



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal

**ESTUDO DA OCORRÊNCIA DA INFECÇÃO POR *Hepatozoon* sp. EM GATOS
DOMÉSTICOS DE BRASÍLIA E REGIÕES PERIURBANAS**

NATHÁLIA SALGADO ZANANI

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA/DF

JUNHO/2015



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal

**ESTUDO DA OCORRÊNCIA DA INFECÇÃO POR *Hepatozoon* sp. EM GATOS
DOMÉSTICOS DE BRASÍLIA E REGIÕES PERIURBANAS**

NATHÁLIA SALGADO ZANANI

ORIENTADOR: GIANE REGINA PALUDO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

PUBLICAÇÃO: 111

BRASÍLIA/DF

JUNHO/2015


UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**ESTUDO DA OCORRÊNCIA DA INFECÇÃO POR *Hepatozoon* sp. EM GATOS
DOMÉSTICOS DE BRASÍLIA E REGIÕES PERIURBANAS**


NATHÁLIA SALGADO ZANANI

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL,
COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS A
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM SAÚDE ANIMAL


APROVADA POR:



GIANE REGINA PALUDO, DOUTORA (UnB)
(ORIENTADOR)



ÂNGELA PATRÍCIA SANTANA, DOUTORA (UnB)
(EXAMINADOR INTERNO)



SABRINA DOS SANTOS COSTA POGGIANI, DOUTORA (UPIS)
(EXAMINADOR EXTERNO)

BRASÍLIA/DF, 2 DE JUNHO DE 2015.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

ZANANI, N.S. **Estudo da ocorrência da infecção por *Hepatozoon* sp. em gatos domésticos de Brasília e Regiões Periurbanas.** Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2015. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de Mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos; foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Zanani, Nathália Salgado

Estudo da ocorrência da infecção por *Hepatozoon* sp. em gatos domésticos de Brasília e Regiões Periurbanas/ Nathália Salgado Zanani
Orientação de Giane Regina Paludo
Brasília, 2015. 46p

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2015

1.Hepatozoonose felina. 2.*Hepatozoon canis*. 3.Hemoparasitas

I.Paludo, G.R. II. Doutor

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que cuida de mim e sempre me mostra o melhor caminho a seguir.

Agradeço a minha orientadora Giane Regina Paludo por me dar a oportunidade de realizar este mestrado na Universidade de Brasília. Estendo o agradecimento às pessoas com quem convivi no laboratório que me fizeram crescer como pessoa e como profissional.

Agradeço ao meu marido Bruno que me apoia em todas as tomadas de decisões e que esteve ao meu lado em todos os momentos difíceis e felizes que passamos nestes últimos dois anos.

Agradeço a todo apoio que recebi da minha família e da família do meu marido, sempre acreditando em mim e se orgulhando das minhas conquistas.

Agradeço aos meus amigos e amigas que acreditam em mim, que deram a maior prova de amizade no começo de ano difícil que passei e com quem posso contar sempre.

Não poderia esquecer das minhas meninas Terra e Tequila que me amam sempre, nos momentos felizes e tristes e que sempre estão ao meu lado me dando muitos beijos.

RESUMO GERAL

O *Hepatozoon* sp., pertencente ao filo Apicomplexa, afeta tanto vertebrados quanto invertebrados hematófagos. Nos felinos domésticos, as formas de transmissão, assim como os vetores envolvidos ainda não foram esclarecidos.

No primeiro capítulo determinou-se ocorrência da infecção da Hepatozoonose em felinos de diversas localidades do Distrito Federal, utilizando técnicas moleculares para diagnóstico da doença e caracterização da espécie do parasita.

No segundo capítulo relatou-se um caso clínico de um felino atendido no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília que apresentou alterações clínicas, laboratoriais e anatomopatológicas da Hepatozoonose, posteriormente diagnosticada.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1. Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio 0,01% com resultados dos controles positivos das PCRs realizadas.	11
Figura 2. Gametócito do <i>Hepatozoon canis</i> encontrado em neutrófilo durante exame de esfregaço sanguíneo.	26
Figura 3. Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio (0,01%).	27
Figura 4. Alterações encontradas em cortes histopatológicos.	29

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Descrição dos oligonucleotídeos, sequências e genes utilizados, tamanho do amplicon e referências bibliográficas.	7

LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIACÕES

ALT	Alanina Aminotransferase
BID	“bis in die” - Administração de Medicamentos duas vezes ao dia
CK	Creatina Kinase
°C	Graus Celcius
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dl	Decilitros
dNTP	Trifosfatos de desoxirribonucleosídeos
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético – anticoagulante
FeLV	Vírus da Leucemia Felina
FIV	Virus da Imunodeficiência Felina
GAPDH	Gliceraldeído-3fosfato desidrogenase
g/dl	Gramas por Decilitro
Kg	Quilogramas
LDH	Lactato Desidrogenase
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mg/dl	Miligramas por Decilitro
mg/Kg	Miligramas por Quilo
mM	Mili Molar
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia de Polimerase)
pmol	Picomoles
RFLP-PCR	Reação em cadeia de Polimerase com digestão enzimática
Rrna	Ácido Ribnucleico ribosomal
SID	Administração de Medicamentos uma vez ao dia
Taq	<i>Termophilus aquaticus</i>
UnB	Universidade de Brasília
U	Unidade
µl	Microlitros

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	vi
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações.....	ix
CAPÍTULO I.....	1
• RESUMO.....	2
• ABSTRACT.....	3
• INTRODUÇÃO.....	4
• MATERIAIS E MÉTODOS.....	6
• RESULTADOS.....	10
• DISCUSSÃO.....	12
• CONCLUSÃO.....	16
• REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
CAPÍTULO II.....	22
• RESUMO.....	23
• ABSTRACT.....	24
• RELATO DE CASO.....	25
• DISCUSSÃO.....	30
• CONCLUSÃO.....	33
• REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

CAPÍTULO I

Estudo da Ocorrência da Infecção por *Hepatozoon* sp. em felinos domésticos
do Distrito Federal, Brasil

Nathália S. Zanani, Marianne A. Teixeira, Marcela C. Scalon, Giane R. Paludo

Laboratório de Patologia Clínica e Laboratório de Microbiologia e Patologia
Molecular da Universidade de Brasília (UnB)

RESUMO

O *Hepatozoon* sp., pertencente ao filo Apicomplexa, afeta tanto vertebrados quanto invertebrados hematófagos. Nos felinos domésticos, as formas de transmissão, assim como os vetores envolvidos ainda não foram esclarecidos. Os animais infectados podem ser assintomáticos, porém sinais clínicos da doença já foram descritos e incluem letargia, anorexia, desidratação, perda de peso, falência renal, febre ou hipotermia, linfonodos aumentados e secreção ocular. O presente estudo teve como objetivo determinar a ocorrência da infecção por *Hepatozoon* sp. em gatos domésticos de Brasília e regiões periurbanas e caracterizar a espécie infectante pela técnica RFLP-PCR. Foram coletados sangue de 329 gatos, realizados hemogramas e bioquímicos, além de análises moleculares pelo método de PCR após extração de DNA de todas as amostras. Do total, três foram positivos para *Hepatozoon* sp. A técnica RFLP-PCR foi realizada posteriormente para caracterização das espécies do parasita onde nas três amostras positivas foi confirmada a infecção pelo *Hepatozoon canis*. As alterações hematológicas encontradas foram leucocitose (1/3), trombocitopenia (2/3), neutrofilia (2/3). O perfil bioquímico revelou elevados níveis de uréia (3/3), hiperproteinemia (1/2), hipoalbuminemia (1/2) e hiperglobulinemia (2/2). O estudo demonstrou que a ocorrência da Hepatozoonose nas regiões estudadas é baixa (0,91%), que a espécie predominante é o *Hepatozoon canis* e que as manifestações causadas são severas, com alto potencial de mortalidade.

