

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

**HEMOGRAMA E MIELOGRAMA DE CÃES  
INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM  
*Rangelia vitalii***

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Raquel Teresinha França**

**SANTA MARIA, RS, BRASIL  
2013**

**HEMOGRAMA E MIELOGRAMA DE CÃES  
INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM *Rangelia*  
*vitalii***

**Raqueli Teresinha França**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Clínica Médica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Sonia Terezinha dos Anjos Lopes**

Santa Maria, RS, Brasil

2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

França, Raqueli Teresinha  
Hemograma e mielograma de cães infectados experimentalmente com *Rangelia vitalii* / Raqueli Teresinha França.-2013.  
35 p.; 30cm

Orientadora: Sonia Terezinha dos Anjos Lopes  
Coorientadora: Marta Lizandra do Rêgo Leal  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2013

1. Hematologia 2. Mielograma 3. Hemoparasita 4. Rangeliose I. Lopes, Sonia Terezinha dos Anjos II. Leal, Marta Lizandra do Rêgo III. Título.

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**HEMOGRAMA E MIELOGRAMA DE CÃES INFECTADOS  
EXPERIMENTALMENTE COM *Rangelia vitalii***

elaborada por  
**Raqueli Teresinha França**

Como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Medicina Veterinária**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, Dr<sup>a</sup>.**  
(Presidente/Orientador)

**Alexandre Krause, PhD.** (UFSM)

**Stella de Faria Valle, Dr<sup>a</sup>.** (UFRGS)

Santa Maria, 27 de fevereiro de 2013.

## **AGRADECIMENTOS**

A minha orientadora, professora Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, por tudo que me ensinou, pela confiança no meu trabalho e por ser a grande responsável pelo meu crescimento profissional.

Ao meu noivo Conrado, por me apoiar mesmo quando eu tomei a decisão errada, muito obrigada pela paciência em aguentar o meu mau humor.

A minha irmã Débora e ao meu irmão André, que mesmo longe sempre me deram força e reconheceram o meu esforço.

Todos os colegas de pós em especial ao Márcio, Roberto e Rovaina pela amizade e momentos de descontração na rotina do laboratório. Aos professores e ex-colegas de pós Dani e Aleks por toda ajuda e amizade, vocês fazem muita falta.

Aos amigos e colegas do LacVet-UFSM. Em especial, a Dona Deva, a Rosângela, a Dani, as residentes Camila e Renata. Aos estagiários, em especial ao Gui, Camilinha e a Ana que tornam os meus dias mais felizes.

A minha amiga Marci que mesmo longe sempre esteve presente. A Paula e Liomara ex-colegas de apê, muito obrigada pela parceria, vocês moram no meu coração.

A professora Cinthia, uma pessoa admirável e determinada. Obrigada por me auxiliar e amparar nos momentos em que tudo parecia dar errado.

E não posso deixar de agradecer a minha companheira de apê, o Pet mais lindo do mundo, a Ritinha.

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, por oportunizar a realização de mais uma etapa de minha formação.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria

### HEMOGRAMA E MIELOGRAMA DE CÃES INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM *Rangelia vitalii*

AUTORA: RAQUELI TERESINHA FRANÇA

ORIENTADORA: SONIA TEREZINHA DOS ANJOS LOPES

Data e local da Defesa: Santa Maria, 27 de fevereiro de 2013.

*Rangelia vitalii* é um protozoário do filo Apicomplexa, classe Sporozoasida, ordem Piroplasmorida, que provoca, em caninos, uma doença denominada de rangeliase conhecida popularmente como "peste do sangue" ou "nambyuvú". A transmissão deste parasito ocorre através do carrapato e afeta cães das zonas rurais e periurbanas principalmente nas épocas mais quentes do ano, que favorecem o aumento populacional de carrapatos. Até o momento essa doença foi descrita somente no Brasil. A rangeliase pode causar anemia, icterícia, febre, esplenomegalia, linfadenomegalia, hemorragias no trato gastrointestinal e sangramento persistente pelas bordas e face externa das orelhas, narinas e cavidade oral. O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações hematológicas e a resposta da medula óssea em cães infectados experimentalmente com *Rangelia vitalii* durante a fase aguda da infecção. Foram utilizados 12 cães, separados em dois grupos: grupo A composto por cinco animais saudáveis, e grupo B constituído por sete cães infectados experimentalmente com *R. vitalii*. Após inoculação, os animais foram monitorados para avaliação da parasitemia por meio de esfregaços sanguíneos de ponta de orelha. No grupo B o parasito foi encontrado no interior de eritrócitos, neutrófilos e monócitos cinco dias pós-inoculação (PI). As coletas de sangue com EDTA para a realização do hemograma foram feitas nos dias 0, 10, 20 e 30 PI. Nos dias 10 e 20 PI também foram realizadas as contagens de reticulócitos. Posteriormente à coleta de sangue, os cães foram anestesiados para coleta dos aspirados de medula óssea para realização do mielograma. Este estudo demonstrou redução ( $P < 0,01$ ) no número eritrócitos, hematócrito e hemoglobina no grupo infectado em relação ao controle. No dia 10 PI os animais infectados apresentaram anemia normocítica normocrômica, entretanto, no dia 20 PI foi observada anemia macrocítica hipocrômica e aumento ( $P < 0,05$ ) na amplitude de distribuição eritroide no grupo infectado. Houve redução ( $P < 0,05$ ) nos leucócitos totais no grupo infectado, em relação ao grupo controle, em consequência da redução de neutrófilos e eosinófilos ( $P < 0,05$ ). Também ocorreu aumento ( $P < 0,05$ ) na contagem de linfócitos e monócitos nos cães infectados em relação ao grupo controle. Aumento ( $P < 0,01$ ) na contagem de reticulócitos foi observado no grupo infectado em relação ao grupo controle. No mielograma foi observado uma diminuição ( $P < 0,05$ ) na relação mieloide:eritroide em consequência do aumento dos precursores eritroides (rubriblasto, prorubricito, rubricito e metarrubricito) e diminuição na linhagem mieloide (mielócito, bastonetes e segmentados). Outras células como linfócitos, plasmócitos e macrófagos foram mais frequentes no mielograma no dia 20 PI no grupo infectado em relação ao grupo controle. A partir dos resultados, pode-se concluir que a rangeliase causa anemia hemolítica imunomediada extravascular regenerativa, que coincide com leucopenia por neutropenia e eosinopenia, além, de linfocitose e monocitose. Estes achados que ocorrem na fase aguda da infecção experimental, são semelhantes aos encontrados em casos de infecção natural, nas diferentes fases da doença.

**Palavras-chave:** Rangeliase. Anemia. Mielograma.

## ABSTRACT

Master's Dissertation  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria

### HEMOGRAM AND MYELOGRAM DOGS INFECTED WITH EXPERIMENTALLY

#### *Rangelia vitalii*

AUTHOR: RAQUELI TERESINHA FRANÇA

ADVISOR: SONIA TEREZINHA DOS ANJOS LOPES

Date and place of Defense: Santa Maria, February 27<sup>th</sup>, 2013.

*Rangelia vitalii* is a member of the protozoan phylum Apicomplexa, class Sporozoa, order Piroplasmorida, that causes a disease called rangelirosis in dogs, popularly known as "bleeding plague" or "nambyuvú". The transmission of this parasite occurs through tick and affects dogs in rural and periurban areas especially in hotter times of the year, which favors an increase in ticks population. To date this disease has been described only in Brazil. Rangelirosis is characterized by anemia, jaundice, fever, splenomegaly, generalized lymph node enlargement, hemorrhage along the gastrointestinal tract, and persistent bleeding through the tips of the pinnae, external surface of the ears, nose, and oral cavity. The aim of this study was to evaluate hematologic changes and consequent bone marrow response during the acute phase in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. 12 dogs were, divided into two groups: group A consisted of five healthy animals, and group B consisted of seven dogs experimentally infected with *R. vitalii*. After inoculation, the animals were monitored for parasitemia by blood smears from the tips of the ear. In group B the parasite was found within erythrocytes, neutrophils and monocytes five days post-inoculation (PI). Blood samples with EDTA for complete blood count (CBC) were performed on days 0, 10, 20 and 30 PI and on days 10 to 20 PI the reticulocyte count. After blood collection, the dogs were anesthetized bone marrow aspiration for the myelogram. This study demonstrated a reduction ( $P < 0.01$ ) in erythrocyte count, hematocrit and hemoglobin in the infected group compared to control. On day 10 PI the infected animals showed a normocytic normochromic anemia, however, on day 20 PI was observed macrocytic hypochromic anemia and increased ( $P < 0.05$ ) in the red cell distribution width (RDW) in the infected group compared to control. A decreased ( $P < 0.05$ ) in total leukocyte count as a result of a decrease in neutrophil and eosinophil count was observed in the infected animals ( $P < 0.05$ ). In the infected group there was also an increase in lymphocyte and monocyte count in comparison to control ( $P < 0.05$ ). Increased ( $P < 0.01$ ) in the reticulocyte count was observed in the infected group compared to the control group. The myelogram showed a decrease ( $P < 0.05$ ) in myeloid:erythroid ratio as a result of increased erythroid precursors (rubriblast, prorubricyte, rubricyte and metarubricyte) and a decrease in the myeloid lineage (myelocyte, band and segmented). Other cells such as lymphocytes, plasma cells and macrophages were more frequent in bone marrow on day 20 PI in the infected group compared to the control group. Our results, we conclude that rangelirosis can lead to a regenerative, immunomediated, hemolytic anemia, together with leukopenia due to neutropenia and eosinopenia, as well as lymphocytosis and monocytosis. These findings were observed in the acute phase experimental of infection and are similar to those found in cases of natural infection at different stages of the disease.

**Keywords:** Rangelirosis. Anemia. Myelogram.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1- Sinais clínicos apresentados por caninos infectados naturalmente com *Rangelia vitalii*. A) presença de sangramento pela face externa da orelha e mucosa oral pálida, B) hifema no globo ocular (seta vermelha), C) petéquias e equimoses no abdômen e D) sangramento profuso na face externa da orelha.....11
- Figura 2- Alterações hematológicas e da medula óssea em cães com rangeliase. A) presença de esferócitos, anisocitose policromasia e metarrubricito; B) eritrofagocitose; C) aglutinação de hemácias, anisocitose policromasia e metarrubricitos e D) medula óssea apresentado grande quantidade de precursores eritroides. (Panótico Rápido).....13
- Figura 3- Esfregaços sanguíneos de cães infectados com *Rangelia vitalii* presença do protozoário: A) livres no sangue periférico, B) no interior de hemácia, C) no interior de neutrófilos e D) e livre no sangue periférico. (Panótico Rápido).....18
- Figura 4- Amostra citológica de linfonodo de um canino acometido pela doença, evidenciando a presença de aglomerados de *Rangelia vitalii*. (Panótico Rápido).....19



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>ARTIGO.....</b>	<b>21</b>
	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>31</b>
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>32</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>33</b>

## 1. INTRODUÇÃO

*Rangelia vitalii* é um protozoário do Filo Apicomplexa, Classe Sporozoasida, Ordem Piroplasmorida que causa, em cães, uma doença conhecida como rangeliase, denominada popularmente como peste do sangue, febre amarela dos cães ou Nambyuvú que na língua tupi-guarani significa orelhas que sangram (LORETTI e BARROS, 2004a; FIGHERA, 2007). A rangeliase foi descrita pela primeira vez em 1910 por Bruno Rangel Pestana, sendo que existe relato da ocorrência desta doença no ano de 1908, porém ainda não se sabia a natureza dessa enfermidade (CARINI, 1908; PESTANA, 1910). O nome *Rangelia vitalii* é uma homenagem ao Mestre Vital Brazil e ao seu descobridor Bruno Rangel Pestana (PESTANA, 1910).

