



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA
E PARASITOLOGIA APLICADAS**



Renata Lima de Miranda

**PREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA ESPÉCIE DE
Hepatozoon E PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE CÃES
(*Canis familiaris*) NATURALMENTE INFECTADOS PROCEDENTES DA
MICRORREGIÃO DE UBERLÂNDIA – MG.**

**Uberlândia – MG
2013**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA
E PARASITOLOGIA APLICADAS**



Renata Lima de Miranda

**PREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA ESPÉCIE DE
Hepatozoon E PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE CÃES
(*Canis familiaris*) NATURALMENTE INFECTADOS PROCEDENTES DA
MICRORREGIÃO DE UBERLÂNDIA – MG.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da
Universidade Federal de Uberlândia, para a
obtenção do título de Doutor(a).

Prof^a. Dr^a. Márcia Cristina Cury
Orientadora

**Uberlândia – MG
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M672p Miranda, Renata Lima de, 1983-
2013 Prevalência e caracterização molecular da espécie de *Hepato-*
 zoon e parâmetros hematológicos e bioquímicos de cães (*Canis*
 familiaris) naturalmente infectados procedentes da microrregião
 de Uberlândia – MG / Renata Lima de Miranda. -- 2013.
 72 f. : il.

Orientadora: Márcia Cristina Cury.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pro-
grama de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplica-
das.

Inclui bibliografia.

1. Parasitologia - Teses. 2. Parasitologia veterinária - Teses.
3. Cão - Doenças - Teses. 4. Cão - Parasito - Teses. I. Cury,
Márcia Cristina. II. Universidade Federal de Uberlândia. Progra-
ma de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
III. Título.

CDU: 576.8



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas
www.imunoparasito.ufu.br - E-Mail: coipa@ufu.br - Telefax: (034)3218-2333
Av. Pará 1720 - Campus Umuarama 38400-902 Uberlândia MG



Renata Lima de Miranda

“Prevalência e caracterização molecular da espécie de *Hepatozoon* e parâmetros hematológicos e bioquímicos de cães (*Canis familiaris*) naturalmente infectados procedentes da microrregião de Uberlândia – MG”

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Doutor(a).

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Banca examinadora:

Uberlândia, 28 de fevereiro de 2013.

Prof^a. Dr^a. Lúcia Helena O'Dwyer de Oliveira
UNESP/BOTUCATU

Prof. Dr. Carlos Luiz Massard
UFRRJ/Rio de Janeiro

Prof. Dr. Antonio Vicente Mundim
FAMEV/UFU

Prof. Dr. Fernando Antônio Ferreira
FAMEV/UFU

Prof^a. Dr^a. Márcia Cristina Cury
ICBIM/UFU

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

Cláudio Sérgio de Miranda e Vane Maria de Lima Miranda pelo incentivo e amor.

Aos meus irmãos e afilhado,

Fernanda, Cláudio e Pedro Henrique.

Ao meu marido,

Ricardo, pelo amor, dedicação, companheirismo e carinho essenciais.

Aos meus amigos felinos e caninos,

Rebeca, Francine e Dimmig.

“A persistência é o menor caminho do êxito”
Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dr^ª. Márcia Cristina Cury pela confiança, profissionalismo, oportunidade de realizar este trabalho e pelos valiosos conselhos.

Ao Prof^º Antonio Vicente Mundim, pelo acompanhamento durante toda a minha formação acadêmica, incentivo, paciência e dedicação.

À Prof^ª Lúcia Helena O'Dwyer, pela oportunidade de trabalho em equipe.

À Prof^ª. Ms. Maria José Santos Mundim, pelo incentivo no início de doutoramento.

Ao Prof^º. Dr. Gad Baneth, pelos ensinamentos e dedicação.

Ao Prof^º. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla, por autorizar o uso do Laboratório de Epidemiologia Molecular da Universidade Estadual Paulista (UNESP).

Aos colegas do Departamento de Parasitologia da UNESP, Larissa, Betina, Denise, Adriano, Karina, pela importante colaboração na execução do projeto.

Aos residentes, técnicos e professores do Hospital Veterinário da UFU: Prof^º. Fernando Cristino, Sebastião, Felipe e Célia, pela companhia diária e convivência agradável.

Às amigas: Débora, Rosa e, principalmente, Jacqueline, pela participação direta na coleta das amostras.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, Lucélia e Luceneide.

Aos cães e seus proprietários, que gentilmente nos receberam em suas propriedades.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
cm	Centímetro
nº	Número
bp	Pares de base
µL	Microlitro
mL	Mililitros
mM	Milimolar (10^{-3} M)
µm	Micro (10^{-6} m)
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHGM	Concentração de hemoglobina globular média
CK	Creatina quinase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA K ₃	Ácido etilenodiaminotetracético sal tripotássico
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FAL	Fosfatase alcalina
FAMEV	Faculdade de Medicina Veterinária
GGT	Gama glutamil transferase
LDH	Lactato desidrogenase
IFCC	Internacional Federation of Clinical Chemistry
MGG	May-Grünwald-Giemsa
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Ph	Potencial hidrogeniônico
RDW	Amplitude de distribuição das hemácias (Red Cell Distribution Width)
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RNA	Ácido ribonucleico
SD	Desvio padrão
TAE	Tris-Acetato EDTA
UFU	Universidade Federal de Uberlândia

UNESP	Universidade Estadual Paulista
UV	Ultravioleta
V	Volts
VGM	Volume globular médio
VPM	Volume plaquetário médio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Área rural da microrregião de Uberlândia, MG, Brasil.....	25
Figura 2 – Coleta de sangue por punção da veia cefálica e distribuição da amostra em tubos estéreis com anticoagulante EDTA e sem anticoagulante com gel separador e ativador de coágulo.....	27
Figura 3 – Coleta de sangue periférico e confecção da lâmina de extensão sanguínea.....	27
Figura 4 – Amostras de sangue em tubos estéreis com EDTA em homogeneização e aparelho hematológico automático ABC VET®.....	29
Figura 5 – Amostras de sangue em tubos estéreis sem anticoagulante com ativador de coágulo centrifugados e aparelho bioquímico automático ChemWell®.....	29
Figura 6 – Gamonte de <i>Hepatozoon</i> sp. (seta) em neutrófilo na extensão sanguínea de vaso periférico (Barra = 25µm)	33
Figura 7 – Identificação da espécie <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> : a) Peritrema oval b) Palpo curto e menor que hipostômio.....	38
Figura 8 – Oocisto maduro de <i>Hepatozoon</i> sp. removido da hemolinfa de uma fêmea semi-ingurgitada de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> encontrada em um cão naturalmente infectado (Barra = 100µm).....	39
Figura 9 – Uso do conjunto de primes do gene 18S rRNA gênero específico (HepF e HepR) para a detecção de <i>Hepatozoon</i> sp. em extratos de DNA de sangue de cães (A) e da hemocle de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (B), naturalmente infectados. Símbolos: MM (marcador de peso molecular); CP (controle positivo); CN (controle negativo); POS (positivo); NEG (negativo).....	40
Figura 10 – Árvore filogenética analisada pelo método Neighbor Joining (NJ) comparando fragmentos de 532 pares de base do gene 18S rRNA de <i>Hepatozoon canis</i> do cão da área rural de Uberlândia (JN835188) e da hemolinfa da fêmea de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (HQ 605710).....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Prevalência de <i>Hepatozoon</i> sp. segundo método de extensão sanguínea de vaso periférico em cães naturalmente infectados de Uberlândia, MG, Brasil, de acordo com procedência, sexo e faixa etária.....	34
Tabela 2 – Prevalência de <i>Hepatozoon</i> sp. segundo a técnica de PCR em cães naturalmente infectados de Uberlândia, MG, Brasil, de acordo com procedência, sexo e faixa etária.....	34
Tabela 3 – Prevalência de <i>Hepatozoon</i> sp. segundo a técnica de PCR correlacionando procedência e sexo de cães naturalmente infectados de Uberlândia, MG, Brasil.....	35
Tabela 4 – Prevalência de <i>Hepatozoon</i> sp. segundo a técnica de PCR correlacionando procedência e faixa etária de cães naturalmente infectados de Uberlândia, MG, Brasil.....	36
Tabela 5 – Prevalência de <i>Hepatozoon</i> sp. segundo as técnicas de PCR e extensão sanguínea de vaso periférico em cães naturalmente infectados de Uberlândia, MG, Brasil.....	36
Tabela 6 – Número de cães com infecções concomitantes a <i>Hepatozoon</i> sp. em extensões sanguíneas de vaso periférico, de acordo com a procedência.....	37
Tabela 7 – Número de cães infestados com carrapato nas áreas rural e urbana de Uberlândia, MG, Brasil.....	38
Tabela 8 – Médias e desvios padrão dos parâmetros bioquímicos séricos de cães das áreas rural e urbana de Uberlândia, MG, positivos para <i>Hepatozoon canis</i> (P) e positivos para <i>H. canis</i> com infecção concomitante (PO).....	43
Tabela 9 – Frequência (%) de cães de Uberlândia, MG, positivos para <i>Hepatozoon canis</i> . em relação aos resultados bioquímicos séricos.....	44
Tabela 10 – Médias e desvios padrão dos parâmetros bioquímicos séricos de fêmeas e machos de Uberlândia, MG, positivos para <i>Hepatozoon canis</i> das áreas rural e urbana.....	45
Tabela 11 – Médias e desvios padrão dos parâmetros bioquímicos séricos de filhotes e adultos de Uberlândia, MG, positivos para <i>Hepatozoon canis</i> das áreas rural e urbana.....	46
Tabela 12 – Médias e desvios padrão dos parâmetros hematológicos de cães das áreas rural e urbana de Uberlândia, MG, positivos para <i>Hepatozoon canis</i> (P) e positivos para <i>Hepatozoon canis</i> com infecção concomitante (PO).....	47
Tabela 13 – Frequência (%) de cães de Uberlândia, MG, positivos para <i>Hepatozoon canis</i> em relação aos resultados hematológicos.....	48

Tabela 14 – Médias e desvios padrão dos parâmetros hematológicos de fêmeas e machos de Uberlândia, MG, positivos para <i>Hepatozoon canis</i> das áreas rural e urbana.....	49
--	-----------

Tabela 15 – Médias e desvios padrão dos parâmetros hematológicos de filhotes e adultos de Uberlândia, MG, positivos para <i>Hepatozoon canis</i> das áreas rural e urbana.....	50
---	-----------

SUMÁRIO

RESUMO	12
ABSTRACT.....	13
1 – INTRODUÇÃO	14
2 – OBJETIVOS.....	24
2.1 – Geral.....	24
2.2 – Específicos	24
3 – MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 – Aspectos éticos	25
3.2 – Área de estudo	25
3.3 – Animais do estudo	25
3.4 – Coleta das amostras de sangue circulante	26
3.5 – Coleta de sangue periférico e preparo de extensões sanguíneas	27
3.6 – Coleta e identificação dos carrapatos	28
3.7 – Dissecção dos carrapatos e análises das hemolinfas.....	28
3.8 – Processamento das amostras sanguíneas	28
3.8.1 – Hemograma	28
3.8.2 – Bioquímica	29
3.9 – Técnica molecular	30
3.9.1 – Extração do DNA (Ácido desoxirribonucleico)	30
3.9.2 – PCR	30
3.9.3 – Sequenciamento	31
3.9.4 – Árvore filogenética	32
3.10 – Análise estatística	32
4 – RESULTADOS	33
4.1 – Prevalência do <i>Hepatozoon</i> sp.....	33
4.1.1 – Pela técnica de extensão sanguínea	33
4.1.2 – Pela PCR	34
4.2 – Comparação entre métodos de diagnósticos	36
4.3 – Presença de infecção concomitante a <i>Hepatozoon</i> sp.....	36
4.4 – Carrapatos	37
4.5 – Positividade dos carrapatos.....	38

4.6 – Análise da PCR, sequenciamento e árvore filogenética.....	39
4.7 – Perfil bioquímico sérico	41
4.8 – Perfil hematológico.....	41
5 – DISCUSSÃO	51
6 – CONCLUSÕES	58
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXO I	71
ANEXO II	72

RESUMO

A Hepatozoonose canina tem ganhado importância na Medicina Veterinária, como infecção emergente. A maioria dos casos em Minas Gerais, Brasil, foi diagnosticada mediante testes laboratoriais ocasionais. Este estudo objetivou a caracterização do isolado de *Hepatozoon* sp. em cães naturalmente infectados procedentes de áreas urbana e rural da microrregião de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. Além disso, determinou a prevalência pelas técnicas convencional e molecular, identificou gêneros ou espécies de carrapatos e, promoveu avaliação bioquímica sérica e hematológica dos animais positivos. Foram coletadas, de cada animal, amostras de sangue circulante e periférico. Os cães foram examinados para verificar a presença de carrapatos, os quais foram coletados, identificados e dissecados para análise da presença de oocistos de *Hepatozoon* sp.. Do total de animais que participaram do estudo, 212 foram procedentes da área urbana e 134 da rural, 166 machos e 180 fêmeas e, 92 filhotes e 254 adultos. A prevalência de *Hepatozoon* sp., foi de 20,8% e 79,2%, pelas técnicas de extensão sanguínea e PCR, respectivamente, sendo observadas diferenças ($p < 0,05$) ao comparar as duas metodologias. Pela técnica convencional existiu diferença ($p < 0,05$) na prevalência de infecção por *Hepatozoon* sp. ao relacionar as áreas estudadas. Dos cães da área urbana e rural, 148 (69,8%) e 18 (13,4%), estavam infestados por carrapatos, respectivamente. Uma fêmea de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* apresentou na sua hemolinfa oocistos de *Hepatozoon* sp. Infecções concomitantes ao *Hepatozoon* sp. com *Ehrlichia* sp., *Babesia* sp. e *Anaplasma platys* ocorreram em 38 cães. *Hepatozoon canis* é a espécie responsável pela hepatozoonose canina na região de Uberlândia. Esta espécie está estreitamente relacionada com o agente causador da doença no sul da Europa, porém, diferente de *H. americanum* e *H. felis*. Uma nova sequência de *H. canis* de cão procedente da área rural e a sequência encontrada na hemolinfa do carrapato infectado, foram depositadas no GenBank com acesso JN835188 e HQ605710, respectivamente. As concentrações séricas de AST e LDH e o número de neutrófilos bastonetes apresentaram-se aumentados nos animais com hepatozoonose. Não há relatos na literatura sobre a presença de oocistos de *H. canis* em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Mais estudos são necessários pra determinar o ciclo natural do parasito, assim como, os aspectos epidemiológicos e clínicos da infecção.

Palavras-chave: *Hepatozoon canis*, caracterização molecular, prevalência, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, cães, bioquímica sérica, perfil hematológico.

ABSTRACT

The canine Hepatozoonosis has gained importance in veterinary medicine, as emerging infection. Most cases in Minas Gerais, Brazil, were diagnosed by occasional testing laboratory. This study aimed to characterize the isolate of *Hepatozoon* sp. in naturally infected dogs coming from urban and rural areas of the microregion of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. Furthermore, was determined the prevalence by conventional and molecular techniques, identified genera or species of ticks and promoted serum biochemistry and hematological assessment of the positive animals. Were collected from each animal, samples of peripheral and circulating blood. The dogs were examined to verify the presence of ticks, which were collected, identified and dissected for analysis of the presence of oocysts of *Hepatozoon* sp.. Of the total number of animals in the study 212 were coming from urban area and 134 from rural, 166 males and 180 females and 92 puppies and 254 adults. The prevalence of *Hepatozoon* sp., was 20.8% and 79.2%, by the blood extension techniques and PCR, respectively, and differences were observed ($p < 0.05$) when comparing the two methods. By the conventional technique was no difference ($p < 0.05$) in the prevalence of *Hepatozoon* sp. infection to relate the areas studied. Dogs from urban and rural areas, 148 (69.8%) and 18 (13.4%) respectively, were infested with ticks. Oocysts were recovered from the hemolymph of semi-engorged *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* female. Concomitant infections to *Hepatozoon* sp. with *Ehrlichia* sp., *Babesia* sp. and *Anaplasma platys* occurred in 38 dogs. The *Hepatozoon canis* is the species responsible for the canine Hepatozoonosis in Uberlândia. This species is closely related to the causative agent of the disease in southern Europe, but other than *H. americanum* and *H. felis*. A new sequence of *H. canis* coming from the rural area dogs, and sequence found in the hemolymph of infected tick, was deposited in GenBank with access HQ605710 and JN835188, respectively. The serum concentrations of AST and LDH and counts of neutrophil rods showed to be increased in animals with Hepatozoonosis. There are no reports in the literature about the presence of *H. canis* oocysts in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. More studies are needed to determine the natural cycle of the parasite, as well as the epidemiological and clinical aspects.

Keywords: *Hepatozoon canis*, molecular characterization, prevalence, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, dogs, serum biochemistry, hematological profile.

1 - INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Hepatozoon* são protozoários observados em diversas células de animais domésticos e silvestres (MUNDIM; MUNDIM; BARBOSA, 2002). O parasito promove doença sistêmica denominada de hepatozoonose, em que os animais infectados podem apresentar-se assintomáticos ou com manifestações clínicas variadas, como febre e distúrbios de locomoção (GEVREY, 1993).

O gênero *Hepatozoon* foi descrito pela primeira vez na Índia por Bentley (1905) e James (1905), e este último o denominou de *Leucocytozoon canis*. Posteriormente, o parasito foi chamado de *Hepatozoon* por Miller (1908) e Wenyon (1910), após o encontro em leucócitos de rato.

As espécies do gênero *Hepatozoon* pertencem ao filo Apicomplexa e possuem características comuns a outros gêneros deste grande grupo de protozoários. Foram, previamente, classificadas como membro da família Haemogregarinidae, entretanto, estudos recentes confirmou a inclusão do *Hepatozoon* na família Hepatozoidae, subordem Adeleorina (WENYON, 1926; MATHEW et al., 2000). Estes estudos foram baseados em características morfométricas e morfológicas, nos fatores de especificidade do hospedeiro e mais recentemente, na caracterização molecular (SMITH, 1996; MATHEW et al., 2000; BARTA, 2001).

Mais de 300 espécies de *Hepatozoon* sp. foram descritas até o momento em todos os grupos de vertebrados tetrápodes, sendo que 90% basearam-se na presença de gamontes em células sanguíneas. Destas 300 espécies, 46 infectam mamíferos, 120 répteis e outras parasitam pássaros e anfíbios (SMITH, 1996). Dentre os mamíferos, cães e gatos podem ser infectados (CRAIG et al., 1978; MUNDIM et al., 1992; BANETH et al., 1998a).

Mathew et al. (2000) e Barta (2001), baseados em análise de sequenciamento 18S rDNA e de aspectos morfológicos, comentaram que os componentes desse gênero possuem estreita relação com outros hemoparasitos, que utilizam invertebrados como hospedeiros definitivos, como é o caso de *Plasmodium* e dos piroplasmas.

Até 1997, por serem os gamontes de *Hepatozoon* isolados de cães em diferentes regiões morfológicamente semelhantes, acreditava-se que a doença canina era causada somente por *H. canis*, sendo *H. americanum* considerado cepa ou isolado de *H. canis*. (CRAIG et al., 1978; MURATA et al., 1991; BANETH et al., 1996). Entretanto, Vincent-Johnson et al. (1997) reconheceram uma nova espécie acometendo cães no Estados Unidos, *H. americanum*. Sendo assim, definiu-se *H. canis* como a espécie encontrada na Europa,

África, Ásia e América Latina (GAVAZZA et al., 2003; OYAMADA et al., 2005; RUBINI et al., 2008). Estudos demonstraram que as características clínicas, patológicas e antigênicas, o vetor que transmite a doença e o ciclo de vida do parasito são diferentes de acordo com a espécie (BANETH et al., 2000; EWING et al., 2000).

