review.

Raquel T. França^{a*}, Aleksandro S. Da Silva^{b*}, Alexandre P. Loretto^c, Cinthia M. Mazzanti^a, Sonia T. Lopes^a

^a *Department of Small Animal Clinical Sciences, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS 97105-900, Brazil*

^b *Department of Animal Science, Western Higher Education Center, Santa Catarina State University (UDESC), Chapecó, SC 89815-630, Brazil*

^c *PO Box 16072, Rio de Janeiro, RJ 22221-971, Brazil*

*Corresponding authors at: Departamento de *Clínica* de Pequenos Animais, Hospital Veterinário, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Av. Roraima, bairro Camobi, no. 97, Sala 103, Santa Maria – RS, Brazil. CEP 97105-900. Tel. and fax: +55 55 3220 8814 (R.T. França); Departamento de Zootecnia, Centro de Educação Superior do Oeste (CEO), Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Rua Beloni Trombeta Zanin, 680E, bairro Santo Antonio, Chapecó – SC, Brazil. CEP 89815-630. Tel.: +55 49 3322 4202 (A.S. Da Silva)

E-mail addresses: raquelifranca@yahoo.com.br (R.T. França);
aleksandro_ss@yahoo.com.br (A.S. Da Silva)

ABSTRACT

Canine rangellosis (popular names: “nambi-uvú”, i.e. “bleeding ears”; “peste de sangue”, i.e. “bleeding plague”; and “febre amarela dos cães”, i.e. “yellow fever of dogs”) is a tick-borne haemolytic and haemorrhagic disease caused by the protozoan parasite *Rangelia vitalii* which infects erythrocytes, leukocytes, and endothelial cells of blood capillaries. *Rangelia vitalii* was first reported as a novel piroplasm of dogs in 1910 in Brazil, a discovery that was met with skepticism at that time. Canine rangellosis has been diagnosed in domestic dogs not only in Brazil but also in other South American countries (Argentina and Uruguay). *Rangelia vitalii* infection has also been found incidentally in Brazil in wild dogs (*Cerdocyon thous*, the crab-eating fox). Despite the fact that researchers in the early 1900s suggested that *R. vitalii* was a hitherto unidentified piroplasm that would be transmitted by the tick *Amblyomma aureolatum*, it was not until 2012 that these hypotheses were actually confirmed by PCR and transmission studies. Molecular studies have shown that *R. vitalii* is related to the *Babesia* sensu strictu clade, but genetically different from other morphologically similar species of *Babesia* that infect dogs. Another difference between *Babesia* spp. and *R. vitalii* is the ability of *R. vitalii* to invade endothelial cells, erythrocytes, and leukocytes. Experimental infection in dogs has successfully reproduced the clinical picture and pathology of the natural disease. In this article, epidemiology, clinical signs, laboratory findings, pathogenetic mechanisms including oxidative stress and immune response, necropsy findings, microscopic lesions, diagnosis, and treatment of canine rangellosis are reviewed. What is currently known about this protozoal disease since its first report over a century ago is presented herein.

Keywords: *Rangelia vitalii*; rangellosis; dogs; piroplasm; tick

Introduction

Rangeliosis is a haemorrhagic and haemolytic tick-borne disease of dogs in South America caused by the piroplasm *Rangelia vitalii*. This disease is also known as “bleeding ears” (“nambi-uvú” in the indigenous language Tupi-Guarani), “bleeding plague” (“peste desangue” in Brazilian Portuguese), and “yellow fever of dogs” (“febre amarela dos cães” in Portuguese) (Carini, 1908, 1948; Pestana, 1910a,b; Carini and Maciel, 1914a; Braga, 1935; Rezende, 1976). This article provides an overview about what is currently known about this protozoal disease and its causative agent since its first report approximately a century ago.

History

A paper published in 1908 by Antonio Carini about infectious and parasitic diseases of domestic animals diagnosed in Brazil is the earliest reference to canine rangeliosis in the literature. Carini states in his article that “nambi-uvú” of dogs (canine rangeliosis) is similar to “malignant jaundice” of dogs (canine babesiosis) (Carini, 1908). A few years later, Bruno Rangel Pestana published a more thorough research article about “nambi-uvú” and claimed that this disease was possibly caused by a previously undescribed piroplasm which he named *Piroplasma vitalii* (Pestana, 1910b) in honor of the Brazilian scientist Vital Brazil. In 1914, another manuscript about “nambi-uvú” was published this time by Antonio Carini and Jesuno Maciel (Carini and Maciel, 1914a). They suggested that the scientific name of this new piroplasm should be changed to *Rangelia vitalii* as a tribute to Rangel Pestana who first described the organism. Their paper corroborated the theory first proposed by Pestana that *R. vitalii* was a novel canine piroplasm and that this organism should be placed in the entirely new genus *Rangelia*. They also mentioned that, by the time that their paper about “nambi-uvú” in dogs was published in 1914, no cases of

“malignant jaundice” had been diagnosed in dogs in Brazil. At the time when these first papers about canine rangelirosis came out, there was widespread disbelief among scientists about the statement that *R. vitalii* was a novel piroplasm. Skeptical researchers rejected Pestana’s hypothesis that *R. vitalii* was a new protozoan parasite claiming that the organism that he had found in the blood of the affected animals was not *R. vitalii* but actually *Babesia*, and that the organism found in tissues was in fact *Toxoplasma* (Paraense and Vianna, 1948). From 1985 until 1993, a number of cases of canine rangelirosis were misdiagnosed as canine visceral leishmaniasis in southern Brazil and published as a retrospective study about kala-azar by *Leishmania* sp. in dogs (Pocai et al., 1998). These misdiagnoses added another chapter to the already confusing story of *R. vitalii* (Krauspenhar et al., 2003; Loretto and Barros, 2005). Nothing new about canine rangelirosis was published over decades as researchers were uninterested in pursuing the subject (Figuera, 2007; Loretto, 2012). Over the years, veterinarians presented with dogs showing severe ear margin bleeding, epistaxis, anemia, jaundice, and a history of tick exposure did not consider *R. vitalii* in their differential diagnosis as most of them were unfamiliar with this pathogen since no information about it was published for decades. Early papers on canine rangelirosis were written in Brazilian Portuguese which is a language that most researchers do not read. Besides, most of these publications are not readily available in libraries or online. Therefore, until recently, the majority of scientists were unaware of the existence of *R. vitalii*. In 2003, a retrospective study about canine rangelirosis – which included those cases that were previously misdiagnosed as visceral leishmaniasis (Pocai et al., 1998) – was published (Krauspenhar et al., 2003). This publication sparked interest in the subject, and instigated new research. Since then, many articles about *R. vitalii* have been published (Krauspenhar et al.,

2003; Loretti and Barros, 2004, 2005; Figuera, 2007; Figuera et al., 2010; França et al., 2010, 2012, 2013; Da Silva et al., 2011, 2012, 2013 a, b, c; Puntel et al., 2011; Soares et al., 2011, 2014; Costa et al., 2012; Lemos et al., 2012; Loretti, 2012; Paim et al., 2012 a, b; Paim et al., 2013 a, b). Recently, this piroplasm has received some attention in a multi-authored book about infectious diseases of dogs and cats published in the US as there is a short section about rangeliiosis in a chapter about protozoal diseases (Sykes, 2013).

Taxonomy, life cycle, morphology, and molecular phylogeny

Rangelia vitalii is a protozoan parasite of the phylum Apicomplexa, class Aconoidasida, order Piroplasmida, family Babesiidae (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1401992&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>). To date, there is no detailed information available about the life cycle of *R. vitalii* in its invertebrate hosts (ticks) or vertebrate hosts (canids). In domestic dogs, *R. vitalii* is found in the blood inside erythrocytes, leukocytes, and free in the plasma (Fig. 1A–D) while in tissues it parasitizes endothelial cells of blood capillaries (Fig. 2). The hard tick *Amblyomma aureolatum* (Ixodidae) (Fig. 3), the proven vector of this piroplasm, transstadially transmits *R. vitalii* from nymph to adult (Soares et al., 2012). Inside erythrocytes, *R. vitalii* is a round, oval, or teardrop-shaped organism that can occur singly or in pairs and can be arranged at different angles with their narrow ends abutting. In blood smears stained with Giemsa, intraerythrocytic merozoites of this piroplasm have an abundant, pale red cytoplasm and an eccentric dark blue small nucleus. Inside red blood cells, this piroplasm is $3.34 \pm 0.54 \mu\text{m}$ long and $2.09 \pm 0.34 \mu\text{m}$ wide, and its nucleus is $1.07 \pm 0.20 \mu\text{m}$ long and $0.87 \pm 0.15 \mu\text{m}$ wide. Inside leukocytes

(monocytes and neutrophils), there can be many zoites which look similar to the ones found inside erythrocytes. Inside white blood cells, this protozoan parasite measures $2.97 \pm 0.68 \mu\text{m}$ in length and $1.94 \pm 0.26 \mu\text{m}$ in width, and its nucleus is $1.17 \pm 0.34 \mu\text{m}$ long and $0.85 \pm 0.23 \mu\text{m}$ wide. *Rangelia vitalii* zoites that are found free in the plasma have morphological and tinctorial features that are similar to the ones of those that are present in red blood cells and white blood cells. They measure $3.94 \pm 0.67 \mu\text{m}$ in length and $2.23 \pm 0.42 \mu\text{m}$ in width, and their nucleus is $0.97 \pm 0.17 \mu\text{m}$ long and $0.84 \pm 0.11 \mu\text{m}$ wide (Da Silva et al., 2011). Histologically, *R. vitalii* zoites are seen inside the cytoplasm of endothelial cells of blood capillaries as round, homogeneous, and basophilic organisms in slides stained with hematoxylin and eosin (HE). The cytoplasm of this protozoan parasite on HE-stained sections is abundant and faintly eosinophilic, and the nucleus small but prominent, basophilic, and eccentric. Individual organisms measure 2.0–2.5 μm ; 20–30 organisms can be seen within the cytoplasm of each endothelial cell (Pestana, 1910a, b; Carini and Maciel, 1914 a; Loretti and Barros, 2005; Figuera et al., 2010). Transmission electron microscopy studies show that *R. vitalii* is found in endothelial cells of blood capillaries from a variety of organs and is located inside intracytoplasmic membrane-bound parasitophorous vacuoles. *Rangelia vitalii* has ultrastructural features of a protozoan parasite from the phylum Apicomplexa including a polar ring, the presence of rhoptries in its extreme apical pole, and a trilaminar parasitophorous vacuole membrane that has multiple villar protrusions (Loretti and Barros, 2005).

Phylogenetic studies based on partial sequences of the 18S ribosomal RNA (18S rRNA) and of the 70 kDa heat shock protein (hsp 70) genes of *R. vitalii* (GenBank accession numbers HQ150006 and JF279603, respectively) and other piroplasmids have shown a close relationship between *R. vitalii* and the *Babesia*

sensu stricto clade. According to the gene and method used for phylogenetic analysis (18S rRNA or hsp70 genes were analyzed by neighborjoining, maximum parsimony, or maximum likelihood), *R. vitalii* was either placed within the *Babesia* sensu stricto clade or basal to it (Soares et al., 2011, 2014; Eiras et al., 2012; Lemos et al., 2012; Paim et al., 2013c). Importantly, *R. vitalii* positioning was clearly separated from species of *Babesia* spp. that infect dogs such as *B. vogeli*, and also from *Theileria* spp. and *Cytauxzoon felis* which, as *R. vitalii*, can also infect other host cells besides erythrocytes. These studies strongly support the notion that *R. vitalii* constitutes a taxon different from previously described canine piroplasm species, though further analysis is needed for a clearly defined phylogenetic positioning of this parasite.

Epidemiology

To date, canine rangelioidosis has been reported only in South America in domestic dogs in the southeastern and southern regions of Brazil (Carini, 1908; Pestana, 1910a; Carini and Maciel, 1914a; Rezende, 1976; Krauspenhar et al., 2003; Loretto and Barros, 2005; França et al., 2010; Lemos et al., 2012; Moreira et al., 2013; Soares et al., 2013), in Argentina (Eiras et al., 2012), and in Uruguay (Sarasúa and Donati, 1976). May be *R. vitalii* exists in other South American countries but has not been reported yet because in those places canine rangelioidosis might have been misdiagnosed as it happened in Brazil for several decades. *Rangelia vitalii* was also detected by PCR in live crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*) injured that were rescued, and in dead ones as well that got accidentally hit by cars along Brazilian roads (Soares et al., 2014). None of these crab-eating foxes had any clinical signs or laboratory abnormalities consistent with canine rangelioidosis though, and no piroplasms were found by light microscopy on blood smears (Soares et al., 2014).

Amblyomma aureolatum and *Rhipicephalus sanguineus* are the ixodid ticks that have been found on the coat of the dogs infected with *R. vitalii* and also in the environment where these animals roam (Carini and Maciel, 1914a; Loretto and Barros, 2005; Soares et al., 2011). Studies about the seasonal dynamics of *A. aureolatum* and *R. sanguineus* in Brazil have shown that adult ticks occur throughout the year on dogs (Pinter et al., 2004; Louly et al., 2007). *Amblyomma aureolatum* infests not only domestic dogs but also other potential reservoir hosts of *R. vitalii* such as the Pampa's fox (*Lycalopex gymnocercus* syn. *Pseudalopex gymnocercus*), the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*), the crab-eating raccoon (*Procyon cancrivorus*), the white-eared opossum (*Didelphis albiventris*), the brown howler (*Alouatta guariba*), the margay (*Leopardus wiedii*), and birds. *Amblyomma aureolatum* has been found in Brazil, Argentina, and Uruguay, countries where cases of canine rangelirosis have been reported, and in other countries from South America as well such as Paraguay, Suriname, and French Guiana where *R. vitalii* infection have not been diagnosed to date (Evans et al., 2000; Rodrigues et al., 2002; Arzua et al., 2003; Guglielmone et al., 2003; Labruna et al., 2005; Müller et al., 2005; Martins et al., 2006, 2010; Ogrzewalska et al., 2014). It has been suggested that there is possibly a wildlife reservoir for rangelirosis that would be an asymptomatic carrier of the piroplasm (Loretto and Barros, 2004, 2005; Figuera, 2007; Loretto, 2012; Soares et al., 2014). *Amblyomma aureolatum* was found on the coat of an injured, rescued crab-eating fox in which *R. vitalii* was detected by PCR in blood, spleen, and bone marrow samples (Soares et al., 2014). Blood from dogs with canine rangelirosis (Pestana, 1910a, b; Carini and Maciel, 1914a; Rezende, 1976; Krauspenhar et al., 2003; Loretto and Barros, 2005; Da Silva et al., 2011) and blood and bone marrow samples from a

crab-eatingfox infected with *R. vitalii* (Soares et al., 2014) have reproduced the disease successfully in healthy dogs when injected intravenously.

R. vitalii affects young dogs much more frequently than adult dogs. Dogs from rural areas are usually infected by this piroplasm, or those who travel to those rural areas as ticks which transmit this pathogen are present in this particular environment. There is limited information about the seasonality of canine rangeliosis. Two studies report that the disease occurs all year round, but more cases of this illness are diagnosed during the summer (Cariniand Maciel, 1914a; Loretto and Barros, 2005). There are few studies about the prevalence and geographic distribution of canine rangeliosis in Brazil. In a retrospective study spanning 24 years (1985–2009), 35 cases of *R. vitalii* infection were diagnosed by necropsy/histopathology in the State of Rio Grande do Sul, southern Brazil. The number of cases of canine rangeliosis diagnosed post-mortem per year in this study varied from none to up to 3 (Figuera et al., 2010). In a 2-year prospective study (2006–2008), peripheral blood smears from 103 dogs brought to a veterinary clinic located in the State of Rio de Janeiro, southeastern Brazil, were screened by light microscopy, and blood was tested by PCR for the presence of piroplams. Of those, intraerythrocytic piroplasms were found in the blood films of 4 dogs (*Babesia* and/or *Rangelia* as these two cannot be distinguished from one another based on their morphology only), and in 6 cases, blood samples were positive for *R. vitalii* by PCR-RFLP (Lemos et al., 2012).

Clinical signs

Dogs infected with *R. vitalii* may present with yellow discoloration of the mucous membranes and skin (jaundice) (Fig. 4A), mucosal pallor (anemia) (Fig. 4C), intermittent fever, apathy, loss of appetite, dehydration, weakness, chronic weight

loss, hepatomegaly, splenomegaly, generalized lymphadenopathy, hindlimb edema, mucosal petechiation, hematemesis, and bloody diarrhea. Typical clinical signs of canine rangellosis include persistent bleeding from the nares, oral cavity, eyes, venipuncture sites, and margins and lateral surface of the pinnae (Fig. 4B–D). The severe bilateral pinnal haemorrhage that is often seen in cases of canine rangellosis has been considered a characteristic (if not pathognomonic) clinical sign of this disease. The clinical course of the natural disease varies from just a few days to up to 3 months. In experimental studies, the first clinical signs are observed 5–15 days post inoculation, and death supervenes 7 days after these symptoms have been noted. During the acute stage of the disease, animals are listless, weak, they have fever, and their mucous membranes are pale or yellow. Animals succumb to the disease within 3–5 days after the first clinical signs are observed if they are not treated properly.