Esta doença trata-se de uma enfermidade descrita até o momento somente no Brasil (CARINI, 1908; PESTANA, 1910; KRAUSPENHAR et al., 2003; LORETTI e BARROS, 2004a; FIGHERA et al., 2010; FRANÇA et al., 2010; LEMOS et al., 2012). Possivelmente, a área de distribuição desse protozoário seja mais ampla do que a atualmente conhecida (SOARES et al., 2011). Durante anos, a rangeliase foi esquecida pela comunidade acadêmica e deixou de ser citada em livros e em artigos científicos (FIGHERA, 2007), além de ter sido confundida com outras doenças que apresentam sinais clínicos similares (KRAUSPENHAR et al., 2003).

O estudo filogenético do *R. vitalii* através da análise molecular, tendo como referência fragmentos 18S rRNA e da proteína de choque térmico 70 (hsp70), ampliados por reação em cadeia da polimerase (PCR), foi recentemente realizado. A análise inferida resultou na descrição de um novo genótipo classificado no gênero *Babesia* e concluiu que *R. vitalii*, o agente etiológico da rangeliase, é uma espécie válida de piroplasma. Entretanto, ratifica-se a necessidade de novos estudos do gênero *Rangelia* (SOARES et al., 2011). Desta forma, nos últimos anos, diferentes grupos de pesquisa estão desenvolvendo estudos relacionados a esse protozoário em diferentes regiões do país (FIGHERA et al., 2010; DA SILVA et al., 2011; SOARES et al., 2011; LEMOS et al., 2012).

O *R. vitalii* até o momento foi descrito somente em cães. Esse protozoário afeta principalmente animais jovens e, com menor frequência, cães adultos geralmente acomete animais que vivem em zonas rurais ou que tenham acesso a esses locais. Os carrapatos *Amblyomma aureolatum* e *Rhipicephalus sanguineus* são os ixodídeos que têm sido encontrados em caninos acometidos pelo *R. vitalii* (LORETTI e BARROS, 2004a). Em um

estudo realizado com os carrapatos *Amblyomma aureolatum* e *Rhipicephalus sanguineus* foi demonstrado que somente o *Amblyomma aureolatum* foi capaz de infectar cães com o protozoário *R. vitalii*, o mesmo não ocorreu com o *Rhipicephalus sanguineus* (SOARES et al., 2012). A inoculação deste parasito também pode ser feita via injeção de sangue de um animal infectado (FIGHERA, 2007).

Esta doença ocorre durante todo ano, sendo mais frequente nas épocas mais quentes como o verão, estação em que há maior quantidade de vetores no ambiente. Existe a possibilidade de haver um reservatório silvestre no ciclo biológico do *R. vitalii*, que seria capaz de manter este protozoário sem desenvolver a doença. No estado do Rio Grande do Sul, sugere-se que o protozoário seja mantido no ambiente por animais silvestres e passeriformes (LORETTI e BARROS, 2004a).

Os cães acometidos pela rangelirose podem apresentar os seguintes sinais clínicos: palidez de mucosas, icterícia visível nas mucosas e pele, febre intermitente, apatia, anorexia, desidratação, fraqueza, emagrecimento progressivo, hepato e esplenomegalia, aumento generalizado dos linfonodos, edema dos membros posteriores, hemorragias (petéquias) nas mucosas, hematêmese, diarreia sanguinolenta e sangramento persistente pelas narinas, cavidade oral, locais de punção venosa, olhos, bordas e face externa das orelhas (LORETTI e BARROS, 2004a; FIGHERA et al., 2010; FRANÇA et al., 2010) (Figura 1A, B, C e D).

A rangelirose é classificada de acordo com o tempo de duração e os sinais clínicos mais evidentes apresentados pelo animal. Essa doença possui três formas clínicas: aguda ou ictérica, subaguda ou hemorrágica e crônica ou benigna. Muitas vezes, as formas de apresentação da doença podem sobrepor-se e, um mesmo animal, apresentar icterícia e hemorragia ao mesmo tempo (LORETTI e BARROS, 2004a). A doença espontânea tem evolução de alguns dias até 3 meses dependendo da forma de apresentação (PESTANA, 1910; CARINI e MACIEL, 1914). Na infecção experimental, foi descrito que o aparecimento dos sinais clínicos ocorreu 5 dias após a inoculação, já em outro estudo, o animal desenvolveu a doença após 15 dias da inoculação (período de incubação) e morreu após 7 dias (evolução clínica) (KRAUSPENHAR et al., 2003; DA SILVA et al., 2011).

Os achados laboratoriais geralmente observados em cães naturalmente infectados são compatíveis com anemia hemolítica imunomediada extravascular. A anemia observada em cães com rangelirose 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). As anemias hemolíticas ocorrem como resultado do aumento da destruição de eritrócitos dentro do corpo. Esses eritrócitos podem ser lisados na circulação

(hemólise intravascular) ou, mais frequentemente, por lise nas células fagocíticas do sistema fagocítico mononuclear (hemólise extravascular). As anemias hemolíticas são geralmente do tipo regenerativa, desde que haja tempo apropriado para resposta adequada da medula óssea. Na anemia hemolítica imunomediada a ligação de anticorpos ou complemento na membrana dos eritrócitos pode resultar na fagocitose dessas células por macrófagos e, em alguns casos, até mesmo, em hemólise intravascular. A anemia hemolítica imunomediada pode ser primária ou ocorrer secundariamente a neoplasias, exposição a drogas ou ainda, por infecção causada por vírus, bactérias, rickettsias e protozoários (HARVEY, 2012). Esses organismos estabelecem uma interação com o sistema imune do hospedeiro que pode resultar em fenômenos imunomediados secundários não associados diretamente com a infecção (WEISS e WARDROP, 2010).



Figura 1- Sinais clínicos apresentados por caninos infectados naturalmente com *Rangelia vitalii*. A) presença de sangramento pela face externa da orelha e mucosa oral pálida, B) hifema no globo ocular (seta vermelha), C) petéquias e equimoses no abdômen e D) sangramento profuso na face externa da orelha.

A resposta da medula óssea à perda de sangue é vista no sangue periférico através de reticulocitose e são necessários aproximadamente 4 dias para que ocorra o pico de reticulócitos. Esse tempo é necessário para que ocorra a estimulação dos progenitores

eritroides da medula óssea após estímulo da eritropoietina. Inicialmente os progenitores eritroides podem aumentar na medula óssea dentro de 12 horas após estímulo, mas provavelmente diversos dias são requeridos após hemorragia ou hemólise para que ocorra hiperplasia eritroide proeminente que resulte em diminuição na relação mieloide: eritroide (HARVEY, 2012) (Figura 2 D).

Na avaliação morfológica do esfregaço sanguíneo dos cães acometidos pela doença comumente se observa anisocitose, policromasia, metarrubricitemia e corpúsculos de Howell-Jolly. Quando realizada a contagem de reticulócitos observa-se reticulocitose. Achados microscópicos de esferocitose, autoaglutinação de eritrócitos e eritrofagocitose são sugestivos de dano imunomediado aos eritrócitos e são frequentemente encontrados (FIGHERA, 2007; FIGHERA et al., 2010; FRANÇA et al., 2010; WEISS e WARDROP, 2010) (Figura 2A, B e C). A amplitude de distribuição eritroide (RDW) em casos de infecção natural oscila entre 15 e 24 (FIGHERA et al., 2010). O plasma destes animais geralmente encontra-se icterico e, em alguns casos, é possível observar aglutinação de eritrócitos na parede do tubo (FIGHERA, 2007; FIGHERA et al., 2010). O aumento da bilirrubina no plasma, acompanhada da diminuição do hematócrito, é sugestivo de aumento da fagocitose de eritrócitos (HARVEY, 2012).

O leucograma dos cães acometidos pela doença pode apresentar contagem total de leucócitos dentro dos valores de normalidade ou alterada, leucopenia e leucocitose, 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 e 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).

De acordo com Fighera (2007), em alguns casos é possível observar trombocitopenia de grau leve a moderado. Entretanto, devido à moderada gravidade da trombocitopenia acredita-se que, nos casos em que ocorre sangramento, a trombocitopenia pode não ser o único mecanismo para explicar as hemorragias. Já em outro estudo com cães naturalmente infectados, foi observada severa trombocitopenia (FRANÇA et al., 2010). Em uma pesquisa realizada com cães infectados experimentalmente com *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. Os tempos de protrombina e tromboplastina parcial ativada não diferiram do grupo controle. Os autores concluíram que esses achados sugerem que ocorra

trombocitopenia severa na fase aguda da infecção e que os tempos de coagulação não influenciam na patogênese da doença. Dano à medula óssea também foi descartado como uma das causas de trombocitopenia, pois foi observado aumento no número de megacariócitos. A trombocitopenia que ocorre durante rangeliose está provavelmente relacionada com sequestro esplênico, consumo e/ou trombocitopenia imunomediada. Acredita-se que a trombocitopenia não é o único mecanismo envolvido na doença, pois uma trombocitopenia foi encontrada através da redução da agregação plaquetária que pode estar relacionada com a redução da liberação da adenosina difosfato (ADP) (PAIM et al., 2012a).

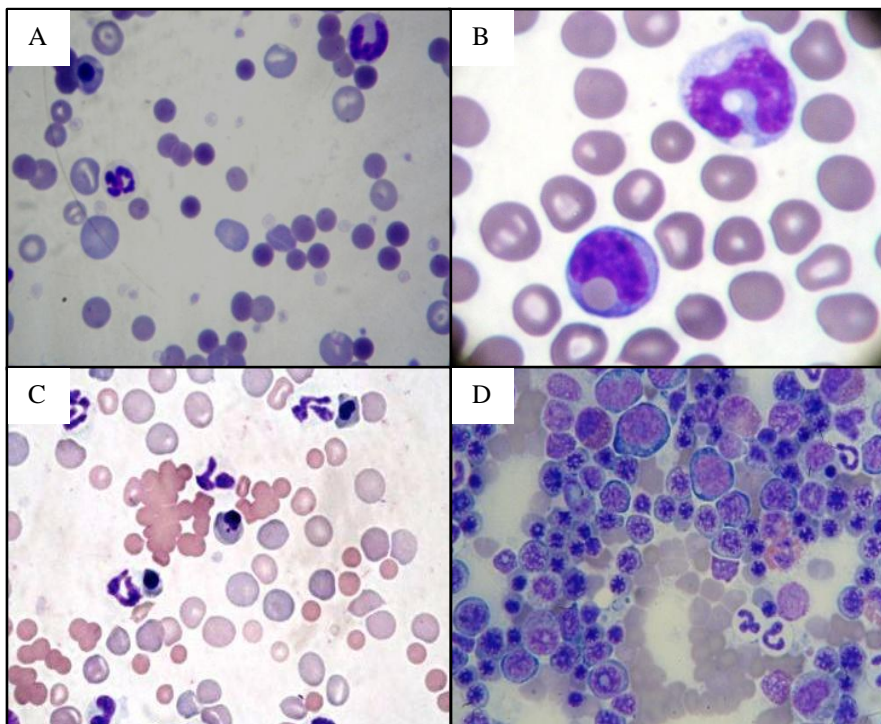


Figura 2- Alterações hematológicas e da medula óssea em cães com rangeliose. A) presença de esferócitos, anisocitose policromasia e metarrubricito; B) eritrofagocitose; C) aglutinação de hemácias, anisocitose policromasia e metarrubricitos e D) medula óssea apresentado grande quantidade de precursores eritroides. (Coloração Panótico Rápido).