PALAVRAS CHAVE: Hepatozoonose felina, *Hepatozoon canis*, hemoparasitoses

ABSTRACT

The *Hepatozoon* sp., belongs to the phylum Apicomplexa, affects both vertebrates as bloodsucking invertebrates. In domestic cats, the modes of transmission, as well as the vectors involved are still unclear. Infected animals can be asymptomatic, but clinical signs of disease have been described and include lethargy, anorexia, dehydration, weight loss, kidney failure, fever or hypothermia, enlarged lymph nodes, and ocular discharge. The present study aimed to determine the occurrence of *Hepatozoon* sp. in domestic cats of Brasilia and peri-urban regions and characterize the infecting species by PCR-RFLP technique. 329 cats blood, blood counts and biochemical performed were collected, and molecular analysis by PCR after extraction of DNA from all samples. Of the total, three were positive for *Hepatozoon* sp. RFLP-PCR technique was used for further characterization of the species of parasite which all positive samples were confirmed *Hepatozoon canis* infection. Hematological alterations were leukocytosis (third), thrombocytopenia (2/3) and neutrophilia (2/3). The biochemical profile revealed high levels of urea (3/3), hyperproteinemia (1/2), hypoalbuminemia (1/2) and hyperglobulinemia (2/2). The study showed that the occurrence of hepatozoonosis the regions studied is low (0.91%), the predominant species is the *Hepatozoon canis* and demonstrations caused are severe, with high potential for mortality.

INDEX TERMS: Feline Hepatozoonosis, *Hepatozoon canis*, hemoparasitosis

INTRODUÇÃO

O Hepatozoon pertence ao filo Apicomplexa e pode afetar grande variedade de vertebrados terrestres como marsupiais, insetívoros, roedores, carnívoros e répteis, além de invertebrados hematófagos (Smith 1996, O'Dwyer et al. 2003). Sua transmissão ocorre pela ingestão do vetor que carrega oocistos esporulados dentro da hemocele (Baneth, Samish e Shkap 2007).

A maior mobilidade dos animais domésticos e o acesso à rua tem resultado em aumento da predisposição à infecções e maior disseminação de doenças transmitidas por carrapatos entre diferentes espécies de hospedeiro (Shaw et al. 2001, Baneth et al. 1998a). Em cães o carrapato da espécie *Rhipicephalus sanguineus* já foi identificado como vetor do *Hepatozoon canis* (Christophers 1907) e é o principal carrapato encontrado em áreas urbanas no Brasil (Labruna e Campos Pereira 2001). O *Amblyomma ovale* é descrito como potencial transmissor do agente em áreas rurais (Forlano et al. 2005, Rubini et al. 2009). Os artrópodes mais comumente encontrados nos gatos são as pulgas (Pulicidae) e os carrapatos da família Ixodidae, e ambos usam cães e gatos como hospedeiros (Shaw et al 2001). O potencial de transmissão da doença por mosquitos, ácaros e piolhos ainda é desconhecido (Tabar et al. 2008).

Achados clínicos, hematológicos e bioquímicos podem ser altamente variáveis e incluem: anemia, leucopenia (Perez, Rubini e O'Dwyer 2004), neutrofilia, leucocitose (Ewing 1977), alta contagem de reticulócitos (Salakij et al. 2008), trombocitopenia (Baneth et al. 1998a). Alterações em exames bioquímicos já foram descritos e incluem, aumento de uréia e creatinina (Perez et al. 2004) pela lesão

renal, aumento dos níveis séricos de CK e LDH (Rich and Coles 1995) pela lesão muscular e da alanina aminotransferase (ALT) (Baneth et al. 1998a) pela lesão hepática.

Usualmente a doença é diagnosticada por observação de esfregaços de sangue periférico em microscópio óptico, a fim de encontrar gametócitos dentro de neutrófilos. Porém às vezes é difícil detectar a presença do parasita quando seu número na circulação é baixo. Recentemente, métodos moleculares têm sido utilizados para detecção do *Hepatozoon* sp. O método da PCR é mais sensível e específico para encontrar patógenos no sangue periférico e em vetores artrópodes (Sasaki et al. 2008).

O objetivo deste trabalho foi determinar a ocorrência do *Hepatozoon* sp. em gatos de Brasília e de regiões periurbanas pelo método de PCR, assim como caracterizar a espécie do parasita, utilizando o método da RFLP-PCR.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram colhidos aproximadamente 3 ml de sangue da veia jugular, cefálica ou femoral de 329 gatos, independente de sexo, idade ou raça, de diversas regiões do Distrito Federal, sendo 180 provenientes do Hospital Veterinário da Universidade de Brasília e 149 em campanhas de vacinação.

As amostras foram divididas em 2 tubos de colheita, um deles contendo anticoagulante (EDTA) e outro sem anticoagulante, identificados e armazenados em caixa térmica com gelo até a chegada ao Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da Universidade de Brasília, para posterior processamento.

Com o sangue total foi realizado hemograma, utilizando um contador semi-automático de células modelo Micros ABC Vet (Horiba ABX), obteve-se a contagem de eritrócitos, leucócitos, plaquetas e a concentração de hemoglobina. O Volume Globular (VG) foi obtido pela centrifugação do sangue em capilar de microhematócrito e a determinação das Proteínas Plasmáticas Totais (PPT) foi feita utilizando-se refratômetro (Modelo: SZJ-D). Os valores de Volume Corpuscular Médio (VCM) e a Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) foram determinados por meio de cálculo padrão. Os esfregaços preparados foram corados com Panótico (NewProv[®]) para contagem diferencial de leucócitos, análise morfológica das células sanguíneas e pesquisa de hemoparasitas.

Os perfis bioquímicos séricos foram realizados a partir do soro, obtido por centrifugação das amostras dos tubos sem anticoagulante, utilizando um aparelho de bioquímico semiautomático (Bio 2000 - Bioplus) e kits comerciais específicos (Labtest[®]) para cada parâmetro testado. Foram avaliados os seguintes parâmetros:

ALT, CK, FA, creatinina, uréia, albumina e proteínas totais e globulinas. O restante das amostras de sangue total e os coágulos foram armazenados à 4°C até extração do DNA.

No Laboratório de Microbiologia e Patologia Molecular, o DNA foi extraído a partir do sangue total ou do coágulo. Para amostras de sangue total foi utilizado o kit comercial Illustra Blood genomicPrep Mini Spin kit, GE Healthcare[®], Piscataway, NJ e para amostras coaguladas, kit Illustra tissue & cells genomicPrep Mini Spin Kit, GE Healthcare[®], UK, ambos seguindo as recomendações do fabricante. O DNA extraído foi armazenado a -20°C até o momento da realização da PCR. Em todas as reações foram utilizados controles negativo (H₂O miliQ) e positivo, amostra de cão positivo para *Hepatozoon* sp. na PCR e que apresentou gametócitos do parasita em esfregaço de sangue periférico.