Avanços na genética molecular de *Hepatozoon* spp., em canídeos, indicam a existência de genótipos de *H. canis* dispersos mundialmente. O primeiro foi encontrado em Israel por Baneth et al. (2000) e o segundo sequenciado no Japão por Inokuma et al. (2002). A presença desses dois genótipos foi citada em outras partes do mundo, como no Brasil (RUBINI et al., 2005; CRIADO-FORNELIO et al., 2006), Espanha (CRIADO-FORNELIO et al. 2006), Turquia (KARAGENC et al., 2006) e Sudão (OYAMADA et al., 2005). Criado-Fornelio et al. (2006) mostraram que duas ou mais cepas podem infectar o mesmo hospedeiro.

As espécies de *Hepatozoon* sp. do Brasil foram recentemente determinadas, indicando que *H. canis* é o responsável pela doença no país (RUBINI et al., 2005). O'Dwyer, Massard e Souza (2001), O'Dwyer et al. (2004) e Paludo et al. (2003) sugeriram que os sinais clínicos e a baixa patogenicidade da(s) espécie(s) brasileira(s) indicam que a doença ocorre por *H. canis* ou outra espécie de estreita relação, mas não por *H. americanum*, sendo este fato confirmado, também, por Forlano et al. (2007). Entretanto, apesar da espécie ter sido caracterizada, existe a possibilidade da ocorrência de cepas ou isolados variantes, que estão relacionadas a determinadas regiões geográficas (RUBINI et al., 2005).

Análises sequenciais revelaram que os isolados brasileiros de *Hepatozoon* sp., possuem relação com o *H. canis* descrito na Índia (MATHEW et al., 2000) e no Japão (INOKUMA et al., 2002), tendo 96-99% de identidade pelo nucleotídeo. A maior discrepância foi detectada pelo sequenciamento parcial do gene 18SrDNA entre os isolados da Turquia, Índia e Japão, onde observaram-se menor variação de cepas (KARAGENC et al., 2006).

Os gamontes de *H. americanum* e *H. canis* são encontrados em leucócitos circulantes. Evidências em microscopia eletrônica e imunohistoquímica indicam que a célula hospedeira, durante a merogonia e gamogonia de *H. americanum* é o monócito, enquanto de *H. canis* é o neutrófilo (CUMMINGS, 2001).

A merogonia de *H. canis* ocorre em vários sítios, principalmente, nos tecidos hemolinfáticos e órgãos viscerais. Nos tecidos foram encontrados merontes de formas e tamanhos variáveis e gamontes medindo em torno de 2,0 a 4,0µm X 2,0 a 6,0µm de largura. O citoplasma de vários merozoítos analisados continha ribossomos, vacúolos lipídicos,

mitocôndrias, corpos eletro densos circundados por membrana e presença do complexo apical na porção anterior do merozoíto (HÉRVAS et al., 1995).

Em relação a *H. americanum*, a merogonia ocorre, primariamente, entre as fibras do músculo estriado, enquanto os merontes apresentam-se em forma de “onion skin”, compostos por camadas de material rico em mucopolissacarídeos produzidos pela célula do hospedeiro (DROLESKEY et al., 1993; PANCIERA et al., 1998; CUMMINGS, 2001).

No início do século 20, o ciclo biológico de *H. canis* foi estudado em carrapatos (vetor biológico) e nos tecidos de cães (CHRISTOPHERS, 1906, 1907, 1912; WENYON, 1911). Em carrapatos, Christopher (1906, 1907) distinguiu as formas de desenvolvimento que precedem a reprodução sexual e foi o primeiro a sugerir que a infecção ocorre pela ingestão do carrapato, embora o autor acreditasse que esta via de infecção era improvável.

Wenyon (1911) não observaram o processo de conjugação no intestino do carrapato, mas seguiram a formação de oocistos de grandes dimensões (100 mm), com 30 a 50 esporócitos e 16 esporozoítos dentro da hemocele do carrapato. O autor relatou que a infecção e a transmissão ocorria por carrapatos adultos, mas Christopher (1912) provou que a fase de ninfa adquire a infecção de cães infectados, enquanto os adultos transmitem o protozoário.

Wenyon (1926) o colocou dentro da família Hepatozoidae, pelo fato de ser transmitido ao hospedeiro vertebrado pela ingestão de artrópodes. É protozoário heteroxeno, com ciclo evolutivo se processando em dois hospedeiros. Nos hospedeiros vertebrados, canídeos domésticos e silvestres, a forma evolutiva conhecida é o gametócito ou gamonte, que é visualizado no citoplasma dos neutrófilos e monócitos (CRAIG et al., 1978; MAKIMURA; KINJO, 1991; MUNDIM et al., 1992; HÉRVAS et al., 1995). Gamontes podem ser encontrados, também, na medula óssea e no líquido cerebrospinal (PARRA; ARRAGA, 1996).

O cão se infecta, comumente, pela ingestão do carrapato contendo na hemocele oocistos maduros de *Hepatozoon canis*. O modo de ingestão dos carrapatos pelos cães não foi documentado, mas acredita-se que esteja relacionado ao processo de lambedura do pêlo ou que o carrapato, em ambientes de cães altamente infestados, caia no alimento, sendo ingerido com o mesmo. No trato gastrointestinal do cão, os esporozoitos são liberados, penetram na parede intestinal e por meio do sangue são transportados para os tecidos hemolinfáticos, incluindo baço, medula óssea e nódulos linfáticos, onde os merontes são formados pelo processo assexuado. A merogonia, também, pode ocorrer em outros órgãos viscerais, como fígado, pulmões e rins. Micromerozoitos libertados dos merontes invadem neutrófilos ou monócitos no sangue periférico, onde se desenvolvem para formar gamontes, e

macromerozoitos dão origem a novos merontes (BANETH et al., 2001, 2003; BANETH; SAMISHI; SHKAP, 2007).

Quando os carrapatos ingerem sangue de cão infectado, os gamontes são libertados dos leucócitos no intestino do vetor, associados aos pares e, se diferenciam em gametas. A fertilização é seguida por formação de um zigoto, o qual é submetido a processo chamado de esporogonia, para formar oocistos maduros na hemocele do carrapato (BANETH et al., 2001, 2003; BANETH; SAMISHI; SHKAP, 2007). Os oocistos não atingem a glândula salivar do carrapato (BEAUFILS; MARTIN-GRANEL, 1992).

Similar a todas as doenças que possuem artrópodes como vetor, a distribuição da hepatozoonose canina está relacionada à presença do hospedeiro definitivo acarino. A maioria dos relatos cita o ixodídeo *Rhipicephalus sanguineus*, carrapato vermelho dos cães, como o principal transmissor (CHRISTOPHERS, 1907, 1912; BANETH; WEIGLER, 1997). É espécie frequente em cães domésticos, mas em alguns países não é considerada prevalente (FÖLDVÁRI; FARKAS, 2005). Entretanto, até agora, não houve nenhum relato de presença de *R. sanguineus* infectados com *H. canis* no Brasil, seja naturalmente ou experimentalmente (FORLANO et al., 2005; GOMES et al., 2010). Segundo O'Dwyer (2011), estes resultados no Brasil podem estar relacionados com diferenças entre *R. sanguineus* no país e em outras regiões do mundo.

Oliveira et al. (2005) descreveram diferenças morfológicas entre espécimes de *R. sanguineus* coletados no Brasil e na Argentina, como o tamanho do corpo, poro genital e estruturas sensoriais, sugerindo que as espécies encontradas no Brasil podem ser diferentes. Enquanto, as sequências mitocondriais 12S rDNA de carrapatos da Argentina foram mais próximas às sequências correspondentes a *R. sanguineus* da França, as sequências de carrapatos brasileiros foram mais próximas a *R. turanicus* do Zimbábue (SZABÓ et al., 2005).

Burlini et al. (2010), ao determinarem as sequências parciais para os genes mitocondriais 12S e 16S rRNA de *R. sanguineus* de sete estados brasileiros, descobriram que as sequências dos carrapatos brasileiros foram agrupadas com as sequências de *R. turanicus* da África Sub-Sahariana (Zimbábue e Zâmbia), e de *R. sanguineus* da Ásia (Tailândia e Taiwan).

Outras espécies de carrapatos podem transmitir *H. canis*, *Haemophysalis flava* pode ser o vetor no Japão (MURATA et al., 1995), *Ixodes ricinus* na Itália (GABRIELLI et al., 2010) e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no Brasil (DE MIRANDA et al., 2011). Cães procedentes da zona rural, que se locomovem sem restrição de área e que compartilham o

ambiente com outros animais domésticos e silvestres são infectados, principalmente, por espécies de *Amblyomma* (LABRUNA; CAMPOS PEREIRA, 2001). Várias espécies deste gênero podem infectar cães de áreas rurais como *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma tigrinum* (LABRUNA et al., 2000, 2001; FORLANO et al., 2005). A presença de gametócitos circulantes em cães, experimentalmente infectados, pela administração de *A. ovale* contendo formas esporozoítas, demonstrou que esta espécie é vetor potencial para *Hepatozoon* sp. (FORLANO et al., 2007).

Hepatozoon americanum é semelhante às outras espécies do gênero, sendo restrito a dois tipos de hospedeiros, um hospedeiro definitivo invertebrado hematófago e um hospedeiro intermediário vertebrado. Trabalhos indicam que *Amblyomma maculatum* é excelente hospedeiro definitivo. Os ixodídeos *R. sanguineus*, *Dermacentor variabilis* e *Amblyomma americanum* foram inoculados, experimentalmente, mostrando-se refratários à infecção (EWING; PANCIERA; MATHEW, 2003).

Experimentalmente, *R. sanguineus* se infecta pela via percutânea, com sangue contendo gamontes. A transmissão transtadial entre os estágios de ninfa e adulto de *R. sanguineus* foi relatada em condições experimentais, entretanto, a transovariana não foi descrita (BANETH et al., 2001).

De acordo com Murata et al. (1993), pode ocorrer a transmissão transplacentária de *H. canis*. O mesmo foi relatado por Nordgren e Craig (1984), que encontraram filhotes jovens infectados naturalmente com *H. americanum* no Texas.

A hepatozoonose causada por *H. canis* foi citada em várias regiões geográficas, sendo de distribuição cosmopolita, descrita na Nigéria, Itália, Índia, Malásia, Israel, França, Japão, Argentina, Colômbia e Brasil (McCULLY et al., 1975; ARRU; PAU; LEONI, 1982; EZEOKOLI et al., 1983; BANSAL; GAUTAM; BARNEJEEN, 1985; RAJAMANICKAN et al., 1985; BEAUFILS; MARTIN-GRANEL; BERTRAND, 1988; MAKIMURA et al., 1991; O'DWYER; GUIMARÃES; MASSARD, 1997; EIRAS et al., 2007; DE MIRANDA et al., 2011). *Hepatozoon canis* tem sido encontrado em infecção mista com *H. americanum*, embora esta última seja a espécie mais abundante nos Estados Unidos (ALLEN et al., 2008).

A prevalência avaliada pela detecção de gametócitos nas células do sangue foi de 22% dos cães na Nigéria (EZEOKOLI et al., 1983); na Malásia e em Israel a infecção foi de 1,2% a 2,3%, respectivamente (RAJAMANICKAM et al., 1985; KLOPFER; NEWMAN; NOBEL, 1973). Pela sorologia, entretanto, Baneth et al. (1996) observaram 33,1% de cães positivos em Israel.

No Brasil existem poucos estudos de prevalência de infecção por *H. canis*, sendo a maioria dos casos diagnosticados, ocasionalmente, durante exames laboratoriais (MUNDIM et al., 1992; O'DWYER; GUIMARÃES; MASSARD, 1997; GONDIM et al., 1998). Massard (1979), em primeiro estudo epidemiológico no Brasil, relatou maior prevalência em cães de área rural (31,58%) do que de urbana (4,48%), utilizando a técnica de extensão sanguínea. Pelo mesmo método, alta prevalência (39,2%) foi observada em cães da área rural do Rio de Janeiro (O'DWYER; MASSARD; SOUZA, 2001) e baixa prevalência, 5,9% e 5,56%, respectivamente, em cães da área urbana do estado de São Paulo e Anápolis (O'DWYER et al., 2006; MUNDIM et al., 2008a). Segundo Rubini et al. (2008), em cães rurais do estado de São Paulo, verificaram uma prevalência de 11,3% e 53,3% pelos métodos parasitológico e molecular, respectivamente. Prevalência de infecção por *H. canis* pelo PCR de 58,7% foi citada por Spolidorio et al. (2009) em cães de área rural e urbana do estado do Espírito Santo.

Os diferentes trabalhos publicados no Brasil revelam que *H. canis* está presente em todas as regiões, mas que a sua prevalência é bastante variável, dependendo do estado, da origem dos animais (área rural ou urbana) e do método de diagnóstico (O'DWYER, 2011).

A infecção por *H. canis* é variável e apresenta sintomas inespecíficos, ocorrendo desde casos assintomáticos, em que o cão apresenta-se aparentemente saudável, a casos severos e potencialmente fatais, em que os animais apresentam extrema letargia, caquexia e anemia. Consideram-se infecções brandas aquelas associadas à baixa parasitemia e ocasionadas pelo *H. canis*, enquanto os casos severos, com alta parasitemia, sejam causados pelo *H. americanum* (BANETH; WEIGLER, 1997).

No Brasil, a maioria dos cães infectados é assintomática e têm infecção subclínica (menos de 1% de neutrófilos parasitados). Frequentemente, está associada com outras infecções, especialmente *Ehrlichia canis* e *Babesia canis* (SASANELLI et al., 2009; O'DWYER, 2011), como também outros agentes patogênicos, *Toxoplasma gondii*, *Mycoplasma haemocanis* e Parvovírus (HARMELIN et al., 1992; MUNDIM et al., 1992; BANETH; WEIGLER, 1997; GONDIM et al., 1998).

Independentemente da baixa patogenicidade da infecção no Brasil, os dados na literatura demonstram que, em alguns casos, a infecção por *H. canis* pode conduzir a uma doença grave, incluindo lesões musculares, como visto na hepatozoonose canina americana (PALUDO et al., 2005; TSACHEV et al., 2008; MARCHETTI et al., 2009).

Algumas investigações consideram *H. canis* como acidental ou não patogênico, exceto, em animais afetados por doenças concorrentes (EZEOKOLI et al., 1983). Entretanto, Baneth e Weigler (1997) reportaram que a parasitemia por este agente não é achado benigno e

pode ser caracterizada clinicamente, devido a diferenças significativas nos parâmetros hematológicos e de temperatura corporal, entre os cães positivos para *H. canis* e os saudáveis.

A relação entre grau de patogenicidade e número de leucócitos parasitados foi descrita em trabalhos realizados na África, Japão, Israel e Turquia (EZEOKOLI et al., 1983; MURATA et al., 1993; BANETH et al., 2001; VOYVADA; PASA; UNVER, 2004). Alta parasitemia é acompanhada por extrema neutrofilia (≥ 150.000 neutrófilos/ μL de sangue). Cães com leucocitose e alta parasitemia podem ter grande número de parasitos circulantes com mais de 50.000 gamontes/ μL de sangue.

No Brasil, os sinais clínicos observados por Gondim et al. (1998), em oito cães naturalmente infectados, foram anorexia, perda de peso, mucosas pálidas, dor, diarreia, vômitos, alterações da marcha, febre, poliúria e polidipsia. Sintomatologia semelhante foi relatada por Paludo et al. (2003, 2005), em que cães apresentavam-se com anorexia, perda de peso e mucosas pálidas. Estes sintomas foram associados com degeneração muscular e atrofia causados pelo *H. americanum* (PALUDO et al., 2005). Hipertermia, anorexia, descargas oculares, mucosas pálidas, apatia e diarreia por Mundim et al. (1994, 2008b), que afirmaram que infecções simultâneas não poderia ser descartada, uma vez que a infecção só foi diagnosticada por meio de exames de extensão sanguínea.

Em Israel, a maioria dos cães com alta parasitemia apresentaram edemaciação, letargia, anorexia, febre e anemia (BANETH; WIEGLER, 1997). Na Turquia, alterações na pele e pêlo foram mencionadas por Voyvada, Papa e Unver (2004), que sugeriram ser consequência da anorexia e caquexia.

As anormalidades hematológicas e bioquímicas comuns em cães infectados com *H. canis*, com ou sem infecção concomitante, foram anemia, neutrofilia, hiperglobulinemia e aumento da atividade da fosfatase alcalina e creatina quinase (ELIAS; HOMANS, 1988; IBRAHIM; RAHAMATHULLA; NJOKU, 1989; BANETH; WEIGLER, 1997). Alguns pesquisadores citaram monocitose, linfocitose, basofilia, eosinofilia e trombocitopenia (CRAIG et al., 1978; BEAUFILS; MARTIN-GRANEL; BERTRAND, 1988; MUNDIM et al., 1992). Esses achados são modificados, quando a hepatozoonose está mascarada por infecções intercorrentes (BANSAL; GAUTAM; BANERJEE, 1985).

Dentre os achados radiológicos em cães infectados com *H. americanum* observa-se proliferação óssea do periósteo, variando de discreto engrossamento laminar a acentuada formação óssea, algumas vezes bilateral. Os principais ossos acometidos são os da pelve, íleo, fêmur, úmero, rádio e vértebras lombares (CRAIG et al., 1978; CRAIG, 1998; MURATA et al., 1991; PANCIERA et al., 1997).

Os achados de necropsia são caquexia, atrofia muscular, congestão em diversos ossos e vísceras. Histopatologicamente destacam-se piogranulomas nos linfonodos, baços, pâncreas, pleura e língua, contendo macrófagos e neutrófilos (MUNDIM; MUNDIM; BARBOSA, 2002). Formas encistadas do parasito podem ser detectadas no baço, linfonodos, tecidos subcutâneos, pulmão, fígado, rins (McCULLY et al., 1975).

Por serem os sinais clínicos inespecíficos, o diagnóstico clínico não é seguro. As doenças caquetizantes com febre recorrente, distúrbios locomotores e que não respondem, adequadamente, a antibioticoterapia, podem ser consideradas casos de hepatozoonose (MUNDIM; MUNDIM; BARBOSA, 2002). A forma americana difere das formas de outras partes do mundo, pela presença de miosite e de estágios do parasito detectados na musculatura esquelética (PANCIERA et al., 1998).

O diagnóstico parasitológico é realizado pela detecção microscópica de gamontes intracelulares do *Hepatozoon* em monócitos e neutrófilos dos esfregaços sanguíneos corados pelo May-Grunwald-Giemsa ou outro corante rápido (O'DWYER; MASSARD; SOUZA, 2001). Mercer e Craig (1988) avaliaram os corantes Diff-Quik, Giemsa e o Estearase Cloroacetato Naftol ASD, sendo o último considerado melhor para visualização de neutrófilos infectados e não infectados. Os gamontes são grandes (11,0 x 5,0 mm), elipsoides, com uma cápsula e um núcleo grande e central (WANER et al., 1994).

Quando a parasitemia é marcante, o esfregaço sanguíneo é extremamente eficiente, entretanto, em baixos níveis ou em infecções crônicas a detecção torna-se difícil. Deve-se ressaltar que a ausência de parasitemia não indica ausência de infecção e o diagnóstico falso negativo é comum, principalmente, quando o nível parasitêmico é baixo (EIRAS et al., 2007). De acordo com Baneth et al. (1998b), é método fácil e prático de diagnóstico, mas a morfologia e morfometria dos gamontes não permitem diferenciação entre espécies. Assim, outros métodos de diagnóstico devem ser usados (O'DWYER, 2011).