Estudos tem relacionado o sistema purinérgico às coagulopatias (SCHETINGER et al., 2007; GÖDECKE, 2008). Esse sistema consiste de enzimas, receptores, nucleotídeos e nucleosídeos (GÖDECKE, 2008; YEGUTKIN, 2008). Os nucleotídeo da adenina ATP, ADP e AMP, e o nucleosídeo adenosina são descritos por sua função de regulação e modulação de diversas funções celulares, dentre elas a agregação plaquetária (GÖDECKE, 2008). O ADP é

primariamente responsável pela promoção da agregação, enquanto a adenosina é um potente inibidor (WOULFE et al., 2001; ANFOSSI et al., 2002). O papel do ATP nas desordens de coagulação não está bem compreendido. Contudo, sabe-se que a hidrólise do ATP e ADP para AMP e/ou adenosina inibem a agregação plaquetária como uma consequência do aumento da concentração extracelular de adenosina (BIRK et al., 2002). Em estudo experimental foi observado que a hidrólise de ATP, ADP e AMP, e a desaminação da adenosina estavam alteradas nas plaquetas de cães infectados por *R. vitalii*. Durante o período de infecção a diminuição da atividade enzimática pode ser relacionada à trombocitopenia. Contudo, 21 dias após a infecção o aumento da atividade enzimática pode ser atribuído ao mecanismo compensatório. As alterações nas atividades dessas enzimas podem implicadas na patogênese da rangeliose. Provavelmente, a infecção por *R. vitalii* causa aumento na concentração da adenosina extracelular, que atua inibindo a agregação plaquetária, causando o sangramento observado em cães naturalmente e experimentalmente infectados (PAIM et al., 2012b).

Nenhum teste bioquímico auxilia diretamente no diagnóstico da rangeliose, entretanto, a realização dessas provas é parte do protocolo de avaliação do paciente, ou serve para diferenciar de outras doenças (FIGHERA, 2007). Em estudo experimental foi encontrado na bioquímica sérica aumento na atividade da Alanina aminotransferase (ALT) no grupo infectado em relação ao controle, esse não ultrapassando o valor de referência. O aumento na atividade dessa enzima geralmente está associado com injúria hepatocelular causada por processo inflamatório tóxico ou infeccioso, esse aumento foi associado com os achados de hepatomegalia e moderada icterícia que esses animais apresentavam. A anemia também pode ser a causa da elevação da atividade dessa enzima, uma vez, que o grau de lesão do fígado causado pela hipóxia pode variar desde moderada a reversível. Em relação a Gama glutamil transferase (GGT) não foi encontrada nenhuma alteração na atividade dessa enzima, embora, os animais tenham apresentado moderada icterícia. Essa enzima é encontrada principalmente no epitélio biliar, seu aumento pode ocorrer em casos de colestase ou hiperplasia biliar, quando há icterícia, na ausência de aumento na atividade desta enzima, atribui-se a icterícia a hemólise extravascular. O aumento na atividade das enzimas Aspartato aminotransferase (AST) e da Creatina quinase (CK) sugere lesão muscular, no caso da AST, seu aumento também pode ser em função da lesão de hepatócitos. Não foram observadas alterações nas concentrações de ureia e creatinina. Essas alterações auxiliam o clínico no diagnóstico diferencial de outras doenças que cursam com sinais clínicos parecidos (COSTA et al., 2012). Outro achado importante na bioquímica sérica, em cães com rangeliose, é o aumento da bilirrubina em decorrência da hemólise extravascular. Além disso, a urina de cães infectados

com *R. vitalii* pode estar visivelmente escura, em decorrência da grande quantidade de urobilinogênio e bilirrubina excretados (FIGHERA, 2007).

Em estudos com outros parasitos como o *Trypanosoma evansi* e *Babesia gibsoni* foi demonstrado que há o envolvimento do estresse oxidativo na patogênese dessas doenças (CHAUDHURI et al., 2008; WOLKMER et al., 2009). Na infecção experimental com *R. vitalii*, foi encontrado aumento nos níveis das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e do produto proteico de oxidação avançada (AOPP), além do aumento na atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). A produção dessas espécies reativas aumentadas pode levar à inibição da atividade de algumas enzimas que são sensíveis à ação desses radicais por possuírem um grupamento sulfidril, como no caso da delta aminolevulinato desidratase ( $\delta$ -ALA-D), levando a disfunção celular e interferindo em diversos processos que ocorrem no organismo. O estresse oxidativo pode estar envolvido na patogênese da rangeliose (FRANÇA et al., 2012).

Em relação ao sistema imune foi observado aumento progressivo nas citocinas Interferon gama (IFN -  $\gamma$ ), Fator de necrose tumoral alfa (TNF -  $\alpha$ ), Interleucina -1 (IL - 1) e Interleucina - 6 (IL - 6) e nos níveis séricos de nitrito/nitrato comparado ao grupo controle. Essas alterações podem estar associadas com a proteção imunitária do hospedeiro contra o piroplasma, semelhante ao que ocorre em infecções por outros hemoparasitas (PAIM et al., 2013a). Em outro estudo realizado por Da Silva et al. (2012), foi observada diminuição nos níveis sérico de ferro e zinco e aumento nos níveis de cobre. A diminuição nos níveis do ferro deve-se, provavelmente, à regulação da hepcidina. Esse hormônio peptídeo aumenta em processos inflamatórios devido à estimulação pela IL - 6. A redução do zinco pode ser em função da participação na resposta imune contra o parasito. O aumento do cobre também pode estar associado à resposta imunológica, esse é transportado pela ceruloplasmina, uma proteína de fase aguda que aumenta em processos inflamatórios. Essas alterações indicam comprometimento metabólico.

Paim et al. (2013b), em um estudo com cães infectados experimentalmente com *R. vitalii*, observaram nos animais infectados, diminuição nas concentrações da proteína total sérica, da albumina, na  $\alpha$ -2 globulina e  $\beta$ -2 globulina acompanhados de aumento na  $\alpha$ -1 globulina e  $\gamma$ -globulina. Além de aumento na Proteína C reativa e na  $\alpha$ -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 parasita indiretamente (através da ativação de células) e/ou diretamente (ataque ao parasito).

Os achados de necropsia em cães infectados com *R. vitalii* incluem palidez (anemia), amarelecimento generalizado da carcaça (icterícia), das mucosas visíveis e dos órgãos internos, sangue mais claro e aquoso, aumento de volume do baço e dos linfonodos que ao corte apresentam-se avermelhados ou castanhos-escuros, úmidos e suculentos podendo apresentar extensas áreas esbranquiçadas. As tonsilas apresentam-se avermelhadas e aumentadas de volume, presença de grande quantidade de sangue coagulado ou fluido na luz intestinal e em menor quantidade no estômago, os pêlos da região perianal podem estar sujos e aglutinados por fezes diarreicas e sanguinolentas (LORETTI e BARROS, 2004a; LORETTI e BARROS, 2004b).

O fígado apresenta-se pálido e com acentuado padrão lobular, difusamente amarelado, a vesícula biliar encontra-se repleta e com a bile espessa e grumosa, pulmões úmidos pesados e não colapsados. Hemorragias de diferentes tamanhos são visualizadas afetando diversos órgãos e tecidos. A medula óssea encontra-se pastosa ou liquefeita e de coloração vermelha intensa, podendo preencher todo canal medular do fêmur, indicando hematopoese ativa. Edema subcutâneo gelatinoso nos membros pélvicos, coágulos lardáceos ou mistos nas câmaras cardíacas e acúmulo de quantidade moderada de líquido citrino e amarelo nas cavidades corporais (LORETTI e BARROS, 2004a; LORETTI e BARROS, 2004b).

Os achados histopatológicos no geral caracterizam-se por inflamação mononuclear, predominantemente plasmocitária de intensidade variável entre leve a moderada. O parasito é observado em vacúolos parasitóforos intra-citoplasmáticos em células endoteliais de capilares sanguíneos de diversos órgãos e tecidos. Os locais em que esse protozoário é encontrado com maior frequência são linfonodos, tonsilas, medula óssea, plexo coroide, rins, pulmões e região medular da glândula adrenal. Também pode ser observada hiperplasia linforeticular, em especial dos linfonodos, que podem conter células gigantes multinucleadas, com localização preferencialmente perivascular e macrófagos que preenchem os seios medulares e contêm hemácias em seu citoplasma ou hemossiderina (LORETTI e BARROS, 2004a).

Na avaliação histológica, é possível observar hematopoese extramedular, principalmente eritropoese e megacariocitopese no baço e fígado. No fígado também é possível observar necrose de coagulação centrolobular e acúmulo de pigmento biliar. A medula óssea apresenta acentuada hiperplasia trilinear, mas principalmente eritroide e megacariocítica, vista na forma de substituição do tecido adiposo por células hematopoiéticas com alta taxa mitótica, com diminuição na relação mieloide:eritroide e pelo aumento na

quantidade de megacariócitos e megacarioblastos. Em alguns casos observa-se aumento na população monocítica-macrofágica e linfoide. Em outros órgãos, como os rins, além da inflamação previamente descrita, é possível observar necrose tubular aguda e acúmulo de hemossiderina. No pulmão, presença de material róseo e homogêneo que pode obliterar a luz alveolar, e por vezes bronquiolar, além de em alguns casos núcleos de megacariócitos obliterando capilares e os septos alveolares (FIGHERA et al., 2010).

Geralmente o diagnóstico de rangelióse é presuntivo, feito com base no histórico, quadro clínico e resposta favorável à terapia. Somente em 4% dos casos este parasito pode ser encontrado na corrente sanguínea (FIGHERA, 2007). Nos últimos anos, estudo realizado pelo mesmo pesquisador demonstrou a ocorrência desse parasito livre no esfregaço sanguíneo em 11,1% dos casos estudados (FIGHERA et al., 2010). No entanto, em outro 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). Em cães infectados experimentalmente com *R. vitalii* o parasito foi observado no esfregaço de ponta de orelha no dia 5 pós-infecção, o pico da parasitemia ocorreu entre os dias 9 e 11 (PI), esses organismos encontravam-se livres no sangue, no interior de hemácias, neutrófilo e macrófagos em todos os animais infectados (DA SILVA et al., 2012) (Figura 3A, B, C e D).