Todos os oligonucleotídeos utilizados nas PCRs estão listados na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos oligonucleotídeos, sequências e genes utilizados, tamanho do amplicon e referências bibliográficas.

Primer	Sequência 5'-3'	Gene	Pares Base	Referência Bibliográfica
GAPDH-R	CCTTCATTGACCTCAACTACAT	GAPDH	400 pb	Birkenheyer et al., 2003
GAPDH-F	CCAAAGTTGTCATGGATGACC	GAPDH		Birkenheyer et al., 2003
HEP-R	CTTATTATTCCATGCTGCAG	18S rRNA	666 pb	Inokuma et al., 2002
HEP-F	ATACATGAGCAAATCTCAAC	18S rRNA		Inokuma et al., 2002
HEP-1	CGCGCAAATTACCCAATT	18S rRNA	665 pb	Criado-Fornélio et al., 2007
HEP-4	TAAGGTGCTGAAGGAGTCGTTTAT	18S rRNA		Criado-Fornélio et al., 2007

Para comprovação da qualidade da extração e da integridade do DNA obtido, foi realizada uma PCR para detectar a presença do gene que codifica a enzima GAPDH, como descrito por Birkenheyer et al. (2003). A mistura da PCR era composta de: 1X de tampão, cerca de 10ng do DNA extraído, 1,5mM MgCl₂, 0,2mM

de cada deoxinucleotídeo, 1µl de cada oligonucleotídeo e 1,25 U de Taq DNA polimerase, totalizando ao final 25 µl. O ciclo era composto por 5 minutos de desnaturação inicial a 95°C, seguido de 40 ciclos de amplificação (94°C por 30 segundos, 52°C por 60 segundos e 72°C também por 60 segundos), seguido de uma etapa de extensão final de 5 minutos a 72°C.

Para identificação do *Hepatozoon* sp. foram utilizados os oligonucleotídeos Hep-R e Hep-F, que anelam no gene 18S rRNA do parasita, resultando em um produto de amplificação de 666 pares de base (pb) (Inokuma et al., 2002). Em um volume final de 25 µL, a mistura da PCR continha: 18,3µl de H₂O miliQ, 2,5µl tampão (1X) Taq polimerase (Phoneutria[®]), 1,6mM de MgCl₂ (Phoneutria[®]), 0,5µl de cada oligonucleotídeo (10pmol), 0,2µl de dNTP (25mM) (dCTP, dGTP, dTTP, dATP - Phoneutria[®]), 1U de Taq DNA polimerase (Phoneutria[®]) e 2,0 µL do DNA da amostra. As amplificações foram realizadas no mesmo termociclador (Biorad[®]). As condições dos ciclos de PCR foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de 30 segundos à 95°C, 30 segundos à 52°C e 90 segundos à 72°C e por último 5 minutos de extensão final à 72°C. Para visualização da reação os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em em gel de agarose 0,9% por aproximadamente 45 minutos a 80 volts. A coloração do gel foi feita com solução de Brometo de etídio (0,01%) por 25 minutos e a visualização com o transluminador ultra-violeta.

As amostras positivas foram submetidas a RFLP-PCR com os oligonucleotídeos Hep-1 e Hep-4 que anelam em uma sequência específica do gene 18S rRNA e amplifica um produto de 665 pares de base (pb). Este produto de amplificação possui um sítio de restrição para a enzima *Pst*I (Criado-Fornélio et al. 2007b), que cliva o amplicon em 2 fragmentos, um de 280 e outro de 380, o que

permite a caracterização da espécie *Hepatozoon canis*. A mistura desta PCR continha: 16,9µl H₂O miliQ, 2,5µl tampão (1X) Taq polimerase (Phoneutria[®]), 1,6mM de MgCl₂ (Phoneutria[®]), 0,2µl dNTP (25mM) (dATP, dCTP, dGTP, dTTP - Phoneutria[®]), 0,75U Taq polimerase (Phoneutria[®]) e 2,0µL do DNA extraído da amostra, totalizando 25µL. Os ciclos da reação foram da seguinte forma: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 40 ciclos sendo cada um 30 segundos à 95°C, 30 segundos à 52°C, 90 segundos à 72°C e uma extensão final de 5 minutos à 72°C. A eletroforese e a coloração do gel de agarose à 1,5% foi idêntica ao protocolo anterior. Para a digestão, 5µL do produto amplificado foi adicionado a uma mistura que continha: 0,5 µL (6UI) da enzima *Pst I* (Invitrogen[®]) e 1,5µl tampão (1X) Taq polimerase (Phoneutria[®]) e 8µl de H₂O miliQ, totalizando volume final de 15 µL, que permaneceram incubados posteriormente no banho-maria por 2 horas à 37°C. O resultado da digestão foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e corado com brometo de etídio (0,01%), sendo visualizado e fotografado em transluminador.

RESULTADOS

Foram analisadas amostras de 329 gatos, de diversas raças, idades e de ambos sexos. Deste total, três foram positivos, dos quais dois foram atendidos no Hospital Veterinário e um era de campanha de vacinação. Os três animais eram provenientes de domicílios localizados em regiões peri urbanas e tinham acesso à rua. A ocorrência da Hepatozoonose nesses animais foi de 0,91%.

Os animais apresentaram ao exame clínico relutância em se movimentar, apatia, polimialgia, hiporexia, letargia, febre, perda de peso e secreção ocular. Um dos animais também apresentava aumento de volume dos membros pélvicos, ataxia e sinais respiratórios. E outro animal apresentava leve desidratação e infestação por carrapatos.

Os exames hematológicos mostraram ausência de anemia nos três animais, presença de leucocitose, neutrofilia e trombocitose em dois dos três positivos. O terceiro animal não apresentou alterações hematológicas. O perfil bioquímico revelou aumento dos níveis de uréia sem aumento da creatinina sérica nos três animais. Não houve alteração no valor das enzimas hepáticas e da CK. Dois dos animais tiveram as proteínas totais e frações dosadas e apresentaram hiperproteinemia com hipoalbuminemia e hiperglobulinemia.

Todas as amostras de DNA testadas foram positivas para a presença do gene GAPDH, indicando que o DNA estava íntegro e que não havia inibidores da reação. Os controles positivos de todas as reações (GAPDH, *H. sp*, *H. canis* e *PstI* – digestão) apresentaram bandas na altura dos pares de base esperadas para sequência amplificada. Os controles negativos não tiveram amplificações (Figura 1).