Laboratory findings

On blood smears, *R. vitalii* is found inside erythrocytes and leukocytes or free in the plasma (Fig. 1A–D). Laboratory findings of natural cases of canine rangellosis are those of an extravascular immune-mediated haemolytic anemia, and it is usually a macrocytic hypochromic anemia but can also be normocytic normochromic, or macrocytic normochromic (Krauspenhar et al., 2003; Figuera et al., 2010; França et al., 2010). In the experimental disease, the anemia starts as normocytic normochromic and evolves into a macrocytic hypochromic anemia as the disease progresses. Reticulocytosis is also observed which indicates regenerative anemia (França et al., 2013). *Rangelia vitalii* can induce varying degrees of anemia due to erythrocyte destruction. Reticulocytosis is observed in the peripheral blood as a

result of the bone marrow response to blood loss, and reaches its peak within 4 days. In experimental cases of canine rangelioidosis, the myeloid:erythroid (M:E) ratio is decreased between days 10 and 20 post inoculation due to an increase in the numbers of erythroid precursors in the bone marrow (França et al., 2013) (Fig. 5A). Anisocytosis, polychromasia, and the presence of metarubricytes and Howell-Jolly bodies are the most common findings on blood smears of dogs infected with *R. vitalii*. Spherocytosis, red blood cell agglutination, and erythrophagocytosis are also noted. These findings are consistent with immunemediated damage to erythrocytes, i.e. immunemediated haemolytic anemia, and are often seen in cases of canine rangelioidosis (Figuera, 2007; Figuera et al., 2010; França et al., 2010, 2013) (Fig. 5B). Red blood cell distribution width (RDW) in natural and experimental cases of canine rangelioidosis is high (Figuera et al., 2010; França et al., 2013). The plasma of these dogs is icteric and, in some cases, clumping of erythrocytes (agglutination) can be seen grossly on the inside wall surface of the blood collection tube (Figuera, 2007; Figuera et al., 2010).

Total leukocyte count in the leukogram of dogs infected with *R. vitalii* can be within normal limits or show leukopenia or leukocytosis, the latter which some times is accompanied by a leukemoid reaction. Leukocytosis in these cases is due to an increase in the number of neutrophils (band cells and metamyelocytes) and lymphocytes (Figuera, 2007; Figuera et al., 2010; França et al., 2010). Atypical and reactive lymphocytes, plasma cells, and activated monocytes are also noted (Figuera et al., 2010; França et al., 2010) (Fig. 5C and D). In an experimental study, inoculated dogs had leukopenia due to neutropenia and eosinopenia, and monocytosis and lymphocytosis as well. In the myelogram of these animals, there

was a decrease in the number of band cells and segmented neutrophils (França et al., 2013).

Mild to moderate thrombocytopenia is present in some cases of canine rangelioidosis. It is believed that thrombocytopenia alone is not the only mechanism responsible for the haemorrhages that are frequently seen in dogs infected with *R. vitalii* (Figuera, 2007). In experimental cases of the disease, there was thrombocytopenia secondary to a defect in platelet aggregation possibly due to a decrease in the release of adenosine diphosphate (ADP) (Paim et al., 2012a). Severe thrombocytopenia was observed in a study about natural cases of canine rangelioidosis (França et al., 2010). Marked thrombocytopenia, presence of macroplatelets in blood smears, an increase in the numbers of megakaryocytes in bone marrow aspirates, and decreased platelet aggregation were noted in the experimental disease. Prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT) were normal in the inoculated dogs and in control dogs as well. Damage to the bone marrow was ruled out as a possible cause of the this thrombocytopenia as there is an increase in the number of megakaryocytes in the bone marrow of these animals. It is suggested that thrombocytopenia in canine rangelioidosis is probably due to one of the following mechanisms, or a combination of these: trapping of platelets in the spleen (splenic sequestration), thrombocytopenia due to increased peripheral consumption of platelets (consumptive thrombocytopenia), immunemediated thrombocytopenia, vasculopathy, and platelet dysfunction (Figuera et al., 2010; Paim et al., 2012a). An experimental study in which dogs were inoculated by the intravenous route with *R. vitalii* showed that hydrolysis of ATP, ADP, and AMP and adenosine deamination was affected. Thrombocytopenia would explain this decrease in enzyme activity, and an increase in enzyme activity in these

experimental cases 21 days post inoculation could be due to a compensatory mechanism. Infection by *R. vitalii* would cause an increase in the extracellular concentrations of adenosine which would inhibit platelet aggregation resulting in haemorrhages (Paim et al., 2012b).

Serum biochemistry does not help much in the diagnosis of canine rangelioidosis but has been included in the panel of ancillary laboratory tests requested in the initial evaluation of the patient, and it would help in the differential diagnosis (Figuera, 2007). Elevated levels of alanine aminotransferase (ALT) are reported in experimental cases of canine rangelioidosis. Anemia would cause an increase in the levels of ALT as tissue hypoxia induces moderate, reversible hepatocellular damage. Despite the fact that jaundice is noted in dogs in experimental studies, gamma-glutamyltransferase (GGT) levels are within normal limits in those icteric animals. Increases in the levels of aspartate aminotransferase (AST) and creatine kinase (CK) are also noted. Blood urea nitrogen and urea and serum creatinine levels (BUN-to-creatinine ratio) are normal in experimental cases of rangelioidosis in dogs (Costa et al., 2012). An increase in serum bilirubin due to extravascular haemolysis is another significant finding in cases of canine rangelioidosis. The urine of these animals can be dark due to the presence of urobilinogen and bilirubin as well (Figuera, 2007). Acetylcholinesterase activity is increased in experimental *R. vitalii* infection in dogs. As acetylcholinesterase is a hydrolase that is found on the membrane of erythrocytes, an increase in its activity could be related to the anemia that these animals develop as a result of *R. vitalii* infection (Da Silva et al., 2013c).

Pathogenetic mechanisms: immune response and oxidative stress

In dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii* there is a progressive increase in the levels of several proinflammatory cytokines including interferon gamma (IFN- γ), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin 1 (IL-1), and interleukin 6 (IL-6), and an increase in the levels of the inflammatory mediator nitric oxide as well (Paim et al., 2013a). These changes are probably the result of an immune response that is mounted by the host against this piroplasm. A decrease in the serum levels of iron and zinc and an increase in the levels of copper are also noted. Low levels of iron and zinc might be involved in the pathogenesis of the anemia and oxidative stress in these animals (Da Silva et al., 2012). In dogs inoculated with *R. vitalii*, there was a concomitant decrease in the concentration of serum total proteins, albumin, α -2 globulin, and β -2 globulin, and an increase in the concentration of α -1 globulin and γ -globulin (Paim et al., 2013b). Increase in the levels of C-reactive protein and α -1-acid glycoprotein acid were also detected in the serum of these animals (Paim et al., 2013b). Increased serum levels of immunoglobulins IgG, IgA, IgM, and IgE (Paim et al., 2013b) and the presence of inflammatory infiltrates composed mostly of plasma cells in multiple tissues (Loretti and Barros, 2005; Figuera et al., 2010) would explain why dogs infected with *R. vitalii* develop a polyclonal gammopathy (hypergammaglobulinemia) (Paim et al., 2013b). Adenosine deaminase (E-ADA) activity varies depending on the stage of the disease suggesting that this enzyme might help the host to mount an immune response against this protozoan parasite (Da Silva et al., 2013a). Based on these findings, it is suggested that in canine rangellosis the immune system is activated by several mechanisms and by a variety of pathways and that humoral immunity and cell-mediated immunity would clear up the infection and protect the dog (Da Silva et al., 2013a; Paim et al., 2013b). Increased levels of thiobarbituric acid reactive

substances (TBARS) and advanced oxidation protein products (AOPP) and an increase in the activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) are findings consistent with oxidative stress which could also be involved in the pathogenesis of *R. vitalii* infection (França et al., 2012).

Pathology

Necropsy findings in natural and experimental cases of rangellosis in dogs include generalized pallor (anemia) or yellow discoloration (jaundice) of the carcass, mucous membranes, and internal organs, watery, thin, bright red blood, an enlarged spleen (Fig. 6) that has a bulging, meaty cut surface, and generalized enlargement of the peripheral and visceral lymph nodes which have a wet, glassy, juicy (edematous), and bulging cut surface which can be diffusely discolored red or dark-brown or have multifocal to coalescing well-defined white foci (Fig. 7). Tonsils are enlarged and discolored red. Stomach and intestines are filled with moderate to large amounts of either unclotted or clotted blood (Fig. 8). Watery bloody feces mat hairs around the anus. The liver is diffusely pale with a pronounced lobular pattern or is diffusely yellow. The gallbladder is markedly distended with thick, inspissated, sludgy bile. Lungs are diffusely wet, heavy, and do not collapse. Areas of haemorrhage of different sizes are seen on mucosal membranes and on a variety of internal organs as well. Femoral bone marrow is pasty or liquefied, vivid red, and fills the entire extent of the medullary cavity indicating active hematopoiesis. There is extensive gelatinous subcutaneous edema of the hindlimbs, presence of yellow, "chicken-fat" clots inside the cardiac chambers (due to the anemia), and presence of moderate amounts of clear, straw-colored fluid (transudate) inside body cavities.

Microscopic findings in natural and experimental cases of canine rangelioidosis consist in the presence of many zoites of *R. vitalii* within the cytoplasm of endothelial cells from blood capillaries of various organs, but more often in lymph nodes, tonsils, bone marrow, choroid plexus, kidneys, lungs, and adrenal medulla (Fig. 2). Inflammation is present in a number of organs, but especially in the kidney, heart, liver, and lymph nodes; it is mild to severe, and the inflammatory infiltrates are composed mostly of plasma cells. In the kidneys, besides the inflammation, there is also acute tubular necrosis in some cases, and accumulation of haemosiderin in the cytoplasm of the renal tubular epithelium. Lymphoreticular hyperplasia is noted in lymph nodes which can be populated not only by large numbers of plasma cells but also by small numbers of Mott cells, haemosiderophages, and Langhans-type multinucleated giant cells that often cuff blood capillaries. There can be erythrophagocytosis in the medullary sinuses of these nodes, too. Extramedullary hematopoiesis—erythropoiesis and megakaryocytopoiesis— can be seen in the spleen and liver. In the liver, there is also centrilobular hepatocellular coagulative necrosis (due to the anemia) and canalicular cholestasis. There is trilineage hyperplasia in the bone marrow – especially erythroid and megakaryocytic – which replaces adipocytes by non neoplastic hematopoietic tissue that displays a high mitotic index, decreased myeloid/erythroid (M:E) ratio with the presence of large numbers of megakaryocytes and megakaryoblasts, and an increase in the number of cells from the monocyte-macrophage and lymphoid lineages. In the lungs, there is abundant homogeneous eosinophilic proteinaceous material into the alveolar spaces (which is interpreted as pulmonary edema). In some cases, blood capillaries from alveolar septa are plugged with several megakaryocytes, and these septa are thickened due to the infiltration by numerous lymphocytes, plasma cells, and macrophages (Krauspenharet al., 2003;

Loretti and Barros, 2005; Figuera et al., 2010). *Rangelia vitalii* is positive in the immunohistochemistry testing for *Babesia microti* and is also positive in the in situ hybridization for *Babesia microti* (Loretti and Barros, 2005). By immunohistochemistry, parasitized and non-parasitized endothelial cells express the endothelial marker von Willebrand factor (vWF) (Loretti and Barros, 2005).

Diagnosis

The diagnosis of canine rangelirosis in a live animal is based on the history, clinical signs, disease course, hemogram, peripheral blood smear evaluation, response to therapy (Loretti and Barros, 2004; Figuera, 2007), and molecular testing (PCR, PCR-RFLP, or qPCR) of blood based on the 18S rRNA gene (Soares et al., 2011; Eiraset al., 2012; Lemos et al., 2012; Paim et al., 2013c). Parasitized erythrocytes tend to be found on the feathered edge of the blood smear. However, in many cases, *R. vitalii* is not found on blood smears. Dual infection with *R. vitalii* and *Babesia* spp. would be possible in geographic areas where these 2 piroplasms coexist (Lemos et al., 2012), and that would pose an additional diagnostic challenge to the clinical pathologist since they have similar morphology. Some retrospective studies about the natural disease state that this piroplasm is found on blood smears in only 4–11.1% of the cases while others say that this parasite is present on blood smears in as much as 71.4% of the cases (Figuera, 2007; Figuera et al., 2010; França et al., 2010). In experimental cases, *R. vitalii* was found on blood smears 5 days post inoculation, and the peak of parasitemia was noted on days 9 and 11 post inoculation. Fine-needle aspiration cytology or histopathology of an incisional or excisional biopsy of a peripheral lymph node or bone marrow would be useful for the

diagnosis of rangellosis in dogs but would pose a risk to the anemic and/or thrombocytopenic patient (Loretti and Barros, 2005; Figuera, 2007).

A definitive diagnosis of canine rangellosis in a live animal should rely on the detection of the organism by PCR in the blood of a dog with a history and clinical signs suggestive of *R. vitalii* infection and in which intraerythrocytic piroplasms with morphological features of *R. vitalii* or *Babesia* spp. are found on Wright-Giemsa stained blood films. The sequence of a fragment of the *R. vitalii* 18S rRNA gene (GenBank accession no. HQ150006) obtained by Soares et al. (2011) has been used as a reference for the molecular identification of this piroplasm in the blood of dogs and in blood and tissue samples (including bone marrow, spleen, liver, lung, lymph node, and carotid artery) of crab-eating foxes by PCR amplification followed by sequencing and bioinformatic phylogenetic analysis (Eiras et al., 2012; Lemos et al., 2012; Soares et al., 2014). In addition, *R. vitalii* 18S rRNA has a different restriction pattern by PCR-RFLP than *Babesia vogeli*, a piroplasm with morphologically similar intraerythrocytic forms that infects dogs in geographic regions where both piroplasms coexist. Thus, this technique has been proposed as a fast and simple molecular diagnostic method when *R. vitalii* infection is suspected (Lemos et al., 2012). Finally, a specific and sensitive quantitative PCR, also based on *R. vitalii* 18S rRNA sequence, has been developed and can be used both for diagnosis and quantification of the parasite load in blood samples (Paim et al., 2013c).

Common diseases among dogs in South America in which clinical signs similar to those of canine rangellosis such as anemia, jaundice, fever, generalized lymphadenopathy, haemorrhages, and splenomegaly are noted should be included in the differential diagnosis of this tick-borne illness. Those include canine babesiosis, canine leptospirosis, canine monocytotropic ehrlichiosis (Loretti and Barros, 2004;

Figuera, 2007; Da Silva et al., 2013b), and canine leishmaniasis. Jaundice is often seen in cases of *Babesia* spp. infection and in cases of *Leptospira* spp. infection in dogs, too, where as animals infected with *Ehrlichia canis* and with *Leishmania* can develop epistaxis (Petanides et al., 2008; Greene, 2012).

Treatment

Treatment of canine rangelirosis is similar to that used in the therapy of other blood-borne protozoan diseases of dogs and is based on the use of antiprotozoal drugs to kill the pathogen and the use of corticosteroids in order to treat the immunemediated haemolytic anemia that is seen in association with *R. vitalii* infection (Loretti and Barros, 2004, 2005; França et al., 2010; Da Silva et al., 2011). Chemotherapeutic agents that have been used to treat cases of canine rangelirosis include diminazene aceturate, imidocarb dipropionate, doxycycline, and trypan blue (Carini and Maciel, 1914b; Loretti and Barros, 2004). Blood transfusion and supportive fluid therapy are necessary in those cases in which the anemia is severe and the condition life-threatening (Loretti and Barros, 2004, 2005; Loretti, 2012). Diminazene aceturate, a diamidine derivative, is a drug deemed risky as it has a low therapeutic index. Neurotoxicosis associated with the use of this antiprotozoal drug in dogs has been reported. The toxicity of diminazene aceturate is cumulative and usually dose-related, but individual variation in susceptibility (idiosyncratic reactions) can occur. A single intramuscular dose of this aromatic diamidine is recommended to clear up the protozoan infection. Repeated injections should be avoided for at least 2 weeks after the first injection. Attention should also be paid to the animal's body weight in order to avoid overdosing and toxicosis (Shaw and Day, 2005). In Brazil, diminazene aceturate is a nonprescription, over-the-counter drug. It is a concern that

toxicosis might occur in such scenario as overzealous owners would buy the drug and medicate their dogs without any previous veterinary consultation. In fatal cases of diminazene aceturate toxicosis in dogs, there is focal symmetrical haemorrhagic encephalomalacia affecting the brainstem and sparing the cerebral cortex (Naudé et al., 1970). Cases of diminazene aceturate toxicosis in dogs have been reported in Brazil (Loretti, 2002; Loretti and Barros, 2005; Ferreira et al., 2007; Brandão et al., 2013) and in other countries as well such as South Africa where the drug is widely used for the treatment of canine babesiosis (Naudé et al., 1970).

Conclusions

A long time ago in 1910 when research tools such as immunohistochemistry, in situ hybridization, electron microscopy, and PCR were not available, and when light microscopes were rudimentary, Pestana suggested that *R. vitalii* was a hitherto unidentified piroplasm (Pestana, 1910a, b). Molecular phylogenetic analyses about this protozoan parasite done during the last couple of years showed that *R. vitalii* is in fact a novel piroplasm as suggested by Pestana over a century ago. More cases of canine rangellosis have been diagnosed lately as there has been an increased awareness of the disease, more papers about the subject have been published, and molecular testing methods have been developed in order to improve diagnostic accuracy (Soares et al., 2011; Eiras et al., 2012; Lemos et al., 2012; Paim et al., 2013c). Since *R. vitalii* has a different life cycle compared to *Babesia* species – *R. vitalii* has a tissue stage in endothelial cells while *Babesia* does not – for now *R. vitalii* has been maintained in a separate genus (*Rangelia*). Intensive research is currently underway in order to try to solve this dilemma.

References

Arzua, M., Navarro Da Silva, M.A., Famadas, K.M., Beati, L., Barros-Battesti, D.M., 2003. *Amblyomma aureolatum* and *Ixodes auritulus* (Acari: Ixodidae) on birds in southern Brazil, with notes on their ecology. *Exp. Appl. Acarol.* 31, 283–296.

Braga, A., 1935. Contribuição ao estudo experimental das piroplasmoses dos cães. *Bol. Vet. Exército.* 3, 1–16.

Brandão, Y.O., Gonçalves, K.A., Moreira Jr., E.A., Gris, V.N., Stedile, S.T.O., Sousa, R.S., 2013. Caso de intoxicação por aceturato de diminazeno em cão. ENAPAVE, Proceedings, Belo Horizonte, BH, Brazil. *Arch. Vet. Sci.* 18 (Suppl. 2), 581–583 (abstract 212).