Esse protozoário quando livre entre as células sanguíneas apresenta as seguintes medidas, comprimento de  $3,94 \pm 0,67 \mu\text{m}$  e largura de  $2,23 \pm 0,42 \mu\text{m}$ , o núcleo do parasito tem comprimento de  $0,97 \pm 0,17 \mu\text{m}$  e largura de  $0,84 \pm 0,11 \mu\text{m}$ . Quando no interior dos eritrócitos esse parasito tem comprimento de  $3,34 \pm 0,54 \mu\text{m}$  e largura de  $2,09 \pm 0,34 \mu\text{m}$ , o núcleo do parasito mede de comprimento  $1,07 \pm 0,20 \mu\text{m}$  e largura de  $0,87 \pm 0,15 \mu\text{m}$ . O tamanho dos parasitos encontrados dentro dos neutrófilos e monócitos é  $2,97 \pm 0,68 \mu\text{m}$  de comprimento e  $1,94 \pm 0,26 \mu\text{m}$  de largura e o núcleo dos parasitos mede de comprimento  $1,17 \pm 0,34 \mu\text{m}$  e largura de  $0,85 \pm 0,23 \mu\text{m}$  (DA SILVA et al., 2011).

Outra forma de diagnóstico da doença pode ser feito por punção aspirativa por agulha fina (PAAF) seguida de avaliação citológica dos esfregaços ou biópsia incisional do baço, dos linfonodos e da medula óssea, pode ser uma alternativa para o diagnóstico definitivo da rangelióse (FIGHERA, 2007) (Figura 4). 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, 2004a). Nas amostras de medula óssea coletadas durante a necropsia, frequentemente observa-se o parasito na avaliação citológica (LORETTI e BARROS, 2004a). Estudo recente demonstra a importância da biologia molecular para um diagnóstico acurado de rangelióse (SOARES et al., 2011).

Durante muitos anos essa doença foi erroneamente confundida com outras patologias que cursam com sinais clínicos similares. Toda essa confusão é fruto do desconhecimento sobre essa importante doença que teve suas pesquisas interrompidas após o ano de 1950 (KRAUSPENHAR et al., 2003). No diagnóstico diferencial devem ser incluídas doenças infecciosas e parasitárias que ocorrem em cães no Brasil que cursam com anemia, icterícia, febre, esplenomegalia, linfadenopatia e hemorragias (LORETTI e BARROS, 2004b).

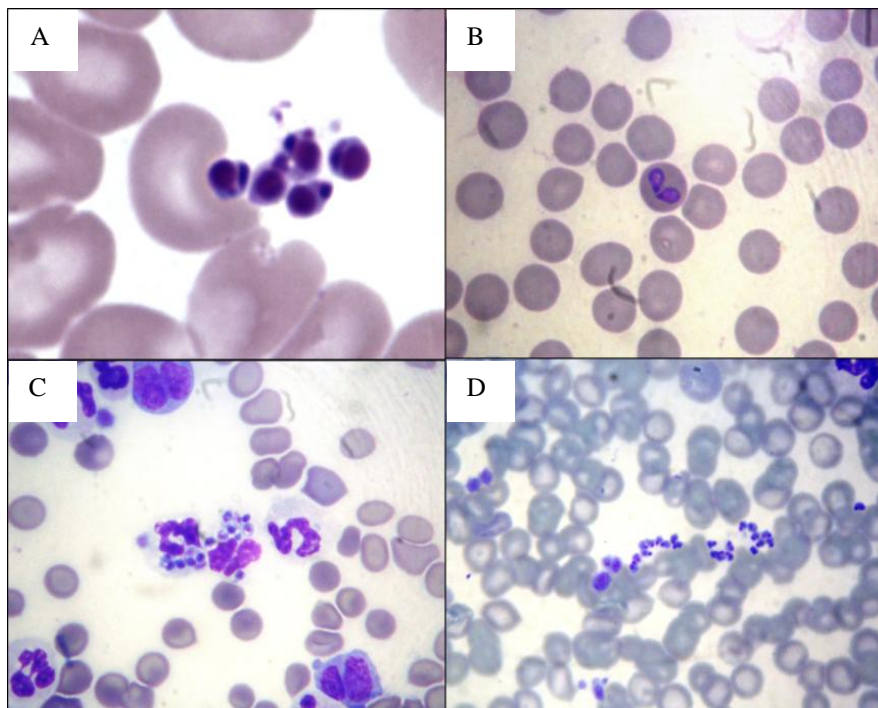


Figura 3- Esfregaços sanguíneos de cães infectados com *Rangelia vitalii* presença do protozoário: A) livres no sangue periférico, B) no interior de hemácia, C) no interior de neutrófilos e D) e livre no sangue periférico. (Coloração Panótico Rápido).

As enfermidades mais frequentemente confundidas com a rangelirose são a babesiose, ehrlichiose, leishmaniose, leptospirose e doenças que cursam com perda de sangue através do tubo digestivo, como verminoses gastrintestinais e úlceras gástricas. A anemia hemolítica imunomediada, associada a diferentes etiologias e idiopática, também deve ser incluída no diagnóstico diferencial dessa doença (LORETTI e BARROS, 2004a).

O tratamento empregado para cães diagnosticados com rangelirose é o mesmo utilizado para outras protozooses e riquetsioses sanguíneas de caninos e é feito a base de drogas protozoocidas. As drogas utilizadas comumente para o tratamento da rangelirose são

doxiciclina, dipropionato de imidocarb, aceturato de diminazeno e azul de tripan (CARINI e MACIEL, 1914; LORETTI e BARROS, 2004a; LORETTI e BARROS, 2004b; FRANÇA et al., 2010; DA SILVA et al., 2011). O *R. vitalii* tem se mostrado sensível a todas as drogas antiprotozoários (LORETTI e BARROS, 2004a).

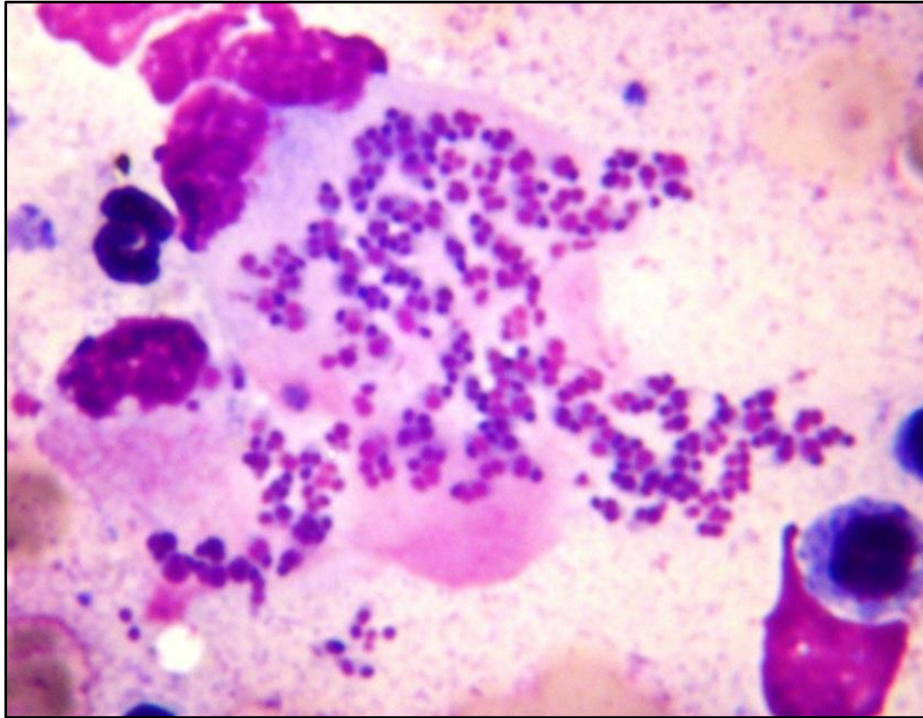


Figura 4- Amostra citológica de linfonodo de um canino acometido pela doença, evidenciando a presença de aglomerados de *Rangelia vitalii*. (Coloração Panótico Rápido).

A doxiciclina, um antibiótico bacteriostático que geralmente é utilizado no tratamento da ehrlichiose canina e da babesiose, tem sido amplamente utilizado no tratamento da rangelirose (LORETTI e BARROS, 2004a; FRANÇA et al., 2010). A utilização de corticóide é indicada para o tratamento da anemia hemolítica imunomediada que os animais podem desenvolver. Quando necessário, transfusão sanguínea e fluidoterapia também são recomendadas (LORETTI e BARROS, 2004a).

O aceturato de diminazeno é uma das drogas utilizadas para o tratamento da rangelirose, no entanto, apresenta baixo índice terapêutico. Nos animais tratados com aceturato de diminazeno não é possível observar o protozoário intracelular nos cortes histológicos após 24 horas da administração deste medicamento (LORETTI e BARROS, 2004a). O dipropionato de imidocarb é outra droga que tem ação protozoocida e tem sido amplamente

utilizada no tratamento da doença, apresenta alguns efeitos colaterais que podem ser minimizados, quando administrado juntamente com atropina (LORETTI e BARROS, 2004a). O azul tripan também seria eficiente no tratamento desse protozoário, todavia, o seu uso foi abandonado em função das diversas desvantagens envolvidas no uso desse medicamento (CARINI e MACIEL, 1914).

Esse protozoário permanece durante vários meses no sangue circulante dos cães tratados ou que tiveram recuperação espontânea. Cães que se recuperam da infecção adquirem imunidade contra uma nova infecção. A infecção por *R. vitalii* culmina com a morte do animal se o paciente não for tratado a tempo e de forma adequada (CARINI e MACIEL, 1914; KRAUSPENHAR et al., 2003).

## **2. ARTIGO**

### **Hematologic and bone marrow changes in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii***

Raquel T. França, Aleksandro S. Da Silva, Marcio M. Costa, Francine C. Paim, João F. Soares, Marcelo B. Labruna, Cinthia M. Mazzanti, Sonia T.A. Lopes.

*Artigo publicado pela Veterinary Clinical Pathology, v.42, n.1, p.31-39, 2013.*

## ORIGINAL RESEARCH

## Hematologic and bone marrow changes in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*

Raquel T. França<sup>1</sup>, Aleksandro S. Da Silva<sup>2</sup>, Marcio M. Costa<sup>1</sup>, Francine C. Paim<sup>1</sup>, João F. Soares<sup>3</sup>, Marcelo B. Labruna<sup>3</sup>, Cinthia M. Mazzanti<sup>1</sup>, Sonia T.A. Lopes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Small Animals, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria-RS, Brazil; <sup>2</sup>Department of Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Chapecó-SC, Brazil; and <sup>3</sup>Department of Veterinary Preventive Medicine and Animal Health, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo-SP, Brazil

### Key Words

Anemia, canine, hemolysis, myeloid:erythroid ratio, piroplasm

### Correspondence:

R.T. França, Departamento de Pequenos Animais, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi – 97, Hospital Veterinário, Sala 103, 97105-900, Santa Maria – RS, Brazil  
E-mail: raquelifranca@yahoo.com.br

DOI:10.1111/vcp.12023

**Background:** *Rangelia vitalii* is a tick-transmitted piroplasm that causes both hemolytic and hemorrhagic disease in dogs in Brazil.