Makimura e Kinjo (1991) comentaram que este método facilita a identificação do tipo de células parasitadas pelos gametócitos. A imunohistoquímica experimental, usando anticorpos monoclonais de esporozoítas de *H. americanum*, identificou estágios sexuais do parasito no citoplasma de células do hospedeiro de forma mais eficiente do que a histopatologia convencional (PANCIERA et al., 2001).

A aplicação de testes sorológicos para detecção de anticorpos anti-*Hepatozoon* pode ser benéfica. Esta é fundamental nos cães crônicos com baixa parasitemia, em que a detecção da positividade pela extensão sanguínea torna-se difícil. A sorologia também é eficiente quando a infecção é recente e não se observa parasitemia (BANETH et al., 1998b). A reação

de ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) e a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), utilizando antígenos purificados de *Hepatozoon* sp., são utilizados como testes sorológicos.

Embora estes métodos sorológicos possam ser úteis para estudos epidemiológicos e para o diagnóstico de cães infectados, necessitam de fonte de antígeno consistente, de cães com parasitemia extremamente elevada, como os cães utilizados por Shkap, Baneth, Pipano (1994). No entanto, no Brasil, o encontro de cães altamente infectados é raro, por isso o diagnóstico sorológico tem baixa aplicabilidade no país (O'DWYER, 2011).

A Reação de Cadeia de Polimerase (PCR), de acordo com Karagenc et al. (2006), é o método mais sensível para detecção de *Hepatozoon*, se sobrepondo ao diagnóstico parasitológico. Entretanto, esses mesmos autores comentam que ao compararem a RIFI e PCR, observaram maior detecção de positivos pela RIFI. A técnica molecular para *H. canis* tem sido utilizada em vários estudos e demonstra ser técnica de diagnóstico sensível (INOKUMA et al., 2002; CRIADO-FORNELIO et al., 2003; KARAGENC et al., 2006; LI et al., 2008). Entretanto, a ausência de gamontes, em parasitemias intermitentes ou baixas, interrompe o desenvolvimento parasitário até estágio de meronte nos órgãos viscerais, levando a falso negativo (MURATA et al., 1993; BANETH et al., 1998b; GONEN et al., 2004). De acordo com Gubbels et al. (1999), a sensibilidade do PCR parece ser afetada somente pelo método de extração do DNA utilizado.

Rubini et al. (2005) demonstraram positividade em 21 dos 31 cães (67,7%) pelo PCR, enquanto pelo esfregaço, a positividade foi de 22,6%. Maior sensibilidade do PCR em relação ao esfregaço, também, foi observada por Rubini et al. (2008) em inquérito de cães da área rural. Spolidorio et al. (2009) relataram positividade de 58,7% para *H. canis* em cães aparentemente saudáveis do sudeste do Brasil pela técnica molecular.

A hepatozoonose canina é doença transmitida por carrapatos e de caráter cosmopolita. Atualmente, vem adquirindo importância como infecção emergente na Medicina Veterinária, em vários países desenvolvidos. No Brasil, se observa aumento de casos no cotidiano das clínicas, entretanto, ainda é considerada doença de pouco mérito e relevância para estudos. Deve-se ressaltar que apesar de não ser considerada zoonose, com importância na saúde pública ou de relevância na produtividade, é doença que acomete uma espécie de animal considerado de companhia, e que tem íntima e profunda ligação afetiva com o homem.

Atualmente, são reconhecidas as espécies *H. canis* e *H. americanum* como agentes etiológicos da doença, sendo diferenciadas pelos sinais clínicos, tropismo pelo tecido, achados patológicos e morfológicos, assim como pelas características antigênicas e genéticas. Porém,

existem lacunas sobre os vários aspectos que envolvem esses parasitos em várias regiões do Brasil.

A manifestação clínica da infecção por *H. canis* pode ser subclínica e inaparente, porém, observam-se casos de hepatozoonoses canina, presumidamente produzida pelo *H. canis*, severos e semelhantes à clínica manifestada e descrita para o *H. americanum*.

Técnicas de análise molecular são usadas para examinar a relação filogenética das espécies de *Hepatozoon* isoladas em diferentes áreas do Brasil. Poucos trabalhos foram realizados no país na determinação da espécie que causa a hepatozoonose canina. A maioria destes relata que o *H. canis* é a espécie responsável pela doença no país, com a possibilidade de ocorrência de cepas variantes relacionadas a regiões geográficas diferentes.

Em Uberlândia, Minas Gerais, os poucos trabalhos existentes estão relacionados à achados na rotina no momento do exame clínico. A doença existe na região, segundo relatos de clínicos, podendo ser confundida, mascarada ou ter os sinais exacerbados por infecções concomitantes com outros hemoparasitos. Não existem levantamentos de prevalência, perfil laboratorial abrangente ou estudos que caracterizem qual a espécie ou isolado que acomete os cães na região.

Baseado nisto, fazem-se necessário estudos que elucidem lacunas existentes em torno do *Hepatozoon* sp. na região, visando dar ao clínico veterinário na sua rotina diária maior conhecimento sobre a espécie e as características comportamentais do parasito, melhorar a confiabilidade do diagnóstico e, conseqüentemente, auxiliar na profilaxia e possível tratamento.

2 – OBJETIVOS

2.1 - Geral

Caracterizar genotipicamente o isolado de *Hepatozoon* sp. em cães naturalmente infectados procedentes de áreas urbana e rural da microrregião de Uberlândia, Minas Gerais.

2.2 - Específicos

1. Determinar prevalência do *Hepatozoon* sp., pela técnica de extensão sanguínea e pela PCR, nos cães das áreas urbana e rural;
2. Comparar a prevalência entre as técnicas propostas;
3. Comparar as prevalências entre as procedências, o sexo e faixa etária dos animais;
4. Relacionar a positividade com o sexo e a faixa etária;
5. Verificar a presença de infecção concomitante a *Hepatozoon* sp. pela técnica de extensão sanguínea;
6. Identificar os gêneros ou espécies de carrapatos presentes nos cães avaliados;
7. Verificar a positividade dos carrapatos presentes nos cães avaliados pelo teste da hemolinfa;
8. Promover avaliação bioquímica sérica e hematológica dos animais positivos, fazendo paralelo entre positividade e alterações encontradas.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Aspectos éticos

Este estudo seguiu as normas de Legislação e Ética do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) – <http://www.cobea.org.br> – e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (CEP/UFU) sob o número 033/09 (Anexo I). A contenção dos animais seguiu rigorosamente as técnicas semiológicas em Medicina Veterinária para pequenos animais.

3.2 – Área de estudo

O estudo foi realizado na microrregião de Uberlândia (Figura 1), Estado de Minas Gerais, localizada na mesorregião do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. O estado, que se destaca como um dos principais geradores de renda e produtos da economia brasileira, consolida cada vez mais como maior produtor de leite entre as unidades da federação (EMBRAPA, 2009).

A Microrregião abrange em torno de 7.115,09 Km², possui latitude 18°55'25" S e longitude 48°16'38"O. Apresenta clima tropical de altitude com temperaturas amenas e chuvas repartidas em duas estações: úmida e seca. A vegetação é típica de cerrado, entrecortada por veredas com solos ácidos e pouco férteis.



Figura 1 – Área rural da microrregião de Uberlândia, MG, Brasil.

3.3 – Animais do estudo

No período compreendido de julho/2009 a julho/2011 foram avaliados 346 cães de diferentes raças e aparentemente saudáveis. Esses cães foram provenientes da área urbana (n=212) e rural (n=134) da microrregião de Uberlândia. O número de amostras foi estimado de acordo com Beiguelman (1991), mediante aplicação da fórmula $n = (1,96^2 \times p \times q) / e^2$ com 95% de confiança (dimensionamento de amostra para proporção baseado no Teorema do Limite Central). Considerou-se um erro de 7%, com prevalência em área rural de 31,6% e em área urbana de 4,5% (MASSARD, 1979).

Os animais foram divididos em dois grupos etários, os quais 92 eram filhotes (de um mês a um ano) e 254 adultos (> um ano de idade), com base no padrão de dentição ou informações dos proprietários. Participaram 166 machos e 180 fêmeas.

Durante o contato com os animais, foi explicado ao proprietário o objetivo do trabalho, obtendo-se o consentimento, por escrito (Anexo II), para a colheita das amostras de sangue e dados do animal.

3.4 – Coleta das amostras de sangue circulante

Foram colhidas, de cada animal, amostras de cinco mililitros (5 mL) de sangue por punção da veia cefálica ou radial (Figura 2), com uso de agulhas e seringas descartáveis. As mesmas foram divididas em duas frações.

Do total colhido, dois mililitros (2 mL) foram transferidos para tubos à vácuo estéreis (BD Vacutainer®), previamente identificados, com 0,1 mL de anticoagulante EDTA K₃ (ácido etilenodiaminotetracético sal tripotássico) em solução a 10%. O sangue colhido foi utilizado, imediatamente, para realização do hemograma completo. Posteriormente, as amostras foram separadas em duas alíquotas, armazenadas em freezer -70° C para utilização na PCR e sequenciamento.

Os três mililitros (3 mL) restantes, foram transferidos para tubos à vácuo contendo gel separador e ativador de coágulo. Posteriormente, após completa coagulação do sangue, as amostras foram centrifugadas (Centrífuga Excelsa Baby I Modelo 206 – FANEM) a 720 x g durante cinco minutos, a fim de se obter o soro, o qual foi utilizado para as análises bioquímicas no mesmo dia da coleta.



Figura 2 – Coleta de sangue por punção da veia cefálica e distribuição da amostra em tubos estéreis com anticoagulante EDTA e sem anticoagulante com gel separador e ativador de coágulo.

3.5 – Coleta de sangue periférico e preparo de extensões sanguíneas

De cada cão foram coletadas pequenas amostras de sangue dos vasos marginais da orelha, para confecção das extensões sanguíneas. Para isso, realizou-se tricotomia da ponta da orelha seguida de limpeza com solução de álcool iodado e, com uso de agulha 25x7, a região foi perfurada e pressionada delicadamente. Com uma lâmina retirou-se a gota de sangue e, imediatamente, com uso de lâmina extensora, em ângulo de 45°, processou-se a extensão sanguínea (Figura 3).

Todas as extensões foram fixadas e coradas pelo método May-Grünwald-Giemsa (MGG) para pesquisa de gamontes de *Hepatozoon* sp. e de outros possíveis hemoparasitos. A mesma lâmina foi utilizada para contagem diferencial ou específica de leucócitos, realizada de acordo com Ferreira Neto, Viana e Magalhães (1982).



Figura 3 – Coleta de sangue periférico e confecção da lâmina de extensão sanguínea.

3.6 – Coleta e identificação dos carrapatos

Após a coleta sanguínea os cães eram examinados para verificar a presença de carrapatos. Na presença desses ectoparasitos, esses eram coletados, colocados em frascos identificados (número do cão, procedência) e encaminhados para o Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Gêneros ou espécies foram identificados com base na chave dicotômica (BARROS-BATTESTI; ARZUA; BECHARA, 2006).

3.7 – Dissecção dos carrapatos e análise das hemolinfas

Todos os carrapatos foram dissecados para pesquisa de oocistos de *Hepatozoon* sp.. Para isso, foi feita uma pequena insição no idiossoma de cada carrapato, com lâmina de bisturi (nº10). Em seguida, o idiossoma foi pressionado, levemente, para forçar a saída da hemolinfa. A hemolinfa, colocada entre a lâmina e lamínula com solução salina fisiológica 0,85%, foi examinada a fresco em microscópio óptico na objetiva de 40X. Para cada carrapato foram confeccionadas duas lâminas, sendo essas analisadas por duas pessoas treinadas, na tentativa de dar maior fidedignidade.

3.8 – Processamento das amostras sanguíneas

A leitura das extensões sanguíneas, o processamento dos hemogramas e das análises bioquímicas séricas foram realizados no Laboratório Clínico Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV) da UFU.

3.8.1 – Hemograma

O hemograma foi processado em contador automático de células sanguíneas - Animal Blood Counter (ABC VET® - Horiba ABX SAS, France) (Figura 4).



Figura 4 – Amostras de sangue em tubos estéreis com EDTA em homogeneização e aparelho hematológico automático ABC VET®.

3.8.2 – Bioquímica

Para cada amostra de soro foram determinadas as concentrações de Proteínas totais (Método do biureto); Albumina (Método verde-bromocresol); Globulinas (calculada pela diferença entre as proteínas totais e albumina); Creatinina (Método do picrato alcalino); Uréia (Método urease - cinético UV); Alanina aminotransferase (ALT/TGP) (Método cinético IFCC UV); Fosfatase alcalina (Método Bowers e McComb modificado); γ -Glutamilttransferase (Método Szasz modificado); Aspartato aminotransferase (AST/TGO) (Método cinético IFCC UV) e Creatina quinase (Método Okinada modificado). Todas as determinações foram realizadas em analisador automático ChemWell® (Figura 5) a 37°C, utilizando kits comerciais (Labtest Diagnósticos®, Lagoa Santa, MG, Brasil).



Figura 5 – Amostras de sangue em tubos estéreis sem anticoagulante com ativador de coágulo centrifugados e aparelho bioquímico automático ChemWell®.

3.9 – Técnica molecular

A extração e amplificação do DNA (Ácido desoxirribonucleico) foram realizadas no Laboratório de Epidemiologia Molecular do Departamento de Parasitologia de Universidade Estadual Paulista (UNESP).

3.9.1 – Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada, mediante a pré-incubação de 200 µL de sangue com 20 µL proteinase K e 200 µL de tampão AL (tampão de lise) durante 10 minutos a 56 °C. O DNA foi isolado usando QIAamp DNA Mini Kit® (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. Cada amostra de DNA foi eluída em 50 µL de tampão AE (tampão de eluição).

3.9.2 – PCR

Para amplificação do DNA foram utilizados cinco microlitros do extrato de DNA das 346 amostras sanguíneas. Um fragmento da região de 18S rRNA foi amplificado utilizando o conjunto de primers Hep F (5'-ATA-CAT-G AG-CAA-AAT-CTC-AAC- 3') e Hep R (5' -CTT-ATT-ATT-CCA-TGC-TGC-AG-3'), que correspondem às sequências conservadas de *Hepatozoon* (INOKUMA et al., 2002; RUBINI et al., 2005). A reação de amplificação foi realizada num total de 25 µL, contendo 5 µL de DNA extraído, 0,2 µL de Taq DNA polimerase ([1U/µL]) (Invitrogen, Carls, CA), 1,0 µL de MgCl₂ ([50 nM]), 0,5 µL (dNTPs [10 nM]), 0,75 µL de cada primer HepF e HepR ([10:00]), 2,5 µL de tampão de reação 10x (10 nM de Tris-HCl pH 8,3, 50, nM de KCl). O controle negativo da reação não continha DNA e água livre de DNase-RNase foi utilizada para ajustar o volume final de 25 µL. O controle positivo da reação foi o isolado de *Hepatozoon* sp. de um cão no Brasil (RUBINI et al., 2005). Reações de PCR foram realizadas em termociclador Biometra (T gradiente) a 94 °C durante 3 minutos e 35 ciclos repetitivos de 94 °C durante 1 minuto, 57 °C durante 2 minutos e, 72 °C durante 2 minutos, seguido de 1 ciclo de 7 minutos de extensão a 72 °C. Aliquotas dos produtos amplificados (6 µL) foram analisadas em gel de agarose a 1% corado com GelRedTM (Uniscience) em eletroforese a 80 V durante 30 min em tampão TAE e visualizadas em transluminador UV. Os fragmentos de PCR foram estimados por comparação

com quantidades conhecidas de padrões eletroforéticos, usando um marcador de 250 bp (Invitrogen®).

3.9.3 – Sequenciamento

Amostras sanguíneas e a hemolinfa de carrapatos positivos foram enviadas para School of Veterinary Medicine, Department of Microbiology and Molecular Genetics, Hebrew University, em Israel, onde se realizaram a extração do DNA, PCR e sequenciamento do DNA, sob a supervisão do Professor Gad Baneth.

Após a verificação da positividade de todas as amostras pelas técnicas de extensão sanguínea e PCR, foram selecionadas para o sequenciamento aquelas positivas nos dois métodos de diagnósticos utilizados.

Alíquotas amostrais, mantidas em freezer -70° C, foram descongeladas à temperatura ambiente. Em seguida, utilizando-se pipeta e ponteiros estéreis, foram colocadas em papéis filtro estéreis nº3 (Whatman®) de 12,5 centímetros (cm) de diâmetro, previamente identificados, formando três círculos equidistantes de aproximadamente dois centímetros de diâmetro cada. As amostras em papel filtro foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis, de modo a evitar o contato de uma amostra com outra.

Em relação à hemolinfa do carrapato, uma vez constatada a presença de oocistos de *Hepatozoon* sp., o material foi lavado com solução salina fisiológica 0,85% e transferido para microtubo de polietileno. O microtubo, devidamente identificado, contendo a solução salina com a hemolinfa do carrapato, foi enviado para confirmação do diagnóstico pela técnica molecular e sequenciamento para o local acima mencionado.

O DNA foi extraído das amostras em papel filtro e da solução salina contendo a hemolinfa do carrapato utilizando o kit comercial Tissue Illustra Mini Spin kit (GE Healthcare®, Buckinghamshire, UK) de acordo com instruções do fabricante.

Um fragmento da região de 18S rRNA foi amplificado utilizando o conjunto de primers Hep F (5'-ATA-CAT-GAG-CAA-AAT-CTC-AAC-3') e Hep R (5' - CTT-ATT-ATT-CCA-TGC-TGC-AG-3'), que correspondem as sequências conservadas de *Hepatozoon* (INOKUMA et al., 2002; RUBINI et al., 2005).

Os fragmentos amplificados pela PCR seguido da purificação foram sequenciados utilizando o Big Dye v 3.1 (TM Terminator - cycle sequencing ready reaction – Applied Biosystems). As sequências foram avaliadas no software ChromasPro versão 1.33 e

comparadas com dados de sequências disponíveis no GenBank, utilizando o programa BLAST 2.2.9 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

3.9.4 – Árvore filogenética

O alinhamento das sequências de aminoácidos de todas as amostras foi feito usando Clustal W implementado no programa MEGA 3.0 (www.megasoftware.net). Foi estimada a divergência entre os diferentes haplótipos pelo modelo de distância nucleotídica Kimura 2-parâmetros (K2p) e o método de distância Neighbor Joining (NJ) para construção de árvore filogenética, usando medidas de suporte e confiabilidade de ramos calculados com porcentagem de 1000 replicas (bootstrap).

3.10 – Análise estatística

O teste Qui-quadrado, com nível de significância de 5%, foi utilizado para avaliar a possível interferência das variáveis procedência, sexo e faixa etária de cães infectados com *Hepatozoon* sp. e, verificar a relação de positividade entre as metodologias convencional e molecular. Para comparar duas proporções, foi usado o teste Binomial, com nível de significância de 5%, pelo software BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2005).

A análise estatística de cada variável hematológica e bioquímica estudada foi feita no software BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2005). Foi utilizado o teste de Mann-Whitney para as variáveis não paramétricas e o teste *t* de Student para as variáveis paramétricas, com nível de significância de 5%. Para comparação de frequência de valores, foi utilizado o Teste de comparações múltiplas para proporções, utilizando o programa estatístico R (BIASE; FERREIRA, 2009).

4 – RESULTADOS

4.1 – Prevalência do *Hepatozoon* sp.

4.1.1 – Pela técnica de extensão sanguínea

Dos 346 animais avaliados, 72 (20,8%) apresentaram, pela extensão sanguínea proveniente de vaso periférico, gamontes de *Hepatozoon* sp. (Figura 6).