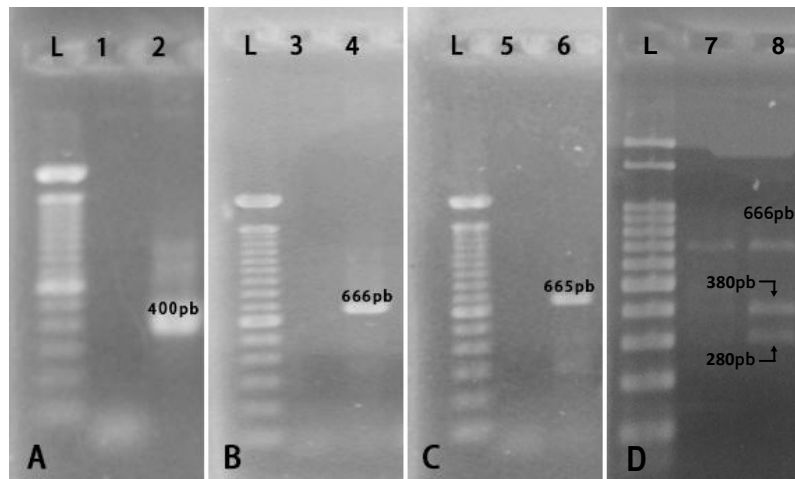


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio 0,01% com resultados de amostras positivas. **A**-GAPDH: L- marcador molecular de 100 pb; 1- controle negativo; 2- amostra positiva; **B**-PCR para *Hepatozoon* sp. utilizando os nucleotídeos Hep-R/Hep-F: L- marcador molecular de 100 pb; 3- controle negativo; 4- amostra positiva; **C**-PCR para caracterização do *Hepatozoon canis* utilizando os oligonucleotídeos Hep-1/Hep-4: L- marcador molecular de 100 pb; 5- controle negativo; 6- amostra positiva; **D**-RFLP-PCR com enzima PstI, formando dois fragmentos característicos de *H. canis*: L- marcador molecular de 100 pb; 7- controle negativo; 8- amostra positiva, mostrando o amplicon com 666 pares de base e dois fragmentos menores, de 280 e 380 pb.

Para a técnica RFLP-PCR (*Restriction fragment length polymorphism analysis*) as três amostras foram positivas e após digestão enzimática, o DNA foi clivado e foram visualizadas duas bandas de amplificação menores, uma de 280 pb e outra de 380 pb, confirmando o DNA do parasita como sendo da espécie *Hepatozoon canis*.

DISCUSSÃO

O presente estudo determinou a ocorrência da Hepatozoonose em gatos domésticos em Brasília e caracterizou a espécie *Hepatozoon canis* em gatos pelo método de RFLP-PCR. Foi demonstrado neste trabalho que a frequência da infecção pelo *Hepatozoon* sp. em gatos é baixa, representando uma ocorrência de 0,91% na população estudada. Mesmo assim, esta ocorrência foi maior do que outro estudo realizado no Brasil, cuja ferramenta diagnóstica foi a PCR. No Maranhão em 2011, De Bortoli et al. encontraram o parasita em apenas 0,5% de um total de 200 animais testados.

O resultado encontrado neste estudo se aproxima do que foi observado também a partir de métodos moleculares em diferentes regiões do mundo. Em 2009, na França, Criado-Fornélio et al. utilizaram o método de PCR em tempo real e encontraram 2 animais positivos em um total de 116 testados, demonstrando uma ocorrência de 1,7%, ligeiramente maior do que outros trabalhos que utilizaram PCR tradicional. Na Espanha, Criado-Fornélio et al. (2006) encontraram 2 gatos positivos, representando 0,6% do total estudado. Em contrapartida, outro estudo realizado na Espanha encontrou 4 gatos positivos de um total de 25 testados (16%) (Ortuño et al. 2008). Esta maior ocorrência poderia ser explicada pelo local que as amostras foram coletadas por Ortuño et al. onde sabidamente havia exposição dos animais a doenças transmitidas por artrópodes, situação semelhante à encontrada no nosso estudo, na qual os animais positivos tinham acesso à rua e moravam em regiões onde o controle de ectoparasitas não é efetivo. Por esse motivo é possível imaginar que em algum momento da vida o gato possa ter contato com ectoparasitas como

pulgas ou carrapatos que também infectam cães, havendo assim transmissão do agente entre estes hospedeiros.

Dois dos gatos positivos eram machos e tinham acesso à rua. Baneth et al., em 1998 discutiram sobre a influência do sexo dos animais infectados e afirmaram que há explicações para a desproporcional taxa de infecção entre machos e fêmeas. Explicam que gatos machos que tem acesso livre à rua podem ser mais expostos ao vetor felino da doença do que as fêmeas que tem o hábito de ficar próximo à sua casa. Além disso, o acesso à rua pode resultar em brigas territoriais, o que também predispõe infecções por doenças imunossupressoras como FIV ou FeLV, o que aumenta a chance de manifestação da Hepatozoonose.

Dois dos animais positivos neste estudo apresentaram manifestações clínicas como anorexia, letargia, febre, perda de peso, polimialgia e secreção ocular, manifestações estas descritas por muitos autores desde a descoberta deste parasita. Contudo, outros sinais observados devem ser destacados, como por exemplo, membros torácicos e pélvicos edemaciados, por causa inflamação e necrose do tecido muscular, o que resultam em aumento da enzima muscular (CK). Os sinais respiratórios manifestados por um dos animais já foram observados anteriormente por Baneth et al. 1998a e Ortuño et al. 2008. A ataxia também foi descrita anteriormente por East et al. em 2008, porém não parece ser uma manifestação comum da doença.

Os resultados laboratoriais mostram que dois gatos apresentavam leucocitose (Leucócitos $> 19.500 \times 10^3/\mu\text{l}$) por neutrofilia (Segmentados $> 12.500 \times 10^3/\mu\text{l}$). A leucocitose foi um achado que corrobora com outros autores (Baneth et al. 1998a). Essa leucocitose por neutrofilia pode ser explicada por processo inflamatório do músculo esquelético, entretanto necrose e inflamação podem ocorrer também no

baço, linfonodos, fígado e pulmões (Gaunt 2000). É importante salientar que a leucopenia também pode estar relacionada à doença, como descrito por Perez et al. (2004).

Segundo Thrall et al. (2006), o fígado utiliza aminoácidos na síntese de albumina. Inanição leva ao menor aporte de aminoácidos e, conseqüentemente, diminuição na síntese hepática da albumina. A deficiência de aminoácidos raramente causa diminuição da produção de globulinas grave o suficiente para promover hipoglobulinemia detectável. É possível então, que os animais positivos apresentem anorexia que resulte em hipoalbuminemia como observado em dois dos animais. Além disso, a albumina é uma proteína de fase aguda negativa e um processo infeccioso ou inflamatório agudo, levaria a uma redução dos seus teores séricos (Cerón, Eckersall e Martínez-Subiela 2005).

Elevados níveis séricos de uréia foram observados nos três gatos, porém nenhum deles apresentou aumento dos níveis de creatinina. Este resultado não foi semelhante a outros relatos, nos quais a uréia e a creatinina se encontravam elevadas em animais positivos para infecção pelo *Hepatozoon* sp. (Perez et al. 2004). O aumento da uréia sem aumento da creatinina pode ser explicado pelo excessivo catabolismo protéico ou perda de massa muscular (Eimegh Hart 2005), manifestação esta encontrada em 2 dos animais positivos que apresentavam polimialgia e relutância em se movimentar.

O diagnóstico da Hepatozoonose pode ser realizado sem a ajuda de métodos moleculares, por exemplo, através de exame de esfregaço de sangue periférico. Com este método é possível visualizar gametócitos do parasita no interior de neutrófilos de animais com a doença, porém o sucesso deste método vai depender do grau de parasitemia. No esfregaço sanguíneo de dois animais estes

gametócitos foram identificados parasitando neutrófilos. Alguns autores basearam a prevalência da infecção por *Hepatozoon* sp. na presença do parasita em esfregaços de sangue periférico examinados por microscopia. Baneth et al. (1998a) identificaram gametócito em 7 gatos (n= 1229), representando uma prevalência de 0,57%. Perez et al. (2004) também diagnosticaram 3 gatos em São Paulo, Brasil, ao visualizar gametócitos do parasita em leucócitos polimorfonucleares.