Carini, A., 1908. Notícias sobre zoonoses observadas no Brasil. *Rev. Méd. São Paulo* 22, 459–465.

Carini, A., Maciel, J., 1914a. Sobre a molestia dos cães, chamada nambi-uvú, e o seu parasita (*Rangelia vitalii*). *An. Paul. Med. Cir.* 3, 65–71.

Carini, A., Maciel, J.J., 1914b. Contribuição ao tratamento do nambyuvú pelo trypanblau. *Rev. Vet. Zootech.* 1, 63–64.

Carini, A., 1948. Sobre o ciclo de desenvolvimento exoeritrocitário de um piroplasmado cão. *Arq. Biol.* 285, 49–52.

Costa, M. M., França, R.T., Da Silva, A. S., Paim, C. B., Paim, F., do Amaral, C. H., Dornelles, G. L., da Cunha, J. P., Soares, J. F., Labruna, M. B., Mazzanti, C. M., Monteiro, S. G., Lopes, S. T., 2012. *Rangelia vitalii*: changes in the enzymes ALT CK and AST during the acute phase of experimental infection in dogs. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 21, 243–248.

Da Silva, A. S., França, R. T., Costa, M. M., Paim, C.B., Paim, F. C., Dornelles, G. L., Soares, J. F., Labruna, M. B., Mazzanti, C. M., Monteiro, S. G., Lopes, S. T., 2011. Experimental infection with *Rangelia vitalii* in dogs: acute phase, parasitemia, biological cycle, clinical–pathological aspects and treatment. Exp. Parasitol. 128, 347–352.

Da Silva, A. S., França, R. T., Costa, M. M., Paim, C. B., Paim, F. C., Santos, C. M., Flores, E. M., Eilers, T. L., Mazzanti, C. M., Monteiro, S. G., do Amaral, C. H., Lopes, S. T., 2012. Influence of *Rangelia vitalii* (Apicomplexa: Piroplasmorida) on copper, iron, and zinc bloodstream levels in experimentally infected dogs. J. Parasitol. 98, 1018–1020.

Da Silva, A. S., França, R. T., Costa, M. M., Paim, F. C., Pimentel, V. C., Schmatz, R., Jaques, J. A., Schetinger, M. R., Mazzanti, C. M., Tonin, A. A., Lopes, S. T., 2013a. Adenosine levels in serum and E-ADA activity in blood cells of dogs infected by *Rangelia vitalii*. J. Parasitol. 99, 1125–1128.

Da Silva, A. S., Martins, D. B., Soares, J. F., França, R. T., 2013b. Canine rangelioidosis: the need for differential diagnosis. Parasitol. Res. 112, 1329–1332.

Da Silva, A. S., França, R. T., Costa, M. M., Paim, C. B., Paim, F. C., Schmatz, R., Jaques, J. A., Schetinger, M. R., Morsch, V. M., Mazzanti, C. M., Lopes, S. T. A., 2013c. Cholinesterase activity in serum, whole blood and lymphocytes of dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. *Acta Sci. Vet.* 41, 1155.

Eiras, D.F., Craviotto, M.B., Baneth, G., Moré, G., 2012. Primer descripción de *Rangelia vitalii* (Protozoa, Piroplasmida) en la especie canina en Argentina. In: XIX Reunión Científico Técnica Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. Proceedings, Buenos Aires, Argentina, pp. 338–339 (abstract P9).

Evans, D. E., Martins, J. R., Guglielmone, A. A., 2000. A review of the ticks (Acari Ixodida) of Brazil, their hosts and geographic distribution–1. The State of Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 95, 453–470.

Ferreira, E. V., Boabaid, F. M., Gasparetto, N. D., Fontana, D. S., Oliveira, P. M., Silva, I. S., Souza, M. A., Nakazato, L., Colodel, E. M., 2007. Achados clínicos e patológicos na intoxicação por diaceturato de diminazeno em dois cães. In: XIII ENAPAVE Proceedings, Campo Grande, MS, Brazil.

Figuera, R. A., 2007. Rangeliose. *Acta Sci. Vet.* 35, 261–263.

Figuera, R. A., Souza, T. M., Kommers, G. D., Irigoyen, L. F., Barros, C. S. L., 2010. Patogênese e achados clínicos, hematológicos e anatomopatológicos da infecção por *Rangelia vitalii* em 35 cães (1985–2009). *Pesq. Vet. Bras.* 30, 974–987.

França, R. T., Da Silva, A. S., Paim, F. C., Costa, M. M., Soares, J. F., Mazzanti, C. M., Lopes, S. T. A., 2010. *Rangelia vitalii* in dogs in southern Brazil. *Comp. Clin. Pathol.* 19, 383–387.

França, R. T., Da Silva, A. S., Costa, M. M., Paim, F. C., Paim, C. B., Thomé, G. R., Wolkmer, P., Pereira, M. E., Schetinger, M. R., Moresco, R. N., Mazzanti, C. M., Monteiro, S. G., Lopes, S. T., 2012. Relationship between oxidative stress and clinical pathological aspects in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. *Res. Vet. Sci.* 93, 1309–1313.

França, R. T., Da Silva, A. S., Costa, M. M., Paim, F. C., Soares, J. F., Labruna, M. B., Mazzanti, C. M., Lopes, S. T., 2013. Hematologic and bone marrow changes in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. *Vet. Clin. Pathol.* 42, 31–39.

Greene, C.E., 2012. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, Fourth ed. Elsevier Saunders, Missouri, pp. 1354.

Guglielmone, A. A., Estrada-Peña, A., Mangold, A. J., Barros-Battesti, D. M., Labruna, M. B., Martins, J. R., Venzal, J. M., Arzua, M., Keirans, J. E., 2003. *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) and *Amblyomma ovale* Kock, 1844 (Acari: Ixodidae): hosts, distribution and 16S rDNA sequences. *Vet. Parasitol.* 113, 273–288.

Krauspenhar, C., Figuera, R. A., Graça, D. L., 2003. Anemia hemolítica em cães associada a protozoários. *Medvop* 1, 273–281.

Labruna, M. B., Jorge, R. S., Sana, D. A., Jácomo, A. T., Kashivakura, C. K., Furtado, M. M., Ferro, C., Perez, S. A., Silveira, L., Santos Jr., T. S., Marques, S. R., Morato, R. G., Nava, A., Adania, C. H., Teixeira, R. H., Gomes, A. A., Conforti, V. A., Azevedo, F. C., Prada, C. S., Silva, J. C., Batista, A. F., Marvulo, M. F., Morato, R. L., Alho, C. J., Pinter, A., Ferreira, P. M., Ferreira, F., Barros-Battesti, D. M., 2005. Ticks (Acari: Ixodida) on wildcarnivores in Brazil. *Exp. Appl. Acarol.* 36, 149–163.

Lemos, T. D., Cerqueira A. de, M., Toma, H. K., Silva, A. V., Corrêa, R. G., Paludo, G. R., Massard, C. L., Almosny, N. R., 2012. Detection and molecular characterization of piroplasm species from naturally infected dogs in southeast Brazil. *Rev. Bras.Parasitol. Vet.* 21, 137–142.

Loretti, A. P., 2002. Focal symmetrical hemorrhagic encephalomalacia associated with diminazene aceturate therapy in a dog. In: III RAPAVE Proceedings, Rosario, Santa Fe, Argentina, p. 54.

Loretti, A. P., Barros, S. S., 2004. Parasitismo por *Rangelia vitalii* em cães (“nambiuvú”, “peste de sangue”)—uma revisão crítica sobre o assunto. *Arq. Inst. Biol., São Paulo* 71, 101–131.

Loretti, A.P., Barros, S.S., 2005. Hemorrhagic disease in dogs infected with an unclassified intraendothelial piroplasm in southern Brazil. *Vet. Parasitol.* 134, 193–213.

Loretti, A.P., 2012. Infecção por *Rangelia vitalii* (rangelirose) em cães. Rev. Cães & Gatos 156, 50–53.

Louly, C. C. B., Fonseca, I. N., Oliveira, V. F., Linhares, G. F.C., Menezes, L. B., Borges, L. M. F., 2007. Seasonal dynamics of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in dogs from a police unit in Goiânia, Goiás, Brazil. Cienc. Rural 37, 464–469.

Martins, J. R., Salomão, E. L., Doyle, R. L., 2006. First record of *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) (Acari: Ixodidae) parasitizing *Alouatta guariba* (Humboldt, 1812) (Primata: Atelidae) in Southern Brazil. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 15, 203–205.

Martins, J. R., Reck Jr., J., Doyle, R. L., da Cruz, N. L., Vieira, A. W., Souza, U. A., 2010. *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae) parasitizing margay (*Leopardus wiedii*) in Rio Grande do Sul. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 19, 189–191.

Moreira, M. V. L., Guimarães, L. B., Silva, J. F., Ocarino, N. M., Serakides, R., Ecco, R., 2013. Infecção por *Rangelia vitalii* em um cão em Minas Gerais. Arch. Vet. Sci. 18 (Suppl.2), 637–639 (ENAPAVE, Belo Horizonte, BH, Brazil, Proceedings, abstract 233).

Müller, G., Brum, J. G. W., Langone, P. Q., Michels, G. H., Pesenti, T. C., 2005. *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae) parasitizing *Didelphis albiventris* (Marsupialia: Didelphidae) in the State of Rio Grande Do Sul, Brazil. Arq. Inst. Biol., São Paulo 72, 115–116.

Naudé, T. W., Basson, P. A., Pienaar, J. G., 1970. Experimental diamidine poisoning due to commonly used babecides. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 37, 173–184.

Ogrzewalska, M., Literak, I., Martins, T. F., Labruna, M. B., 2014. Rickettsial infections in ticks from wild birds in Paraguay. *Ticks Tick Borne Dis.* 5, 83–89.

Paim, C. B., Paim, F. C., Da Silva, A. S., França, R. T., Costa, M. M., Leal, C. A., Soares, J. F., Labruna, M. B., Schetinger, M. R., Mazzanti, A., Mazzanti, C. M., Monteiro, S. G., Lopes, S. T., 2012a. Thrombocytopenia and platelet activity in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. *Vet. Parasitol.* 185, 131–137.

Paim, C. B., Da Silva, A. S., Paim, F. C., França, R. T., Costa, M. M., Souza, V. C., Pimentel, V. C., Jaques, J. A., Mazzanti, C. M., Leal, D. B., Monteiro, S. G., Schetinger, M. R., Lopes, S. T., 2012b. Activities of ectonucleotidases and adenosine deaminase in platelets of dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. *Exp. Parasitol.* 31, 252–257.

Paim, F. C., Da Silva, A. S., Paim, C. B., França, R. T., Costa, M. M., Duarte, M. M., Sangoi, M. B., Moresco, R. N., Monteiro, S. G., Lopes, S. T., 2013a. Increased cytokine and nitric oxide in serum of dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. *Korean J. Parasitol.* 51, 133–137.

Paim, F. C., Da Silva, A. S., Paim, C. B., França, R. T., Costa, M. M., Duarte, M. M., Da Silva, C. B., Mazzanti, C. M., Monteiro, S. G., Lopes, S. T., 2013b. Serum

proteinogram, acute phase proteins and immunoglobulins in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. Vet. Parasitol. 192, 137–142.

Paim, F. C., Santos, A. P., Nascimento, N. C., Oliveira, S. T., Lasta, C. S., Lopes, S. T. A., Messick, J. B., 2013c. Development of a SYBR green quantitative PCR for the detection of *Rangelia vitalii*. In: ASVCP 48th Annual Meeting, Montreal, Canada. Proceedings, vol. 19, (abstract 44).

Paraense, W. L., Vianna, Y. L., 1948. Algumas observações sobre a babesiose dos cães no Rio de Janeiro. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 46, 595–603.

Pestana, B. R., 1910a. O nambyuvú (nota preliminar). Rev. Soc. Científ. São Paulo 5, 14–17.

Pestana, B. R., 1910b. O Nambyuvú. Rev. Méd. São Paulo 22, 423–426.

Petanides, T. A., Koutinas, A. F., Mylonakis, M. E., Day, M. J., Saridomichelakis, M. N., Leontides, L. S., Mischke, R., Diniz, P., Breitschwerdt, E. B., Kritsepi, M., Garipidou, V. A., Koutinas, C. K., Lekkas, S., 2008. Factors associated with the occurrence of epistaxis in natural canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). J. Vet. Intern. Med. 22, 866–872.

Pinter, A., Dias, R. A., Gennari, S. M., Labruna, M. B., 2004. Study of the seasonal dynamics, life cycle, and host specificity of *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae). J. Med. Entomol. 41, 324–332.

Pocai, E. A., Frozza, L., Headley, S. A., Graça, D. L., 1998. Leishmaniose visceral (calazar). Cinco casos em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. Cienc. Rural 28,501–505.

Puntel, L., Kruger, R., Barini, A. C., Pagliosa, G. M., Marchan, P. R. A. C., Oliveira, S., 2011. Rangeliose em cocker spaniel–Relato de caso. Medvep 9, 336–341.

Rezende, H. E. B., 1976. Sobre a validade de *Rangelia vitalii* (Pestana, 1910) hemoparasito de cães no Estado do Rio de Janeiro. In: XV Congresso Brasileiro De Medicina Veterinária, Rio de Janeiro-RJ, Brazil, Proceedings, pp. 159–160.

Rodrigues, D. S., Carvalho, H. A., Fernandes, A. A., Freitas, C. M., Cerqueira, R. C., de Oliveira, P. R., 2002. Biology of *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) (Acari: Ixodidae) on some laboratory hosts in Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97, 853–856.

Sarasúa, L. M., Donati, N. R., 1976. Constatación de babesiosis canina en el Departamento de Artigas (Uruguay). Veterinaria, Uruguay, pp. 137–139.

Shaw, S. E., Day, M. J., 2005. Arthropod-borne Infectious Diseases of the Dog and Cat. Manson Publishing, London, pp. 71–72.

Soares, J. F., Giroto, A., Brandão, P. E., Da Silva, A. S., França, R. T., Lopes, S. T., Labruna, M. B., 2011. Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. Vet. Parasitol. 180, 203–208.

Soares, J. F., Costa, F. B., Soares, H. S., Da Silva, A. S., França, R. T., Miyashiro, S., Lopes, S. T. A., Monteiro, S. G., Hagiwara, M. K., Labruna, M. B., 2012. Caracterização morfológica, molecular, e estudos dos ixodídeos vetores de *Rangelia vitalii*. In: XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. São Luis, MA, Brazil, Proceedings, abstract PPR, p. 087.

Soares, J. F., Giroto, A., Dalmolin, M. L., França, R. T., Hlavac, N. R. C., Moroz, L. R., Alves, C. B. R., Salomão, E. L., Pelissar, M. H. S., Franchini, M. L., Miyashiro, S., Lopes, S. T. A., Lacerda, L. A., Hagiwara, M. K., Labruna, M. B., 2013. Detecção molecular de *Rangelia vitalii* nos Estados de São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. In: IV SIBAC. Bento Gonçalves-RS, Brazil, Proceedings.

Soares, J. F., Dall'Agnol, B., Costa, F. B., Krawczak, F. S., Comerlato, A. T., Rossato, B. C. D., Linck, C. M., Sigahi, E. K. O., Teixeira, R. H. F., Sonne, L., Hagiwara, M. K., Gregori, F., Vieira, M. I. B., Martins, J. R., Reck, J., Labruna, M. B., 2014. Natural infection of the wild canid, *Cerdocyon thous*, with the piroplasmid *Rangelia vitalii* in Brazil. *Vet. Parasitol.* 202, 156–163.

Sykes, J. E., 2013. *Canine and Feline Infectious Diseases*, First ed. Elsevier Saunders, Missouri, pp. 915.

Legends to illustrations:

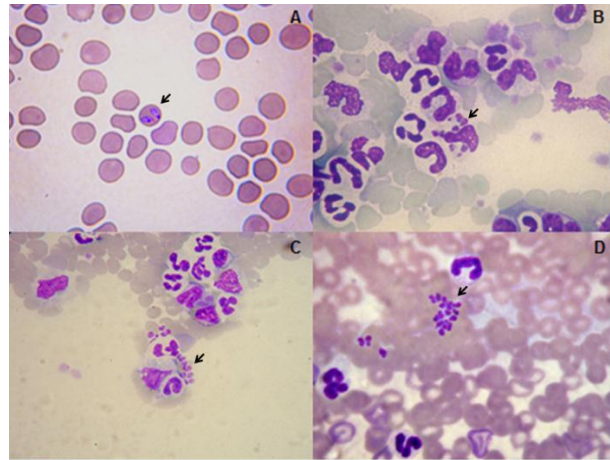


Fig. 1. Natural and experimental cases of *Rangelia vitalii* infection in dogs. Blood smears, rapid Panoptic staining: presence of *R. vitalii* inside erythrocytes (A), inside leukocytes (B), and (C and D) free in the plasma.

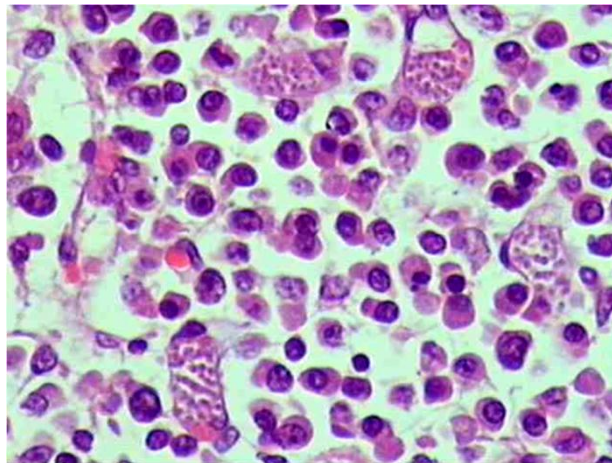


Fig. 2. Natural case of *Rangelia vitalii* infection in a dog, lymph node, histopathology, HE. Presence of large numbers of zites within the cytoplasm of endothelial cells of blood capillaries. Large numbers of plasma cells infiltrate this lymph node.