Dos 134 animais procedentes da área rural, 45 (33,6%) foram positivos e, dos 212 da área urbana, 27 (12,7%) foram positivos. Dos 166 machos e 180 fêmeas, 33 (19,8%) e 39 (21,6%), respectivamente, foram positivos. Em relação à faixa etária observou-se positividade em 53 dos 254 (20,8%) adultos e 19 dos 92 (20,6%) filhotes (Tabela 1).

Pela técnica convencional existiu diferença significativa ($p < 0,05$) na prevalência de infecção por *Hepatozoon* sp. ao relacionar as áreas estudadas (Tabela 1).

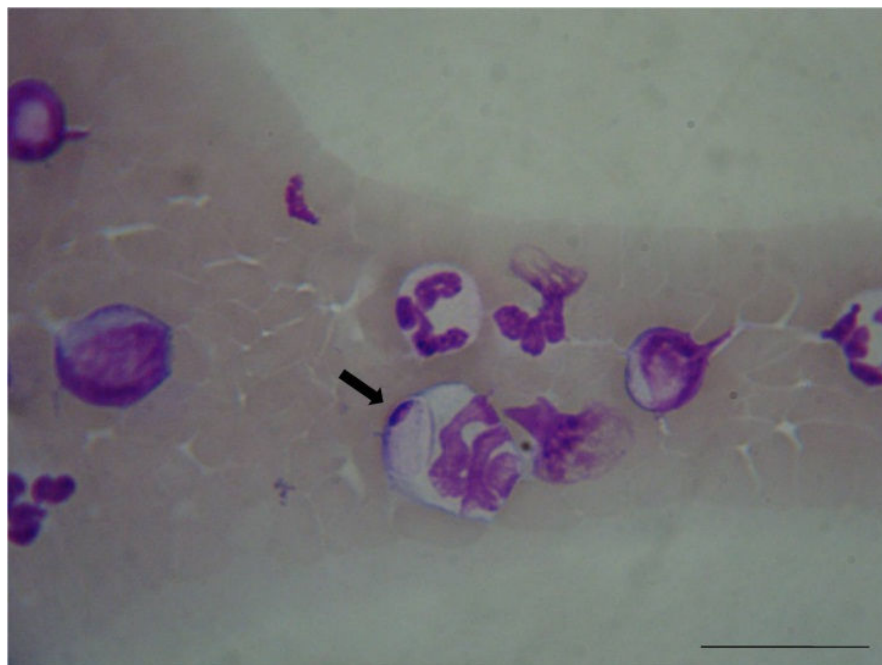


Figura 6 – Gamonte de *Hepatozoon* sp. (seta) em neutrófilo na extensão sanguínea de vaso periférico (Barra = 25µm)

Tabela 1 – Prevalência do *Hepatozoon* sp. pela extensão sanguínea de vaso periférico em cães naturalmente infectados de Uberlândia, MG, Brasil, de acordo com procedência, sexo e faixa etária.

VARIÁVEL		EXTENSÃO SANGUÍNEA		p valor *
		Nº	Positivo	
Procedência	Rural	134	45(33,6%)	<0,0001*
	Urbana	212	27(12,7%)	
Sexo	Macho	166	33 (19,8%)	0,7821
	Fêmea	180	39 (21,6%)	
Faixa etária	Adulto	254	53 (20,8%)	0,9151
	Filhote	92	19 (20,6%)	
TOTAL		346	72 (20,8%)	

Teste Qui-quadrado (* p< 0,05)

4.1.2 – Pela PCR

A prevalência observada pela técnica de PCR foi de 79,2% (274/346).

Do total de animais da área rural (n=134), 113 (84,3%) foram positivos e, de procedência urbana (n=212), 161 (75,9%) foram positivos. Dos 166 machos e 180 fêmeas, 133 (80,1%) e 141 (78,3%), respectivamente, foram positivos. Em relação à faixa etária observou-se positividade em 196 dos 254 (77,1%) adultos e 78 dos 92 (84,7%) filhotes (Tabela 1).

Não foram observadas diferenças estatísticas significantes (p>0,05) entre as áreas estudadas, sexo e faixa etária. (Tabela 2).

Tabela 2– Prevalência do *Hepatozoon* sp. pela PCR em cães naturalmente infectados de Uberlândia, MG, Brasil, de acordo com procedência, sexo e faixa etária.

VARIÁVEL		PCR		p valor *
		Nº	Positivo	
Procedência	Rural	134	113 (84,3%)	0,0826
	Urbana	212	161 (75,9%)	
Sexo	Macho	166	133 (80,1%)	0,7821
	Fêmea	180	141 (78,3%)	
Faixa etária	Adulto	254	196 (77,1%)	0,1639
	Filhote	92	78 (84,7%)	
TOTAL		346	274	

Teste Qui-quadrado (* p< 0,05)

Ao se avaliar procedência e o sexo, dos animais, a positividade foi maior nos machos em relação às fêmeas. Quando se avalia a relação entre sexo e área, machos de área rural foram mais positivos, sem diferença significativa, enquanto, em relação às fêmeas, estas foram mais positivas na área urbana do que rural, com diferença significativa.

Em relação ao sexo, observou-se relação desta variável com a área estudada, com diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) entre as prevalências de animais positivos.

Tabela 3 – Prevalência do *Hepatozoon* sp. pela PCR correlacionando procedência e sexo de cães naturalmente infectados de Uberlândia, MG, Brasil.

Área	Nº. de cães PCR+	Positivo para <i>Hepatozoon</i> sp.		p valor *
		Macho (n=166) n (%)	Fêmea (n=180) n (%)	
Rural	113 (41,2%)	64 (56,6) ^{Aa}	49 (43,4) ^{Bb}	0,0337*
Urbana	161(58,8%)	69 (42,8) ^{Ba}	92 (57,2) ^{Aa}	
TOTAL	274	133 (80,1) ^A	141 (78,3) ^A	

Teste Qui-quadrado (* $p < 0,05$)

Teste Binomial: duas proporções. - Letras maiúsculas diferentes na linha indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0.05$).

Letras minúsculas diferentes na coluna indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0.05$).

Na tabela 4 se encontram os dados de comparação entre faixa etária e procedência. Como pode ser observado, 84,7% dos filhotes examinados estavam positivos, sendo a positividade maior em área urbana, sem diferença estatística. Entre os adultos, percentual maior de cães de área urbana estava infectado, com diferença estatística. Quando se comparam filhotes e adultos de ambas as áreas, o percentual de adultos infectados foi maior, com diferença significativa.

Em relação à idade, observou-se relação desta variável com a área estudada, com diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) entre as prevalências de animais positivos.

Tabela 4 – Prevalência do *Hepatozoon* sp. pela PCR correlacionando procedência e faixa etária de cães naturalmente infectados de Uberlândia, MG, Brasil

Área	Nº de cães PCR+	Positivo para <i>Hepatozoon</i> sp.		p valor *
		Filhote (n=92) n (%)	Adulto (n=254) n (%)	
Rural	113 (41,2%)	44 (38,9) ^{Ba}	69 (61,1) ^{Ab}	0,0021*
Urbana	161 (58,8%)	34 (21,1) ^{Ba}	127 (78,9) ^{Aa}	
TOTAL	274	78 (84,7) ^A	196 (77,1) ^A	

Teste Qui-quadrado (* p<0,05)

Teste Binomial: duas proporções. - Letras maiúsculas diferentes na linha indicam valores estatisticamente diferentes (p < 0.05).

Letras minúsculas diferentes na coluna indicam valores estatisticamente diferentes (p < 0.05).

4.2 – Comparação entre métodos de diagnóstico

A prevalência pela técnica de extensão sanguínea foi de 20,8% (72/346) e, pela PCR 79,2% (274/346). Todas as 72 amostras positivas pelo método parasitológico foram positivas pelo método molecular. Foram observadas diferenças estatísticas (p<0,05) ao comparar as duas metodologias, conforme mostra a tabela 5.

Tabela 5 – Prevalência do *Hepatozoon* sp. pela PCR e extensão sanguínea de vaso periférico em cães naturalmente infectados de Uberlândia, MG, Brasil.

Técnica	<i>Hepatozoon</i> sp.		p valor *
	Positivo Nº (%)	Negativo Nº (%)	
PCR	274 (79,2) ^{Ab}	72 (20,8) ^{Ba}	<0,0001*
EXTENSÃO SANGUÍNEA	72 (20,8) ^{Ba}	274 (79,2) ^{Ab}	
TOTAL	346	346	

Letras minúsculas diferentes na coluna indicam valores estatisticamente diferentes (p < 0.05).

Letras maiúsculas diferentes na linha indicam valores estatisticamente diferentes (p < 0.05).

Teste Binomial: duas proporções

Teste Qui-Quadrado (* p<0,05)

4.3 – Presença de infecção concomitante ao *Hepatozoon* sp.

Ao avaliar a presença de outros hemoparasitos pela leitura da extensão de sangue periférico, observaram-se 38 cães com infecção concomitante ao *Hepatozoon* sp.. Desses, 11 (28,9%) eram procedentes da área rural e 27 (71,1%) da área urbana. Mórulas de *Ehrlichia*

sp., merozoítos de *Babesia* sp. e corpúsculos de inclusão de *Anaplasma platys* foram visualizados.

O número de cães com infecção concomitante ao *Hepatozoon* sp., em relação ao número total dos animais, foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$) entre áreas rural e urbana (Tabela 6).

Tabela 6 – Número de cães com infecções concomitantes ao *Hepatozoon* sp. em extensões sanguíneas de vaso periférico, de acordo com a procedência.

Hemoparasitos	Procedência	
	ÁREA RURAL	ÁREA URBANA
<i>Hepatozoon</i> sp. + <i>Ehrlichia</i> sp.	8	17
<i>Hepatozoon</i> sp. + <i>Babesia</i> sp.	1	1
<i>Hepatozoon</i> sp. + <i>Anaplasma platys</i>	1	3
<i>Hepatozoon</i> sp. + <i>Ehrlichia</i> sp. + <i>Babesia</i> sp.	1	4
<i>Hepatozoon</i> sp. + <i>Ehrlichia</i> sp. + <i>Anaplasma platys</i>	0	2
Total (n=38)	11(28,9%) ^B	27 (71,1%) ^A

Letras maiúsculas diferentes na linha indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0.05$).
Teste Binomial: duas proporções

4.4 – Carrapatos

Dos 212 cães da área urbana, 148 (69,8%) estavam infestados por carrapatos. Esses, pelas características apresentadas e colocadas em chave dicotômica foram diagnosticados com *Rhipicephalus sanguineus*.

Dos 134 cães da área rural, 18 (13,4%) tinham infestação por carrapatos, dos quais 14 (77,8%) estavam infestados por *R. sanguineus*, três (16,7%) por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e um (5,5%) por *Amblyomma cajennense*. Dos cães infestados por *R. sanguineus*, um cão apresentava, também, *A. cajennense* e outro cão *R.(B.) microplus*.

O número de cães infestados por carrapatos em relação ao número total de cães foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$) nas áreas rural e urbana (Tabela 7).

Tabela 7 – Número de cães infestados com carrapato nas áreas rural e urbana de Uberlândia, MG, Brasil.

Espécie	Procedência	
	ÁREA RURAL (n=134)	ÁREA URBANA (n=212)
<i>R. sanguineus</i>	12	148
<i>R. (B.) microplus</i>	3	0
<i>A. cajennense</i>	1	0
<i>R. sanguineus</i> + <i>A. cajennense</i>	1	0
<i>R. sanguineus</i> + <i>R.(B.) microplus</i>	1	0
Total	18 (13,4%) ^B	148 (69,8%) ^A

Letras maiúsculas diferentes na linha indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0.05$).
 Teste Binomial: duas proporções

4.5 – Positividade dos carrapatos

Todos os carrapatos foram dissecados e na hemolinfa de uma fêmea semi-ingurgitada de *R.(B.) microplus* (Figura 7) foram observados oito oocistos esporulados ovais, mensurados em $251,3 \pm 13,7 \times 173,9 \pm 5,34 \mu\text{m}$ (Figura 8).

O cão, procedente da área rural, infestado pela fêmea de *R.(B.) microplus* apresentou na extensão sanguínea de vaso periférico, um gamonte de *Hepatozoon* sp. de formato elipsoidal e com $10 \mu\text{m}$ de comprimento por $7 \mu\text{m}$ de largura (Figura 6).



Figura 7 – Identificação da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: a) Peritreme oval b) Palpo curto e menor que hipostômio.

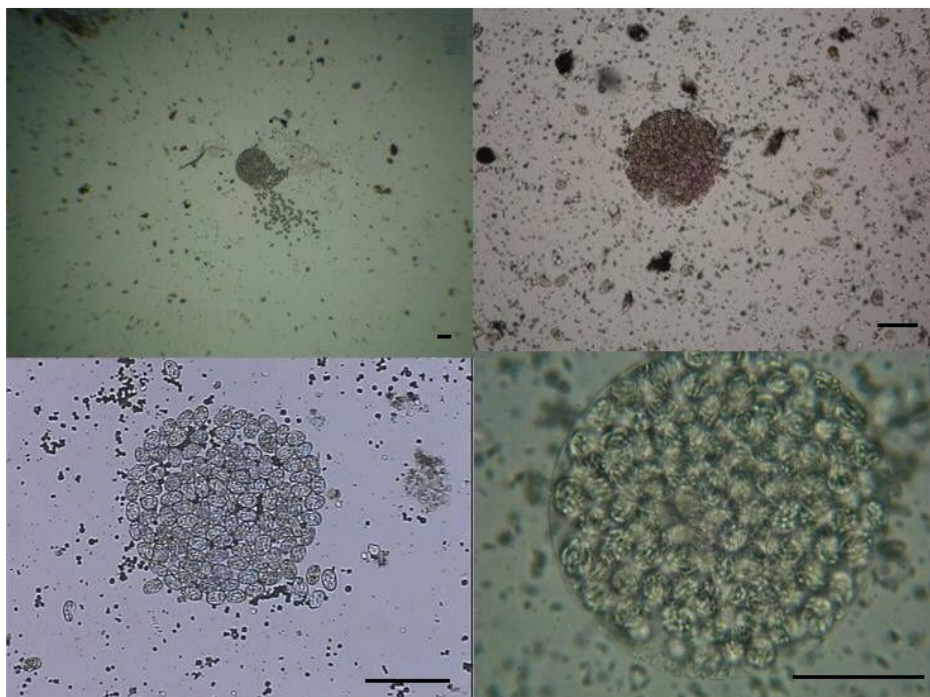


Figura 8 – Oocisto maduro de *Hepatozoon* sp. removido da hemolinfa de uma fêmea semi-ingurgitada de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* encontrada em um cão naturalmente infectado. (Barra = 100µm)

4. 6 – Análise da PCR, sequenciamento e árvore filogenética

Obteve-se sucesso no sequenciamento do DNA de 31 amostras sanguíneas, das 72 amostras positivas pelos métodos parasitológico e molecular (Figura 9) enviadas para Hebrew University. Das amostras sequenciadas, 17 foram de cães da área urbana e 14 da área rural.

Os produtos de PCR das amostras sanguíneas dos 17 cães da área urbana foram sequenciados e as análises pelo BLAST de um fragmento de aproximadamente 630 pares de base do gene 18S rRNA indicaram que as sequências de 14 cães foram 99% homólogas ao *H. canis* de um cão da Espanha (número de acesso no GenBank AY150067). As sequências dos outros três cães foram 99% idênticas ao número de acesso no GenBank FJ497017, de um cão da Croácia.

Ao analisar os produtos de PCR de 14 amostras de sangue de cães da área rural, as sequências de 11 cães foram 99% idênticas ao *H. canis* de um cão da Espanha (número de acesso no GenBank AY150067), enquanto que as sequências dos outros dois cães foram 99% homólogas ao *H. canis* de uma raposa vermelha da Itália (número de acesso no GenBank GU371448). As análises pelo BLAST de um fragmento de aproximadamente 493 pares de base do gene 18S rRNA indicaram que a sequências do cão infestado *R.(B) microplus* foram 98% homólogas ao *H. canis* da Espanha (AY150067).

Uma nova sequência de *H. canis* de cão da área rural de Uberlândia idêntica à sequência de nove cães de outros locais foi depositada no GenBank com número de acesso JN835188. Análise filogenética de 533 pares de base do gene 18S rRNA foi similar às sequências de *H. canis* de outros locais e países, porém diferente de *H. americanum* e *H. felis* (Figura 10).

A sequência de 595 pares de base do gene 18S rRNA da hemolinfa do carrapato foi 100% idêntica à sequência base do *H. canis* depositado no GenBank acesso AY150067.2 e depositada no GenBank com número de acesso HQ605710 (Figura 10). Entretanto, esta sequência não foi 100% homóloga a sequência do cão infestado pelo *R.(B) microplus*.

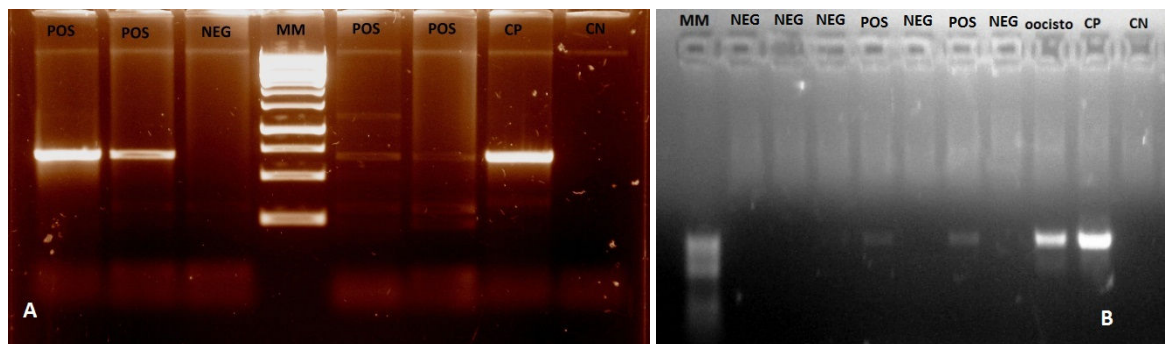


Figura 9– Uso do conjunto de primers do gene 18S rRNA gênero específico (HepF e HepR) para a detecção de *Hepatozoon* spp. em extratos de DNA de sangue de cães (A) e da hemocele de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (B) naturalmente infectados. Símbolos: MM (marcador de peso molecular); CP (controle positivo); CN (controle negativo); POS (positivo); NEG (negativo).

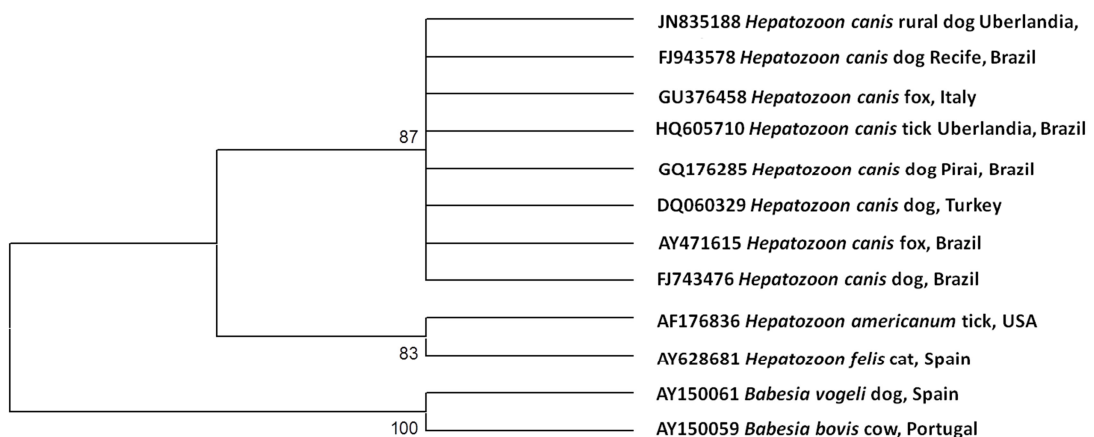


Figura 10- Árvore filogenética analisada pelo método Neighbor Joining (NJ) comparando fragmentos de 532 pares de base do gene 18S rRNA de *Hepatozoon canis* do cão da área rural de Uberlândia (JN835188) e, da hemocele da fêmea de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (HQ 605710).