**Objective:** The aim of this study was to evaluate the response of the bone marrow in dogs experimentally infected with *R. vitalii* during the acute stage of the disease.

**Methods:** For this study, 2 groups of a total of 12 young dogs were used. Group A was composed of healthy dogs ( $n = 5$ ), and group B consisted of animals infected with *R. vitalii* ( $n = 7$ ). Blood samples were collected on days 0, 10, 20, and 30 post-inoculation and stored in EDTA tubes for a full hematology profile, including a reticulocyte count. On days 10 and 20, bone marrow samples were collected, stained, and examined.

**Results:** In infected dogs anemia was identified on days 10 and 20 post-inoculation ( $P < .01$ ), and on day 20 reticulocytosis was present. Infected dogs had leukopenia due to neutropenia and eosinopenia, along with lymphocytosis and monocytosis, when compared with control animals. In bone marrow, the myeloid:erythroid ratio was significantly decreased ( $P < .05$ ) in infected dogs due to increased erythroid precursors.

**Conclusions:** Dogs experimentally infected with *R. vitalii* develop regenerative extravascular hemolytic anemia accompanied by erythroid hyperplasia in the bone marrow. During the acute phase of the disease, leukopenia due to neutropenia and eosinopenia suggests intense tissue recruitment of these cells in response to the endothelial damage caused by this parasite.

## Introduction

*Rangelia vitalii* is a tick-transmitted protozoan parasite of the phylum Apicomplexa, order Piroplasmida. It causes hemolytic and hemorrhagic disease in dogs referred to popularly as “*peste do sangue*” (blood plague), “*nambiuvú*” (bleeding ears), and “*febre amarela dos cães*” (yellow fever of dogs). To date, published reports about this tick-borne canine protozoan disease are limited to dogs in Brazil. Although this canine piroplasm was first described in 1908, many aspects of the life cycle and the pathophysiology are yet to be studied and reported.<sup>1</sup> It is believed that the ticks *Rhipicephalus sanguineus* and *Amblyomma aureolatum* transmit this pathogen since these 2 species of ticks have been found on the coat and in the environment of affected dogs.

However, this hypothesis has not been confirmed experimentally. *R. vitalii* affects mainly young dogs, especially in rural areas of Brazil.<sup>2,3</sup>

*Rangelia vitalii* replicates in endothelial cells of blood capillaries, RBCs, and WBCs (neutrophils and monocytes) and circulates free in the bloodstream. Clinical signs in affected dogs include lethargy, anorexia, weakness, weight loss, intermittent fever, dyspnea, and pale or jaundiced mucous membranes, as well as spleno-, hepato-, and lymphadenomegaly. In addition, mucosal and serosal petechiae, persistent bleeding from the nostrils, oral cavity, eyes, and edges of the pinnae, and hematemesis and bloody diarrhea are observed during the course of disease.<sup>1-8</sup>

Typical laboratory findings in dogs naturally infected with *R. vitalii* are those of an extravascular

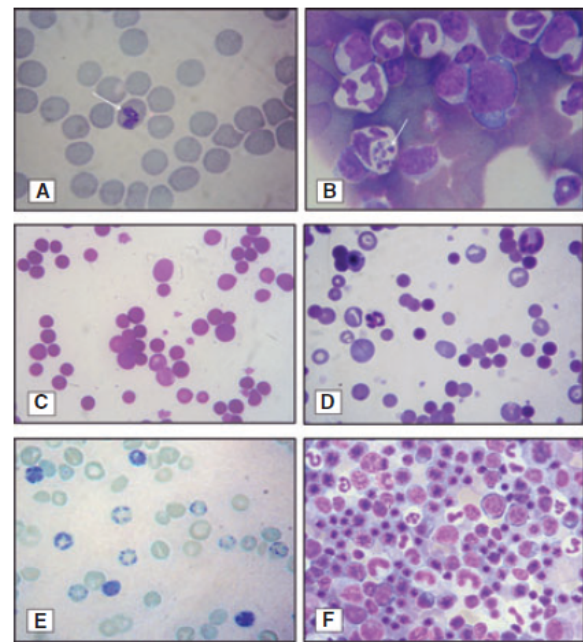
immune-mediated hemolytic anemia. They include anemia, spherocytosis, erythrophagocytosis, anisocytosis, polychromasia, metarubricitemia, and presence of Howell-Jolly bodies in RBCs in peripheral blood. Macroscopically visible autoagglutination (on the sides of the EDTA tube) suggests an immune-mediated hemolytic anemia.<sup>7</sup> Icteric plasma is noted in some cases. The leukogram is characterized by leukocytosis, lymphocytosis, monocytosis, and in some cases a left shift of the myeloid series.<sup>6,9</sup> Severe thrombocytopenia has been associated with bleeding diathesis in natural and experimental infections.<sup>6,10</sup> Other hemostatic disorders may occur simultaneously such as disseminated intravascular coagulation (DIC) and reduced platelet aggregation.<sup>5</sup>

In early reports the clinical course of *R vitalii* infection in dogs was divided into acute, subacute, and chronic phases.<sup>2</sup> Chronic clinical and pathologic findings include anemia, bleeding from the ears, subcutaneous edema of the hind limbs, weight loss, lymphadenopathy, mucosal petechiae, and inflammatory infiltrates composed mainly of lymphocytes, plasma cells, and macrophages in various organs such as kidneys, heart, tonsil, liver, spleen, and heart.<sup>4,6</sup> Since then, only 2 dogs have been infected experimentally. Their clinical and pathologic signs were described as follows: anorexia, lethargy, vomiting and dehydration, pale mucous membranes, enlarged lymph nodes, hemorrhage in lungs and epicardium, and inflammatory infiltrates in the myocardium.<sup>4,5</sup> However, hematologic data for experimentally infected dogs during the acute phase of disease were not reported. Therefore, the aim of this study was to evaluate hematologic changes and consequent bone marrow responses during the acute phase in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*.

## Material and methods

### Animals

In this study, 12 female mixed breed dogs (6–12 months old) were included as previously described.<sup>11</sup> At the beginning of a 30-day acclimatization period all dogs were treated with fenbendazole and praziquantel, and the blood was tested for *Babesia* spp,<sup>12</sup> *Hepatozoon* spp,<sup>13</sup> *Ehrlichia* spp,<sup>14</sup> and *R vitalii*<sup>15</sup> by PCR. Prior to inoculation, dogs were determined to be healthy based on physical examination, fecal analysis, CBC, and biochemical hepatic and renal profiles. The present study was approved by the Animal Welfare Committee of the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, protocol number 15/2010).



**Figure 1.** Peripheral blood smear (A-E) and bone marrow (F) from a dog experimentally infected with *R vitalii*. Note parasites in RBCs (A) and neutrophils (B), morphologic changes such as agglutination of RBCs (C) and spherocytes (D), increased numbers of reticulocytes (E), and nucleated erythroid precursors in bone marrow (F). A-D, F: Romanowsky; E: New methylene blue. A,B,E:  $\times 100$  objective; C,D,F:  $\times 40$  objective.

### Inoculum

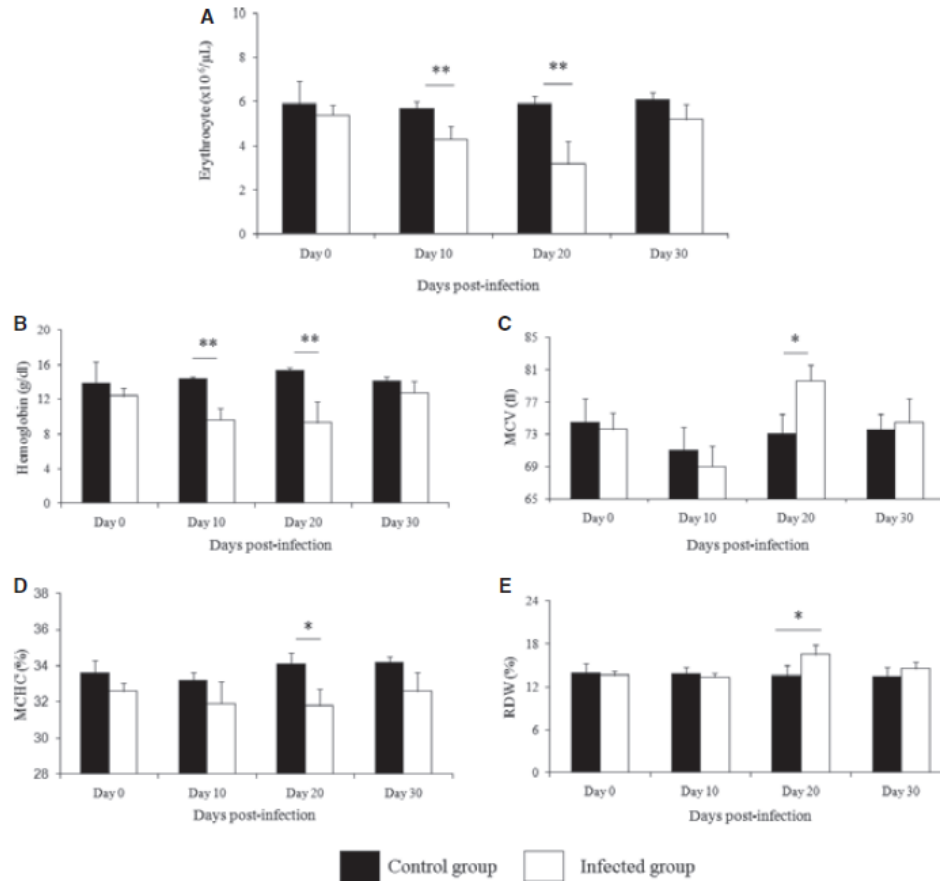
The inoculum for this study originated from a dog naturally infected with *R vitalii* from the city of Santa Maria, State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil,<sup>15</sup> as previously described.<sup>11</sup> Two mL of this blood were inoculated into the jugular vein of a 5-month-old male dog (study dog no. 13) that was maintained as a permanent piroplasm donor. Seven additional dogs were inoculated with *R vitalii* (from dog 13), and 5 animals were used as negative controls.

Blood smears from capillary blood collected with a hypodermic needle from the tip of the ear of each dog were prepared at 2-day intervals throughout the entire study period up to day 30 post-inoculation (PI). Romanowsky-stained smears were examined under 1000 $\times$  magnification by light microscopy for the presence of *R vitalii* organisms to document infection.<sup>11</sup>

### Hematology

Three mL of EDTA blood were collected from the jugular vein of each dog on days 0, 10, 20, and 30 PI for an





**Figure 2.** Group means  $\pm$  SD of RBC counts (A), hemoglobin concentration (B), MCV (C), MCHC (D), and RDW (E) in control dogs and dogs infected with *Rangelia vitalii* on days 0, 10, 20, and 30 post-infection. Asterisks represent significant differences between groups (\* $P < .05$ ; \*\* $P < .01$ ).