Fig. 3. *Amblyomma aureolatum*, adult, State of Rio Grande do Sul, southern Brazil.



Fig. 4. Natural cases of *Rangelia vitalii* infection in dogs, clinical signs. (A) Yellow discoloration of the oral mucosa (jaundice); (B) hyphema and epistaxis; (C) petechiae and echymoses scattered throughout the oral mucosa, and mucosal pallor (anemia); (D) severe bleeding on the outer surface of the right pinna and on a venipuncture site on the right forelimb.

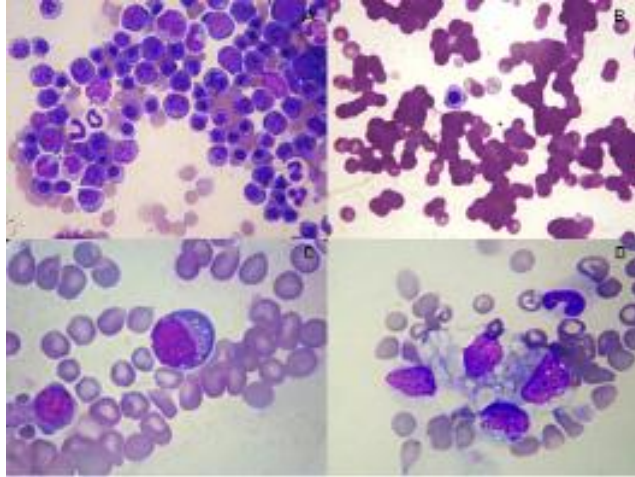


Fig. 5. Natural and experimental cases of *Rangelia vitalii* infection in dogs. Blood smears and bone marrow smears, rapid Panoptic stain: (A) large numbers of erythroid precursors in the bone marrow; erythrocyte agglutination, and presence of metarubricytes (B), plasma cells (C), e activated monocytes (D).

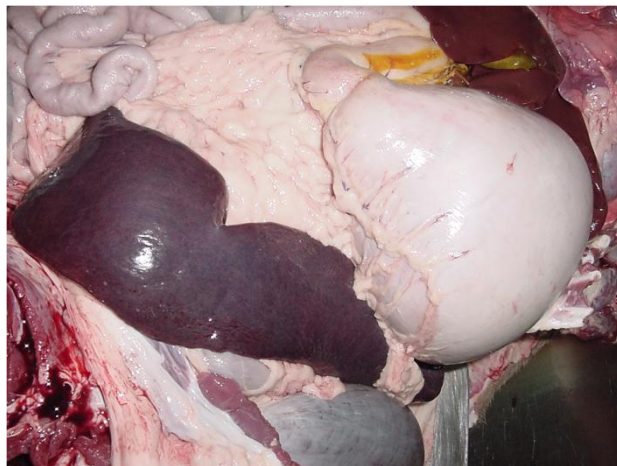


Fig. 6. Natural case of *Rangelia vitalii* infection in a dog, spleen, gross pathology. Massive, diffuse splenomegaly.



Fig. 7. Natural case of *Rangelia vitalii* infection in a dog: lymph node, gross pathology. The cut surface of this lymph node is wet and bulging and has multifocal to coalescing well-demarcated white foci.



Fig. 8. Natural case of *Rangelia vitalii* infection in a dog: small intestine, gross pathology. The intestinal lumen is filled with large amounts of clotted blood.

3. MANUSCRITO I

Aumento de plaquetas reticuladas e detecção de anticorpos IgM e IgG ligados à superfície de plaquetas em cães com rangeliose

Raqueli Teresinha França, Micheli Mainardi Pillat, Cássia Bagolin da Silva, Andressa Salvadori Schafer, Guilherme Lopes Dornelles, Alexander Henning Ulrich, Sonia Terezinha dos Anjos Lopes.

Manuscrito submetido para: *Ciência Rural*

**Aumento de plaquetas reticuladas e detecção de anticorpos IgM e IgG ligados
à superfície de plaquetas em cães com rangelirose**

**Increased reticulated platelets and detection of IgM and IgG antibodies bound
to the surface of platelets in dogs rangelirosis**

Raqueli Teresinha França^{1*}; Micheli Mainardi Pillat²; Andressa Salvadori Schafer¹;
Guilherme Lopes Dornelles¹; Cássia Bagolin da Silva ¹; Alexander Henning Ulrich²;
Sonia Terezinha dos Anjos Lopes¹.

RESUMO

Rangelia vitalii (*R. vitalii*) é um protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, ordem Piroplasmida e a família Babesiidae. Até o momento, o *R. vitalii* foi descrito parasitando canídeos domésticos e selvagens em países da América do Sul. Os principais achados laboratoriais na infecção por *R. vitalii* são anemia e trombocitopenia. O objetivo deste estudo foi investigar a participação de anticorpos IgM e IgG ligados à superfície de plaquetas e avaliar a resposta à trombocitopenia, pela determinação do percentual de plaquetas reticuladas em cães naturalmente infectados com *Rangelia vitalii*. Amostras sanguíneas de vinte cães atendidos na rotina hospitalar foram utilizadas para este estudo, que foram divididos em dois grupos. O grupo infectado composto por 10 animais com rangelirose e o grupo controle foi composto por 10 animais hígidos. A trombocitopenia descrita nos animais com rangelirose foi classificada como de grau moderado a severo. O

¹Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria-RS, Brasil

² Universidade de São Paulo (USP), São Paulo-SP, Brasil

*Raquel T. França, e-mail: raquelifranca@gmail.com

percentual de plaquetas reticuladas foi maior ($p < 0,001$) nos animais infectados quando comparados ao grupo controle. Os animais com rangelirose apresentaram aumento ($p < 0,001$) do anticorpo IgM ligado à superfície das plaquetas em relação aos animais do grupo controle, contudo, a IgG ligada à superfície das plaquetas não diferiu entre os grupos. Em conclusão, neste estudo demonstramos que na rangelirose ocorre ligação de anticorpo IgM na superfície das plaquetas e esta ligação de anticorpos pode afetar tanto a função plaquetária (hemostasia primária), quanto levar essas células a uma destruição precoce. Observou-se também, aumento das plaquetas reticuladas em resposta a trombocitopenia, indicando trombopoiese ativa. Contudo, Não se descarta a possibilidade de estarem ocorrendo outros mecanismos que contribuam para a trombocitopenia severa encontrada na doença.

Palavras-chave: *Rangelia vitalii*, trombocitopenia, imunoglobulinas.

ABSTRACT

Rangelia vitalii (*R. vitalii*) belonging (fellowship) protozoan at the phylum Apicomplexa, order Piroplasmida and, family Babesiidae. *R. vitalii* thus far (until now) described domestic and wild canis parasiting in South American countries. The main laboratory findings included anemia and thrombocytopenia by *R. vitalii* infection. The aims of this study it were investigated of the IgM e IgG antibodies attached to surfaces of the platelets and evaluated thrombocytopenia response, by percentage reticulated platelets determination with natural *R. vitalii* infection in canis. Blood samples of the thenty dogs divided in two groups received at the Veterinary Hospital of the Santa Maria Federal University (HVU) evaluated in this study. The infected *R. vitalii* group composed by 10 animals, and control group composed by healthy 10 animals. The thrombocytopenia described in animal *R. vitalii* infection

and classified as moderated and severe degree. The reticulated platelets percentage in infected animals were increase ($p < 0.001$) when compared the control group. The ***R. vitalii*** infection animals demonstrated IgM antibody attached to surface of the platelets increase ($p < 0.001$) in comparison of the control group, however the IgG antibody attached to the surface of the platelets not showed differences between groups. In conclusion demonstrated in this study that rangelirosis infection present IgM antibody attached to surface of the platelets, and this antibody attachment affected both the platelet function (primary hemostasis) and premature destruction of these cells. Showed also, the reticulated platelets increase in response of the thrombocytopenia, indicated active thrombopoiesis. The possibility of the severe thrombocytopenia in ***R. vitalii*** infection occurring by other mechanisms not this discarded.

Keywords: *Rangelia vitalii*, thrombocytopenia, antibodies.

INTRODUÇÃO

Rangelia vitalii* (*R. vitalii*)** é um protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, ordem Piroplasmida e a família Babesiidae (SOARES et al., 2011). Esse parasito tem como vetor o carrapato ***Amblyomma aureolatum e está associado à uma doença severa, denominada rangelirose (SOARES et al., 2012). Até o momento, o ***R. vitalii*** foi descrito parasitando canídeos domésticos e selvagens em países da América do Sul, como Brasil, Argentina e Uruguai (SOARES et al., 2011; FRANÇA et al., 2014; EIRAS et al., 2014; SOARES et al., 2014; SOARES et al., 2015; QUADROS et al., 2015).

Os sinais clínicos geralmente observados em cães com rangelirose são: apatia, anorexia, emagrecimento, membranas mucosas pálidas e ictericas,

hipertermia, hematoquezia, sangramento pelas orelhas, petéquias, equimoses, hepatomegalia e esplenomegalia (LORETTI e BARROS, 2005; FRANÇA et al., 2010; FIGHERA et al., 2010). Os principais achados laboratoriais na infecção por *R. vitalii* são anemia e trombocitopenia (PAIM et al., 2012a; França et al., 2013). Diferentes mecanismos são propostos para o desenvolvimento da trombocitopenia em animais com rangeliose, porém essa alteração ainda não foi completamente elucidada. O protozoário *R. vitalii* causa trombocitopenia severa, provavelmente relacionada ao sequestro esplênico, consumo de plaquetas ou trombocitopenia imunomediada secundária (FIGHERA et al., 2010; ; FRANÇA et al., 2010; PAIM et al., 2012a).

Trombocitopenia é um achado comum em doenças infecciosas, como as riquetsioses, entretanto, a sua patogênese é mal compreendida. Na erliquiose aguda acredita-se que a trombocitopenia seja imunomediada (WEISS e WARDROP, 2010). Além disso, mecanismos imunológicos também podem contribuir para trombocitopenia observada nas infecções por *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia rickettsii* e *Leishmania infantum* (GRINDEM et al., 1999; CORTESE et al., 2009). A detecção de anticorpos na superfície das plaquetas é um fator importante para a diferenciação das causas de trombocitopenia (WANG et al., 2001). A utilização da citometria de fluxo para detecção de anticorpos na superfície das plaquetas é um teste sensível e específico para o diagnóstico imunológico de trombocitopenia imunomediada (MORLEY et al., 2008). No entanto, na rangeliose ainda não foi investigado o envolvimento de anticorpos na superfície das plaquetas e sua relação com a trombocitopenia.

Plaquetas são pequenos fragmentos do citoplasma de megacariócitos que circulam por, aproximadamente, 5 dias no sangue de cães (WILLARD e TVEDTEN,

2012). A avaliação da morfologia plaquetária é um parâmetro útil para o diagnóstico de várias desordens relacionadas às plaquetas, principalmente nas trombocitopenias (WEISS e WARDROP, 2010). Em relação a uma resposta regenerativa para a trombocitopenia, em casos de rangeliose, os dados são insuficientes e essa avaliação limita-se usualmente à colheita de medula óssea (PAIM et al., 2012a). Semelhante aos reticulócitos, plaquetas jovens de cães contêm RNA residual e sua detecção é possível por citometria de fluxo, utilizando-se corantes que penetram na membrana destas células e interagem com o RNA (KIENAST e SCHMITZ, 1990). Considerando-se que a trombocitopenia observada durante a rangeliose é um fator agravante importante nessa infecção e que existam componentes imunomediados relacionados ao desenvolvimento desta, torna-se relevante a detecção de anticorpos IgM e IgG ligados à superfície de plaquetas e a avaliação da resposta à trombocitopenia, pela determinação do percentual de plaquetas reticuladas em cães naturalmente infectados com *R. vitalii*.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho experimental

Amostras sanguíneas de vinte cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Santa Maria (HVU) foram utilizadas para este estudo. As amostras foram coletadas de animais com idade entre 11 meses e 3 anos, machos e fêmeas de diferentes raças. As amostras obtidas foram divididas em dois grupos, infectado e controle. O grupo infectado foi composto por amostras sanguíneas de 10 cães diagnosticados com rangeliose com base no histórico, sinais clínicos, achados do hemograma e observação do protozoário em esfregaço sanguíneo.

Posteriormente, uma alíquota de sangue foi encaminhada para confirmação da infecção através da reação em cadeia de polimerase (PCR).

O grupo controle foi formado por amostras sanguíneas provenientes de 10 cães clinicamente saudáveis, atendidos no HVU para realização de cirurgia eletiva. Esses animais apresentavam exame físico sem alterações e não receberam nenhuma medicação ou vacina que pudessem alterar os parâmetros hematológicos. Todos os animais foram submetidos à exames como o hemograma completo e o perfil bioquímico (*dados não mostrados*). Assim, as amostras de sangue desses animais foram utilizadas como controle negativo na detecção de imunoglobulinas IgM e IgG ligadas à superfície das plaquetas e na avaliação do percentual de plaquetas reticuladas.

Coleta da amostra

Dois mililitros de sangue foram coletados de cada animal por punção da jugular e acondicionados em tubos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). As amostras foram encaminhadas ao laboratório de análises clínicas veterinárias para realização do plaquetograma, detecção de anticorpos IgM e IgG na superfície das plaquetas e determinação do percentual de plaquetas reticuladas.

Plaquetograma

A contagem de plaquetas foi realizada, utilizando-se contador automatizado. A avaliação da morfologia plaquetária foi realizada em esfregaço sanguíneo corado com Panótico Rápido®, através de microscopia óptica.

Reação em Cadeia de Polimerase - PCR

Uma alíquota de sangue total com EDTA (500 µL) foi utilizada para extração de DNA e posterior realização da PCR direcionada à 550-pares de base do gene 18S rRNA de piroplasmas. Os produtos amplificados foram sequenciados e submetidos à análise de Blast (SOARES et al., 2011). Os animais pertencentes aos dois grupos foram testados para *R. vitalii*, além de outros hemoparasitas que poderiam interferir nas análises, como ***Babesia spp.***, ***Hepatozoon spp.***, ***Ehrlichia spp.*** e ***R. vitalii***.

Percentual de plaquetas reticuladas

Para contagem de plaquetas reticuladas foi utilizada a solução de laranja de tiazol na concentração de 20 ng/mL. Uma alíquota de sangue total com EDTA contendo 1.000.000 de células foi adicionada a 560 µL de solução de laranja de tiazol. Para todas as amostras foi feito um tubo que serviu de controle negativo contendo PBS (Phosphate Buffered Saline; PBS; Ca²⁺, Mg²⁺ -free PBS, pH 7,4) e a mesma quantidade de células. As amostras foram incubadas protegidas da luz por 30 minutos a temperatura ambiente conforme técnica previamente descrita por Wilkerson et al. (2001). Após o período de incubação, a aquisição dos dados foi obtida no citômetro de fluxo BD FACS Diva, sendo adquiridos 30.000 eventos por amostra. A seleção/*gate* da população de plaquetas foi realizada da mesma forma como descrita na subseção “*Deteção de anticorpos na superfície das plaquetas*”. A partir das amostras negativas traçou-se uma região no FL1, onde eventos observados a direita foram considerados positivos para laranja de tiazol. As análises foram realizadas no *software* Flowjo V10.

Detecção de anticorpos na superfície de plaquetas

A detecção de anticorpos na superfície das plaquetas foi determinada em uma alíquota de sangue total com EDTA contendo 1.000.000 de células. As amostras foram lavadas três vezes com PBS contendo 3 mM EDTA e centrifugadas 1.500 g por 5 minutos. Após as lavagens, as células foram incubadas por 30 minutos com anticorpo específico (anti-IgM ou anti-IgG conjugados com FITC, ambos na diluição de 1:50) a temperatura ambiente e protegido da luz. Após o período de incubação, as amostras foram lavadas três vezes com PBS e ressuspendidas em 400 µL desta mesma solução para aquisição dos dados no citômetro de fluxo BD FACS Diva. Foram adquiridos 30.000 eventos por amostra no *gate* das plaquetas, sendo que um *gate* no *dot-plot* do FSC versus SSC foi utilizado para selecionar as plaquetas. *Beads* de 2 µm e amostras incubadas com anticorpo anti-CD61 FITC (1:100; GeneTex) foram utilizadas para auxiliar na seleção da população referente as plaquetas (Figura 1). Cada animal estudado continha sua amostra negativa, que consistiu de células não expostas aos anticorpos, conforme técnica descrita por Cortese et al. (2009). As análises foram realizadas no *software* Flowjo V10.

Análise Estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov), verificando que os mesmos não apresentaram distribuição normal. Assim, os dados foram submetidos ao teste não-paramétrico de Mann-Whitney, para amostras independentes. Os dados foram considerados significativamente diferentes com uma probabilidade (*P*) menor que 5%. O programa GraphPad Prism, versão 5.01, foi utilizado para a realização de todos os testes estatísticos.

RESULTADOS

Avaliação clínica

Rangelia vitalii foi encontrada na microscopia óptica e posteriormente comprovada por PCR em todos os animais com suspeita da infecção. Em ambos os grupos, as amostras foram consideradas negativas para os demais hemoparasitas pesquisados.

Os cães com rangeliase apresentaram apatia (n=10), anorexia (n=10), emagrecimento (n=9), hematoquezia (n=7), diarreia (n=5) e sangramento pelas bordas e face externa das orelhas (n=1). No exame clínico foi evidenciado mucosas pálidas (n=4), hipertermia (n=9) e aumento da frequência cardíaca (n=4).

Contagem de plaquetas

Os animais com rangeliase apresentaram trombocitopenia de grau moderado a severo (Tabela 1) (WILLARD e TVEDTEN, 2012). Durante avaliação da morfologia plaquetária, observou-se moderada presença de macroplaquetas no esfregaço sanguíneo dos cães infectados.

Determinação das plaquetas reticuladas

Nos cães infectados com ***R. vitalii*** foi observado aumento ($p < 0,001$) no percentual de plaquetas reticuladas em relação aos animais do grupo controle (Figura 2).