4. 7 – Perfil bioquímico sérico

A tabela 8 mostra os valores médios dos parâmetros bioquímicos séricos das amostras sanguíneas dos 274 cães positivos para *H. canis*, procedentes das áreas rural e urbana. Como pode ser observado, na comparação com os valores de referência, os animais positivos procedentes das áreas rural e urbana, com *H. canis* e com infecção concomitante, apresentaram aumento na atividade das enzimas AST e LDH. Animais da área urbana com infecção mista tiveram os valores de CK elevados. Não foram observadas diferenças significantes entre os valores médios dos parâmetros aumentados ao se comparar cães com *H. canis* e com infecção concomitante ($p>0,05$), independente da área.

O aumento da atividade das enzimas AST e LDH ocorreu na maioria dos animais, confirmando o comportamento do grupo frente a estes parâmetros e descartando a possibilidade de valores isolados extremos, que poderiam, erroneamente, justificar os valores médios altos encontrados (Tabela 9).

Machos e fêmeas da área rural apresentaram valores séricos de triglicérides menores, quando comparados aos valores de machos e fêmeas da área urbana. As concentrações de uréia, creatinina foram menores em fêmeas da zona rural, do que em fêmeas da zona urbana (Tabela 10).

As concentrações de proteína total e globulinas foram menores em filhotes do que em adultos, ao contrário dos valores de FAL e CK, em ambas as áreas do estudo. Na área urbana, os adultos apresentaram valores de uréia e creatinina maiores do que os filhotes, em contrapartida, os valores de colesterol total foram menores. Na comparação entre filhotes da área rural e filhotes da área urbana, os valores de triglicérides e CK foram menores para aqueles procedentes da área rural, enquanto, os de proteína total e globulinas foram inferiores nos da urbana. Concentrações de uréia, creatinina e triglicérides foram estatisticamente menores ($p<0,05$) em adultos da zona rural do que em adultos da zona urbana (Tabela 11).

4. 8 – Perfil hematológico

O perfil hematológico dos cães positivos para *H. canis*, assim como, para os animais com infecção concomitantes, das áreas rural e urbana, está inserido na tabela 12. Observa-se redução dos valores médios, abaixo dos valores de referência, do número de hemácias, hemoglobina, volume globular e plaquetas, somente nos animais com infecção concomitante, procedentes da área rural e urbana. Os cães de ambas as áreas, independente da presença de

outro hemoparasito, apresentaram aumento do número de metamielócitos e neutrófilos bastonetes (desvio para esquerda). Também, foi observado nesses animais com infecção única, eosinofilia.

A diminuição do número de hemácias, valores de hemoglobina, volume globular e plaquetas e, aumento do número de metamielócitos e eosinófilos não ocorreu na maioria dos animais, havendo a possibilidade dos valores isolados extremos, justificarem erroneamente os valores médios encontrados. Entretanto, a elevação no número de neutrófilos bastonetes ocorreu na maioria dos animais, confirmando o comportamento do grupo frente a este parâmetro (Tabela 13).

Os valores de volume globular, hemoglobina e número de hemácias foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) entre machos e fêmeas da área urbana, porém dentro da normalidade para a espécie (Tabela 14).

Em relação à idade, os valores de volume globular, hemoglobina, número de hemácias foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) entre filhotes e adultos de ambas as áreas, porém dentro da normalidade para a espécie (Tabela 15).

Tabela 8 - Médias e desvios padrão dos parâmetros bioquímicos séricos de cães das áreas rural e urbana de Uberlândia, MG, positivos para *Hepatozoon canis* (P) e positivos para *H. canis* com infecção concomitante (PO).

Parâmetros	ÁREA RURAL				ÁREA URBANA				Valores de referência
	P (n=102)		PO (n=11)		P (n=134)		PO (n=27)		
	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	
Proteína total (g/dL)	6,81 ^a	1,31	7,08 ^a	1,79	6,72 ^A	1,39	7,15 ^A	1,73	5,4-7,1*
Albumina (g/dL)	2,92 ^a	0,50	2,67 ^a	0,47	2,85 ^A	0,53	2,62 ^A	0,44	2,6-3,3 *
Globulinas (g/dL)	3,89 ^a	1,22	4,41 ^a	1,68	3,97 ^A	1,58	4,43 ^A	1,82	2,7-4,4 *
Relação A:G	0,83 ^a	0,32	0,68 ^a	0,27	0,90 ^A	0,50	0,71 ^A	0,31	0,5-1,3
Uréia (mg/dL)	32,88 ^a	16,12	31,89 ^a	10,16	39,67 ^A	31,66	39,91 ^A	16,11	21-60,0***
Creatinina (mg/dL)	0,95 ^a	0,26	0,89 ^a	0,33	1,19 ^A	0,73	1,05 ^A	0,55	0,5-1,5 *
Colesterol total (mg/dL)	179,35 ^a	61,36	167,72 ^a	76,62	172,66 ^A	56,27	178,71 ^A	69,97	135-270,0 *
Triglicérides (mg/dL)	61,10 ^a	41,07	60,01 ^a	31,14	84,64 ^A	55,40	77,19 ^A	47,59	40-169,0 ***
FAL (U/L)	72,43 ^a	66,75	145,38 ^a	228,37	85,26 ^A	51,04	103,96 ^A	91,60	20-156,0 *
GGT (U/L)	6,53 ^a	3,47	5,94 ^a	2,98	6,83 ^A	4,93	7,25 ^A	3,63	1,2-6,4 *
ALT (U/L)	40,31 ^a	20,34	43,26 ^a	14,68	49,70 ^A	26,53	39,76 ^A	20,34	21-102,0 *
CK (U/L)	202,98 ^a	168,52	210,84 ^a	149,02	202,09 ^A	167,32	301,43 ^A	249,82	50-250,0 **
AST (U/L)	44,74 ^a	15,46	43,99 ^a	7,79	45,35 ^A	17,73	48,63 ^A	15,25	16-40,0 **
LDH (U/L)	299,37 ^a	204,72	371,82 ^a	395,90	345,90 ^A	271,14	421,41 ^A	284,22	45-233,0 *

Diferentes letras maiúsculas na linha indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) entre cães positivos para *H. canis* (P) e positivos para *H. canis* com infecção concomitante (PO) na área urbana. Diferentes letras minúsculas na linha indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) entre cães positivos para *H. canis* (P) e positivos para *H. canis* com infecção concomitante (PO) na área rural.

* Kaneko, Harvey e Bruss (2008) ** Thrall et al. (2006) *** Latimer, Mahaffey e Prasse (2003)

Tabela 9 - Frequência (%) de cães de Uberlândia, MG, positivos para *Hepatozoon canis* em relação aos resultados bioquímicos séricos

Parâmetros	ÁREA RURAL (n=113)			ÁREA URBANA (n=161)		
	Diminuído % (n)	Normal % (n)	Aumentado % (n)	Diminuído % (n)	Normal % (n)	Aumentado % (n)
Proteína total (g/dL)	15,04 (17) ^b	38,05 (43) ^a	46,90 (53) ^a	14,20 (23) ^B	48,76 (78) ^A	37,04 (60) ^A
Albumina (g/dL)	20,35 (23) ^b	64,60 (73) ^a	15,04 (17) ^b	34,56 (56) ^B	54,32 (87) ^A	11,12 (18) ^C
Globulinas (g/dL)	18,58 (21) ^b	50,44 (57) ^a	30,98 (35) ^b	20,98 (34) ^B	43,82 (70) ^A	35,20 (57) ^A
Relação A:G	15,04 (17) ^b	76,99 (87) ^a	7,97 (9) ^b	22,22 (36) ^B	65,43 (105) ^A	12,35 (20) ^B
Uréia (mg/dL)	19,47 (22) ^b	76,99 (87) ^a	3,54 (4) ^c	12,96 (21) ^B	79,02 (127) ^A	8,02 (13) ^B
Creatinina (mg/dL)	0,88 (1) ^b	97,34 (110) ^a	1,78 (2) ^b	0,61 (1) ^C	82,10 (132) ^A	17,29 (28) ^B
Colesterol total (mg/dL)	25,66 (29) ^b	66,37 (75) ^a	7,97 (9) ^c	26,54 (43) ^B	66,66 (107) ^A	6,80 (11) ^C
Triglicérides (mg/dL)	33,62 (38) ^b	63,71 (72) ^a	2,67 (3) ^c	15,43 (25) ^B	78,40 (126) ^A	6,17 (10) ^B
FAL (U/L)	6,19 (7) ^b	83,18 (94) ^a	10,63 (12) ^b	8,64 (14) ^B	83,95 (135) ^A	7,41 (12) ^B
GGT (U/L)	0 (0) ^c	61,94 (70) ^a	38,05 (43) ^b	4,32 (7) ^B	50,00 (80) ^A	45,68 (74) ^A
ALT (U/L)	7,07 (8) ^b	91,15 (103) ^a	1,78 (2) ^b	4,94 (8) ^B	89,50 (144) ^A	5,56 (9) ^B
CK (U/L)	3,54 (4) ^c	75,22 (85) ^a	21,24 (24) ^b	3,08 (5) ^C	72,22 (116) ^A	24,70 (40) ^B
AST (U/L)	0 (0) ^b	43,36 (49) ^a	56,64 (64) ^a	0 (0) ^C	40,42 (64) ^B	59,88 (97) ^A
LDH (U/L)	0 (0) ^b	45,13 (51) ^a	54,87 (62) ^a	0 (0) ^C	30,24 (49) ^B	69,76 (113) ^A

Diferentes letras maiúsculas indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0.05$) em cães da área urbana. Diferentes letras minúsculas indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0.05$) em cães da área rural.

Tabela 10 – Médias e desvios padrão dos parâmetros bioquímicos séricos de fêmeas e machos de Uberlândia, MG, positivos para *Hepatozoon canis* das áreas rural e urbana.

Parameters	ÁREA RURAL				ÁREA URBANA			
	Machos (n=64)		Fêmeas (n=49)		Machos (n=69)		Fêmeas (n=92)	
	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio
Proteína total (g/dL)	6,87 ^{Aa}	1,46	6,79 ^{Aa}	1,21	6,71 ^{Aa}	1,50	6,88 ^{Aa}	1,43
Albumina (g/dL)	2,89 ^{Aa}	0,51	2,91 ^{Aa}	0,49	2,85 ^{Aa}	0,52	2,87 ^{Aa}	0,56
Globulinas (g/dL)	3,98 ^{Aa}	1,33	3,88 ^{Aa}	1,20	3,86 ^{Aa}	1,68	4,02 ^{Aa}	1,63
Relação A:G	0,81 ^{Aa}	0,33	0,83 ^{Aa}	0,29	0,92 ^{Aa}	0,52	0,80 ^{Aa}	0,45
Uréia (mg/dL)	34,30 ^{Aa}	17,21	30,81 ^{Ab}	13,14	36,24 ^{Aa}	12,36	42,34 ^{Aa}	37,66
Creatinina (mg/dL)	0,97 ^{Aa}	0,27	0,92 ^{Ab}	0,25	1,15 ^{Aa}	0,51	1,17 ^{Aa}	0,83
Colesterol total (mg/dL)	171,93 ^{Aa}	64,47	186,42 ^{Aa}	59,98	164,14 ^{Aa}	54,42	180,91 ^{Aa}	60,84
Triglicérides (mg/dL)	55,98 ^{Ab}	36,97	67,53 ^{Ab}	43,36	84,43 ^{Aa}	54,16	82,61 ^{Aa}	54,35
FAL (U/L)	82,84 ^{Aa}	117,69	75,21 ^{Aa}	55,94	66,17 ^{Aa}	58,47	75,92 ^{Aa}	63,01
GGT (U/L)	6,67 ^{Aa}	3,99	6,21 ^{Aa}	2,49	7,13 ^{Aa}	3,59	6,72 ^{Aa}	5,46
ALT (U/L)	43,24 ^{Aa}	23,36	37,14 ^{Aa}	13,40	50,57 ^{Aa}	29,41	44,94 ^{Aa}	23,09
CK (U/L)	220,09 ^{Aa}	166,65	182,39 ^{Aa}	164,70	218,49 ^{Aa}	176,00	218,76 ^{Aa}	194,96
AST (U/L)	46,45 ^{Aa}	16,88	41,44 ^{Aa}	11,49	47,95 ^{Aa}	18,78	44,34 ^{Aa}	16,10
LDH (U/L)	317,61 ^{Aa}	217,99	301,82 ^{Aa}	243,26	369,27 ^{Aa}	345,14	350,27 ^{Aa}	205,60

Diferentes letras maiúsculas na linha indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) para machos e fêmeas de cada área. Diferentes letras minúsculas na linha indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) entre machos e entre fêmeas.

Tabela 11 – Médias e desvios padrão dos parâmetros bioquímicos séricos de filhotes e adultos de Uberlândia, MG, positivos para *Hepatozoon canis* das áreas rural e urbana.

Parâmetros	ÁREA RURAL				ÁREA URBANA			
	Filhotes (n=44)		Adultos (n=69)		Filhotes (n=34)		Adultos (n=127)	
	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio
Proteína total (g/dL)	6,22 ^{Ba}	1,21	7,13 ^{Aa}	1,30	5,62 ^{Bb}	1,22	7,11 ^{Aa}	1,36
Albumina (g/dL)	2,91 ^{Aa}	0,49	2,89 ^{Aa}	0,51	2,86 ^{Aa}	0,54	2,83 ^{Aa}	0,54
Globulinas (g/dL)	3,31 ^{Ba}	1,02	4,23 ^{Aa}	1,27	2,77 ^{Bb}	1,14	4,28 ^{Aa}	1,59
Relação A:G	0,95 ^{Ab}	0,30	0,74 ^{Aa}	0,29	1,31 ^{Aa}	0,64	0,73 ^{Ba}	0,35
Uréia (mg/dL)	30,27 ^{Aa}	12,09	34,39 ^{Ab}	17,39	33,15 ^{Ba}	16,53	41,38 ^{Aa}	31,93
Creatinina (mg/dL)	0,90 ^{Aa}	0,29	0,97 ^{Ab}	0,24	0,81 ^{Ba}	0,22	1,26 ^{Aa}	0,76
Colesterol total (mg/dL)	186,92 ^{Aa}	67,04	172,67 ^{Aa}	59,61	192,98 ^{Aa}	64,48	168,72 ^{Ba}	56,17
Triglicérides (mg/dL)	59,81 ^{Ab}	41,75	61,74 ^{Ab}	39,29	70,75 ^{Aa}	22,14	86,64 ^{Aa}	59,23
FAL (U/L)	130,87 ^{Aa}	132,39	46,80 ^{Ba}	34,49	128,57 ^{Aa}	57,23	57,16 ^{Ba}	53,19
GGT (U/L)	5,75 ^{Aa}	2,86	6,93 ^{Aa}	3,67	6,79 ^{Aa}	4,61	6,93 ^{Aa}	4,78
ALT (U/L)	39,26 ^{Aa}	23,41	42,73 ^{Aa}	17,00	40,14 ^{Aa}	15,70	49,22 ^{Aa}	27,87
CK (U/L)	279,22 ^{Ab}	195,72	155,61 ^{Ba}	123,28	334,85 ^{Aa}	175,24	188,92 ^{Ba}	177,96
AST (U/L)	43,86 ^{Aa}	14,10	44,54 ^{Aa}	15,54	45,75 ^{Aa}	21,16	45,94 ^{Aa}	16,32
LDH (U/L)	342,07 ^{Aa}	265,15	303,70 ^{Aa}	200,66	374,79 ^{Aa}	203,77	354,31 ^{Aa}	289,67

Diferentes letras maiúsculas na linha indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) para filhotes e adultos de cada área. Diferentes letras minúsculas na linha indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) entre filhotes e entre adultos.

Tabela 12 - Médias e desvios padrão dos parâmetros hematológicos de cães das áreas rural e urbana de Uberlândia, MG, positivos para *Hepatozoon canis* (P) e positivos para *Hepatozoon canis* com infecção concomitante (PO).

Parâmetros	ÁREA RURAL				ÁREA URBANA				Valor Referência *
	P (n=102)		PO (n=11)		P (n=134)		PO (n=27)		
	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	
Volume globular (%)	39,7 ^a	7,25	35,3 ^a	9,18	43,6 ^A	9,57	33,4 ^B	9,23	37-55
Hemoglobina (g/dL)	12,8 ^a	2,56	11,9 ^a	3,28	14,3 ^A	3,20	11,0 ^B	3,19	12-18
Hemácias (x 10 ⁶ /μL)	6,3 ^a	1,12	5,6 ^a	1,48	6,6 ^A	1,30	5,3 ^B	1,44	5,5-8,5
VGM (μm ³)	62,9 ^a	3,31	63,0 ^a	3,32	65,7 ^A	4,33	64,9 ^A	3,15	60-77
CHGM (g/dL)	33,6 ^a	1,41	32,8 ^a	1,56	32,8 ^A	1,29	32,8 ^A	1,24	31-36
RDW (%)	13,2 ^a	1,48	13,6 ^a	1,00	13,9 ^A	1,87	13,7 ^A	2,22	14-17
VPM	9,5 ^b	2,24	11,9 ^a	3,08	9,5 ^B	1,61	10,3 ^A	2,21	6,1-10,1
Plaquetas (x 10 ³ /μL)	286,6 ^a	141,68	168,7 ^b	118,95	268,5 ^A	147,19	140,6 ^B	109,06	200-500
Leucócitos (/μL)	15874,5 ^a	5158,76	13318,2 ^a	6051,42	15297,0 ^A	5592,58	15874,1 ^A	7487,46	6,000-17,000
Metamielócitos (/μL)	22,6 ^a	119,93	73,9 ^a	245,13	23,3 ^A	270,22	70,1 ^A	208,91	0
Bastonetes (/μL)	707,9 ^a	747,61	845,9 ^a	891,15	705,7 ^B	921,25	1615,8 ^A	1715,14	0-300
Segmentados (/μL)	9019,6 ^a	3378,01	6888,7 ^b	2767,51	8406,0 ^A	3642,95	8952,9 ^A	5412,10	3,000-11,500
Eosinófilos (/μL)	1419,7 ^a	1141,04	829,7 ^a	459,17	1804,2 ^A	1806,59	814,4 ^B	1038,06	100-1,250
Basófilos (/μL)	61,7 ^a	128,20	0 ^a	0	41,2 ^A	146,04	16,9 ^A	61,69	raros
Linfócitos (/μL)	3898,4 ^a	1369,66	4073,3 ^a	2169,91	3615,9 ^A	1576,03	3656,6 ^A	2351,53	1,000-4,800
Monócitos (/μL)	744,7 ^a	262,28	606,6 ^a	250,06	700,7 ^A	278,25	747,3 ^A	599,20	150-1,350

Diferentes letras maiúsculas na linha indicam valores estatisticamente diferentes (p<0,05) entre cães positivos para *H. canis* (P) e positivos para *H. canis* com infecção concomitante (PO) na área urbana. Diferentes letras minúsculas na linha indicam valores estatisticamente diferentes (p<0,05) entre cães positivos para *H. canis* (P) e positivos para *H. canis* com infecção concomitante (PO) na área rural.

* Meinkoth; Clinkenbeard (2000), Latimer, Mahaffey e Prasse (2003)

Tabela 13 - Frequência (%) de cães positivos de Uberlândia, MG, para *Hepatozoon canis*, em relação aos resultados hematológicos.