Pelo método RFLP-PCR a espécie *Hepatozoon canis* foi caracterizada em dois dos três gatos positivos. Os oligonucleotídeos utilizados nesta técnica foram desenhados por Criado-Fornélio (2007a) que conseguiu caracterizar a espécie em cães da Venezuela, Tailândia e Espanha. O *H. canis* também foi caracterizado em 3 gatos no Brasil (Rubini et al. 2006) e em 1 gato na Tailândia (Jittapapalong et al. 2006) pelo método de seqüenciamento.

CONCLUSÃO

O presente estudo constatou, através das técnicas de PCR e RFLP-PCR, a presença do agente *Hepatozoon canis* causando infecção em gatos domésticos no Distrito Federal, Brasil, com uma prevalência de 0,91%. Dos animais acometidos 66,67% manifestaram doença clínica, mas não apresentaram resultado de exames laboratoriais semelhantes aos descritos anteriormente, tornando mais difícil o diagnóstico diferencial clínico e laboratorial da doença.

Comitê de Ética: Esta pesquisa recebeu aprovação do Comitê de Ética da UnB sob o número UnBDOC nº 55141/2013.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baneth G., Aroch I., Tal N. & Harrus S. 1998a. *Hepatozoon* species infection in domestic cats: A retrospective study. *Vet. Parasit.* 79:123-133

Baneth G., Samish M., Shkap V. 2007. Life cycle of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae) in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dog (*Canis familiaris*). *J. Parasit.* 93(2):283-299

Cerón, J.J., Echersall, P.D., Martínez-Subiela, S. 2005. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Veterinary Clinical Pathology.* 34(2):85-98

Criado-Fornélio A., Ruas J.L., Casado N., Farias N.A.R., Soares M.P., Müller G., Brum J.G.W., Berne M.E.A., Buling-Saraña A. & Barba-Carretero J.C. 2006. New molecular data on mammalian *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Adeleorina) from Brazil and Spain. *J. Parasitol.* 92(1):93-99

Criado-Fornélio A., Rey-Valerion C., Buling A., Barba-Carretero J.C., Jefferies R. & Irwin P. 2007a. New advances in a molecular epizootiology of canine hematic protozoa from Venezuela, Thailand as Spain. *Vet. Parasit.* 144:261-269

Criado-Fornélio A., Buling A., Pingret, J.L., Etievant M., Boucraut-Baralon C., Alongi A., Agnone A. & Torina A. 2009b. Hemoprotozoa of domestic animals in France: Prevalence and molecular characterization. *Vet. Parasit.* 159:73-76

Criado-Fornélio A. 2012. Emerging tick-borne protozoal diseases: Part 2. Feline Hepatozoonosis and the resurrection of *Hepatozoon felis*. In: García R. & Jiménez R. *Felines*. Nova Science Publishers, Inc, Hauppauge, New York. cap.3 p. 68

De Bortoli, C.P., André M.R., Braga M.S.C. & Machado R.Z. 2011. Molecular characteriation of *Hepatozoon sp* in cats from São Luis Island, Maranhão, Northeastern Brazil. *Parasitol. Res.* 109:1189-1192

East M.L., Wibbelt G., Lleckfeldt D., Lugwig A., Goller K., Wilhelm K., Schares G., Thierer D & Hofer H. 2008. A *Hepatozoon* species genetically distinct from *H. canis* infecting spotted hyenas in the Serengueti ecosystem, Tanzania. *Journal of Wildlife Diseases* 44(1), January

Emeigh Hart, S.G. 2005. Assessment of renal injury in vivo. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods.* 52:30-45

Ewing G.O. 1997. Granulomatous cholangiohepatitis in a cat due to a protozoan parasite resembling *Hepatozoon canis*. In: *Feline Practice* 7:37-40

Forlano, M., Scofield, A., Elisei, C., Fernandes, K.R., Ewing, S.A., Massard, C.L. 2005. Diagnosis of *Hepatozoon* spp. in *Amblyomma ovale* and its experimental transmission in domestic dogs in Brazil. *Veterinary Parasitology*. 134:1-7

Gaunt S.D. 2000. Extreme Neutrophilic Leukocytosis. In: Feldman B.F., Zinkl J.G & Jain N.C. Schalm's *Veterinary Hematology*. 5th ed., cap. 52, p. 347-349

Inokuma, H., Okuda, M., Ohno, K., Shimoda, K., Onishi, T. 2002. Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a *Hepatozoon* detected in two Japanese dogs. *Veterinary Parasitology*. 106:265-271

Jittapalapong S., Rungphisutthipongse O., Maruyama S., Schaefer J.J. & Stich R.W. 2006. Detection of *Hepatozoon canis* in stray dogs and cats in Bangkok, Thailand. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1081:479-488

Labruna, M.B., Campos Pereira, M. 2001. Carrapato em cães no Brasil. *Clínica Veterinária*. 30:24-32

Lassem E.D. 2006. Avaliação Laboratorial das Proteínas do Plasma e do Soro Sanguíneo. In: 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. cap. 26, p. 376-387, São Paulo

O'Dwyer L.H., Moço T.C., Barrelha T.H., Vilela F.C. & Silva R.J. 2003. Prevalência de *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa: Hepatozoidae) em serpentes recém-capturadas no Brasil. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 55(3)

Ortuño A., Castella J., Criado-Fornélio A., Buling A. & Barba-Carretero J.C. 2008. Molecular detection of a *Hepatozoon* species in stray cats from a feline colony in North-eastern Spain. The Veterinary Journal. 177(1):134-135

Perez R.R., Rubini A.S & O'Dwyer L.H. 2004. The first report of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) in domestic cats from São Paulo state, Brazil. Parasitol. Res. 94:83-85

Rich L.J. & Coles E.H. 1995. Tables of abnormal values as a guide to disease syndroms. In: Ettinger S.J., Feldman E.C. Textbook of Veterinary Internal Medicine, 4th ed. W.B. Saunders, Philadelphia. p. 14

Rubini A.S., Paduan K.S., Perez R.R., Ribolla P.E.M., O'Dwyer L.H. 2006. Molecular characterization of feline *Hepatozoon* species from Brazil. Veterinary Parasitology. 137(1-2):168-171

Rubini, A.S., Paduan, K.S., Martins, T.F., Labruna, M.B., O'Dwyer, L.H. 2009. Acquisition and transmission of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) by the tick *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae). Veterinary Parasitology. 164:324-327

Salakij C., Salakij J., Narkkong N. & Sirinarumitr T. 2008. Hematologic, cytochemical, ultrastructural and molecular findings of *Hepatozoon*-infected flat-headed cats (*Prionailurus planiceps*). *Veterinary Clinical Pathology*. 37(1):31-41

Sasaki M., Omobowale O., Ohta K., Tozuka M., Matsuu A., Hirata H., Nottidge H.O., Ikadai H. & Oyamada T. 2008. A PCR-Based epidemiological survey of *Hepatozoon canis* in dogs in Nigeria. *Vet. Med. Sci.* 70(7):743-745

Shaw S.E., Day M.J., Birtles R.J. & Breitschwerdt E.B. 2001. Tick-Born infectious diseases of dogs. *Trends in Parasitology*. 17(2):74-80

Smith T.G. 1996. The genus *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae). *J. Parasitol.* 82(4):565-585

Tabar M.D., Altet L., Francino O., Sánchez A., Ferrer L. & Roura X. 2008. Vector-Borne infections in cats: Molecular study in Barcelona área (Spain). *Veterinary Parasitology*. 151(2-4):332-336

CAPÍTULO II

Relato de Caso: Infecção por *Hepatozoon canis* em um gato doméstico do Distrito Federal, Brasil

Zanani, N.S.; Camargos, L.R.; Martins, C.S.; Scalon, M.C.; Barbosa E.F.G.; De Assis, A. Z.; Reis Júnior, J.L.; Paludo, G.R.