Detecção de anticorpos na superfície das plaquetas

Os animais com rangeliase apresentaram aumento ($p < 0,001$) no percentual de anticorpo IgM ligado à superfície das plaquetas em relação aos animais do grupo

controle. Já, para o anticorpo IgG ligado à superfície das plaquetas não foi observada diferença estatística entre os grupos (Figura 3).

DISCUSSÃO

A trombocitopenia é a causa mais comum de sangramento em cães, podendo estar associada às doenças infecciosas, como a riquetsiose, erliquiose, babesiose, entre outras (WEISS e WARDROP, 2010). Na maioria dos casos, os animais apresentam trombocitopenia leve, não sendo descritos sinais de hemorragia (WILLARD e TVEDTEN, 2012). No entanto, no presente estudo, cães infectados com *R. vitalii* apresentaram trombocitopenia de grau moderado a severo associada à sinais clínicos como hematoquezia e sangramento pelas bordas e face externa das orelhas. Os demais sinais clínicos observados nos animais infectados estão de acordo com os descritos na literatura (LORETTI e BARROS, 2005; FIGHERA et al., 2010; FRANÇA et al., 2010).

Durante a infecção por *R. vitalii*, frequentemente são encontradas macroplaquetas na avaliação de esfregaços sanguíneos (FRANÇA et al., 2014), como pôde ser observado nos animais do grupo infectado. O aumento no número de macroplaquetas no sangue sugerem uma trombopoiese aumentada, relacionada a resposta regenerativa à trombocitopenia (WEISS e WARDROP, 2010). A avaliação da resposta regenerativa para a trombocitopenia geralmente limita-se a obtenção de amostras de medula óssea e avaliação dos megacariócitos. No entanto, a detecção de plaquetas reticuladas é um método rápido, menos invasivo e útil na avaliação da trombopoiese ativa em cães, cavalos e humanos. Assim, corantes fluorescentes, como o laranja de tiazole, que liga-se ao RNA podem ser utilizados para a

identificação de plaquetas jovens no sangue através da citometria de fluxo (WEISS e TOWNSEND, 1998; WILKERSON et al., 2001).

No presente trabalho, os cães com rangeliose apresentaram aumento significativo ($p < 0,001$) no percentual de plaquetas reticuladas quando comparados à animais hígidos. Esse aumento no percentual de plaquetas reticuladas pode ser observado em pacientes com destruição periférica de plaquetas como um indicativo de resposta regenerativa à trombocitopenia. Porém, cães trombocitopênicos que tenham um comprometimento da trombopoiese podem apresentar diminuição do percentual de plaquetas reticuladas na circulação (WEISS e WARDROP, 2010). Além disso, um estudo realizado em cães com doenças imunomediadas, neoplásicas, hemorrágicas e outras coagulopatias foi constatado que estes apresentaram maior percentual de plaquetas reticuladas em relação aos animais saudáveis (WEISS e TOWNSEND, 1998). Assim, sugere-se que durante a infecção por *R. vitalii* o aumento dessas plaquetas ocorra como parte de uma resposta regenerativa à trombocitopenia.

Em cães infectados com *Babesia gibsoni* não foi evidenciado aumento do percentual de plaquetas reticuladas no momento do pico de ligação de anticorpos às plaquetas. A porcentagem de plaquetas reticuladas aumentou uma semana após o pico de ligação dos anticorpos (WILKERSON et al., 2001). Contrariamente, no presente estudo foi encontrado aumento das plaquetas reticuladas em cães infectados com *R. vitalii*, juntamente com a ligação de IgM na superfície das plaquetas. Esse aumento pode estar relacionado a um consumo aumentado de plaquetas, pois sabe-se que na rangeliose ocorre lesão endotelial devido a multiplicação do protozoário em vacúolos parasitóforos (LORETTI e BARROS, 2005).

A trombocitopenia imunomediada (TIM) secundária é uma das causas de diminuição do número de plaquetas, sendo os agentes infecciosos importantes desencadeadores da produção de anticorpos. Na TIM secundária, a destruição plaquetária é resultante da ligação de complexos imunes aos receptores Fc à antígenos estranhos inespecificamente adsorvidos na superfície das plaquetas ou à novos antígenos que são gerados durante o curso de uma doença infecciosa (WEISS e WARDROP, 2010). A principal classe de anticorpo associado à TIM secundária é a IgG (LEWIS e MEYERS, 1996). Em estudo com cães infectados experimentalmente com *R. vitalii*, foi observado aumento nas imunoglobulinas IgG, IgA, IgM e IgE. Provavelmente, o aumento nesses parâmetros ocorra em resposta à infecção pelo parasito, indiretamente (através da ativação de células) e/ou diretamente (ataque ao parasito) (PAIM et al., 2013).

Diferentes mecanismos são propostos para a patogenia da trombocitopenia em animais com rangeliose, como os mecanismos imunológicos (FIGHERA et al., 2010; PAIM et al., 2012a). Sabe-se que, após a fixação de anticorpos e complemento, as plaquetas revestidas são removidas da circulação por macrófagos do baço e fígado (WEISS e WARDROP, 2010). Cães infectados por *R. vitalii* apresentam trombocitopenia, contudo, neste estudo foi observado unicamente aumento significativo na ligação de IgM à superfície das plaquetas nos cães infectados, enquanto a IgG ligada à superfície das plaquetas não diferiu. A ligação de anticorpos na superfície das plaquetas afeta a função plaquetária, comprometendo a hemostasia primária em cães com leishmaniose (CIARAMELLA et al., 2005).

Os anticorpos reconhecem receptores e glicoproteínas das plaquetas funcionalmente relevantes e que são capazes de interferir na função dessas células.

A diminuição da agregação plaquetária foi descrita em cães com rangeliose (PAIM et al., 2012b) e durante a co-infecção por *Leishmania infantum* e *Ehrlichia canis* (CORTESE et al., 2006). Além disso, na infecção por *Leishmania infantum*, *Ehrlichia canis* e na co-infecção pelos dois agentes ocorre fixação de anticorpos na superfície de plaquetas, principalmente de IgM, estando associados à disfunção plaquetária, uma vez que os animais apresentavam trombocitopenia leve (CORTESE et al., 2011). Em cães com leishmaniose a presença de anticorpos IgM e IgG ligados às plaquetas pôde ser relacionada com o estágio clínico da doença e com a presença de uma baixa contagem de plaquetas (TERRAZZANO et al., 2006). Assim, a ligação de anticorpos na superfície das plaquetas pode comprometer a hemostasia primária, através da diminuição da agregação plaquetária, mas também, pode levar a destruição dessas células pelo sistema fagocítico mononuclear.

Em conclusão, este estudo demonstrou que durante a infecção por *R. vitalii* ocorre ligação de anticorpo IgM na superfície de plaquetas. A ligação desse anticorpo pode afetar tanto a função plaquetária, quanto levar a uma destruição precoce e acelerada dessas células pelo sistema fagocítico. No entanto, não se descarta a possibilidade do envolvimento de outros mecanismos que contribuam para a trombocitopenia severa observada na rangeliose, à exemplo do que ocorre em outras hemoparasitoses, que geralmente descrevem a trombocitopenia como multifatorial. Ainda, conclui-se que em animais infectados por *R. vitalii* ocorre aumento das plaquetas reticuladas em resposta a trombocitopenia indicando trombopoiese ativa.

AGRADECIMENTO

O autor agradece ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico) pelo financiamento de bolsas de estudo e ao Universal - CNPq pelo apoio financeiro.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, protocolo número 039/2012).

REFERÊNCIAS

CIARAMELLA, P. et al. Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Journal**, v.169, p.465-467, 2005.

CORTESE, M. L. et al. Secondary immune-mediated thrombocytopenia in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Record**, v.164, p.778-782, 2009.

CORTESE, L. et al. Prevalence of anti-platelet antibodies in dogs naturally co-infected by *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*. **The Veterinary Journal**, v.188, p.118-121, 2011.

CORTESE, L. et al. Platelet aggregation and haemostatic response in dogs naturally co-infected by *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*. **Journal of Veterinary Medicine**, v.53, p.546–548, 2006.

EIRAS, D. et al. First report of *Rangelia vitalii* infection (canine rangelirosis) in Argentina. **Parasitology International**, v.63, p.729–734, 2014.

FELDMAN, B. F. et al. **Schalm's Veterinary Hematology**, 5th, 2000, p.1344.

FIGHERA, R. A. et al. Patogênese e achados clínicos, hematológicos e anatomopatológicos da infecção por *Rangelia vitalii* em 35 cães (1985-2009). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, p.974-987, 2010.

FRANÇA, R. T. et al. *Rangelia vitalii*, in dog in southern Brazil. **Comparative Clinical Pathology**, v.19, p.383-387, 2010.

FRANÇA, R. T. et al. Hematologic and bone marrow changes in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. **Veterinary Clinical Pathology**, v.42, p.31-39, 2013.

FRANÇA, R. T. et al. Canine rangelirosis due to *Rangelia vitalii*: from first report in Brazil in 1910 to current day - A review. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.5, p.466-474, 2014.

GRINDEM C. B. et al. Platelet-associated immunoglobulin (antiplatelet antibody) in canine Rocky Mountain spotted fever and ehrlichiosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.35, p.56-61, 1999.

KIENAST, J.; SCHMITZ, G. Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets: a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorders. **Blood**, v.75, p.116-121, 1990.

LEWIS, D. C.; MEYERS, K. M. Canine idiopathic thrombocytopenic purpura. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.10, p.207-218, 1996.

LORETTI, A. P.; BARROS, S. S. Hemorrhagic disease in dogs infected with an unclassified intraendothelial piroplasm in southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 134, p.193-213, 2005.

MORLEY, P. et al. Anti-Erythrocyte Antibodies and Disease Associations in Anemic and Nonanemic Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.22, p.886-892, 2008.

PAIM, C. B. V. et al. Thrombocytopenia and platelet activity in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. **Veterinary Parasitology**, v. 185, p.131-137, 2012a.

PAIM, C. B. V. et al. Activities of ectonucleotidases and adenosine deaminase in platelets of dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. **Experimental Parasitology**, v.131, p.252-257, 2012b.

PAIM, F. C. et al. Serum proteinogram, acute phase proteins and immunoglobulins in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. **Veterinary Parasitology**, v.192, p.137-142, 2013.

QUADROS, R. M. et al. Natural Infection of the Wild Canid *Lycalopex gymnocercus* by the Protozoan *Rangelia vitalii*, the Agent of Canine Rangeliosis. **Journal of Wildlife Diseases**, v.51, p. 000–00, 2015.

SOARES, J. F. et al. Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 153-167, 2011.

SOARES, J. F. et al. Caracterização morfológica, molecular, e estudos dos ixodídeos vetores de *Rangelia vitalii*. **XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária**. São Luis, MA, Brazil, 2012.

SOARES, J. F. et al. Natural infection of the wild canid, *Cerdocyon thous*, with the piroplasmid *Rangelia vitalii* in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.202, p.156-163, 2014.

SOARES, J. F. et al. Molecular detection of *Rangelia vitalii* in domestic dogs from Uruguay. **Veterinary Parasitology**, v.210, p.98-101, 2015.

TERRAZZANO et al. Presence of anti-platelet IgM and IgG antibodies in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.110, p.331-337, 2006.

WANG, Z. et al. Detection of red blood cell-bound immunoglobulin G by flow cytometry and its application in the diagnosis of autoimmune haemolytic anemia. **International Journal of Haematology**, v.73, p.188-193, 2001.

WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6th ed. 2010. 1206p.

WEISS, D. J.; TOWNSEND, E. Evaluation of Reticulated Platelets in Dogs. **Comparative Haematology International**, v.8, p.166-170, 1998.

WILKERSON, M. J. et al. Platelet Size, Platelet Surface-Associated IgG, and Reticulated Platelets in Dogs with Immune-Mediated Thrombocytopenia. **Veterinary Clinical Pathology**, v.30, p.141-149, 2001.

WILLARD, M. D.; TVEDTEN, H. **Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods**, 5th. 2012. 432 p.

Tabela 1. Valores de contagem de plaquetas em cães naturalmente infectados com *Rangelia vitalii*.

Cão	Contagem de plaquetas (μL)
1	44.000
2	9.000
3	28.000
4	24.000
5	12.000
6	105.000
7	43.000
8	40.000
9	18.000
10	18.000
*Valores de referência	200.000 – 500.000

*FELDMAN, et al. (2000).

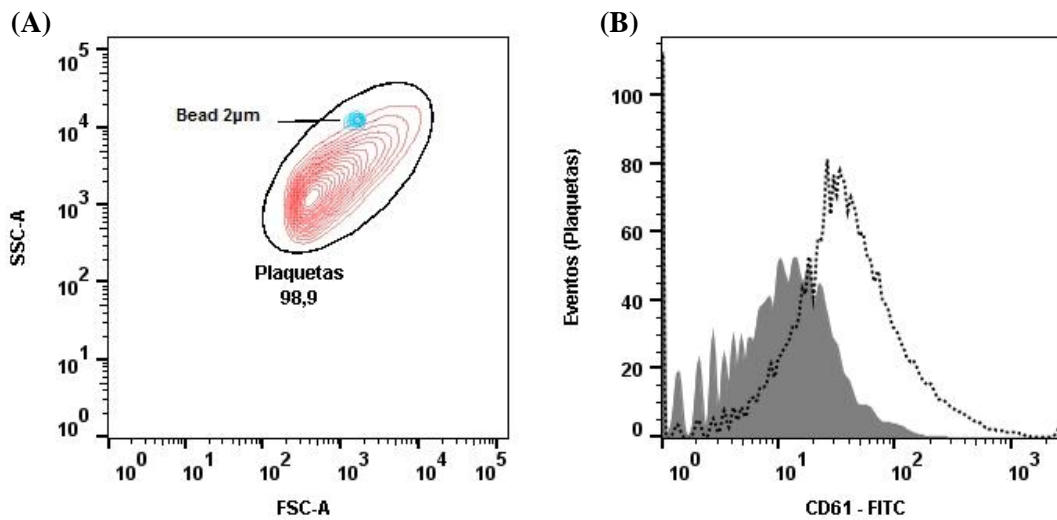


Figura 1. Esquema utilizado para identificar a população de plaquetas. *Dot-plot* de SSC (side scatter; granulidade) versus FSC (forward scatter; tamanho celular) demonstrando a população de plaquetas em vermelho e as *beads* de 2 µm em azul (A). Histograma demonstrando a intensidade de fluorescência no canal de detecção FL1 de uma amostra incubada com anticorpo anti-CD61 (marcador de plaquetas) conjugado com o fluoróforo FITC (linha tracejada), e de uma amostra negativa, não exposta ao anticorpo (cor cinza) (B). As análises foram realizadas no *software* Flowjo V10.

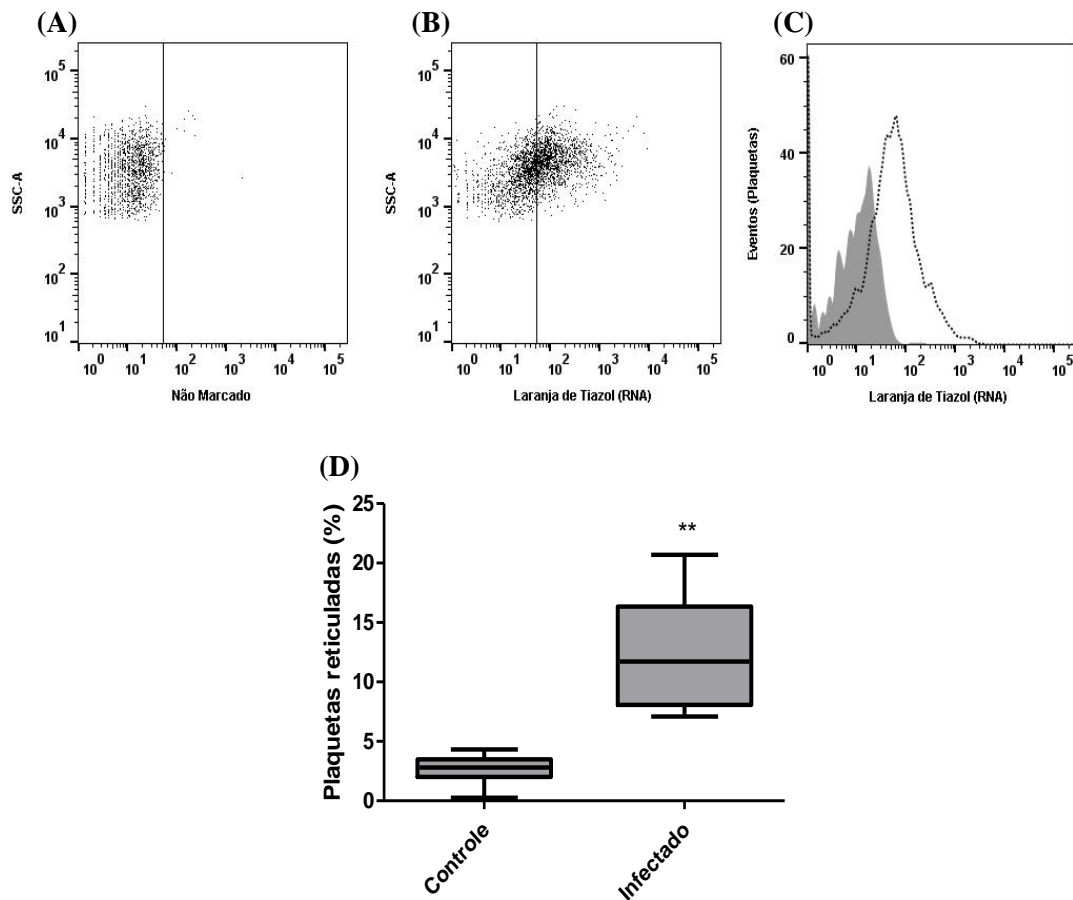


Figura 2. Gráficos em *dot plots* exemplificando *gate* na população de plaquetas não marcado (A) e amostra marcada com laranja de tiazol (RNA) (B). Intensidade de fluorescência representada por histograma, fluorescência negativa (cor cinza) e fluorescência positiva com ligação do laranja de tiazol ao RNA das plaquetas reticuladas (linha tracejada) (C). As análises foram realizadas no *software* Flowjo V10. Gráfico em *boxplot* apresentando mediana e desvio padrão do percentual de plaquetas reticuladas em cães controle e infectados naturalmente com *R. vitalii* (teste de Mann-Whitney – ** $p < 0,001$).