RBC count, hemoglobin (Hb) concentration, RDW, and WBC count. Cell counts were determined using an automated blood cell counter (Vet Auto Hematology Analyzer, model BC 2800, Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co, LTD, Shenzhen, China). The hematocrit was determined by centrifugation of microhematocrit tubes in a microhematocrit centrifuge (Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz, Germany) for 5 minutes at 19720g. MCV and MCHC were calculated. Blood smears were stained with a Romanowsky-type stain (Instant-Prov, Newprov, Pinhais, Brazil) for evaluation of RBC morphology and the WBC differential count. The reticulocyte count was performed by counting 1000 RBCs stained with new methylene blue.<sup>16</sup>

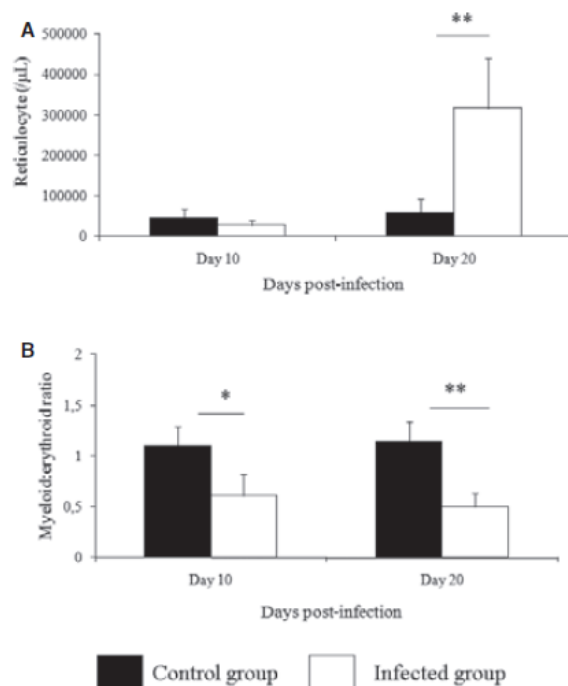
#### Bone marrow examination

On day 10 and day 20 PI a bone marrow sample was collected from the right humerus of each dog

under general anesthesia (ketamine [0.08 mg/kg] and xylazine [0.05 mg/kg]). Bone marrow smears were stained with a Romanowsky-type stain, and a complete differential count of 500 cells in different bone marrow particles was performed and the myeloid:erythroid (M:E) ratio was calculated. The latter was determined by counting 500 cells and dividing the number of all myeloid cells, including mature granulocytes, by the number of nucleated erythroid cells. Other cell types such as lymphocytes, plasma cells, and macrophages were recorded separately.<sup>17</sup>

#### Treatment

On day 21 PI, 6 inoculated dogs were treated with an intramuscular dose of diminazene aceturate (3.5 mg/kg, Ganaseg, Novartis, São Paulo, Brazil).<sup>11</sup> On day 30 PI, PCR for *R vitalii* was performed to evaluate the efficacy of treatment.<sup>11</sup>



**Figure 3.** Group means  $\pm$  SD of reticulocyte counts (A) and myeloid:erythroid ratio (B) in control dogs and dogs infected with *Rangelia vitalii* on days 10 and 20 post infection. Asterisks represent significant differences between groups (\* $P < .05$ ; \*\* $P < .01$ ).

### Statistical analysis

The results were subjected to analysis of variance, and means were compared by student *t*-test with significance set at  $P < .05$ .

## Results

### Preinoculation examination

The fecal exams were negative and all dogs were found to be free of ectoparasites (ticks and fleas) during the adaptation period and throughout the experiment (tested every 5 days). Hematologic and biochemical profiles on day 0 (or day 30 of the acclimatization period) just prior to inoculation were within reference intervals (data not shown). PCR testing for *Babesia* spp,<sup>12</sup> *Hepatozoon* spp,<sup>13</sup> *Ehrlichia* spp,<sup>14</sup> and *R vitalii*<sup>15</sup> during the acclimatization were always negative for all dogs. PCR was positive for *R vitalii* for the 7 infected dogs on day 10 PI.

### Parasitemia and clinical signs

These data were previously described.<sup>11</sup> The first *R vitalii* parasitemia was observed 5 days PI in capillary

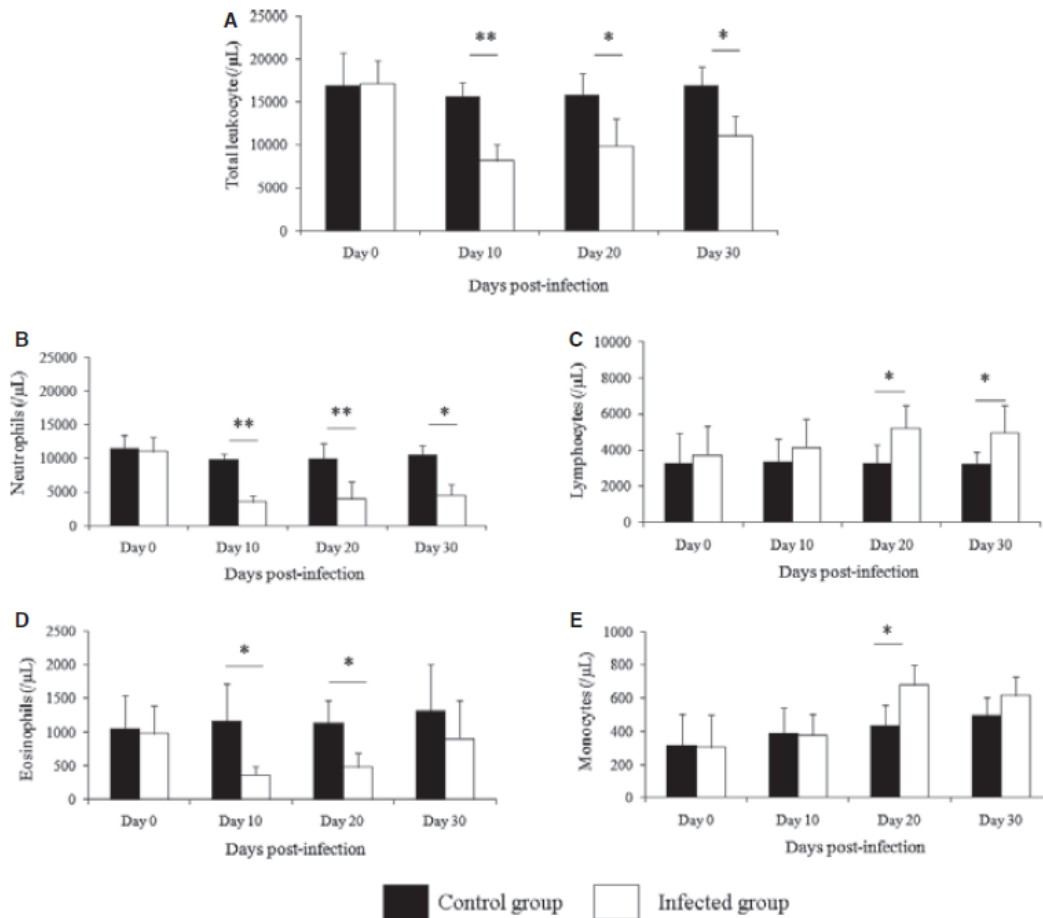
blood smears. The parasitemia increased progressively from day 5 reaching a peak on day 11 PI. *R vitalii* was found inside RBCs and WBCs (neutrophils and monocytes) between day 10 and day 20 PI when the differential WBC count was performed. Thereafter, the number of parasites gradually decreased and could not be found on blood smears between day 13 and 21 PI in some of the inoculated dogs, as described previously.<sup>11</sup> *R vitalii* was found inside RBCs (Figure 1A) and neutrophils (Figure 1B) and free in the background of the smears. Clinical signs such as anorexia, lethargy, weight loss, fever, anemia, and diarrhea with streaks of blood were observed in infected dogs between day 9 and day 21 PI.<sup>11</sup>

### Hematology

On day 10 PI the dogs infected with *R vitalii* developed normocytic normochromic anemia, characterized by significantly lower RBC counts, Hb concentrations, and hematocrits ( $P < .01$ ), which became macrocytic and hypochromic on day 20 PI and was accompanied by a significantly increased RDW ( $P < .05$ , Figure 2). Microscopic agglutination of RBCs on the slides, as well as spherocytosis, anisocytosis, polychromasia, and Howell-Jolly bodies in RBCs and metarubricytes were seen (Figure 1). In one of the infected dogs, autoagglutination on the sides of the blood tube was observed. There was an increased number of reticulocytes in dogs experimentally infected with *R vitalii* on day 20 PI ( $P < .01$ , Figures 1E and 3A). There was a significant decrease in the total WBC count on days 10, 20, and 30 PI due to neutropenia and eosinopenia (Figure 4). Concurrently, reactive lymphocytes and reactive monocytes were observed. There was a lymphocytosis on days 20 and 30 PI, as well as a monocytosis on Day 20 PI (Figure 4).

### Bone marrow

Bone marrow populations were characterized by a significant increase ( $P < .05$ ) in erythroid precursors on day 10 (rubriblasts and prorubricytes, Figure 5) and day 20 (rubriblasts, prorubricytes, rubricytes, and metarubricytes) PI and a relative decrease in myeloid precursors on day 10 (myelocytes and segmented neutrophils, Figure 6) and day 20 (bands and segmented neutrophils) PI. There was no difference on day 10 PI between the infected ( $2.7 \pm 0.31\%$ ) and control group ( $2.6 \pm 0.24\%$ ) in the percentage of other cells, such as lymphocytes, plasma cells, and macrophages, whereas on day 20 PI these cell types



**Figure 4.** Group means  $\pm$  SD of WBC (A), neutrophil (B), lymphocyte (C), eosinophil (D), and monocyte (E) counts in control dogs and dogs infected with *Rangelia vitalii* on days 0, 10, 20, and 30 post-infection. Asterisks represent significant differences between groups (\* $P < .05$ ; \*\* $P < .01$ ).

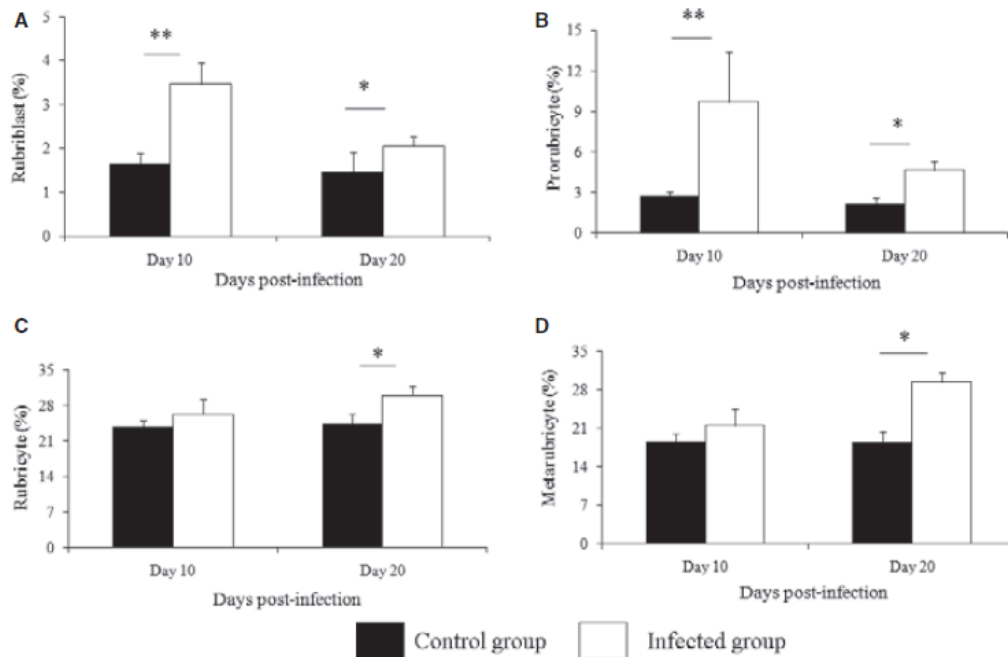
were more frequent in the infected animals ( $3.6 \pm 0.34\%$ ,  $P < .05$ ) than in controls ( $2.5 \pm 0.19\%$ ). Decreases in the M:E ratio were observed on day 10 and day 20 PI (Figures 1F and 3B,  $P < .05$ ).