Laboratório de Patologia Clínica e Laboratório de Microbiologia e Patologia Molecular da Universidade de Brasília (UnB)

RESUMO

Gato macho, SRD, 2 anos foi admitido no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília (UnB) apresentando hiporexia, emaciação, secreção ocular purulenta, polimialgia, polidipsia, xifose e infestação por carrapatos. Resultado do ultrassom revelou quadro sugestivo de degeneração renal. Após suspeita de Hepatozoonose foi realizado uma PCR que confirmou a presença da infecção. O teste RFLP-PCR realizado posteriormente confirmou a espécie do parasita como sendo *Hepatozoon canis*. Após tentativa de tratamento, não houve melhora clínica e optou-se por eutanásia. Após necropsia foi constatado presença de esquizonte do parasita no músculo esquelético, além de alterações como encefalite supurativa parasitária, glomerulonefrite membranoproliferativa e miosite piogranulomatosa multifocalfocal.

ABSTRACT

Male cat, SRD, 2 years was admitted to the Veterinary Hospital of the University of Brasília (UNB) showing decreased appetite, emaciation, purulent eye discharge, polymyalgia, polydipsia, xifose and tick infestation. Results of the ultrasound showed suggestive of renal degeneration. After one suspected hepatozoonosis PCR confirmed the presence of infection was performed. The RFLP-PCR test performed later confirmed parasite species as *Hepatozoon canis*. After the treatment trial, there was no clinical improvement and we opted for euthanasia. After necropsy was found squizontes presence of the parasite in the skeletal muscle, in addition to changes such as parasitic suppurative encephalitis, myositis and membranoproliferative glomerulonephritis multifocalfocal pyogranulomatous.

RELATO DE CASO

Gato macho, SRD, adulto, pesando 2,935 Kg foi atendido no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília apresentando hiporexia, emaciação, além de prurido na região ocular, conjuntivas hiperêmicas, presença de secreção ocular purulenta bilateral, polidipsia, xifose e infestação por carrapatos.

Durante exame físico foi observado apatia, caquexia, mucosas levemente hipocoradas, discreta polimialgia e rins diminuídos de tamanho à palpação. Foi coletado sangue e urina para realização de hemograma, bioquímicos e urinálise no Laboratório de Patologia Clínica da Universidade de Brasília.

Os resultados hematológicos revelaram ausência de anemia, discreta neutrofilia $12.798 \times 10^3/\mu\text{l}$ ($2.500\text{--}12.500 \times 10^3/\mu\text{l}$), trombocitose $877.000 \times 10^3/\mu\text{l}$ ($200.000\text{--}500.000 \times 10^3/\mu\text{l}$) e presença de gametócitos de *Hepatozoon* sp. durante observação do esfregaço sanguíneo (Figura 2). O perfil bioquímico revelou elevação dos níveis de uréia 56mg/dl (10–20mg/dl) e hipoalbuminemia 1,6g/dl (2,6–3,3g/dl).

Foi coletada urina para análise por cistocentese. A urinálise revelou densidade acima de 1.040, pH 6, proteinúria leve (30 mg/dl) e hematúria com presença de hemácias incontáveis no sedimento.

Após exames físico e laboratoriais foi prescrito acetato de retinol, prednisolona e cloridrato de tramadol.

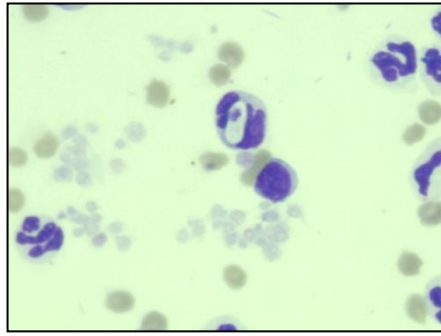


Figura 2. Gametócito do *Hepatozoon canis* encontrado em neutrófilo durante exame do esfregaço sanguíneo.

Na semana seguinte, o animal retornou ao Hospital para a realização de ultrasonografia abdominal, que revelou contorno renal irregular, com ecotextura alterada e presença de áreas hiperecóticas, formando um padrão em mosaico, além de relação cortico medular alterada, pelve preservada, quadro sugestivo de degeneração renal. O tratamento prescrito anteriormente foi mantido.

Após 15 dias houve piora no quadro clínico. O animal não conseguia se levantar, houve piora da conjuntivite além de poliamialgia generalizada, secreção purulenta e seborreica nos condutos auditivos e lesões de pele eritematosas generalizadas. Outro hemograma e alguns bioquímicos foram realizados. O hemograma revelou novamente ausência de anemia, porém presença de leucocitose $20.400 \times 10^3/\mu\text{l}$ ($5.500-19.500 \times 10^3/\mu\text{l}$), neutrofilia $18.360 \times 10^3/\mu\text{l}$ ($2.500-12.500 \times 10^3/\mu\text{l}$) e trombocitose $650.000 \times 10^3/\mu\text{l}$ ($200.000-500.000 \times 10^3/\mu\text{l}$) com presença de macroplaquetas. Elevação dos níveis séricos de uréia 101mg/dl e hipopotassemia 3,36mEq/l puderam ser observados a partir da análise bioquímica do soro. Exames moleculares (PCR) foram solicitados para pesquisa de Toxoplasmose, FIV, FeLV, Rickettsias e *Hepatozoon* sp. Foi mantido o tratamento com cloridrato de tramadol 3mg/Kg, BID por quatro dias e prescrito azitromicina 2 - 15mg/Kg, SID por três dias, o qual resultou em discreta melhora da poliamialgia e leve aumento do apetite.

Tratamento nosocomial foi prescrito a seguir com dipropionato de imidocarb 5mg/Kg via subcutânea, doxiciclina 10mg/Kg por via oral, SID, por 15 dias e famotidina 0,5 mg/Kg via oral, SID até novas recomendações. Não houve melhora clínica após este tratamento e optou-se por eutanásia do animal.

No Laboratório de Microbiologia e Patologia Molecular da Universidade de Brasília a amostra de DNA foi extraída utilizando-se o kit comercial Illustra Blood genomicPrep Mini Spin kit, GE Healthcare®, Piscataway, NJ, seguindo as recomendações do fabricante. Para comprovação da qualidade da extração e da integridade do DNA obtido, foi realizada uma PCR para detectar a presença de um gene que codifica a enzima GAPDH, como descrito por Birkenheyer et al. em 2003.

As PCRs foram processadas e apenas a infecção por *Hepatozoon* spp. foi confirmada. Para esta PCR foram utilizados os oligonucleotídeos Hep-R e Hep F como descrito por Inokuma et al. em 2002 (Figura 3).