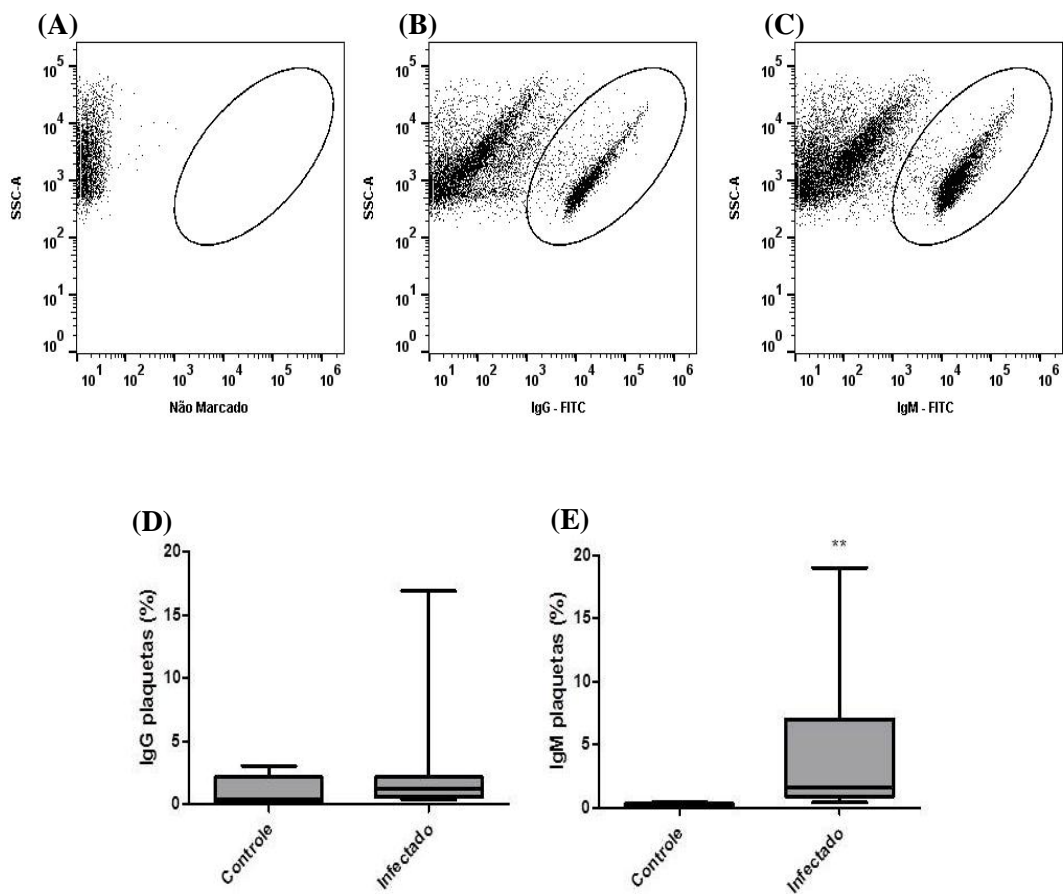


Figura 3. Gráficos em *dot plots* exemplificando *gate* na população de plaquetas não marcado (A), plaquetas marcadas com IgG (B) e IgM (C) em um cão com rangelirose. As análises foram realizadas no *software* Flowjo V10. Gráficos em *boxplot* apresentando mediana e desvio padrão de IgG (D) e IgM (E) em plaquetas de cães controle e naturalmente infectados com *R. vitalii* (teste de Mann-Whitney – ** $p < 0,001$).

4. MANUSCRITO II

Anticorpos IgM e IgG na superfície de eritrócitos e resposta a anemia em cães naturalmente infectados por *Rangelia vitalii*

Raqueli Teresinha França, Micheli Mainardi Pillat, Cássia Bagolin da Silva, Andressa Salvadori Schafer, Guilherme Lopes Dornelles, Alexander Henning Ulrich, Sonia Terezinha dos Anjos Lopes.

Manuscrito submetido para: *Ciência Rural*

Anticorpos IgM e IgG na superfície de eritrócitos e resposta a anemia em cães naturalmente infectados por *Rangelia vitalii*

IgM and IgG antibodies at the surface of erythrocytes and response to anemia in dogs naturally infected *Rangelia vitalii*

Raqueli Teresinha França^{1*}; Micheli Mainardi Pillat²; Cássia Bagolin da Silva¹; Andressa Salvadori Schafer¹; Guilherme Lopes Dornelles¹; Alexander Henning Ulrich²; Sonia Terezinha dos Anjos Lopes¹.

RESUMO

A rangeliose é uma doença severa que afeta cães e é causada por um protozoário denominado *Rangelia vitalii*, sendo um dos principais achados laboratoriais a anemia. Sabe-se que em outras doenças causadas por hemoparasitas ocorre anemia mediada pela produção de anticorpos. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a ligação de anticorpos IgM e IgG na superfície de eritrócitos e avaliar a resposta à anemia pela determinação do percentual de reticulócitos em cães naturalmente infectados com *Rangelia vitalii*. Neste estudo, foram utilizadas vinte amostras sanguíneas de cães atendidos na rotina hospitalar. As amostras foram divididas em dois grupos, grupo controle e grupo infectado. O grupo infectado foi composto por amostras de sangue de 10 animais com rangeliose e como grupo controle foram utilizadas amostras sanguíneas de 10 animais clinicamente saudáveis. Os animais com rangeliose apresentaram anemia

¹Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria-RS, Brasil

² Universidade de São Paulo (USP), São Paulo-SP, Brasil

*Raqueli T. França, e-mail: raquelifranca@gmail.com

normocítica normocrômica. Não foi observada diferença significativa no percentual de reticulócitos e nem para os anticorpos IgM e IgG ligados à superfície dos eritrócitos entre os animais do grupo controle e infectado. Assim, através da avaliação dos resultados apresentados neste estudo, sugere-se que os anticorpos IgG e IgM não estão envolvidos na patogênese da anemia hemolítica durante a fase inicial da infecção por *R. vitalii*. Também, não foi possível observar uma resposta regenerativa à anemia nos cães com rangeliose, o que poderia corroborar o fato da infecção estar em sua fase inicial. Futuros estudos devem ser desenvolvidos a fim de investigar a participação de outros mecanismos envolvidos no desenvolvimento da anemia, além de investigar esses mecanismos em diferentes fases da infecção por *R. vitalii*.

Palavras-chave: *Rangelia vitalii*, anemia, anticorpos.

ABSTRACT

Rangeliosis is a severe disease that affect dogs and is caused by a protozoan named *Rangelia vitalii*, the main laboratory findings of disease are anemia and thrombocytopenia. It is known that in other diseases caused by hemoparasites anemia occurs mediated by antibodies. Thus, the aim of this study was to evaluate the binding IgM and IgG antibodies on the surface of red blood cells and assess response to anemia by determining the reticulocyte percentage in dogs naturally infected with *Rangelia vitalii*. In this study, we used twenty blood samples from dogs treated at the University Veterinary Hospital (HVU) of the Federal University of Santa Maria. The samples were divided into two groups, control group and infected group. The infected group was composed of blood samples from 10 animals with rangeliosis and as a control group blood samples from 10 clinically healthy animals were used.

There was no significant difference in the percentage of reticulocytes and not for IgM and IgG antibodies attached to the surface of red blood cells in the animals of control and infected group. Thus, by evaluating the results of this study it is suggested that the IgG and IgM antibodies are not involved in pathogenesis of the hemolytic anemia during the initial phase of infection by *R. vitalii*. Also, was not possible to observe regenerative response to anemia in dogs with rangellosis, which could corroborate the infection is in early stages. Future studies are needed to investigate the participation of other mechanisms involved in the development of anemia, and to investigate these mechanisms at different stages of infection by *R. vitalii*.

Keywords: *Rangelia vitalii*, anemia, antibodies.

INTRODUÇÃO

A rangeliose é uma doença severa que afeta cães e é causada por um protozoário denominado *Rangelia vitalii* (*R. vitalii*) (SOARES et al., 2011). Os principais achados laboratoriais da doença cursam com anemia e trombocitopenia (FIGHERA et al., 2010; FRANÇA et al., 2014). O protozoário *R. vitalii* foi descrito parasitando canídeos domésticos e selvagens em países da América do Sul, como Brasil, Argentina e Uruguai (FIGHERA et al., 2010; SOARES et al., 2011; EIRAS et al., 2014; SOARES et al., 2014; FRANÇA et al., 2014; SOARES et al., 2015; QUADROS et al., 2015). Os sinais clínicos mais frequentes apresentados pelos animais infectados são apatia, anorexia, emagrecimento, membranas mucosas pálidas e ictéricas, hipertermia, hematoquezia, sangramento pelas orelhas, petéquias, equimoses, hepatomegalia e esplenomegalia (LORETTI e BARROS, 2005; FRANÇA et al., 2010; FIGHERA et al., 2010).

Diferentes mecanismos são propostos para a patogenia da anemia em animais com rangelirose, porém esta ainda não foi completamente esclarecida. A anemia em cães com rangelirose é do tipo regenerativa (FIGHERA et al., 2010; FRANÇA et al., 2013). Fighera et al. (2010) citam que cães infectados com *R. vitalii* desenvolvem anemia hemolítica, exclusivamente de origem extravascular e mediada imunologicamente. No entanto, na infecção experimental por *R. vitalii*, a hemólise também pode ser intravascular devido ao desenvolvimento intraeritrocitário do protozoário (DA SILVA et al., 2011). O estresse oxidativo é outro mecanismo que pode contribuir para o desenvolvimento da anemia observada em cães com a doença (FRANÇA et al., 2012).

A anemia hemolítica imunomediada (AHIM) secundária ocorre quando há uma razão subjacente para a ligação de imunoglobulinas aos eritrócitos. Esse tipo de anemia pode ocorrer como um fenômeno secundário na doença neoplásica, ou quando anticorpos possuem especificidade para agentes infecciosos ou drogas que estão associados à superfície dos eritrócitos (STOCKHAM e SCOTT, 2011). A AHIM foi descrita em doenças causadas por hemoparasitas como babesiose, erlichiose, leishmaniose, riquetsioses e, possivelmente, anaplasmoses e bartonelose (WEISS e WARDROP, 2010). A detecção de anticorpos na superfície dos eritrócitos é importante para a diferenciação das causas da anemia (WANG et al., 2001).

Na resposta imunológica contra agentes infecciosos ocorre uma grande produção de anticorpos. Os anticorpos ou imunoglobulinas são glicoproteínas produzidas por linfócitos B em resposta à estimulação antigênica (BUSH, 2004). As imunoglobulinas secretadas realizam várias funções efetoras, como neutralização de antígenos, ativação de complemento, fagocitose e destruição de microorganismos e são classificadas em diferentes isotipos e subtipos (ABBAS et al., 2012). Os cães

possuem quatro subclasses de IgG denominadas IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, em ordem de abundância, além de IgA, IgM e IgE. O principal isotipo de imunoglobulina no sangue e nos fluidos extracelulares é a IgG, que exerce papel principal nos mecanismos de defesa mediado por anticorpos (TIZARD, 2008). A IgG também atua na neutralização de toxinas, imobilização de bactérias, sensibilização para células *natural killer* (NK), ativação do complemento e opsonização. A IgM é a principal classe de imunoglobulina produzida durante uma resposta imune primária, é capaz de ativar o complemento de maneira mais eficaz, o que contribui para o controle mais eficiente de uma infecção (PEDERSEN, 1999).

Divergência em relação aos achados laboratoriais tem sido descritos em cães infectados naturalmente por *R. vitalii*. No entanto, acredita-se que a anemia observada durante a rangeliose envolva componentes imunomediados relacionados ao desenvolvimento da doença. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a presença de anticorpos IgM e IgG ligados à superfície de eritrócitos e a avaliação da resposta à anemia pela determinação de reticulócitos em cães naturalmente infectados por *R. vitalii*.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho experimental

Neste estudo foram utilizadas vinte amostras sanguíneas de cães atendidos no Hospital Veterinário Universitário (HVU) da Universidade Federal de Santa Maria. Esses animais tinham idade entre 11 meses e 3 anos, machos e fêmeas de raças variadas. As amostras foram divididas em dois grupos, grupo controle e grupo infectado. O grupo infectado foi composto por amostras de sangue de 10 animais

com rangelióse que foram confirmados como positivos para a infecção por meio da reação em cadeia de polimerase (PCR). Como grupo controle foram utilizadas amostras sanguíneas de 10 animais clinicamente saudáveis, que foram atendidos no HVU para realização de cirurgia eletiva. Esses cães não apresentavam alterações no exame físico e não tinham histórico de vacinação recente ou uso de medicação. Em todos os animais foram realizados hemograma completo e perfil bioquímico (*dados não mostrados*). As amostras de sangue desses animais foram utilizadas como controle negativo para avaliar a detecção de imunoglobulinas IgM e IgG ligadas á superfície de eritrócitos e o percentual de reticulócitos.

Coleta de amostras

Dois mililitros de sangue foram coletados de cada animal por punção da jugular e acondicionadas em tubos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). As amostras foram encaminhados ao laboratório para realização do eritrograma, detecção de anticorpos IgM e IgG ligados à superfície dos eritrócitos e determinação do percentual de reticulócitos.

Eritrograma

A contagem de eritrócitos e a concentração de hemoglobina foram determinados utilizando-se contador automatizado. A determinação do hematócrito foi obtida em centrífuga de micro-hematócrito na rotação de 19.720 g por 5 minutos. O volume corpuscular médio (VCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinados por cálculos indiretos. A avaliação morfológica dos eritrócitos foi realizada em esfregaço sanguíneo corado com Panótico Rápido®, utilizando-se microscopia óptica.

Reação em cadeia de polimerase - PCR

Sangue total com EDTA (500 µL) foi utilizado para extração de DNA e posterior PCR direcionada a 550-pares de base do gene 18S rRNA de piroplasmas. Os produtos amplificados foram sequenciados e submetidos à análise de Blast (Soares et al., 2011). Os animais pertencentes aos dois grupos foram testados também para outros hemoparasitas que poderiam interferir nas análises como ***Babesia spp***, ***Hepatozoon spp***, ***Ehrlichia spp*** e ***R. vitalii***.

Detecção de anticorpos na superfície de eritrócitos

Um mililitro de sangue total foi centrifugado a 1.500 g por 5 minutos para obtenção da fração de eritrócitos livre de plasma. Após a remoção das proteínas do plasma, 100 µL de eritrócitos foi adicionado a 4 mL de solução salina fosfato tamponada (*Phosphate Buffered Saline*; PBS; Ca²⁺, Mg²⁺ -free PBS, pH 7,4). Os eritrócitos foram lavados três vezes com PBS para remover quaisquer proteínas plasmáticas restante. Após a última centrifugação o *pellet* foi ressuspensionado em 5 mL de PBS. Alíquotas contendo 1.000.000 de células foram incubadas com os anticorpos específicos (anti-IgM ou anti-IgG conjugados com o fluoróforo FITC; Bethyl Laboratories, Inc.) na diluição de 1:50 a 4 °C por 45 minutos. Após o período de incubação, as amostras foram lavadas três vezes com PBS e ressuspensionadas em 300 µL de PBS conforme técnica descrita por Wilkerson et al. (2000). A aquisição dos dados foi feita no citômetro de fluxo BD FACS Diva (BD Bioscience), sendo adquiridos 30.000 eventos por amostra.

Um *gate* no *dot-plot* do canal de dispersão frontal (FS – *forward scatter*) versus o canal de dispersão lateral (SS – *side scatter*) foi utilizado para selecionar os

eritrócitos. *Beads* de 7,3 μm foram utilizadas para confirmação da localização do *gate* (Figura 1). Cada animal estudado continha sua amostra negativa, que consistia de células não expostas aos anticorpos. A partir das amostras negativas, traçou-se uma região no detector de fluorescência 1 (FL1 - FITC), onde eventos observados a direita foram considerados positivos. As análises foram realizadas no *software* Flowjo V10.

Determinação do percentual de reticulócitos

Para a determinação do percentual de reticulócitos foi utilizada uma solução de laranja de tiazol na concentração de 100 ng/mL. Uma alíquota de 5 μL de sangue total com EDTA foi adicionada a um mililitro de solução de laranja de tiazol. Para todas as amostras foram feitos, também, tubos que serviram como controle negativo, nos quais foram adicionados 5 μL de sangue total com EDTA à um mililitro de PBS. As amostras foram incubadas protegidas da luz e a temperatura ambiente por 1 hora conforme descrito por Lee et al. (1986). Após o período de incubação, a aquisição dos dados foi realizada em citômetro de fluxo BD FACS Diva, sendo adquiridos 30.000 eventos por amostra. A seleção/*gate* da população de hemácias foi realizada da mesma forma descrita na subseção “*Deteção de anticorpos na superfície de eritrócitos*”. A partir das amostras negativas traçou-se uma região no FL1, onde eventos observados a direita foram considerados positivos para laranja de tiazol. As análises foram realizadas no *software* Flowjo V10.

Análise Estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov), verificando-se que os mesmos não apresentavam distribuição normal. Assim, os

dados foram submetidos ao teste não-paramétrico de Mann-Whitney, para amostras independentes. Os dados foram considerados significativamente diferentes com uma probabilidade (P) menor que 5%. O programa GraphPad Prism, versão 5.01, foi utilizado para a realização de todos os testes estatísticos.

RESULTADOS

Avaliação clínica

Os sinais clínicos observados nos cães com rangeliose foram apatia (n=10), anorexia (n=10), emagrecimento (n=9), hematoquezia (n=7), diarreia (n=5) e sangramento pelas bordas e face externa das orelhas (n=1). No exame clínico foi evidenciado mucosas pálidas (n=4), hipertermia (n=10) e aumento da frequência cardíaca (n=4).