Parâmetros	ÁREA RURAL (n=113)			ÁREA URBANA (n=161)		
	Diminuído % (n)	Normal % (n)	Aumentado % (n)	Diminuído % (n)	Normal % (n)	Aumentado % (n)
Volume globular (%)	36,28 (41) ^b	61,06 (69) ^a	2,66 (3) ^c	31,67 (51) ^b	60,24 (97) ^a	8,09 (13) ^c
Hemoglobina (g/dL)	33,62 (38) ^b	62,83 (71) ^a	3,55 (4) ^c	32,29 (52) ^b	57,14 (92) ^a	10,57 (17) ^c
Hemácias (x 10 ⁶ /μL)	25,66 (29) ^b	71,68 (81) ^a	2,66 (3) ^c	25,46 (41) ^b	73,29 (118) ^a	1,25 (2) ^c
VGM (μm ³)	14,16 (16) ^b	85,84 (97) ^a	0 (0) ^b	8,70 (14) ^b	91,30 (147) ^a	0 (0) ^b
CHGM (g/dL)	0,88 (1) ^b	95,57 (108) ^a	3,55 (4) ^b	3,72 (6) ^b	95,03 (153) ^a	1,25 (2) ^b
RDW (%)	74,33 (84) ^a	23,89 (27) ^b	1,78 (2) ^c	60,86 (98) ^a	33,54 (54) ^b	5,60 (9) ^c
VPM (μm ³)	0 (0) ^c	68,14 (77) ^a	31,86 (36) ^b	0 (0) ^c	75,15 (121) ^a	24,85 (40) ^b
Plaquetas (x 10 ³ /μL)	30,08 (34) ^b	62,83 (71) ^a	7,09 (8) ^c	37,88 (61) ^b	55,90 (90) ^a	6,22 (10) ^c
Leucócitos (/μL)	0,88 (1) ^c	63,71 (72) ^a	35,41 (40) ^b	4,96 (8) ^c	59,02 (95) ^a	36,02 (58) ^b
Metamielócitos (/μL)	0 (0) ^b	95,58 (108) ^a	4,42 (5) ^b	0 (0) ^b	97,52 (157) ^a	2,48 (4) ^b
Bastonetes (/μL)	0 (0) ^c	29,20 (33) ^b	70,80 (80) ^a	0 (0) ^c	31,68 (51) ^b	68,32 (110) ^a
Segmentados (/μL)	0 (0) ^c	82,30 (93) ^a	17,70 (20) ^b	3,10 (5) ^c	80,74 (130) ^a	16,16 (26) ^b
Eosinófilos (/μL)	0 (0) ^c	60,18 (68) ^a	39,82 (45) ^b	6,22 (10) ^b	49,06 (79) ^a	44,72 (72) ^a
Basófilos (/μL)	0 (0) ^c	77,87 (88) ^a	22,13 (25) ^b	0 (0) ^b	87,57 (141) ^a	12,43 (20) ^b
Linfócitos (/μL)	0 (0) ^c	75,23 (85) ^a	24,77 (28) ^b	3,10 (5) ^c	74,53 (120) ^a	22,37 (36) ^b
Monócitos (/μL)	0,88 (1) ^b	98,24 (111) ^a	0,88 (1) ^b	1,25 (2) ^b	96,89 (156) ^a	1,86 (3) ^b

Diferentes letras maiúsculas indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0.05$) em cães da área urbana.Diferentes letras minúsculas indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0.05$) em cães da área rural.

Tabela 14 – Médias e desvios padrão dos parâmetros hematológicos de fêmeas e machos de Uberlândia, MG, positivos para *Hepatozoon canis* das áreas rural e urbana.

Parâmetros	ÁREA RURAL				ÁREA URBANA			
	Macho (n=64)		Fêmea (n=49)		Macho (n=69)		Fêmea (n=92)	
	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio
Volume globular (%)	40,2 ^{Ab}	7,80	38,1 ^{Aa}	7,05	43,9 ^{Aa}	9,83	40,3 ^{Ba}	10,28
Hemoglobina (g/dL)	13,5 ^{Aa}	2,81	12,8 ^{Aa}	2,44	14,4 ^{Aa}	3,29	13,3 ^{Ba}	3,46
Hemácias (x 10 ⁶ /μL)	6,4 ^{Aa}	1,24	6,0 ^{Aa}	1,07	6,7 ^{Aa}	1,31	6,2 ^{Ba}	1,46
VGM (μm ³)	62,8 ^{Aa}	3,43	63,1 ^{Aa}	3,14	63,9 ^{Aa}	3,86	63,5 ^{Aa}	4,51
CHGM (g/dL)	33,5 ^{Aa}	1,45	33,5 ^{Aa}	1,43	32,7 ^{Ab}	1,22	32,9 ^{Ab}	1,31
RDW (%)	13,4 ^{Aa}	1,47	13,2 ^{Aa}	1,39	13,8 ^{Aa}	2,26	13,7 ^{Aa}	1,65
VPM (μm ³)	9,6 ^{Aa}	2,31	9,9 ^{Aa}	2,58	9,5 ^{Aa}	1,65	9,7 ^{Aa}	1,82
Plaquetas (x 10 ³ /μL)	275,2 ^{Aa}	146,95	275,0 ^{Aa}	140,40	238,7 ^{Aa}	131,34	253,3 ^{Aa}	161,62
Leucócitos (/μL)	15940,6 ^{Aa}	5321,23	15214,3 ^{Aa}	5244,96	15231,9 ^{Aa}	5274,79	15515,2 ^{Aa}	6402,08
Metamielócitos (/μL)	34,9 ^{Aa}	162,16	18,0 ^{Aa}	93,00	15,4 ^{Aa}	91,19	43,0 ^{Aa}	336,43
Bastonetes (/μL)	774,2 ^{Aa}	788,53	652,5 ^{Aa}	721,66	790,3 ^{Aa}	759,66	909,3 ^{Aa}	1359,45
Segmentados (/μL)	8837,0 ^{Aa}	3300,30	8779,7 ^{Aa}	3499,68	8483,9 ^{Aa}	3515,08	8508,1 ^{Aa}	4313,43
Eosinófilos (/μL)	1535,5 ^{Aa}	1305,10	1135,9 ^{Aa}	726,35	1561,4 ^{Aa}	1541,59	1695,8 ^{Aa}	1880,49
Basófilos (/μL)	50,2 ^{Aa}	105,04	62,8 ^{Aa}	144,21	33,0 ^{Aa}	95,21	40,2 ^{Aa}	160,03
Linfócitos (/μL)	3955,5 ^{Aa}	1486,83	3863,0 ^{Aa}	1424,13	3687,1 ^{Aa}	1702,03	3574,5 ^{Aa}	1743,67
Monócitos (/μL)	753,3 ^{Aa}	257,31	702,4 ^{Aa}	270,77	660,8 ^{Aa}	294,90	744,3 ^{Aa}	385,05

Diferentes letras maiúsculas na linha indicam valores estatisticamente diferentes (p<0,05) para machos e fêmeas de cada área. Diferentes letras minúsculas na linha indicam valores estatisticamente diferentes (p<0,05) entre machos e entre fêmeas.

Tabela 15 – Médias e desvios padrão dos parâmetros hematológicos de filhotes e adultos de Uberlândia, MG, positivos para *Hepatozoon canis* das áreas rural e urbana.

Parâmetros	ÁREA RURAL				ÁREA URBANA			
	Filhote (n=44)		Adulto (n=69)		Filhote (n=34)		Adulto (n=127)	
	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio
Volume globular (%)	35,8 ^{Ba}	6,95	41,5 ^{Aa}	7,05	37,8 ^{Ba}	9,67	42,9 ^{Aa}	10,12
Hemoglobina (g/dL)	12,0 ^{Ba}	2,50	13,9 ^{Aa}	2,52	12,3 ^{Ba}	3,32	14,1 ^{Aa}	3,36
Hemácias (x 10 ⁶ /μL)	5,7 ^{Ba}	1,11	6,6 ^{Aa}	1,08	5,8 ^{Ba}	1,38	6,5 ^{Aa}	1,39
VGM (μm ³)	63,0 ^{Ab}	2,96	62,8 ^{Ab}	3,52	65,6 ^{Aa}	3,11	65,7 ^{Aa}	4,50
CHGM (g/dL)	33,6 ^{Aa}	1,39	33,5 ^{Aa}	1,48	32,6 ^{Ab}	1,47	32,9 ^{Ab}	1,22
RDW (%)	13,8 ^{Aa}	1,19	13,2 ^{Aa}	1,57	14,1 ^{Aa}	2,36	13,4 ^{Aa}	1,76
VPM	9,6 ^{Aa}	2,09	9,8 ^{Aa}	2,63	9,9 ^{Aa}	1,35	9,7 ^{Aa}	1,83
Plaquetas (x 10 ³ /μL)	262,0 ^{Aa}	115,40	283,5 ^{Aa}	159,12	283,4 ^{Aa}	162,84	257,3 ^{Aa}	144,37
Leucócitos (/μL)	16370,5 ^{Aa}	5712,52	15150,7 ^{Aa}	4964,27	15655,9 ^{Aa}	4957,47	15323,6 ^{Aa}	6179,17
Metamielócitos (/μL)	64,1 ^{Aa}	210,05	4,3 ^{Aa}	35,63	31,4 ^{Aa}	128,93	31,1 ^{Aa}	286,56
Bastonetes (/μL)	849,6 ^{Aa}	910,86	639,6 ^{Aa}	638,49	825,7 ^{Aa}	955,03	867,0 ^{Aa}	1188,01
Segmentados (/μL)	9318,7 ^{Aa}	3706,35	8489,2 ^{Aa}	3127,21	8237,0 ^{Aa}	2992,07	8567,5 ^{Aa}	4211,64
Eosinófilos (/μL)	1236,2 ^{Aa}	872,00	1442,7 ^{Aa}	1232,05	1487,6 ^{Aa}	1606,69	1678,6 ^{Aa}	1777,16
Basófilos (/μL)	30,4 ^{Aa}	80,93	71,8 ^{Aa}	141,95	31,9 ^{Aa}	109,37	38,5 ^{Aa}	142,34
Linfócitos (/μL)	4084,8 ^{Aa}	1294,72	3807,4 ^{Aa}	281,20	4280,6 ^{Aa}	1670,45	3946,6 ^{Aa}	1698,34
Monócitos (/μL)	786,8 ^{Aa}	224,29	695,8 ^{Aa}	1546,88	761,8 ^{Aa}	267,38	694,2 ^{Aa}	369,46

Diferentes letras maiúsculas na linha indicam valores estatisticamente diferentes (p<0,05) para filhotes e adultos de cada área. Diferentes letras minúsculas na linha indicam valores estatisticamente diferentes (p<0,05) entre filhotes e entre adultos.

5 – DISCUSSÃO

Hepatozoonose canina é doença cosmopolita (O'DWYER; MASSAR; SOUZA, 2001; MUNDIM et al., 2008b; RUBINI et al., 2008) que tem ganhado importância na Medicina Veterinária, como infecção emergente. A maioria dos casos, no Brasil, foi diagnosticado mediante testes laboratoriais ocasionais e não por estudos sistemáticos (MUNDIM et al., 1992; O'DWYER; GUIMARÃES; MASSARD, 1997; GONDIM et al., 1998).

A presença de *H. canis* nos cães avaliados neste estudo corrobora com a pesquisa de Mundim et al. (2008b), que relataram o parasito na região de Uberlândia em estudo retrospectivo dos anos de 1995 a 2005, em 115 cães diagnosticados por exames laboratoriais de rotina.

Pela técnica de extensão sanguínea, os valores de prevalência de *H. canis*, deste estudo, foram similares aos citados por Rubini et al. (2005) em cães de área urbana e por Massard (1979), O'Dwyer, Massard e Souza (2001) e Rubini et al. (2008) em cães de área rural. Porém, foram superiores aos trabalhos de Garcia de Sá et al. (2007) e Gomes et al. (2010) em cães urbanos. O'Dwyer (2011) relata que a prevalência de infecção, em diferentes municípios do Brasil varia entre 9,1-59,4%. Em relação à prevalência pela técnica de PCR, os achados desse estudo foram superiores aos relatos de Rubini et al. (2005, 2008) e Spolidorio et al. (2009), que encontraram, 67,7%, 53,3% e 58,7%, respectivamente, em cães de São Paulo e do Espírito Santo, provenientes de áreas rural e urbana. Diferenças de resultados em vários países também ocorrem, sendo os valores de prevalência, desse estudo, maiores do que os encontrados em cães na Turquia por Karagenc et al. (2006), tanto pela extensão sanguínea (10,6%) quanto pela PCR (25,8%). A prevalência de infecção por *H. canis* pode variar consideravelmente e, depende da procedência do animal, amostragem, características da população canina, distribuição do vetor e método de diagnóstico empregado.

Neste estudo não foi observada diferença estatística entre as prevalências, obtidas pela PCR, das áreas rural e urbana, apesar da maior proporção de cães infectados ser procedentes da área rural. Entretanto, ao considerar a técnica de extensão sanguínea, observou-se maior prevalência na área rural do que na área urbana, corroborando com os relatos de Massard (1979). Cães de áreas rurais podem ter livre acesso às florestas e outros ambientes, onde estão presentes diferentes espécies de animais selvagens e domésticos. Nestas condições, os cães podem se infestar com diferentes espécies de carrapatos, hospedeiros primários de animais selvagens (LABRUNA; CAMPOS PEREIRA, 2001).

Nesta pesquisa os resultados de positividade pela PCR foram maiores do que os obtidos pela extensão sanguínea. Garcia de Sá et al. (2007) observaram diferenças entre os resultados ao utilizarem duas técnicas. De acordo com Vincent-Johnson et al. (1997), Baneth et al. (1998b) e Karagenc et al. (2006) o método direto por extensão sanguínea é bom, por ser de fácil execução e baixo custo, mas a morfologia e morfometria dos gamontes não permite a diferenciação entre as espécies. Este método pode levar a resultados falsos negativos pela inexperiência técnica do examinador ou, por alguns gamontes se perderem durante o processamento laboratorial. Paludo et al. (2003) comentaram que a ausência de gamontes nas extensões sanguíneas pode, também, ocorrer pelo parasito apresentar-se na forma tecidual, no momento da coleta da amostra. Neste estudo foram confeccionadas duas lâminas de cada animal, sendo essas avaliadas por duas pessoas diferentes e treinadas, na tentativa de minimizar falsos resultados. A PCR para *H. canis* é utilizada em vários estudos, demonstrando ser técnica de diagnóstico sensível (INOKUMA et al., 2002. CRIADO-FORNELIO et al., 2003). Dados da literatura mostram que dentro da prática clínica de rotina o exame de extensão sanguínea é o teste de diagnóstico de escolha, apesar da sua baixa sensibilidade e incapacidade de permitir a diferenciação das espécies. A detecção molecular é utilizada em estudos epidemiológicos e de caracterização das espécies, com alta sensibilidade (O'DWYER, 2011).

Independente da metodologia utilizada, nessa pesquisa, o sexo não influenciou na infecção, corroborando com Beaufils, Martin-Granel e Bertrand (1988) e Gomes et al. (2010). Porém, esses resultados foram contrários aos de Gavazza, Bizzet e Papine (2003) e Mundim et al. (2008b) que observaram maior proporção de machos infectados. Os autores justificaram esses resultados pela predominância de machos na população estudada. Na análise do sexo dos animais positivos em relação à procedência, a positividade foi maior nas fêmeas da área urbana e nos machos da rural. Esses resultados podem estar relacionados a aspectos populacionais e comportamentais. Machos de propriedades rurais podem transitar mais livremente e, como consequência, ser expostos a diferentes ectoparasitos, assim como, a população de fêmeas tende a ser maior na área urbana.

Neste estudo, a faixa etária não influenciou na infecção, corroborando com os achados de Gomes et al. (2010) e O'Dwyer (2011), os quais relataram que a prevalência de infecção é semelhante em diferentes grupos etários, em várias regiões do Brasil. Nas duas áreas estudadas a positividade foi maior nos adultos, do que nos filhotes. Isso pode ser explicado pelo maior tempo de exposição do adulto ao vetor do *H. canis*, assim como, pelo hábito dos proprietários de protegerem os filhotes do ambiente, reduzindo a infestação pelo carrapato.

Infecções concomitantes ao *Hepatozoon* sp. com outros hemoparasitos, encontradas nos animais das áreas rural e urbana deste estudo, corroboram com os relatos de Mundim et al. (1992), Mundim et al. (2008b), Sakuma et al. (2009), Spolidorio et al. (2009), Gomes et al. (2010) e De Caprariis et al. (2011). Possivelmente, a presença de infecção concomitante seja atribuída ao vetor em comum. Segundo Labruna e Campos Pereira (2001) e Dantas-Torres et al. (2004), a transmissão desses patógenos ocorre, principalmente, pelo *R. sanguineus*, que é o vetor dos principais patógenos descritos em cães no Brasil, tais como *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *H. canis* e *Mycoplasma haemocanis* (TRAPP et al., 2006; FORLANO et al., 2007).

A principal espécie de carrapato encontrado infestando cães da área rural foi o *R. sanguineus*. Esse achado não corrobora com os achados de O'Dwyer, Massard e Souza (2001), que relataram infestação, principalmente, por *Amblyomma* spp. em cães do estado do Rio de Janeiro. *Rhipicephalus sanguineus* é reportado como o principal vetor do *H. canis* no Velho Mundo, demonstrada por transmissão experimental do protozoário (BANETH et al., 2001). Hepatozoonose canina no Brasil é relatada, principalmente, em áreas rurais, onde várias espécies de carrapato são encontradas infestando cães (O'DWYER, MASSARD, SOUZA, 2001). Cães no Brasil, geralmente, são infestados por *R. sanguineus* em áreas urbanas, e por *R. sanguineus* e *Amblyomma* spp. em áreas rurais (RUBINI et al., 2008; SPOLIDORIO et al., 2009). Em estudo da hepatozoonose em duas áreas rurais do estado do Rio de Janeiro, Forlano et al. (2005) mostraram que a maioria dos cães estavam infestados por *Amblyomma cajennense*, *A. aureolatum*, *A. ovale* e *R. sanguineus*. A maior prevalência de *H. canis* em cães da área rural e, a possibilidade de outras espécies de carrapatos, ser vetor deste hematozoário demonstram, a necessidade de mais estudos sobre a epidemiologia e transmissão da hepatozoonose canina no Brasil (GARCIA DE SÁ et al., 2007). *Amblyomma aureolatum* foi a única espécie de carrapato encontrada infestando raposas, parasitadas pelo protozoário, no sul do Brasil (CRIADO-FORNELIO et al., 2006). No Japão *Haemaphysalis* spp. é sugerida como o possível vetor (MURATA et al., 1995) e nos Estados Unidos o *A. maculatum* é o único vetor reconhecido do *H. americanum*.

A menor infestação dos cães da área rural deste estudo, provavelmente, se deve ao microambiente onde vivem os cães da cidade. Ambiente urbano é ideal para o desenvolvimento de todas as fases do carrapato fora do hospedeiro e mais propício à infecção do cão pelo vetor, pois é uma área mais restrita do que o ambiente rural, onde os animais vivem soltos (SZABÓ et al., 2001).

Não há relatos na literatura sobre a presença de oocistos de *H. canis* em *R. (B.) microplus*. O hospedeiro preferencial desse carrapato é a espécie bovina (GONZALES, 1974). *Rhipicephalus (B.) microplus* é vetor de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* para bovinos, assim como, de *Theileria equi* para equinos (OLIVEIRA et al., 2005b), embora esses não sejam hospedeiros habituais. Isso demonstra que essa espécie pode ter especificidade de hospedeiro relativo. Os nossos resultados sugerem que o *R. (B.) microplus* pode desempenhar papel na transmissão do *H. canis*, no entanto, a extensão deste papel na manutenção natural do *H. canis* deve ser avaliada, cuidadosamente, uma vez que os cães não são hospedeiros comuns para esta espécie de carrapato. Obviamente, mais estudos são necessários para determinar o ciclo natural do parasito, porém, os resultados deste estudo devem contribuir em relação ao envolvimento dos carrapatos vetores da hepatozoonose canina brasileira, que ainda é questão controversa.