#### Post treatment results

Blood smears were negative for *R. vitalii* within 24 hours after treatment with a single dose of diminazene aceturate. Nine days after treatment (day 30 PI), *R. vitalii* could not be identified either by microscopic examination of blood smears or PCR in previously inoculated animals. Clinically, there were no toxic effects of diminazene aceturate treatment in the experimental animals. On day 30 PI, 9 days post-treatment, all RBC values resolved to levels comparable to controls ( $P > .05$ ), whereas lymphocytosis and leukopenia due to neutropenia persisted ( $P < .05$ ) (Figures 2 and 4).

#### Discussion

In dogs naturally infected with *R. vitalii*, normocytic normochromic and macrocytic hypochromic anemia can be observed, similar to our experimental results.<sup>6,7</sup> Leukocytosis and leukopenia have also been noted in the natural disease in debilitated animals.<sup>6,7</sup> Morphologic changes during the acute phase of an experimental infection with *R. vitalii* infection together with the increased reticulocyte counts and decreased M:E ratios documented in this study now confirm that this anemia can be classified as a strongly regenerative and most likely hemolytic anemia. This is in agreement with other hemoparasitic infections such as canine babesiosis,<sup>18</sup> canine ehrlichiosis,<sup>19</sup> and canine hepatozoonosis.<sup>20</sup> Therefore, in young dogs with evidence of regenerative hemolytic anemia, in addition to infections with *Babesia* spp., *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis*,



**Figure 5.** Group means  $\pm$  SD of the percentage of erythroid precursors in control dogs and dogs infected with *Rangelia vitalii* on days 10 and 20 post-infection: (A) Rubriblasts, (B) prorubricytes, (C) rubricytes, and (D) metarubricytes. Asterisks represent significant differences between groups (\* $P < .05$ ; \*\* $P < .01$ ).

infection with *R vitalii* should be included in the differential diagnoses. Importantly, co-infection with these pathogens is also possible.<sup>6,8</sup>

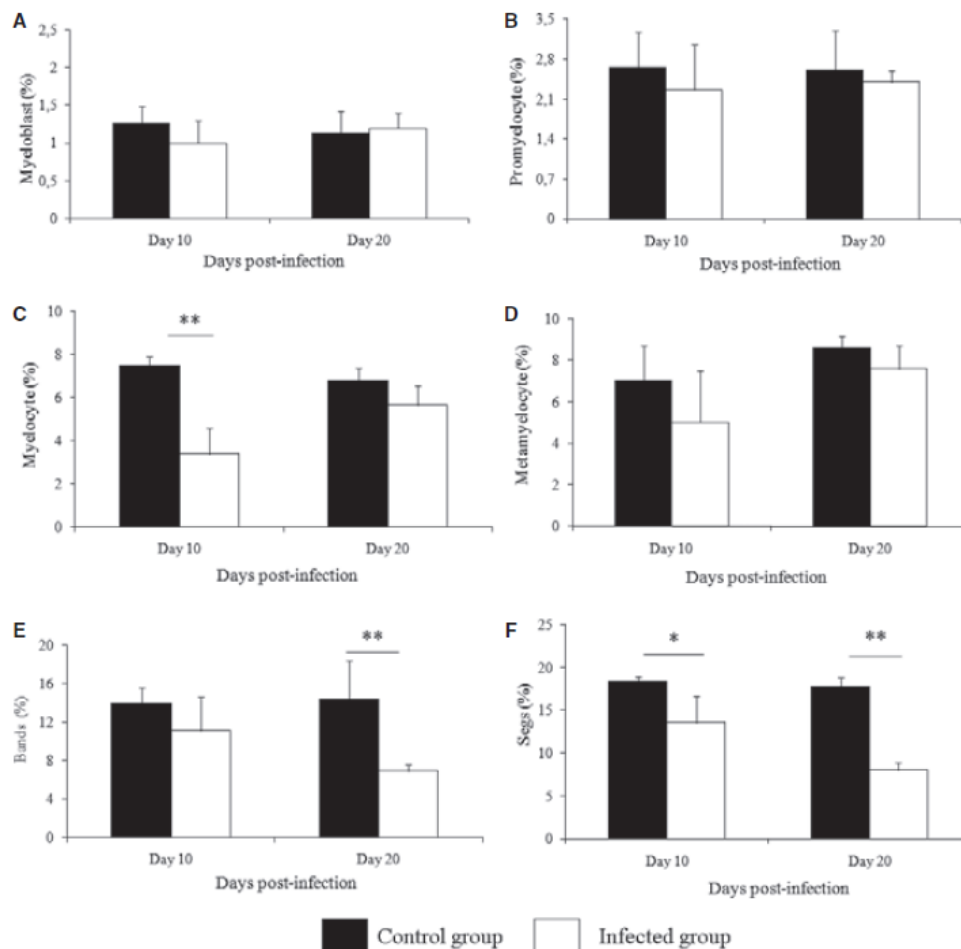
In dogs naturally infected with *R vitalii* anemia, severe jaundice, and bleeding can result in a fatal outcome in the absence of treatment.<sup>6,7</sup> The normocytic normochromic anemia and absence of reticulocytosis seen in the dogs on day 10 PI suggested relatively recent onset of hemolysis with insufficient time for an adequate regenerative erythroid marrow response at that time.<sup>21,22</sup> By day 20 PI regenerative macrocytic hypochromic anemia had developed, as confirmed by the reticulocytosis. These findings are similar to the response observed in dogs with babesiosis.<sup>22,23</sup> Altogether, the morphologic changes in RBCs observed in the present study are typical of immune-mediated extravascular hemolytic anemia with a regenerative response of bone marrow<sup>21</sup> and have been described in spontaneous natural *R vitalii* infection.<sup>4</sup>

Erythroid precursors in the bone marrow can increase 12 hours after the bone marrow is stimulated by erythropoietin. However, 2 to 3 days are necessary for erythroid hyperplasia to develop resulting in a significant decrease in the M:E ratio.<sup>17,21</sup> Our study showed a decrease in the M:E ratio on day 10 and day 20 PI, indicating an increase in the erythroid lineage to

compensate for anemia caused by *R vitalii* infection. Similar findings are reported in mice infected with *Babesia microti*.<sup>24</sup>

Hemolysis could be due to the erythrocytic cycle of the *R vitalii*. In the present study, anemia was observed during the peaks of parasitemia that occurred between days 9 and 11 PI.<sup>11</sup> In a retrospective study, dogs naturally infected with *R vitalii* developed hemolytic disease that was exclusively extravascular.<sup>7</sup> It is suggested that the anemia observed in dogs infected by *R vitalii* is due to an extravascular immune-mediated hemolysis or intravascular hemolysis due to parasite-related destruction of RBCs in peripheral blood. A similar pathogenesis has been proposed for canine babesiosis.<sup>25,26</sup> However, hemoglobinemia and hemoglobinuria as occur in *Babesia* spp. infection have not been observed in *R vitalii* infection. Splenic sequestration of RBCs in cases of immune-mediated hemolytic extravascular anemia results in splenomegaly, which is a common finding in cases of *R vitalii* infection in dogs.<sup>4,5</sup>

In this study, there was no evidence for compromised erythropoietic bone marrow activity since increased reticulocyte counts after an adequate time lag and a decrease in the M:E ratio were seen. The leukogram of dogs affected by *R vitalii* often shows



**Figure 6.** Group means  $\pm$  SD of the percentage of myeloid precursors in control dogs and dogs infected with *Rangelia vitalii* on days 10 and 20 post-infection: (A) Myeloblasts, (B) promyelocytes, (C) myelocytes, (D) metamyelocytes, (E) bands, and (F) segs. Asterisks represent significant differences between groups (\* $P < .05$ ; \*\* $P < .01$ ).

leukocytosis due to neutrophilia with a left shift. In some cases, a leukemoid reaction is present, but leukopenia can also be observed.<sup>7,9</sup> However, in our study there was leukopenia due to neutropenia and eosinopenia during the acute phase of the infection. Similar findings have been observed in dogs infected with *B canis*, *E canis*, and *Trypanosoma* sp.<sup>7,19,26-29</sup>

Dogs infected with *R vitalii* had peak parasitemia between days 9 and 11 PI. It has been suggested that damage to endothelial cells in blood capillaries induced by *R vitalii* may trigger a systemic inflammatory response resulting in the migration of neutrophils and eosinophils to tissues to attack the parasite.<sup>5</sup> This would explain the reduction in these 2 cell types in peripheral blood and in the storage compartment of the bone marrow during the acute

phase of this disease. Histologically, the inflammation observed in multiple organs in cases of *R vitalii* infection in dogs is composed mainly of plasma cells, but monocytes, lymphocytes, macrophages, and multinucleated giant cells are also noted.<sup>4,5,7</sup>

Lymphocytosis and lymphoid hyperplasia in spleen and lymph nodes are attributed to antigenic stimulation induced by this parasite, comparable to what occurs in babesiosis, ehrlichiosis, trypanosomosis, and leishmaniasis.<sup>7,30-33</sup> Monocytes migrate into the tissues and transform into macrophages.<sup>21</sup> These cells can phagocytize bacteria, protozoa, damaged cells, cellular debris, and foreign particles.<sup>16</sup> Erythrophagocytosis has been investigated in vitro in dogs with babesiosis.<sup>34</sup> There was increased activity of these phagocytic cells in response to *B gibsoni* infec-

tion.<sup>34</sup> Phagocytosis of RBCs and zoites of *R. vitalii* by circulating monocytes also has been observed.<sup>6</sup> Our study showed monocytosis on day 20 PI, which coincided with the reduction in the number of parasites on peripheral blood smears.<sup>11</sup> In natural cases of *R. vitalii* infection in dogs, monocytosis has been noted<sup>7</sup> and is also a common finding in the leukogram of dogs with intra- and extravascular hemolysis.<sup>21</sup>

In the present study, the erythrogram normalized after treatment with the antiprotozoal drug. Changes in the leukogram 9 days after treatment suggested ongoing antigenic stimulation in spite of the absence of parasitemia on peripheral blood smears.

The findings of increased numbers of reticulocytes and decreased M:E ratios in our experimental study suggest that *R. vitalii* induces a regenerative and mostly extravascular hemolytic anemia. This anemia coincided with leukopenia due to neutropenia and eosinopenia, as well as lymphocytosis and monocytosis. These findings are similar to those seen in the natural disease.<sup>4,6,7</sup>

#### Acknowledgments

This research was funded by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). We thank Sílvia G. Monteiro, Carlos Breno Paim, Carlos do Amaral, and Guilherme Dornelles for their help in this experimental study.