Eritrograma

Os eritrogramas dos animais infectados com *R. vitalii* apresentaram redução do número de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina. Os valores do volume corpuscular médio (VCM) e da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) mantiveram-se dentro do intervalo de referência para a espécie (Tabela 1), caracterizando a anemia como sendo do tipo normocítica normocrômica. Alterações morfológicas, como discreta anisocitose, policromasia, presença de corpúsculo de Howell-Jolly e metarrubricitos, foram observadas nos animais com rangeliose.

Determinação do percentual de reticulócitos

Neste estudo não foi observada diferença significativa no percentual de reticulócitos entre os animais do grupo controle e infectado (Figura 2).

Detecção de anticorpos na superfície de eritrócitos

Os animais com rangeliose não apresentaram diferença para anticorpo IgM e IgG ligados à superfície dos eritrócitos quando comparados ao grupo controle (Figura 3).

DISCUSSÃO

Os sinais clínicos observados neste estudo são semelhantes aos descritos na literatura em animais com rangeliose (Loretti e Barros, 2005; Fighera et al., 2010; França et al., 2010). Os animais doentes apresentaram anemia normocítica normocrômica. Embora, os sinais de regeneração eritroide estivessem presentes, esses não foram suficientes para alterar o VCM e CHCM. A anemia observada em cães com rangeliose é variável, podendo ser macrocítica hipocrômica, normocítica normocrômica e macrocítica normocrômica (FIGHERA et al., 2010; FRANÇA et al., 2010).

A anemia observada nos cães deste estudo pôde ser classificada como de grau leve a moderado (WILLARD e TVEDTEN, 2012). A classificação da anemia como normocítica normocrômica e a ausência de reticulocitose nos animais infectados provavelmente deve-se ao tempo insuficiente para resposta adequada da medula óssea. Em estudo experimental com animais infectados por *R. vitalii* a reticulocitose só foi observada no dia 20 pós-inoculação (FRANÇA et al., 2013), sendo que no presente estudo não foi possível determinar o tempo de infecção por se tratar de uma ocorrência espontânea.

Não foi observada diferença entre os grupos controle e infectado em relação à ligação de IgG e IgM na superfície dos eritrócitos, embora a anemia em alguns

casos de rangeliose seja compatível com anemia hemolítica extravascular imunomediada, caracterizada pelos achados de esferócitos, aglutinação de eritrócitos e sinais de regeneração (FIGHERA et al., 2010; FRANÇA et al., 2014). Assim, é provável que outros mecanismos, como lise direta dos eritrócitos por meio da replicação intracelular dos parasitas ou aumento da atividade eritrofagocítica dos macrófagos, estejam relacionados ao desenvolvimento da anemia em animais com rangeliose (MURASE et al., 1996; DA SILVA et al., 2011). Em um estudo prévio foi demonstrado que o estresse oxidativo pode contribuir para o desenvolvimento da anemia observada em cães infectados com *R. vitalii* (França et al., 2012). Na infecção por *Babesia canis canis* e *Babesia canis vogeli*, Carli et al. (2009) evidenciaram que animais infectados por *Babesia canis canis* não apresentavam anticorpos ligados à membrana dos eritrócitos, diferindo dos achados encontrados na infecção por *Babesia canis vogeli*, que demonstraram anticorpos IgG e IgM ligados à membrana dos eritrócitos. Com isso, pode-se sugerir que a infecção por *R. vitalii* comporta-se de forma semelhante a infecção por *Babesia canis canis*.

A anemia hemolítica imunomediada (AHIM) ocorre quando a destruição de eritrócitos ou precursores eritroides da medula óssea é mediada pelo mecanismo de hipersensibilidade tipo II (WEISS e WARDROP, 2010). A reação de hipersensibilidade é caracterizada pela fixação de anticorpos na superfície da célula, receptores celulares, membranas basais, lâmina basal, ou substâncias intracelulares (PEDERSEN, 1999; ZACHARY e MCGAVIN, 2013). A AHIM foi descrita em doenças causadas por hemoparasitas (WEISS e WARDROP, 2010), porém anticorpos IgG e IgM não foram observados ligados à superfície dos eritrócitos de cães infectados por *R. vitalii*. No entanto, acredita-se que os animais avaliados no presente estudo encontravam-se na fase inicial da doença. Assim, é possível que com o decorrer do

tempo de infecção e agravamento do quadro clínico, em que a anemia seria mais severa, anticorpos IgG e IgM poderiam ser detectados na superfície dos eritrócitos de animais com rangeliose, uma vez que a presença crônica de hemoparasitas pode inicialmente criar danos aos eritrócitos e, com o tempo, expor antígenos eritrocitários internos que levam à produção de anticorpos anti-eritrócito específicos. Além disso, a presença crônica do protozoário pode conduzir à produção de reação cruzada de anticorpos, ligação de anticorpos produzidos contra o agente infeccioso ligado à membrana do eritrócito, ou indução de complexos imunes que aderem à membrana do eritrócito (STOCKHAM e SCOTT, 2008; CARLI, et al., 2009).

Assim, através da avaliação dos resultados apresentados neste estudo, sugere-se que os anticorpos IgG e IgM não estão envolvidos na patogênese da anemia hemolítica durante a fase inicial da infecção por *R. vitalii*. Não foi possível observar uma resposta regenerativa à anemia nos cães com rangeliose, o que poderia corroborar o fato da infecção estar em sua fase inicial. Futuros estudos devem ser desenvolvidos a fim de investigar a participação de outros mecanismos relacionados no desenvolvimento da anemia, além de investigar esses mecanismos em diferentes fases da infecção por *R. vitalii*.

AGRADECIMENTO

O autor agradece ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico) pelo financiamento de bolsas de estudo e ao Universal - CNPq pelo apoio financeiro.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, protocolo número 039/2012).

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K; LICHTMAN, A. H; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**, 7 ed. Philadelphia: Elsevier, 2012. 545p.

BUSH, B. M. **Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais**, 1 ed. São Paulo: Roca, 2004. 384 p.

CARLI, E. et al. Detection of erythrocyte binding IgM and IgG by flow cytometry in sick dogs with *Babesia canis canis* or *Babesia canis vogeli* infection. **Veterinary Parasitology**,v.162 p.51-57, 2009.

DA SILVA, A. S. et al. Experimental infection with *Rangelia vitalii* in dogs: acute phase, parasitemia, biological cycle, clinical-pathological aspects and treatment. **Experimental Parasitology**, v.128, p.347-352, 2011.

EIRAS, D. et al. First report of *Rangelia vitalii* infection (canine rangellosis) in Argentina. **Parasitology International**,v.63, p.729-734, 2014.

FELDMAN, B. F. et al. **Schalm's Veterinary Hematology**, 5th, 2000, p.1344.

FIGHERA, R. A. et al. Patogênese e achados clínicos, hematológicos e anatomopatológicos da infecção por *Rangelia vitalii* em 35 cães (1985-2009).

Pesquisa Veterinária Brasileira, v.30, p.974-987, 2010.

FRANÇA, R. T. et al. *Rangelia vitalii*, in dog in southern Brazil. **Comparative Clinical Pathology**, v.19, p.383-387, 2010.

FRANÇA, R. T. et al. Hematologic and bone marrow changes in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. **Veterinary Clinical Pathology**, v.42, p.31-39, 2013.

FRANÇA, R. T. et al. Relationship between oxidative stress and clinical–pathological aspects in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. **Research in Veterinary Science**, v.93, p.1309-1313, 2012.

FRANÇA, R. T. et al. Canine rangellosis due to *Rangelia vitalii*: from first report in Brazil in 1910 to current day - A review. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.5, p.466-474, 2014.

LORETTI, A. P.; BARROS, S. S. Hemorrhagic disease in dogs infected with an unclassified intraendothelial piroplasm in southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 134, p.193-213, 2005.

LEE, L. G.; CHEN, C.; CHIU, L. A. Thiazole Orange: A New Dye for Reticulocyte Analysis. **Cytometry**, v.7, p.508-517, 1986.

MURASE, T., UEDA, T., YAMATO, O., TAJIMA, M., MAEDE, Y. Oxidative damage and enhanced erythrophagocytosis in canine erythrocytes infected with *Babesia gibsoni*. **Journal of Veterinary Medical Science**. v.58, p.259-261, 1996.

PEDERSEN, N. C. A review of immunologic diseases of the dog. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.69, p.251-342, 1999.

QUADROS, R. M. et al. Natural Infection of the Wild Canid *Lycalopex gymnocercus* by the Protozoan *Rangelia vitalii*, the Agent of Canine Rangeliosis. **Journal of Wildlife Diseases**, v.51, p.000–00, 2015.

SOARES, J. F. et al. Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.180, p.153-167, 2011.

SOARES, J. F. et al. Natural infection of the wild canid, *Cerdocyon thous*, with the piroplasmid *Rangelia vitalii* in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.202, p.156-163, 2014.

SOARES, J. F. et al. Molecular detection of *Rangelia vitalii* in domestic dogs from Uruguay. **Veterinary Parasitology**, v.210, p.98-101, 2015.

STOCKHAM, S.L., SCOTT, M.A., Platelets. **Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology**. Blackwell Publishing Professional, Ames, p. 239. 2008.

TIZARD, I. R. **Veterinary Immunology: An Introduction**. 8a ed. Philadelphia: Elsevier (Saunders), 2008. 147p.

WANG, Z. et al. Detection of red blood cell-bound immunoglobulin G by flow cytometry and its application in the diagnosis of autoimmune haemolytic anemia. **International Journal of Haematology**, v.73, p.188-193, 2001.

WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6th ed. 2010. 1206p.

WILKERSON M. J. et al. Isotype-specific antibodies in horses and dogs with immune-mediated hemolytic anemia. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.14, p.190-196, 2000.

WILLARD, M. D.; TVEDTEN, H. **Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods**. 5th ed. 2012. 418p.

ZACHARY, J. F.; MCGAVIN, M. D. **Bases da Patologia em Veterinária**. 5^a ed. 2013. 1324p.

Tabela 1. Eritrograma de cães naturalmente infectados com *Rangelia vitalii*.

Cão	Eritrócitos (x10⁶)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	VCM (fl)	CHCM (%)
1	4,04	9,5	26	64	36
2	3,55	8,1	23	64	35
3	4,36	10,8	30	68	36
4	4,97	12,0	33	66	36
5	4,78	12,0	31	64	38
6	5,41	13,5	35	64	38
7	3,64	9,2	26	71	35
8	5,0	11,7	32	64	36
9	4,53	10,9	31	68	35
10	4,5	10,3	28	62	36
*Valores de referência	6,0-8,0	12,0 -18,0	37-55	60-77	32-38

*FELDMAN, et al. (2000).

VCM: volume corpuscular médio. CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média.

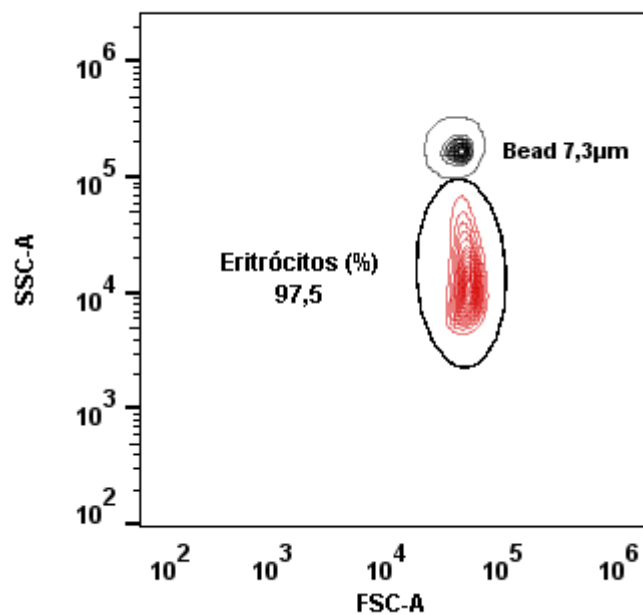


Figura 1. Esquema utilizado para identificar a população de eritrócitos *dot-plot* de SSC (side scatter; granulocidade) versus FSC (forward scatter; tamanho celular) demonstrando a população de eritrócitos em vermelho e as *beads* de 7,3 µm em preto. As análises foram realizadas no *software* Flowjo V10.

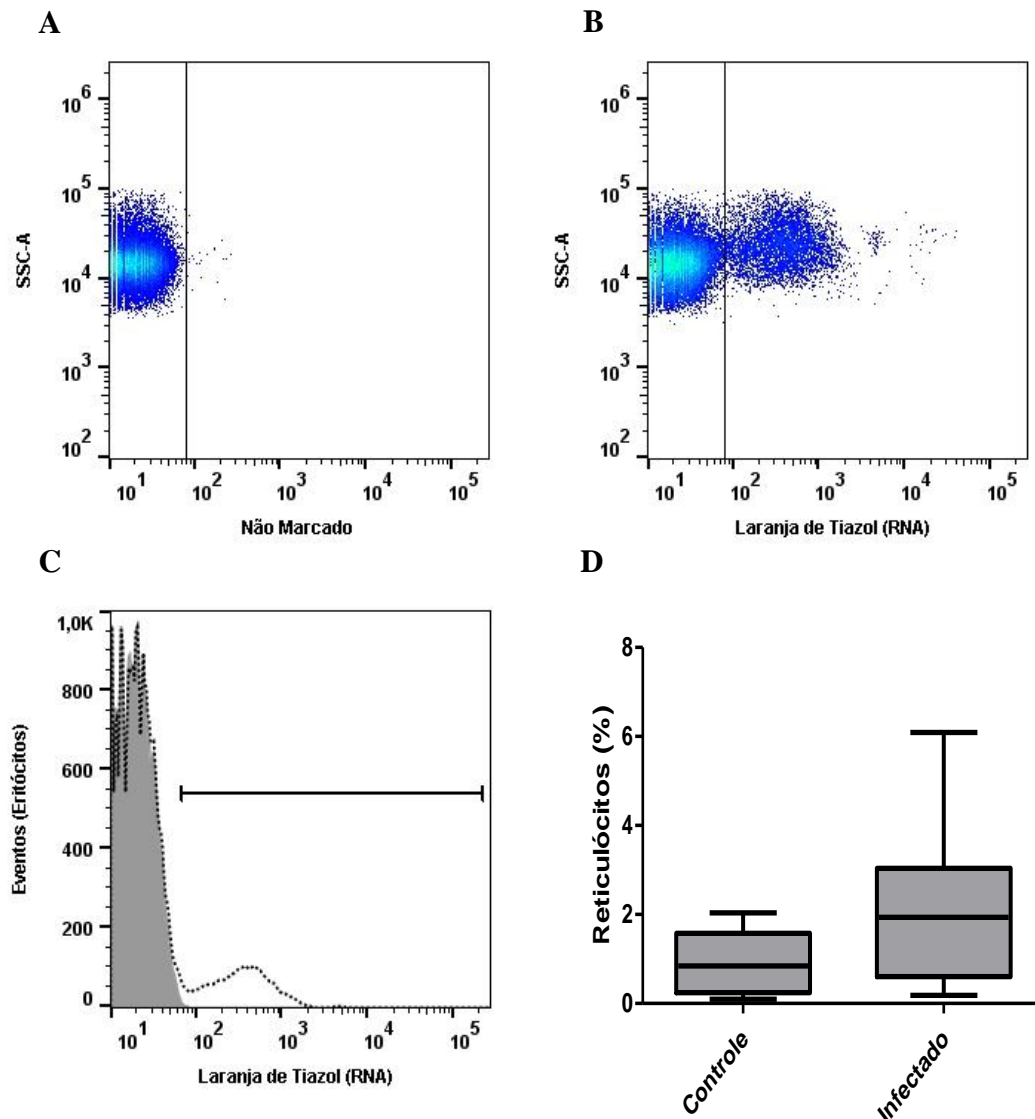


Figura 2. Gráficos em *dot plots* exemplificando *gate* na população de eritrócitos não marcado (A) e amostra marcada com laranja de tiazol (RNA) a população que se projeta para frente da linha são os reticulócitos (B). Intensidade de fluorescência representada por histograma, fluorescência negativa (cor cinza) e fluorescência positiva com ligação do laranja de tiazol ao RNA dos reticulócitos (linha tracejada) (C). As análises foram realizadas no *software* Flowjço V10. Gráfico em *boxplot* apresentando mediana e desvio padrão do percentual de reticulócitos em cães controle e infectados naturalmente com *R.vitalii* (D) (teste de Mann-Whitney).