O presente estudo demonstrou que o *Hepatozoon canis* é o agente etiológico da hepatozoonose canina em Uberlândia e está estreitamente relacionado com o agente causador da doença no sul da Europa. Estes resultados são consistentes com as descobertas de O'Dwyer et al. (2004), Paludo et al. (2005) e Rubini et al. (2005) em outras regiões geográficas do Brasil.

A presença de oocistos maduros de *H. canis* na hemolinfa de *R. (B.) microplus* é sugestivo de que esta espécie possa ser um dos vetores do *H. canis*. A identidade similar do DNA amplificado e sequenciado da hemolinfa do *R. (B.) microplus* e do cão infestado por este carrapato indicam, pela agregação das sequências na análise filogenética, que o cão e o carrapato estavam infectados com *H. canis*. Pelo fato do *R. (B.) microplus* ser carrapato em que todos os estágios se alimentam em um único hospedeiro, seria de se esperar que a sequência do gene 18S rRNA do *H. canis*, encontrado no carrapato, fosse a mesma do *H. canis* encontrada do cão no qual o carrapato se alimentou, fato esse não observado. A falta de identidade entre as sequências do *H. canis* do carrapato e do cão infestado por ele, pode ser explicada pela possibilidade do cão estar infectado por mais de um genótipo de *H. canis*, ou pode ter sido infectado mais de uma vez, por carrapatos diferentes. Outra possibilidade é a que o *R. (B.) microplus* possa ter se movido de um hospedeiro para outro da fazenda. Movimento para hospedeiros bovinos secundários foi documentado em associação com a transmissão de *B. bigemina* (DALGLIESH; STEWART; CALLOW, 1978). Estudos anteriores com *H. canis* e *H. americanum* indicam a existência de intra-espécies de sequências do gene 18S rRNA em ambas as espécies (LITTLE et al., 2009).

Em relação ao perfil bioquímico sérico, pode-se observar neste estudo que as concentrações séricas de AST e LDH encontraram-se aumentadas, o que indica possível lesão muscular em decorrência da infecção por *H. canis*. Este aumento da AST e LDH não foi acompanhado pela CK, enzima de extravasamento específico de músculo, que pode ser utilizada para estimar o momento do início da lesão muscular. Esses resultados não foram condizentes com Inokuma et al. (2002), Aguiar et al. (2004) e Sakuma et al. (2009), que relataram aumento da CK em cães com hepatozoonose. Provavelmente, a hepatozoonose tem caráter crônico, pois a lesão muscular aguda é caracterizada pelo aumento exclusivo da CK sem tempo suficiente para o aumento da atividade da AST após a lesão, o que não ocorreu neste estudo. A diferença de concentração da enzima CK entre filhotes e adultos, pode ser de origem fisiológica e comportamental, pois filhotes são mais ativos do que adultos e estão em fase de crescimento, elevando a atividade da enzima.

A infecção por *H. canis*, provavelmente, não interferiu nos valores de triglicérides e colesterol, pois os mesmos se encontraram dentro dos valores de normalidade. A maior concentração de triglicérides dos animais da área urbana, possivelmente, se deve ao sedentarismo da cidade. Cães criados em fazendas são livres, tem atividade física intensa, conseqüentemente, gasto energético maior, com maior queima de gordura. Outro fator que deve ser considerado é o maior teor de gordura na dieta dos animais da zona urbana pode ter contribuído neste resultado. Outro fator que deve ser considerado é a hiperlipemia pós-prandial, que atinge seu valor máximo em seis a oito horas após a refeição e, provavelmente, como a coleta de sangue não foi realizada com os animais em jejum adequado, isto pode ter interferido no aumento destes metabólitos. Os triglicérides respondem a maior parte da hiperlipidemia, mas a concentração de colesterol também pode estar ligeiramente aumentada, o que pode explicar a maior concentração do colesterol em filhotes do que em adultos da área urbana (THRALL et al., 2006).

A enzima FAL permaneceu dentro da normalidade e, possivelmente, a hepatozoonose não influenciou na atividade. Entretanto, Voyvada; Pasa; Uner (2004), Inokuma et al. (2002), Baneth, (2011), Murata et al. (1991) e Sakuma et al. (2009) demonstraram, em casos clínicos isolados, o aumento da atividade da FAL nos cães com hepatozoonose. A diferença nos valores da FAL entre filhotes e adultos das zonas rural e urbana, pode ser atribuída à maior atividade osteoblástica em animais jovens em fase de crescimento, sendo variação fisiológica decorrente da faixa etária, e, portanto, independente da infecção por *H. canis* (THRALL et al., 2006). É provável, também, que a hepatozoonose não influencie na atividade sérica da GGT, apesar do discreto aumento dos valores da enzima.

Neste estudo, as concentrações séricas de proteínas totais e globulinas nos filhotes foram inferiores às dos adultos, apesar dos valores estarem dentro da normalidade. Provavelmente, isso ocorreu por falha na ingestão de colostro ou na absorção de imunoglobulinas colostrais, ou seja, falha na transferência de imunidade passiva. Pode se supor que a infecção por *H. canis* não interferiu nos valores séricos das proteínas, sendo as variações observadas atribuídas à fatores fisiológicos.

Ao avaliar a função renal dos animais positivos, percebe-se que os valores séricos de uréia e creatinina permaneceram dentro dos limites da normalidade e, possivelmente a hepatozoonose não interferiu nesses metabólitos. Porém, tais metabólitos nos adultos da área rural apresentaram concentração menor, quando comparada aos adultos da área urbana. Tal diferença pode ser atribuída ao tipo de alimentação desses animais, sendo a dieta dos cães da zona urbana mais rica em proteínas (aminoácidos) e creatina, ocasionando, respectivamente, concentrações maiores de uréia e creatinina (THRALL et al., 2006). Cães adultos procedentes da área urbana apresentaram valores de uréia e creatinina maiores do que os filhotes, condizente com Thrall et al. (2006), que relataram que a idade influencia na concentração sérica desses metabólitos. Não existe na literatura dados sobre esses metabólitos associados ao *Hepatozoon* sp.

O quadro de anemia e trombocitopenia apresentado pelos cães infectados com *H. canis* e outro hemoparasito, nas áreas rural e urbana, corroboraram com os relatos de Alencar, Kohayagawa e Santarém (1997), Baneth et al. (2003), Inokuma et al. (2002), Voyvada, Pasa e Unver (2004), Mundim et al. (2008b) e Sakuma et al. (2009). Na hepatozoonose causada pelo *H. canis*, achados laboratoriais e clínicos podem ser mascarados pela presença dessas infecções concomitantes e não podem ser atribuídos, exclusivamente, a *H. canis* (MUNDIM et al., 2008b; O'DWYER, 2011). Entretanto, nesse estudo, a anemia e trombocitopenia não ocorreram na maioria dos animais e, valores isolados extremamente baixos, podem ter ocasionado esse quadro.

Nesta pesquisa observou-se, nos animais infectados com *H. canis*, procedentes das áreas urbana e rural independente da presença de outro hemoparasito, aumento do número de metamielócitos e bastonetes, caracterizando desvio para esquerda. Não existem relatos na literatura que confirmem este achado e que possibilitem comparação. A maioria dos animais, deste estudo, apresentou aumento do número de neutrófilos bastonetes, excluindo a possibilidade de valores isolados extremos justificarem o quadro. Outras infecções assintomáticas primárias ou secundárias, virais ou bacterianas, podem ocasionar processos inflamatórios, e como consequência levar ao aumento de neutrófilos imaturos.

Diferenças no número de hemácias e, nos valores de hemoglobina e volume globular, entre fêmeas e machos e, entre filhotes e adultos, podem ser atribuídas à outros fatores, não inerentes à infecção por *H. canis*. Dentre estes, um que merece destaque é a significativa influência dos fatores ambientais sobre o quadro hemático dos animais. Há concordância quase unânime entre os pesquisadores, que animais criados sob diferentes condições ambientais, climáticas e de manejo, podem apresentar evidentes variações dos elementos constituintes do hemograma (JAIN, 1993). Outra situação de anemia relativa verifica-se nos animais muito jovens, que tendem a ter hematócrito mais baixo, pois ao crescerem aumentam rapidamente o espaço vascular (COWEL et al., 1999). Em estudos com cães jovens e geriátricos da raça Beagle, verificou-se, após o desmame, que as contagens eritrocitárias, hemoglobina e hematócrito eram inferiores aos valores de referência para cães adultos, enquanto, nos animais geriátricos os valores, encontravam-se dentro dos intervalos de referência (HARPER et al., 2003). Além da idade, o estado hormonal e o sexo desempenham função importante na regulação eritrocitária. Os andrógenos aumentam a concentração de glóbulos vermelhos, estimulando a produção de eritropoietina ou potenciando a ação na medula. Os estrógenos, por sua vez, apresentam efeito inibidor sobre a eritropoiese, assim, os machos têm tendência a apresentar maior contagem de eritrócitos que as fêmeas (LOPES; BIONDO; SANTOS, 2007).

6 – CONCLUSÕES

- *Hepatozoon canis* foi a espécie encontrada em cães naturalmente infectados procedentes da microrregião de Uberlândia, Mina Gerais, Brasil;
- A sensibilidade do teste de PCR foi maior do que o de extensão sanguínea de vaso periférico.
- Não ocorreu diferença de positividade entre os animais da área rural e urbana pela PCR, entretanto, a positividade nos animais da área rural foi maior do que na urbana pela extensão sanguínea;
- Outros hemoparasitos, *Babesia* sp., *Anaplasma platys* e *Ehrlichia* sp., foram encontrados parasitando cães em associação a *Hepatozoon canis*, pela extensão sanguínea;
- Cães de área urbana são mais infestados por carrapatos do que cães de área rural. *Rhipicephalus sanguineus* foi a espécie mais prevalente;
- *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é capaz de se infectar com *Hepatozoon canis* e produzir formas infectantes;
- Cães infectados com *Hepatozoon canis* apresentaram aumento das concentrações séricas de LDH e AST e número de neutrófilos bastonetes;
- O sexo e faixa etária não interferiram no perfil bioquímico sérico e hematológico dos cães infectados com *H. canis*.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

AGUIAR, D.M.; RIBEIRO, M.G.; SILVA, W.B.; DIAS Jr, J.G.; MEGID, J.; PAES, A.C. Hepatozoonose canina: achados clínico-epidemiológicos em três casos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, p. 411-413, 2004.

ALLEN, K.E.; LI, Y.; KALTENBOECK, B.; JOHNSON, E.M.; REICHARD, M.V.; PANCIERA, R.J.; LITTLE, S.E. Diversity of *Hepatozoon* species in naturally infected dogs in the southern United States. **Veterinary Parasitology**, v.154, p.220-225, 2008.

ALENCAR, N.X.; KOHAYAGAWA, A.; SANTARÉM, V.A. *Hepatozoon canis* infections of wild carnivores in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.70, p.279-282, 1997.

ARRU, E.; PAU, S.; LEONI, A. Segnalazione di *Hepatozoon canis* in Sardegna. **Rivista di Parassitologia**, v.43, p.57-62, 1982.

AYRES, M.; AYRES JUNIOR, M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. **Bioestat 4.0**: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Sociedade Civil Mamirauá, Brasília: CNPq, Belém; 2005:1-324.

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

BANETH, G.; WEIGLER, B. Retrospective case-control study of hepatozoonosis in dogs in Israel. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.11, p.365-370, 1997.

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

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

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

BANETH, G.; SHKAP, V.; SAMISH, M.; JAFFE, C.L. Antigenic analysis of gamonts of *Hepatozoon canis* purified from leucocytes. **Journal of Parasitology**, v.86, p.289-294, 2000.

¹ SILVA, A.M.; PINHEIRO, M.S.F.; FREITAS, N.E. Guia para normalização de trabalhos técnicos científicos: projetos de pesquisa, monografias, dissertações e teses. 4ª ed. Uberlândia: EDUFU, 2002. 163p.

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

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

BANETH G. Perspectives on canine and feline hepatozoonosis. **Veterinary Parasitology**, v.181, p.3-11, 2011.

BANSAL, S.R.; GAUTAM, O.P.; BANERJEE, D.P. Prevalence of *Babesia canis* and *Hepatozoon canis* infection in dogs of Hissar (Haryana) and Delhi and attempts to isolate *Babesia* from humans beings. **Indian Veterinary Journal**, v.62, p.748-751, 1985.

BARROS-BATTESTI, D.M.; ARZUA, M.; BECHARA, G.H. **Carrapatos de importância médico-veterinária da região Neotropical** - Um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo, SP: Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006. 223 p.

BARTA, J.R. Molecular approaches for inferring evolutionary relationships among protistan parasites. **Veterinary Parasitology**, v.101, p.175-186, 2001.

BEAUFILS, J.P.; MARTIN-GRANEL, J. *L'hépatozoonose canine première partie: étude bibliographique*. **Pratique Médicale and Chirurgicale de l'Animal de Compagnie**, v.27, p.81-86, 1992.

BEAUFILS, J.P.; MARTIN-GRANEL, J.; BERTRAND, F. Hépatozoonose canine 2 partie a propos de 28 cas. **Pratique Médicale and Chirurgicale de l'Animal de Compagnie**, v.23, p.281-293, 1988.

BEIGUELMAN, B. **Curso Prático de Bioestatística**. Ribeirão Preto: Editora da Revista Brasileira de Genética, 1991. 224 p

BENTLEY, C. A. Preliminary note on a *Leucocytozoan* of the dog. **British Medical Journal**, v.1, p.988, 1905.

BIASE, N.G.; FERREIRA, D.F. Comparações múltiplas e testes simultâneos para parâmetros binomiais de *K* populações independentes. **Revista Brasileira de Biometria**, v.27, p.301-323, 2009.

BURLINI, L.; TEIXEIRA, K.R.; SZABÓ, M.P.; FAMADAS, K.M. Molecular dissimilarities of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Brazil and its relation with samples throughout the world: is there a geographical pattern? **Experimental and Applied Acarology**, v. 50, p.361-74, 2010.

CHRISTOPHERS, S. R. *Leucocytozoon canis*. **Scientific Memoirs by Officers of the Medical and Sanitary Departments of the Government of India**, v.26, p.1-18, 1906.

CHRISTOPHERS, S. R. The sexual cycle of *Leucocytozoon canis* in the tick. **Scientific Memoirs by Officers of the Medical and Sanitary Departments of the Government of India**, v.28, p.1-14, 1907.

CHRISTOPHERS, S. R. The development of *Leucocytozoon canis* in the tick with a reference to the development of *Piroplasma*. **Parasitology**, v. 5, n. 1, p. 37-48, 1912.

COWEL, R. L.; TYLER, R. D.; MEINKOTH, J. H. **Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat**. 2. ed. Philadelphia: Mosby, 1999. 496p.

CRAIG, T.M.; SMALLWOOD, J.E.; KNAUER, K.W.; MCGROTH, J.P. *Hepatozoon canis* infection in dogs: Clinical, radiographic and hematologic findings. **Journal of the American Medical Association**, v.173, p.967-972, 1978.

CRAIG, T.M. Hepatozoonosis. In: GREENE, C.E. (Ed.). **Infections diseases of the dog and cat**. 2 ed. Philadelphia: The W. B. Saunders Co, 1998. p. 485-465.

CRIADO-FORNELIO, A.; MARTINEZ-MARCOS, A.; BULING-SARAÑA, A.; BARBA-CARRETERO, J.C. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe: Part I. Epizootiological aspects. **Veterinary Parasitology**, v.113, p.189-201, 2003.

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

CUMMINGS, C.A. **A morphologic and immunologic study of American canine Hepatozoonosis**. 2001. PhD thesis. Oklahoma State University, Stillwater, Oklahoma, 2001.

DALGLIESH, R.J.; STEWART, N.P.; CALLOW, L.L. Transmission of *Babesia bigemina* by transfer of adultmale Boophilus microplus. **Australian Veterinary Journal**, v.54, p.205-206, 1978.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEIREDO, L.A.; FAUSTINO, M.A.G. Ectoparasitos de cães provenientes de alguns municípios da região metropolitana do recife, Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, p.151-154, 2004.

DE CAPRARIIS, D.; DANTAS-TORRES, F.; CAPELLI, G.; MENCKE, N.; STANNECK, D.; BREITSCHWERDT, E.B.; OTRANTO, D. Evolution of clinical, haematological and biochemical findings in young dogs naturally infected by vector-borne pathogens. **Veterinary Microbiology**, v.149, p.206-212, 2011.

DE MIRANDA, R.L.; DE CASTRO, J.R.; OLEGÁRIO, M.M.; BELETTI, M.E.; MUNDIM, A.V.; O'DWYER, L.H.; EYAL, O.; TALMI-FRANK, D.; CURY, M.C.; BANETH, G. Oocysts of *Hepatozoon canis* in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from a naturally infected dog. **Veterinary Parasitology**, v.177, p.392-396, 2011.

DROLESKEY, R.E.; MERCER, S.H.; DELOACH, J.R.; CRAIG, T.M. Ultrastructure of *Hepatozoon canis* in the dog. **Veterinary Parasitology**, v.50, p.83-99, 1993.

EIRAS, F.D.; BASABE, J.; SCODELLARO, C.F.; BANACH, D.B.; MATOS, M.L.; KRIMER, A.; BANETH, G. First molecular characterization of canine hepatozoonosis in Argentina: evaluation of asymptomatic *Hepatozoon canis* in dogs from Buenos Aires. **Veterinary Parasitology**, v.149, p.275-279, 2007.

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

EMBRAPA, Gado de Leite. **Informes técnicos**: Produção de leite em Minas Gerais e na Zona da Mata Mineira, nº27, fevereiro, 2009.

EWING, S.A.; PANCIERA, R.J.; MATHEW, J.S.; CUMMINGS, C.A.; KOGAN, A.A. American canine hepatozoonosis: an emerging disease in the New World. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.916, p.81-92, 2000.

EWING, S.A.; PANCIERA, R.J.; MATHEW, J.S. Persistence of *Hepatozoon americanum* (Apicomplexa: Adeleorina) in a naturally infected dog. **Journal of Parasitology**, v.89, p.611-613, 2003.

EZEOKOLI, C.D.; OGUMKOYA, A.B.; ABDULLAHI, R.; TEKDEK, L.B.; SANNUSI, A.; ILEMOBADE, A.A. Clinical and epidemiological studies of canine hepatozoonosis in Zaria. **Journal of Small Animal Practice**, v.24, p.445-460, 1983.

FERREIRA NETO, J.M.; VIANA, E.S.; MAGALHÃES, L.M. **Patologia clínica veterinária**. Belo Horizonte, MG: Rabelo, 1982. 279 p.

FÖLDVÁRI, G.; FARKAS, R. Ixodid tick species attaching to dogs in Hungary. **Veterinary Parasitology**, v.129, p.125-131, 2005.

FORLANO, M.D.; SCOFIELD, A.; ELISEI, C.; FERNANDES, K.R.; EWING, S. A.; MASSARD, C.L. Diagnosis of *Hepatozoon spp.* in *Amblyomma ovale* and its experimental transmission in domestic dogs Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.134, p.1-7, 2005.