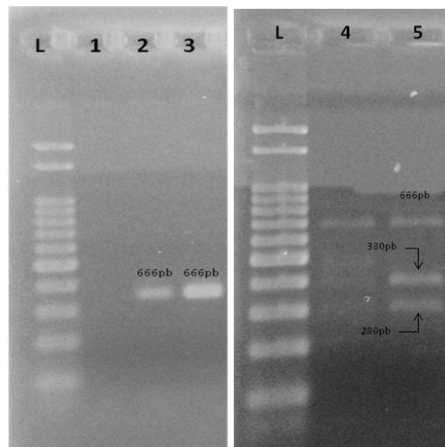


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio (0,01%). À esquerda: PCR para identificação do *Hepatozoon* sp.: L- marcador molecular de 100 pb; 1- controle negativo; 2- controle positivo; 3- amostra positiva para *Hepatozoon* sp.; À direita: RFLP-PCR para caracterização da espécie do parasita: 4- outra amostra positiva; 5- amostra positiva. Parte do DNA foi clivado pela enzima PstI, resultando fragmentos de 280 e 380 pb. Espécie reconhecida como *Hepatozoon canis*.

A fim de caracterizar a espécie do *Hepatozoon* sp. encontrado no animal foi realizada a técnica de RFLP-PCR (*Restriction fragment length polymorphism*

analysis), utilizando os oligonucleotídeos Hep-1 e Hep-4 como descrito por Criado-Fornélio et al. em 2007, e a enzima de restrição *Pst*I. O resultado deste exame molecular confirmou a infecção pelo *Hepatozoon canis*.

Após eutanásia o corpo do animal foi encaminhado ao Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade de Brasília onde foi necropsiado. Fragmentos de córtex frontal, rim, intestino grosso, músculo esquelético, pulmão, intestino delgado, fígado, adrenal, tireóide, baço, cerebelo, estômago, esôfago, medula óssea e coração foram coletados, fixados em formol tamponado 10%, seccionados, acondicionados em cassetes e encaminhados para processamento histopatológico rotineiro em hematoxilina e eosina.

Foram emblocados em parafina, microtomizados, pescados em banho-maria (30°C), colocados para retirar excesso de parafina, seguindo para hidratação (bateria xilol e álcool crescente), coloração em hematoxilina e posteriormente em eosina. Seguindo para desidratação e montagem final da lâmina.

A análise das lâminas em microscopia de luz revelou encefalite supurativa parasitária, miosite piogranulomatosa multifocal crônica severa com presença de estruturas compatíveis com esquizontes de *Hepatozoon* sp. e glomerulonefrite membranoproliferativa multifocal a coalescente. Outras alterações como atelectasia, enfisema multifocal moderado, degeneração vacuolar difusa e congestão moderada no fígado, enterite linfocítica focalmente extensa e hemorragia multifocal discreta no miocárdio foram observadas. Os outros fragmentos não apresentaram alterações dignas de nota. As principais alterações estão demonstradas na Figura 4.

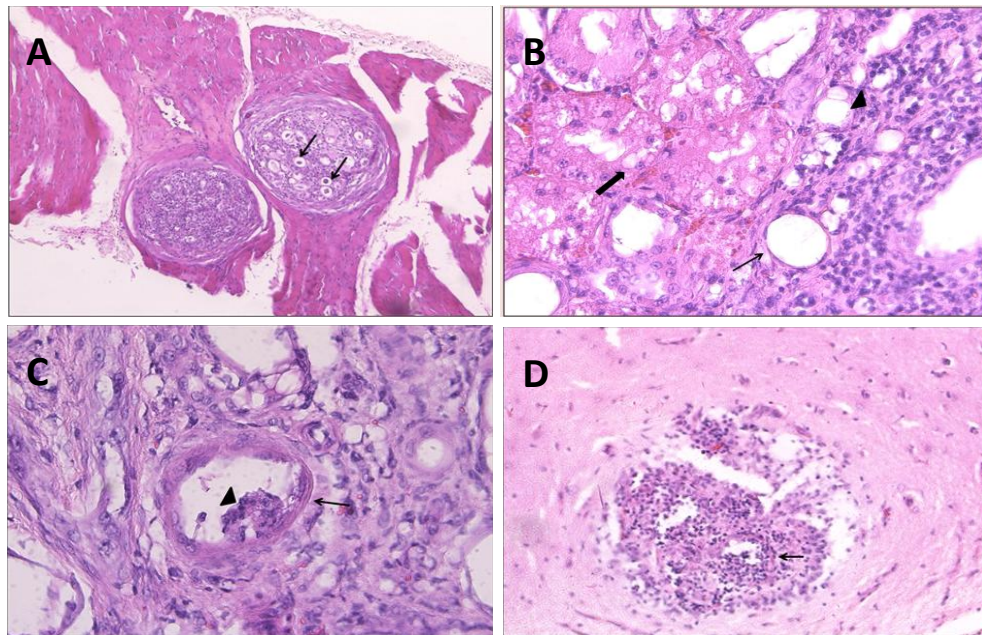


Figura 4. Alterações encontradas em cortes histopatológicos. A) Esquizonte de *Hepatozoon canis* (seta) em músculo estriado esquelético (40x); B) Rim com infiltrado inflamatório e fibrose (cabeça de seta), dilatação do túbulo (seta fina) e degeneração do epitélio tubular (seta grossa)(400x); C) Rim com glomerulonefrite membranoproliferativa (seta) com atrofia glomerular (cabeça de seta)(400x); D) Córtex cerebral com vasculite linfoplasmocítica necrotizante (100x).

DISCUSSÃO

A infecção pelo *Hepatozoon* sp. já foi relatada anteriormente em gatos domésticos no Brasil. Em 2004, Perez et al. diagnosticaram 3 felinos com a doença, assim como Rubini et al. em 2006. O método de diagnóstico da infecção variou entre os autores. Perez et al. (2004) utilizou método de pesquisa de gametócitos em esfregaço sanguíneo. Já outros autores extraíram DNA de amostras de sangue para realização da PCR (Rubini et al. 2006, De Bortoli et al. 2011). O animal do presente estudo teve gametócitos encontrados em esfregaços sanguíneos e foi positivo para infecção pelo *Hepatozoon* sp. na PCR.

O animal relatado era macho, morava na rua antes de ser resgatado e estava infestado por carrapatos. O livre acesso à rua foi discutido por Baneth et al. em 1998^a, que explicaram a razão da maior predisposição à infecção dos machos em relação às fêmeas. Estes afirmaram que gatos machos tendem a se envolver em brigas territoriais, o que aumenta a exposição deste grupo de animais ao vetor felino da doença e a predisposição a infecções imunossupressoras como FIV ou FeLV, que agravam a manifestação da Hepatozoonose.

Os sinais clínicos como hiporexia, letargia, febre, secreção ocular e polidipsia, apresentados pelo animal no momento da anamnese já foram descritos em outros gatos com a doença desde a descoberta deste parasita. Contudo, outros sinais observados devem ser destacados, como por exemplo, edema de membros torácicos e pélvicos, ataxia e sinais respiratórios. Problemas respiratórios foram observados também por Baneth et al. (1998a) e Ortuño et al. (2008). A ataxia também foi descrita anteriormente por East et al. em 2008, porém não parece ser

uma manifestação comum da doença. A polimialgia, a xifose e a relutância em se movimentar podem ser explicadas pela lesão muscular que o parasita provoca, similar ao observado em cães com *Hepatozoon americanum* já descrito por Baneth et al. em 2003.