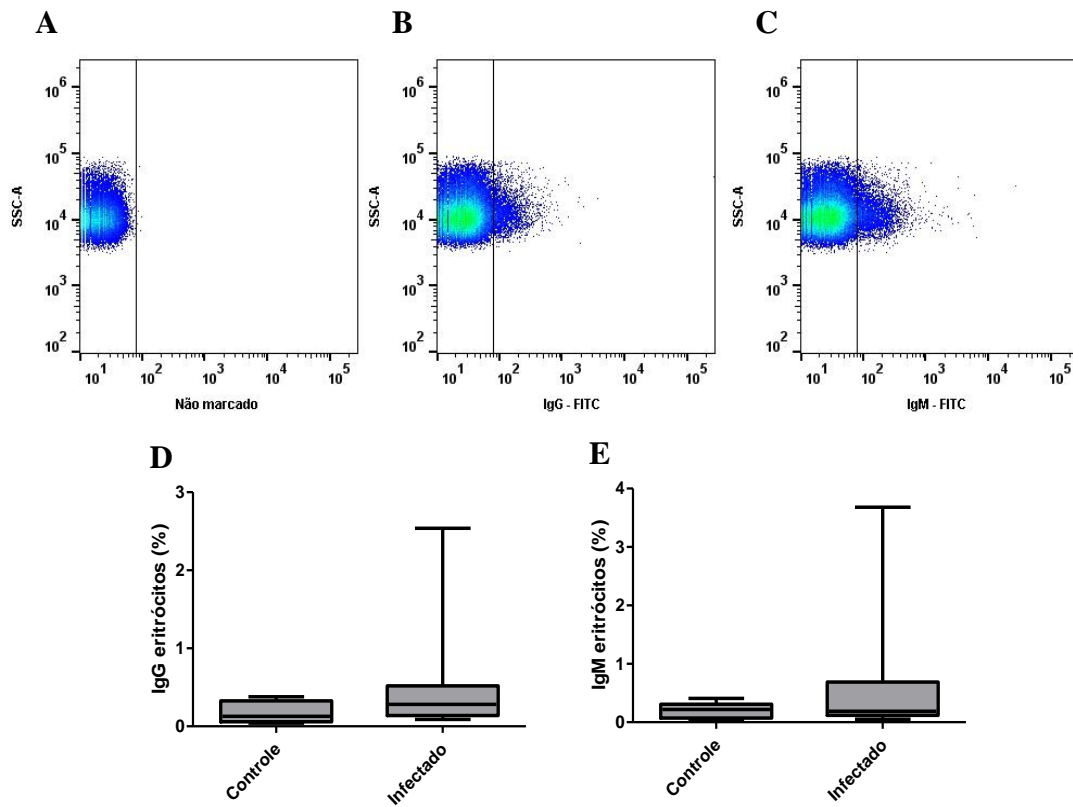


Figura 3. Gráficos em *dot plots* exemplificando *gate* na população de eritrócitos não marcado (A), eritrócitos marcado com IgG (B) e IgM (C). As análises foram realizadas no *software* Flowjo V10. Gráficos em *boxplot* apresentando mediana e desvio padrão do percentual de IgG (D) e IgM (E) em eritrócitos de cães controle e naturalmente infectados com *R. vitalii* (teste de Mann-Whitney).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A rangeliose foi descrita pela primeira vez em 1908 e, apesar do tempo decorrido após sua descoberta, é uma doença considerada reemergente. Trata-se de uma enfermidade causada pelo protozoário *Rangelia vitalii* e que afeta cães principalmente na região sul do país (LORETTI e BARROS, 2005; FIGHERA et al., 2010; FRANÇA et al., 2010). No entanto, com o auxílio da biologia molecular diversos casos dessa enfermidade foram confirmados em canídeos domésticos e selvagens no Brasil e em outros países da América do Sul (SOARES et al., 2011; EIRAS et al., 2014; SOARES et al., 2015; QUADROS et al., 2015). Nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo diversos estudos relacionados com a patogênese da rangeliose, buscando investigar aspectos relacionados ao ciclo biológico do protozoário (DA SILVA et al., 2011), aos mecanismos que levam ao desenvolvimento da anemia (FRANÇA et al., 2013), trombocitopenia (PAIM et al., 2012a), resposta imunológica (PAIM et al., 2013) e ao envolvimento do processo de estresse oxidativo (FRANÇA et al., 2012) em cães acometidos por essa infecção. Nos últimos anos importantes avanços foram feitos em relação ao diagnóstico dessa doença, que por muito tempo foi confundida com outras patologias (FIGHERA, 2007; FRANÇA et al., 2014). Contudo, muitas pesquisas ainda são necessárias para um melhor entendimento sobre a rangeliose.

Neste estudo, cães naturalmente infectados com *R. vitalii* apresentaram sinais clínicos como apatia, anorexia, emagrecimento, hematoquezia, diarreia e sangramento pelas bordas e face externa das orelhas, similar ao descrito na literatura (FIGHERA et al., 2010; FRANÇA et al., 2010). Os sinais clínicos observados estão associados aos achados laboratoriais de anemia e trombocitopenia, visto que a redução de plaquetas circulantes predispõe à hemorragias, levando, assim, ao desenvolvimento da anemia. Além disso, os sinais clínicos apresentados pelos animais, deste estudo, enquadram-se, em sua maioria, na forma hemorrágica da doença, sendo essa a apresentação clínica mais comum da infecção por *R. vitalii*, na qual os animais acometidos geralmente apresentam apatia, anorexia, emagrecimento progressivo e hematoquezia (PESTANA, 1910; CARINI e MACIEL, 1914)

Nos manuscritos I e II, buscamos demonstrar o envolvimento de anticorpos IgM e IgG na patogênese da anemia e trombocitopenia observada em cães com rangeliose. Através da citometria de fluxo foi possível determinar se estas imunoglobulinas encontravam-se ligadas à superfície de eritrócitos e plaquetas dos animais infectados. Além disso, a presença de uma resposta regenerativa para a anemia e trombocitopenia pôde ser avaliada pelo percentual de reticulócitos e de plaquetas reticuladas.

A anemia descrita na rangeliose é caracterizada como hemolítica com sinais de intensa regeneração eritroide e frequentemente é classificada como macrocítica hipocrômica em relação aos índices eritrocitários, e regenerativa em relação a resposta medular (FIGHERA et al., 2010; FRANÇA et al., 2010; STOCKHAM e SCOTT, 2011). Neste estudo, a anemia foi de grau leve a moderado e classificada como normocítica normocrômica. Além disso, observou-se sinais discretos de regeneração como anisocitose, policromasia (Figura 4), presença de raros corpúsculos de Howell-Jolly e metarrubricitos. Em casos de anemia regenerativa a medula óssea libera células jovens conhecidas como reticulócitos (STOCKHAM e SCOTT, 2011). No entanto, nos animais deste estudo não foi observada diferença no percentual de reticulócitos entre os grupos controle e infectado. Por tratar-se de uma infecção natural não foi possível determinar o tempo decorrido do momento da infecção pelo protozoário ao momento da coleta das amostras sanguíneas. Porém, a ausência de reticulocitose sugere que a infecção é recente, sem tempo suficiente para que ocorresse resposta medular. Em um estudo com cães experimentalmente infectados com *R. vitalii* a contagem de reticulócitos foi realizada nos dias 10 e 20 pós-inoculação e somente no dia 20 pós-infecção foi observada reticulocitose (FRANÇA et al., 2013).



Figura 4. Esfregaço sanguíneo de um cão com rangeliose apresentando discreta anisocitose e policromasia. Panótico rápido, 100x.

Os cães deste estudo não apresentaram anticorpos IgG e IgM ligados à superfície dos eritrócitos. Carli et al. (2009) avaliaram a ligação de anticorpos na superfície dos eritrócitos em cães infectados com *Babesia canis canis* e *Babesia canis vogeli* e somente o grupo infectado com *Babesia canis vogeli* possuía anticorpos ligados à superfície dos eritrócitos. A literatura sobre rangeliose descreve que os animais infectados apresentam anemia hemolítica imunomediada. Provavelmente, neste trabalho, não ocorreu a ligação de anticorpos à superfície dos eritrócitos devido a fase da doença, que, a partir dos achados laboratoriais, suspeita-se tratar de um período inicial. Sabe-se que o grau de lise dos eritrócitos depende do tipo e da quantidade de anticorpo que se liga à célula e do envolvimento da fixação do complemento, sendo que a maioria dos casos de anemia hemolítica em cães é resultado da ligação de IgG na superfície dos eritrócitos. Porém, em casos de infecções por certas bactérias, protozoários, rickettsias e doenças virais, antígenos dos microorganismos são incorporados às superfícies celulares do hospedeiro alterando sua membrana celular. Assim, a natureza exata da anemia em doenças infecciosas geralmente não é identificada, podendo ser multifatorial (PEDERSEN, 1999).

A trombocitopenia em cães infectados com *R. vitalii* foi descrita como sendo de grau leve a severo (FIGHERA et al., 2010; PAIM et al, 2012). No presente estudo, a trombocitopenia variou de moderada a severa e na avaliação da morfologia plaquetária os animais infectados apresentavam macroplaquetas circulantes (Figura

5), sendo que a presença de macroplaquetas em animais com trombocitopenia sugere uma resposta regenerativa (FRANÇA et al., 2014). Além disso, os animais foram avaliados quanto à presença de plaquetas reticuladas no sangue e observou-se aumento destas células na circulação dos cães infectados, quando comparados aos cães hígidos, indicando uma trombopoiese ativa. Weiss e Wardrop (2010) citam que pacientes trombocitopênicos, os quais possuem comprometimento da trombopoiese apresentam diminuição do percentual de plaquetas reticuladas.



Figura 5. Esfregaço sanguíneo de um cão com rangeliose apresentando macroplaqueta (seta). Panótico rápido, 100x.

Os anticorpos anti-plaquetas no soro de cães reagem com antígenos de membrana GPIIb e GPIIIa (PEDERSEN, 1999). A ligação de anticorpos à superfície das plaquetas pode afetar tanto a função plaquetária, quanto levar a uma destruição precoce e acelerada dessas células pelo sistema fagocítico (CIARAMELLA et al., 2005; WEISS e WARDROP, 2010). No presente trabalho, os animais infectados por *R. vitalii* apresentaram anticorpo IgM ligados a superfície de plaquetas, sendo esta a principal classe de imunoglobulina produzida durante uma resposta imune primária (MOLINARO et al., 2009). Em adição, em estudo experimental com cães infectados por *R. vitalii* foi demonstrado que não ocorre alteração nos fatores de coagulação e nem diminuição do número de megacariócitos na medula óssea (PAIM et al., 2012a). Assim, sugere-se que componentes imunomediados possam estar

relacionados ao desenvolvimento da trombocitopenia observada na infecção por *R. vitalii*.

Os resultados do presente estudo demonstram que ocorre ligação de anticorpos IgM nas plaquetas e resposta regenerativa para trombocitopenia. Porém, não foi observada ligação de anticorpos IgM e IgG na superfície dos eritrócitos e nem resposta regenerativa para a anemia. Entretanto, é possível que em casos mais crônicos e severos de rangeliose possa ocorrer a ligação de IgG juntamente com IgM na superfície de plaquetas e eritrócitos e o desenvolvimento de uma resposta regenerativa para a anemia. Outros estudos devem ser desenvolvidos a fim de investigar a participação de diferentes mecanismos na patogênese da anemia e trombocitopenia em diferentes fases da infecção por *R. vitalii*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEXFIELD, N. H.; VILLIERS, E. J.; HERRTAGE, M. E. Immune - mediated haemolytic anaemia and thrombocytopenia associated with *Anaplasma phagocytophilum* in a dog. **Journal Small Animal Practice**, v.46, p.543-548, 2005.

CARINI, A. Notícias sobre zoonoses observadas no Brasil. **Revista Médica de São Paulo**, v.22, p.459-462, 1908.

CARINI, A.; MACIEL, J. J. Contribuição ao tratamento do nanbyuvú pelo trypanblau. **Revista de Veterinária e Zootecnia**, p.63-64, 1914.

CARLI, E. et al. Detection of erythrocyte binding IgM and IgG by flow cytometry in sick dogs with *Babesia canis canis* or *Babesia canis vogeli* infection. **Veterinary Parasitology**, v.162 p.51-57, 2009.

CHABANNE, L. et al. Clinical applications of flow cytometry and cell immunophenotyping to companion animals (dog and cat). **Methods in Cell Science**, v.22, p.199-207, 2000.

CORTESE, L. et al. Prevalence of anti-platelet antibodies in dogs naturally co-infected by *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*. **The Veterinary Journal**, v.188, p.118-121, 2011.

COSTA, M. M. et al. *Rangelia vitalii*: changes in the enzymes ALT, CK and AST during the acute phase of experimental infection in dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, p. 243-248, 2012.

COWGILL, E. S.; NEEL, J. A.; GRINDEM, C. B. Clinical application of reticulocyte counts in dogs and cats. **Veterinary Clinical Small Animal**, v.33, p.1223-1244, 2003.

DA SILVA, A. S. et al. Experimental infection with *Rangelia vitalii* in dogs: acute phase, parasitemia, biological cycle, clinical- pathological aspects and treatment. **Experimental Parasitology**, v.128, p.347-352, 2011.

EIRAS, D. F. et al. First report of *Rangelia vitalii* infection (canine rangeliosis) in Argentina. **Parasitology International**, v.63 p.729–734, 2014.

FIGHERA, R. A. Rangeliose. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, p.261-263, 2007.

FIGHERA, R. A. et al. Patogênese e achados clínicos, hematológicos e anatomopatológicos da infecção por *Rangelia vitalii* em 35 cães (1985-2009). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, p.974-987, 2010.

FRANÇA, R. T. et al. *Rangelia vitalii*, in dog in southern Brazil. **Comparative Clinical Pathology**, v.19, p.383-387, 2010.

FRANÇA, R. T. et al. Canine rangeliosis due to *Rangelia vitalii*: from first report in Brazil in 1910 to current day - A review. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.5, p.466-474, 2014.

FRANÇA, R. T. et al. Hematologic and bone marrow changes in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. **Veterinary Clinical Pathology**, v.42, p.31-39, 2013.

GERSHWIN, L. J. Autoimmune Diseases in Small Animals. **Veterinary Clinical Small Animal**, v.40, p.439-457, 2010.

GRINDEM, C. B. et al. Platelet - associated immunoglobulin (antiplatelet antibody) in canine Rocky Mountain spotted fever and ehrlichiosis. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.35, p.56-61, 1999.

JUNT, T. et al. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. **Science**, v.317, p.1767-1770, 2007.

KAUSHANSKY, K. Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis. **Blood**, v.111, p.981-986, 2008.

KRAUSPENHAR, C.; FIGHERA, R. A.; GRAÇA, D. L. Anemia hemolítica em cães associada a protozoários. **Revista Científica de Medicina Veterinária de Pequenos Animais e Animais de Estimação - MEDVEP**, v.1, p.273-281, 2003.

KUCINSKIENE, G. et al. Flow cytometric evaluation of bound IgG on erythrocytes of anaemic dogs. **The Veterinary Journal**, v.169, p.303-307, 2005.

LEMOS, T. D. et al. Detection and molecular characterization of piroplasms species from naturally infected dogs in southeast Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.21, p.137-142, 2012.

LORETTI, A. P.; BARROS, S. S. PARASITISMO POR *RANGELIA VITALLI* EM CÃES ("NAMBIUVÚ", "PESTE DE SANGUE") - UMA REVISÃO CRÍTICA SOBRE O ASSUNTO. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v.71, p.101-131, 2004.

LORETTI, A. P.; BARROS, S. S. Hemorrhagic disease in dogs infected with an unclassified intraendothelial piroplasm in southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 134, p.193-213, 2005.

McCULLOUGH, S. Immune-mediated hemolytic anemia: understanding the nemesis. **Veterinary Clinical Small Animal**, v.33, p.1295-1315, 2003.

MORLEY, P. et al. Anti-Erythrocyte Antibodies and Disease Associations in Anemic and Nonanemic Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.22, p.886-892, 2008.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 4 ed. 2010. 1468p.

PAIM, C. B. V. et al. Thrombocytopenia and platelet activity in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. **Veterinary Parasitology**, v. 185, p.131-137, 2012a.

PAIM, C. B. V. et al. Activities of ectonucleotidases and adenosine deaminase in platelets of dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. **Experimental Parasitology**, v.131, p.252-257, 2012b.

PAIM, F. C. et al. Serum proteinogram, acute phase proteins and immunoglobulins in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. **Veterinary Parasitology**, v.192, p.137-142, 2013.

PEDERSEN, N. C. A review of immunologic diseases of the dog. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.69, p.251-342, 1999.

PESTANA, B. R. O nambyuvú (nota preliminar). **Revista da Sociedade Científica de São Paulo**, v.5, p.14-17, 1910.

QUADROS, R. M. et al. Natural Infection of the Wild Canid *Lycalopex gymnocercus* by the Protozoan *Rangelia vitalii*, the Agent of Canine Rangeliosis. **Journal of Wildlife Diseases**, v.51, p. 000–00, 2015.

QUIGLEY, K. A. et al. Application of a direct flow cytometric erythrocyte immunofluorescence assay in dogs with immune-mediated hemolytic anemia and comparison to the direct antiglobulin test. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.13, p.297-300, 2001.

RILEY, R. S.; BEN-EZRA, J. M.; TIDWELL, A. Reticulocyte Enumeration: Past & Present. **Laboratory Medicine**, v.32, p.599-608, 2001.

RUSSELL K. E. et al. A flow cytometric method for detecting thiazole orange positive platelets (reticulated platelets) in thrombocytopenic ponies. **American Journal of Veterinary Research**, v.58, p.1092-1096, 1997.

SOARES, J. F. et al. Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 153-167, 2011.

SOARES, J. F. et al. Caracterização morfológica, molecular, e estudos dos ixodídeos vetores de *Rangelia vitalii*. **XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária**. São Luis, MA, Brazil, 2012.

SOARES, J. F. et al. Natural infection of the wild canid, *Cerdocyon thous*, with the piroplasmid *Rangelia vitalii* in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.202, p.156-163, 2014.

SOARES, J. F. et al. Molecular detection of *Rangelia vitalii* in domestic dogs from Uruguay. **Veterinary Parasitology**, v.210, p.98-101, 2015.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. **Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária**. 2ª ed. 2011.

TERRAZZANO, G. et al. Presence of anti-platelet IgM and IgG antibodies in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.110, p.331-337, 2006.

WANER, T. et al. Detection of platelet-bound antibodies in beagle dogs after artificial infection with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.77, p.145-150, 2000.

WEISS, J. D. Application of Flow Cytometric Techniques to Veterinary Clinical Hematology. **Veterinary Clinical Pathology**, v.31, p.72-82, 2002.

WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6th ed. 2010. 1206p.

WILKERSON M. J. et al. Isotype-specific antibodies in horses and dogs with immune-mediated hemolytic anemia. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.14, p.190-196, 2000.

WILKERSON, M. J. et al. Platelet Size, Platelet Surface-Associated IgG, and Reticulated Platelets in Dogs with Immune-Mediated Thrombocytopenia. **Veterinary Clinical Pathology**, v.30,p.141-149, 2001.

ZACHARY, J. F.; McGAVIN, M. D. **Bases da Patologia em Veterinária**. 5ª ed. 2013. 1324p.