*Disclosure:* The authors have indicated that they have no affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in, or in financial competition with, the subject matter or materials discussed in this article.

#### References

1. Carini A. News about zoonoses observed in Brazil. *Rev Méd.* 1908;28:459–462.
2. Pestana BR. O nambiuvú [The nambiuvú]. *Rev Méd.* 1910;22:423–426.
3. Carini A, Maciel J. About the disease of dogs called Nambi-Uvú and its parasite (*Rangelia vitalii*). *An Paul Med Circ.* 1914;3:65–71.
4. Krauspenhar C, Figuera RA, Graça DL. Protozoan-associated hemolytic disease in dogs. *Med Vep.* 2003; 1:273–281.
5. Loretto AP, Barros SS. Hemorrhagic disease in dogs infected with an unclassified intraendothelial piroplasm in southern Brazil. *Vet Parasitol.* 2005;134:193–213.
6. França RT, Da Silva AS, Paim FC, et al. *Rangelia vitalii* in dogs in southern Brazil. *Comp Clin Pathol.* 2010;19:383–387.
7. Figuera RA, Souza TM, Kommers GG, Irigoyen LF, Barros CSL. Pathogenesis, clinical, hematological, and pathological aspects of *Rangelia vitalii* infection in 35 dogs (1985–2009). *Pesq Vet Bras.* 2010;30:974–987.
8. Loretto AP, Barros SS. Parasitism by *Rangelia vitalii* in dogs (“nambiuvú”, “peste de sangue”) – a critical review on the subject. *Arq Inst Biol.* 2004;71:101–131.
9. Figuera RA. Rangeliose [Rangioliolosis]. *Acta Sci Vet.* 2007;35:261–263.
10. Paim CB, Paim FC, Da Silva AS, et al. Thrombocytopenia and platelet activity in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. *Vet Parasitol.* 2012;185: 131–137.
11. Da Silva AS, França RT, Costa MM, et al. Experimental infection with *Rangelia vitalii* in dogs: acute phase, parasitemia, biological cycle, clinical-pathological aspects and treatment. *Exp Parasitol.* 2011;128:347–352.
12. Spolidorio MG, Campos WNS, Melo ALT, et al. Molecular detection of *Hepatozoon canis* and *Babesia canis vogeli* in domestic dogs from Cuiabá, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2011;20:253–255.
13. Criado-Fornelio A, Ruas JL, Casadom N, et al. New molecular data on mammalian *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Adeleorina) from Brazil and Spain. *J Parasitol.* 2006;92:93–99.
14. Labruna MB, McBride JW, Camargo LM, et al. A preliminary investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. *Vet Parasitol.* 2007;143:189–195.
15. Soares JF, Giroto A, Brandão PE, et al. Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. *Vet Parasitol.* 2011;180:203–208.
16. Thrall MA. *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. 1st ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2004:518.
17. Harvey JW. *Atlas of Veterinary Hematology: Blood and Bone Marrow of Domestic Animals*. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company; 2001:228.
18. Irwin P. Canine babesiosis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2010;40:1141–1156.
19. Rungsipipat A, Oda M, Kumposiri N, et al. Clinicopathological study of experimentally induced canine monocytic ehrlichiosis. *Comp Clin Pathol.* 2009;18:13–22.
20. Mundim A, Morais I, Tavares M, Cury M, Mundim M. Clinical and hematological signs associated with dogs naturally infected by *Hepatozoon* sp. and with other hematozoa: a retrospective study in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol.* 2008;153:3–8.

21. Feldman BV, Zinkl JG, Jain NC. *Schalm's Veterinary Hematology*. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2000:787.
22. Cowgill E, Neel J, Grindem C. Clinical application of reticulocyte counts in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2003;33:1223–1244.
23. Meinkoth JH, Kocan AA, Loud SD, Lorenz MD. Clinical and hematologic effects of experimental infection of dogs with recently identified *Babesia gibsoni*-like isolates from Oklahoma. *J Am Vet Med Assoc*. 2002;220:185–189.
24. Hussein HS. The bone marrow response during *Babesia hylomysci* and *Babesia microti* infections in mice. *J Comp Pathol*. 1982;92:613–620.
25. Wenyon CM. *Protozoology: A Manual for Medical Men Veterinarians and Zoologists*. 1st ed. London: Bailliére Tindall and Cox; 1926:1012–1022.
26. Levine ND. *Protozoan Parasites of Domestic Animals and Man*. 2nd ed. Minneapolis, MN: Burgess Publishing; 1973:406.
27. Schettersa PM, Kleuskensa JAGM, Van De Crommertta J, De Leeuw PWJ, Finiziob AL, Gorenflot A. Systemic inflammatory responses in dogs experimentally infected with *Babesia canis*; a haematological study. *Vet Parasitol*. 2009;162:7–15.
28. Waner T, Harrus S, Bark H, Bogin E, Avidar Y, Keysary A. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. *Vet Parasitol*. 1997;69:307–317.
29. Da Silva AS, Wolkmer P, Costa MM, et al. Relação parasitemia e leucograma de gatos infectados com *Trypanosoma evansi* [Parasitemia and leukogram of cats infected with *Trypanosoma evansi*]. *Semina: Ciên Agr*. 2010;31:699–706.
30. Zygnier W, Gójska O, Rapacka G, Jaros D, Wedrychowicz H. Hematological changes during the course of canine babesiosis caused by large *Babesia* in domestic dogs in Warsaw (Poland). *Vet Parasitol*. 2007;145:146–151.
31. Codner EC, Farris LL. Characterization of the subclinical phase of ehrlichiosis in dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 1986;189:47–50.
32. Paim FC, Duarte MMF, Costa MM, et al. Cytokines in rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. *Exp Parasitol*. 2011;128:365–370.
33. Costa-Val AP, Cavalcanti RR, Gontijo NF, et al. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. *Vet J*. 2007;174:636–643.
34. Murase T, Maede Y. Increased erythrophagocytic activity of macrophages in dogs with *Babesia gibson* infection. *J Vet Sci*. 1990;52:321–327.

## CONCLUSÃO

A *R. vitalii* na fase aguda da infecção leva a aumento no número de reticulócitos e uma diminuição na relação mieloide:eritroide, este protozoário também induz uma anemia hemolítica extravascular regenerativa. Essa anemia coincide com leucopenia devido à redução da contagem de neutrófilos e eosinófilos, bem como linfocitose e aumento de monócitos. Estes resultados são semelhantes aos observados na infecção natural.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em nossa rotina laboratorial nos deparamos com inúmeros casos de anemia, os patologistas clínicos e os clínicos de pequenos animais devem incluir a rangelirose como diagnóstico diferencial. Sempre que o animal apresentar anemia ou trombocitopenia o esfregaço de ponta de orelha deve ser incluído no auxílio ao diagnóstico, embora ainda não se saiba qual a sensibilidade e especificidade desse exame para o diagnóstico desse hemoparasita, em nossa rotina essa análise tem se mostrado de muita valia para o diagnóstico desta doença.

A rangelirose até o momento foi descrita somente no Brasil, os recentes aumentos no número de animais de estimação e a movimentação desses animais tanto em território nacional quanto internacional, em conjunto com as mudanças climáticas, essa doença não deve ser desconsiderada como diagnóstico diferencial em todo país e em outras partes do mundo. Clínicos que atendam cães com histórico de viagem que apresentem anemia devem incluir essa doença no seu diagnóstico diferencial, os patologistas clínicos e clínicos de pequenos animais devem manter-se atualizados sobre a disseminação progressiva desse protozoário e seus vetores.

## REFERÊNCIAS

- ANFOSSI, G. et al. Adenosine increases human platelet levels of cGMP through role in this antiaggregating effect. **Thrombosis Research**, v.105, n.1, p.71 - 78, 2002.
- BIRK, A.V. et al. Role of extracellular ATP metabolism in regulation of platelet reactivity. **The Journal Laboratory and Clinical Medicine**, 140, 166–175, 2002.
- 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.
- CHAUDHURI, S. et al. Erythrocytic antioxidant defense, lipid peroxides level and blood iron, zinc and copper concentrations in dogs naturally infected with *Babesia gibsoni*. **Research in Veterinary Science**, v.85, n.1, p.120 - 124, 2008.
- 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**, Jaboticabal, v. 21, n. 3, p. 243 - 248, 2012.
- 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, n. 4, p. 347 - 352, 2011.
- DA SILVA, A. S. et al. Influence of *Rangelia vitalii* (Apicomplexa: Piroplasmorida) on Copper, Iron, and Zinc Bloodstream Levels in Experimentally Infected Dogs. **Journal of Parasitology**, v.98, n.5, p.1018 - 1020, 2012.
- FIGHERA, R. A. Rangeliose. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, n. 2, 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, n. 11, p. 974-987, 2010.
- FRANÇA, R. T. et al. *Rangelia vitalii*, in dog in southern Brazil. **Comparative Clinical Pathology**, v. 19, n. 4, p. 383-387, 2010.

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, n.3, p.1309-1313, 2012.

GÖDECKE, A. cAMP: fuel for extracellular adenosine formation? **British Journal of Pharmacology**, v.153, n.6, p.1087-1089, 2008.

HARVEY, J. W. **Veterinary Hematology: a diagnostic guide and color atlas**. Elsevier, 2012

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, n. 4, p. 273-281, 2003.

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, n.2, p.137-142, 2012.

LORETI, 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, n.1, p. 101-131, 2004a.

LORETI, A. P.; BARROS, S. S. Infecção por *Rangelia vitalli* (“Nambiuvú”, “Peste de Sangue”) em caninos: Revisão. **Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação - Medvep**, v.2, n.6, p.128 -144, 2004b.

PAIM, C. B. et al. Thrombocytopenia and platelet activity in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. **Veterinary Parasitology**, v. 185, n. 2-4, 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, n.2, p.252 - 257, 2012b.

PAIM, F. C. et al. Increased cytokine and nitric oxide in serum of dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. **Korean Journal of Parasitology**, vol.51, n.1-5, p.1-5, *in press*. 2013a.

PAIM, F. C. et al. Serum proteinogram, acute phase proteins and immunoglobulins in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. **Veterinary Parasitology**, v.192, n.1-3, p.137-142, 2013b.

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

SCHETINGER, M. R. C. et al. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. **BioFactors** (Oxford) v.31, n.2, p.77 - 98, 2007.

SOARES, J. F. et al. Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 3, 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**, 2012, São Luis-MA. Anais do XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, p. 132, 2012.

WEISS, D. J.; WARDROP K. J. **Schalm's veterinary hematology**. 6th ed. Wiley Blackwell, 2010.

WOLKMER, P. et al. Lipid peroxidation associated with anemia in rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Veterinary Parasitology**, v.165, n.1-2, p.41-46, 2009.

WOULFE, D. et al. ADP and platelets: the end of the beginning. **Journal of Clinical Investigation** v.107, n.12, p.1503 - 1505, 2001.

YEGUTKIN, G. Nucleotide and nucleoside converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signaling cascade. **Biochemistry Biophysics Acta**, v.1783, n.5, p.673-694, 2008.