As alterações hematológicas apresentadas pelo animal durante a internação e tratamento foram leucocitose por neutrofilia e trombocitose com presença de macroplaquetas. Essa leucocitose por neutrofilia pode ser explicada pelo processo inflamatório decorrente da multiplicação dos esquizontes do parasita no músculo esquelético, semelhante ao encontrado em cães por Panciera et al. (1999).

As alterações morfológicas descritas no exame histopatológico do parênquima renal confirmaram o quadro de doença renal, justificado pela perda estrutural observada no exame ultrassonográfico dos rins, a elevação sérica da uréia, a proteinúria e hematuria encontradas na urinálise. A elevação da concentração sérica de uréia pode ser explicada também pelo aumento do catabolismo protéico, devido a caquexia apresentada pelo animal. Em contrapartida os níveis séricos de creatinina não se elevaram, uma vez que no organismo esta é excretada por mais de uma via nos túbulos renais, tornando mais difícil seu acúmulo no sangue (Eimegh Hart 2005).

Outros relatos descrevem elevados níveis de uréia e a creatinina em animais positivos para infecção pelo *Hepatozoon* sp. Perez et al. (2004) associaram a insuficiência renal encontrada em um dos animais com a hepatozoonose, já Baneth et al. (1998a) descreveu a alteração renal como doença concomitante e não como consequência da infecção pelo *Hepatozoon* sp.

A hipoalbuminemia pode ser reflexo da inanição, que de acordo com Thrall et al. (2006) leva ao menor aporte de aminoácidos e, conseqüentemente, diminuição na síntese hepática de albumina. Além disso, a albumina é uma proteína de fase

aguda negativa e um processo infeccioso ou inflamatório agudo, levaria a uma redução dos seus teores séricos (Cerón, Eckersall e Martínez-Subiela 2005).

De acordo com Thrall et al. (2006) a doença glomerular também pode resultar em hipoalbuminemia pela perda dessa proteína através das membranas glomerulares lesadas. O animal estudado apresentava proteinúria, o que indica lesão glomerular, fornecendo assim outra explicação para a hipoalbuminemia acusada nos exames bioquímicos.

Após testes moleculares com digestão enzimática foi confirmada a infecção pela espécie *Hepatozoon canis*, assim como Criado-Fornélio et al. (2007) que encontraram a mesma espécie em cães na Venezuela e na Tailândia. Rubini et al. em 2006 também confirmaram a presença dessa espécie do parasita em gatos no Brasil, porém utilizando o método de seqüenciamento do DNA. Criado-Fornélio et al. (2009) utilizaram o método de PCR real time e encontraram a espécie em gatos na França.

Durante análises histopatológicas, esquizontes do parasita foram encontrados em tecido muscular esquelético do animal estudado. Essas alterações histológicas justificam a sintomatologia muscular apresentada pelo animal, uma vez que estas lesões resultam em inflamação e necrose do tecido, tendo como consequência a polimialgia e a relutância em se movimentar. Outros trabalhos mostram presença deste esquizonte em capilares do tecido muscular cardíaco (Nobel, Neumann e Klopfer 1974; Klopfer, Nobel e Neumann 1973).

CONCLUSÃO

Hepatozoon canis foi encontrado infectando um gato doméstico no Distrito Federal, Brasil. O diagnóstico foi confirmado usando o método PCR e RFLP-PCR, que confirmou a espécie do parasita. Este estudo chamou a atenção para a importância de incluir a Hepatozoonose como diagnóstico diferencial de doenças renais e musculoesqueléticas em gatos, já que o parasita causa danos principalmente nesses tecidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baneth G., Aroch I., Tal N. & Harrus S. 1998a. *Hepatozoon* species infection in domestic cats: A retrospective study. *Vet. Parasit.* 79:123-133
- Baneth, G., Shkap, V., 2003. Monozoic cysts of *Hepatozoon canis*. *J. Parasitol.* 89, 379-381
- Birkenheuer AJ, et al., 2003 Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* in canine blood samples. *J. Clin. Microbiol.* 41:4172-4177
- Cerón, J.J., Echersall, P.D., Martínez-Subiela, S. 2005. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Veterinary Clinical Pathology.* 34(2):85-98
- Criado-Fornélio A., Rey-Valerion C., Buling A., Barba-Carretero J.C., Jefferies R. & Irwin P. 2007a. New advances in a molecular epizootiology of canine hematic protozoa from Venezuela, Thailand and Spain. *Vet. Parasit.* 144:261-269
- Criado-Fornélio A., Buling A., Pingret, J.L., Etievant M., Boucraut-Baralon C., Alongi A., Agnone A. & Torina A. 2009b. Hemoprotozoa of domestic animals in France: Prevalence and molecular characterization. *Vet. Parasit.* 159:73-76
- De Bortoli, C.P., André M.R., Braga M.S.C. & Machado R.Z. 2011. Molecular characterization of *Hepatozoon sp* in cats from São Luis Island, Maranhão, Northeastern Brazil. *Parasitol. Res.* 109:1189-1192

East ML, et al., 2008 A Hepatozoon species genetically distinct from *H. canis* infecting spotted hyenas in the Serengueti ecosystem, Tanzânia. *Journal of Wildlife Disease*. 44(1)

Emeigh Hart, S.G. 2005. Assessment of renal injury in vivo. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 52:30-45

Inokuma H, et al., 2002 Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a Hepatozoon detected in two Japanese dogs. *Veterinary Parasitology*. 106:265-271

Klopfer, U., Nobel, T.A. and Neumann, F. 1973. Hepatozoon-like parasite (schizonts) in the myocardium of domestic cat. *Vet. Path.* 10:185-190

Lassem E.D. 2006. Avaliação Laboratorial das Proteínas do Plasma e do Soro Sanguíneo. In: 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. cap. 26, p. 376-387, São Paulo

Fettman MJ, Rebar A. 2006. Laboratory Evaluation of Renal Function. In: Thrall MA, et al. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. 1 ed. cap. 21 p. 301-328, São Paulo

Nobel, T.A., Neumann, F., Klopfer, U. 1974. Histopathology of the myocardium in 50 apparently health cats. *Laboratory Animals*. 8: 119-125

Ortuño A., Castella J., Criado-Fornélio A., Buling A. & Barba-Carretero J.C. 2008. Molecular detection of a *Hepatozoon* species in stray cats from a feline colony in North-eastern Spain. *The Veterinary Journal*. 177(1):134-135

Pancier, R.J., Ewing, S.A., Mathew, J.S., Cummings, C.A., Kocan, A.A., Breshears, M.A., Fox, J.C. 1998. Observations on tissue stages of *Hepatozoon americanum* in 19 naturally infected dogs. *Vet. Parasitol.* 78: 265-276

Perez R.R., Rubini A.S & O'Dwyer L.H. 2004. The first report of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) in domestic cats from São Paulo state, Brazil. *Parasitol. Res.* 94:83-85

Rubini A.S., Paduan K.S., Perez R.R., Ribolla P.E.M., O'Dwyer L.H. 2006. Molecular characterization of feline *Hepatozoon* species from Brazil. *Veterinary Parasitology.* 137(1-2):168-171