FORLANO, M.D.; TEIXEIRA, K.R.S.; SCOFIELD, A.; ELISEI, C.; YOTOKO, K. S.C.; FERNANDES, K.R.; LINHARES, G.F.C.; EWING, S.A.; MASSARD, C.L. Molecular

characterization of *Hepatozoon sp.* from Brazilian dogs and its phylogenetic relationship with other *Hepatozoon sp.* **Veterinary Parasitology**, v.145, p.21-30, 2007.

FRANQUE, M.P.; SANTOS, H.A.; Da SILVA, G.V.O.; TAJIRI, G.Y.; MASSARD, C.L. Características biológicas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) a partir de infestação experimental em cão. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.16, p.238-242, 2007.

GABRIELLI, S.; KUMLIEN, S.; CALDERINI, P.; BROZZI, A.; IORI, A.; CANCRINI, G. The first report of *Hepatozoon canis* identified in *Vulpes vulpes* and ticks from Italy. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.10, p. 855-859, 2010.

GARCIA DE SÁ, A.; CERQUEIRA, A.M.F.; O'DWYER, L.H.; ABREU, F.S.; FERREIRA, R.F.; PEREIRA, A.M.; VELHO, P.B.; RUBINI, A.S.; ALMOSNY, N.R.P.; Detection of *Hepatozoon spp* in naturally infected brazilian dogs by Polymerase Chain Reaction. **International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v.5, p.49-51, 2007.

GAVAZZA, A.; BIZZET, M.; PAPINI, R. observations on dogs found naturally infected with *Hepatozoon canis* in Italy. **Revue de Médecine. Vétérinaire**, v.154, p. 465-571, 2003.

GEVREY, J. Hepatozoonose canine. **Recueil de Medecine Veterinaire**, v.169, p.451-455, 1993.

GOMES, P.V.; MUNDIM, M.J.S.; MUNDIM, A.V.; de ÁVILA, D.F.; CURY, M.C. Occurrence of *Hepatozoon sp.* in dogs in the urban area originating from a municipality in southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.174, p.155-161, 2010.

GONDIM, L.F.P.; KONAYAGAWA, A.; ALENCAR, N.X.; BIONDO, A.W.; TAKAHIRA, R.F.; FRANCO, S.R.V. Canine hepatozoonosis in Brazil: description of eight naturally occurring cases. **Veterinary Parasitology**, v.74, p.319-323, 1998.

GONEN, L.; STRAUS-AYALI, D.; SHKAP, V.; VINCENT-JOHNSON, N.; MANCITIRE, D.K.; BANETH, G. An enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Hepatozoon canis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.122, p.131-139, 2004.

GONZALES, J.C. **O carrapato do boi: vida, resistência e controle**. São Paulo, SP: Mestre Jou, 1974. 104 p.

GUBBELS, J.M.; de VOS, A.P.; van der WEIDE, M.; VISCERAS, J.; SCHOULS, J.M.; de VRIES, E.; JONGEJAN, F., Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.1782-1789, 1999.

HARMELIN, A.; DUBEY, J.P.; YAKOBSON, B.; NYSKA, A.; ORGAD, U. Concurrent *Hepatozoon canis* and *Toxoplasma gondii* infections in a dog. **Veterinary Parasitology**, v. 43, p.131-136, 1992.

HARPER, J.; HACKETT, R.; WILKINSON, J.; HEATON, P. Age-related variations in hematologic and plasma biochemical test results in Beagles and Labrador Retrievers. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.223, p.1436-1442. 2003.

HÉRVAS, J.; GÓMEZ-VILLAMONDES, J.C.; MÉNDEZ, A.; SIERRA, M.A.; LARA, F.C.M.; BAUTISTA, M.J.; PÉREZ, J.; CARRASCO, L. Hepatozoonosis canina. **Veterinaria en Práxis**, Barcelona, v.10, n. 2, p. 14-18, 1995.

IBRAHIM, N.D.G.; RAHAMATHULLA, P.M.; NJOKU, C.O. Neutrophil myeloperoxidase deficiency associated with canine hepatozoonosis. **International Journal for Parasitology**, v.19, p.915-918, 1989.

INOKUMA, H.; OKUDA, M.; OHNO, K.; SHIMODA, K.; ONISH, T. Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a *Hepatozoon* detected in two Japanese dogs. **Veterinary Parasitology**, v.106, p.265-271, 2002.

JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417p.

JAMES, S.P. On a parasite found in the white corpuscles of the blood of dogs. **Scientific Memoirs by Officers of the Medical and Sanitary Departaments of the Government of Índia**, v.14, p.1-12, 1905.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6th. ed. San Diego: Academic Press, 2008. 932 p.

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

KLOPFER, U.; NEWMAN, M.; NOBEL, T. *Hepatozoon canis* in dog in Israel. **Refuah Veterinarith**, v.30, p.116-120, 1973.

LABRUNA, M.B.; HOMEM, V.S.; HEINEMANN, M.B.; FERREIRA NETO, J.S. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with rural dogs in Uruará eastern Amazon, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v.37, p.774-776, 2000.

LABRUNA, M.B.; SOUZA, S.L.P.; GUIMARÃES, J.; PACHECO, R.S.; PINTER, A.; GENNARI, S.M. Prevalência de carrapatos em cães de áreas rurais da região norte do estado

do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, p.553-556, 2001.

LABRUNA, M.B.; CAMPOS PEREIRA, M. Carrapatos em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, v.30, p.24-32, 2001.

LATIMER, K.S.; MAHAFFEY, E.A.; PRASSE, K.W. Duncan & Prasse's Veterinary Laboratory Medicine Clinical Pathology. 4th ed., Ames: Blackwell Publishing Company, 2003. 450p.

LI, Y.; WANG, C.; ALLEN, K.E.; LITTLE, S.E.; AHLUWALIA, S.K.; GAO, D.; MACINTIRE, D.K.; BLAGBURN, B.L.; KALTENBOECK, B. Diagnosis of canine *Hepatozoon* spp. infection by quantitative PCR. **Veterinary Parasitology**, v.157, p.50-58, 2008.

LITTLE, S.E.; ALLEN, K.E.; JOHNSON, E.M.; PANCIERA, R.J.; REICHARD, M.V.; EWING S.A. New developments in canine hepatozoonosis in North America: a review. **Parasites & Vectors**, 2 (Suppl 1), S5, 2009.

LOPES, S.; BIONDO, A.; SANTOS, A. **Manual de Patologia Clínica Veterinária**. 3. ed. Santa Maria: UFSM/Departamento de Clínica de Pequenos Animais, 2007. 107p.

MAKIMURA, S.; KINJO, H. Cytochemical identification of canine circulating leucocytes parasitized by the gametocyte of *Hepatozoon canis*. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.53, p.963-965, 1991.

MAKIMURA, S.; KINJO, H.; MATOVELO, J.A.; OGAWA, H.; YAMASAKI, K.; MATSUYAMA, K.; TALEYA, M.A.; SUSUI, H. Three cases of *Hepatozoon canis* infection in dogs in Miyazaki Prefecture. **Journal of the Japan Veterinary Medical Association**, v.44, p.928-932, 1991.

MARCHETTI, V.; LUBAS, G.; BANETH, G.; MODENATO, M.; MANCIANTI, F. Hepatozoonosis in a dog with skeletal involvement and meningoencephalomyelitis. **Veterinary Clinical Pathology**, v.38, p. 121-125, 2009.

MASSARD, C. A. *Hepatozoon canis* (JAMES, 1905) (Adeleida: Hepatozoidae) de cães do Brasil, com uma revisão do gênero em membros da ordem carnívora. 1979. 121f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária - Parasitologia Veterinária)-Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural, Rio de Janeiro.

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

McCULLY, R.M.; BASSON, P.A.; BIGALKE, R.D.; DE VOS, V.; YOUNG, E. Observations on naturally acquired hepatozoonosis of wild carnivores and dogs in the Republic of South Africa. **Journal of Veterinary Research**, v.42, p.117-133, 1975.

MEINKOTH, J.N.; CLINKENBEARD, K.D. Normal hematology of the dog. In: FELDMAN, B.F.; ZINKEL, J.G.; JAIN, N. **Schalm's veterinary hematology**, Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2000. p. 1055-1063.

MERCER, S.H.; CRAIG, T.M. Comparison of various staining procedures in the identification of *Hepatozoon canis* gamonts. **Veterinary Clinical Pathology**, v.17, p.63-65, 1988.

MILLER, W.W. *Hepatozoon perniciosum* (ng.; N.sp), um patogénico haemogregarine para ratos brancos, com uma descrição do ciclo sexual no hospedeiro intermediário, um ácaro (*Lelaps echidninus* Berlese) **Boletim Laboratory Hygiene**, v. 46, p.51-123, 1908.

MUNDIM, A.V.; JACOMINI, J.O.; MUNDIM, M.J.S.; ARAUJO, S.F. *Hepatozoon canis* (James, 1905) em cães de Uberlândia, Minas Gerais. Relato de dois casos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.29, p.359-362, 1992.

MUNDIM, A.V.; MUNDIM, M.J.S.; JENSEN, N.M.P.; ARAÚJO, S.F. *Hepatozoon canis*: estudo retrospectivo de 22 casos de infecção natural em cães de Uberlândia, MG. **Revista do Centro de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia**, v.10, p. 89-95, 1994.

MUNDIM, A.V.; MUNDIM, M.J.S.; BARBOSA, F.C. Hepatozoonosis canina. **Veterinária Notícias**, v.8, p.141-151, 2002.

MUNDIM, E.C.S.; FRANCISCO, M.M.S.; SOUZA, J.N.; ALENCAR, M.A.G.; RAMALHO, P.C.D. Incidência de hemoparasitoses em cães (*Canis familiaris*) de rua capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da cidade de Anápolis-GO. **Ensaios e Ciência**, v.12, p.107-115, 2008a.

MUNDIM, A.V.; MORAIS, I.A.; TAVARES, M.; CURY, M.C.; MUNDIM, M.J.S. Clinical and hematological signs associated with dogs naturally infected by *Hepatozoon* sp. and with other hematozoa. A retrospective study in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.153, p.3-8, 2008b.

MURATA, T.; SHIRAMIZU, K.; HARA, Y.; INOUE, M.; SHIMODA, K.; NAKAMA, S. First case of *Hepatozoon canis* infection of a dog in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.53, p.1097-1099, 1991.

MURATA, T.; INOUE, M.; TATEYAMA, S.; TAURA, Y.; NAKAMA, S. Vertical transmission of *Hepatozoon canis* in dogs. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.55, p.867-868, 1993.

MURATA, T.; INOUE, M.; TAURA, Y.; NAKAMA, S.; ABE, H.; FUJISAKI, K. Detection of *Hepatozoon canis* oocyst from ticks collected from the infected dogs. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.57, p.111-112, 1995.

NORDGREN, R.M.; CRAIG, T.M. Experimental transmission of the Texas strain of *Hepatozoon canis*. **Veterinary Parasitology**, v.16, p.207-214, 1984.

O'DWYER, L.H.; GUIMARÃES, L.; MASSARD, C.L. Ocorrência de infecção múltipla por *Babesia canis*, *Hepatozoon canis* e *Haemobartonella canis* em um cão esplenectomizado. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.4, p.83-84, 1997.

O'DWYER, L.H.; MASSARD, C.L.; SOUZA, J.C.P. *Hepatozoon canis* infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.94, p.143-150, 2001.

O'DWYER, L.H.; SAITO, M.E.; HASEGAWA, M.Y.; KOHAYAGAWA, A. Tissue stages of *Hepatozoon canis* in naturally infested dogs from São Paulo state, Brazil. **Parasitology Research**, v.94, p.240-242, 2004.

O'DWYER, L. H.; SAITO, M.E.; HOSEGAWA, M.Y.; KOHAYAGAWA, A. Prevalence, hematology and serum biochemistry in stray dogs naturally infected by *Hepatozoon canis* in São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p.688-690, 2006.

O'DWYER, L. H. Brazilian canine hepatozoonosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.20, p.181-193, 2011.

OLIVEIRA, P.R.; BECHARA, G.H.; DENARDI, S.E.; SAITO, K.C.; NUNES, E.T.; SZABÓ, M.P.J.; MATHIAS, M.I.C. Comparison of the external morphology of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil and Argentina. **Veterinary Parasitology**, v.129, p.139-147, 2005.

OLIVEIRA, M.C.S.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G.; ARAÚJO JR., J.P.; AMARANTE, A.F.T.; OLIVEIRA, H.N. *Babesia* spp. infection in *Boophilus microplus* engorged females and eggs in São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.130, p.61-67, 2005b.

OYAMADA, M.; DAVOUST, B.; BONI, M.; DEREURE, J.; BUCHETON, B.; HAMMAD, A.; ITAMOTO, K.; OKUDA, M.; INOKUMA, H. Detection of *Babesia canis rossi*, *B. canis vogeli* and *Hepatozoon canis* in dogs in a village of eastern Sudan by using a screening PCR and sequencing methodologies. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.12, p.1343-1346, 2005.

PALUDO, G.R.; DELL'PORTO, A.; CASTRO e TRINDADE, A.R.; McMANUS, C.; FRIEDMAN, H. *Hepatozoon* sp.: report of some cases in dogs in Brasília, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.118, p.243-248, 2003.

PALUDO, G.R.; FRIEDMANN, H.; DELL'PORTO, A.; MACINTIRE, D.K.; WHITLEY, E.M.; BOUDREAUX, M.K.; BANETH, G.; BLAGBURN, B.L.; DYKSTRA, C.C. *Hepatozoon* spp.: pathological and partial 18S rRNA sequence analysis from three Brazilian dogs. **Parasitology Research**, v.97, p.167-170, 2005.

PANCIERA, R.J.; GATTO, N.T.; CRYSTAL, M.A.; HELMAN, R.G.; ELY, R.W. Canine hepatozoonosis in Oklahoma. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.33, p.221-225, 1997.

PANCIERA, R.J.; EWING, S.A.; MATHEW, J.S.; CUMMINGS, C.A.; KOCAN, A.A.; BRESHEARS, M.A.; FOX, J.S. Observations on tissue stages of *Hepatozoon americanum* in 19 naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v.78, p.265-276, 1998.

PANCIERA, R.J.; MATHEW, J.S.; CUMMINGS, C.A.; DUFFY, J.C.; EWING, S.A.; KOCAN, A.A. Comparison of tissue stages of *Hepatozoon americanum* in the dog using immunohistochemical and routine histologic methods. **Veterinary Pathology**, v.38, p.422-426, 2001.

PARRA, M.O.C.; ARRAGA, A.C.M. Hepatozoonosis canina em Venezuela, hallazgos clínicos y de laboratorio. **Revista Científica FCV-LUZ**, v.6, p.125-133. 1996.

RAJAMANICKAM, C.; WIESENHUTTER, E.; ZIM, F.M.D.; HAMID, J. The incidence of canine haematozoa in Peninsular Malaysia. **Veterinary Parasitology**, v.17, p.151-157, 1985.

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

RUBINI, A.S.; PADUAN, K.S.; Von Ah LOPES V.; O'DWYER, L.H. Molecular and parasitological survey of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) in dogs from rural area of Sao Paulo State. Brazil. **Parasitology Research**, v.102, p.895-899, 2008.

SAKUMA, M.; NAKAHARA, Y.; SUZUKI, H.; UCHIMURA, M.; SEKIYA, Z.; SETOGUCHI, A.; ENDO, Y. A case report: a dog with acute onset of *Hepatozoon canis* infection. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.71, p.835-838, 2009.

SASANELLI, M.; PARADIES, P.; LUBAS, G.; OTRANTO, D.; de CAPRARIIS, D. Atypical clinical presentation of coinfection with *Ehrlichia*, *Babesia* and *Hepatozoon* species in a dog. **The Veterinary Record**, v.164, p.22-23, 2009.

SHKAP, V.; BANETH, G.; PIPANO, E. Circulating antibodies to *Hepatozoon canis* demonstrated by immune fluorescence. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.6, p.121-123, 1994.

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

SPOLIDORIO, M.G.; LABRUNA, M.B.; ZAGO, A.M.; DONATELE, D.M.; CALIARI, K.M.; YOSHINARI, N.H. *Hepatozoon canis* infecting dogs in the state of Espírito Santo, southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.163, p.357-361, 2009.

SZABÓ, M.P.J.; CUNHA, T.M.; PINTER, A.; VICENTINI, F. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v.25, p.909-916, 2001.

SZABÓ, M.P.; MANGOLD, A.J.; JOÃO, C.F.; BECHARA, G.H.; GUGLIELMONE, A.A. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. **Veterinary Parasitology**, v. 130, p.131-140, 2005.

THRALL, M.A., BAKER, D.C., CAMPBELL, T.W., DENICOLA, D., FETTMAN, M.J., LASSEN, E.D., REBAR, A., WEISER, G. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 1. ed. São Paulo: Rocca, 2006. 592 p.

TRAPP, S.M.; DAGNONE, A.S.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R.L.; AMUDE, A.M.; MORAIS, H.S.A. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. **Veterinary Parasitology**, v. 140, p.223-230, 2006.

TSACHEV, I.; IVANOV, A.; DINEV, I.; SIMEONOVA, G.; KANAKOV, D. Clinical *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* co-infection in a dog in Bulgaria. **Revue de MédecineVétérinaire**, v.159, p.68-73, 2008.

VINCENT-JOHNSON, N.; MACINTIRE, D.K.; LINDSAY, D.S.; LENZ, S.D. BANETH, G.; SHKAP, V.; BLAGBURN, B.L. A new *Hepatozoon* species from dogs: description of the caustive agent of canine Hepatozoonosis in North America. **Journal of Parasitology**, v.83, p.1165-1172, 1997.

VOYVADA, H.; PASA, S.; UNVER, A. First clinical case of pure *Hepatozoon canis* of a dog in Turkey. **Journal of Small Animal Practice**, v.45, p.613-617, 2004.

WANER, T.; BANETH, G.; ZUCKERMAN, A.; NYSKA, A. *Hepatozoon canis*: size measurement of the gametocyte using image analysis technology. **Comparative Haematology International**, v.4, p.177-179, 1994.

WENYON, C. M. Some remarks on the genus *Leucocytozoon*. **Parasitology**, v.3, p.63-72, 1910.

WENYON, C. M. Oriental sore in Bagdad, together with observation on a gregarine in *Stegomia fasciata*, the haemogregarine of dogs and the flagellates of house flies. **Parasitology**, v.4, p.273-344, 1911.

WENYON, C.M. **Protozoology a manual for medical men, veterinarians and zoologists**. London: Baillière Tindall & Cassel Limited, 1926. 1563 p.

ANEXO I

Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131/4335; e-mail:ceua@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

**ANÁLISE FINAL Nº 033/09 DO COMITÊ DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O
PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 003/09**

Projeto Pesquisa: “Caracterização molecular da espécie de Hepatozoon e parâmetros hematológicos e bioquímicos de cães (Canis familiaris) naturalmente infectados procedentes da microrregião de Uberlândia – MG”.

Pesquisador Responsável: Márcia Cristina Cury

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

.

Uberlândia, 27 de abril de 2009

Prof. Dr. Alcino Eduardo Bonella
Coordenadora do CEUA/UFU

ANEXO II

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós Graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas
Telefax: (034)3218-2333
Av. Pará 1720 - Campus Umuarama 38400-902 Uberlândia MG

TERMO DE AUTORIZAÇÃO

Eu, _____, proprietário (a) do (s) animal (animais)

_____, autorizo a coleta de amostra de sangue do (s) mesmo (s), para fins de pesquisa, sendo essa intitulada **“Caracterização molecular da espécie de *Hepatozoon* e parâmetros hematológicos e bioquímicos de cães (*Canis familiares*) naturalmente infectados procedentes da microrregião de Uberlândia – MG”**.

Responsável: Prof^a. Dr^a. Márcia Cristina Cury

Doutoranda: MSc. Renata Lima de Miranda

Assinatura Proprietário (a)

Uberlândia, 20____.