CAMILA DOMINGUES DE OLIVEIRA

**Avaliação das subpopulações de linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺ e
da razão TCD4⁺ : TCD8⁺ na pré, trans e pós terapia
em cães com demodicidose generalizada**

São Paulo

2010

CAMILA DOMINGUES DE OLIVEIRA

Avaliação das subpopulações de linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺ e da razão TCD4⁺ : TCD8⁺
na pré, trans e pós terapia em cães com demodicidose generalizada

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Clínica Veterinária da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Departamento:

Clínica Médica

Área de Concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson

São Paulo

2010

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2281
FMVZ

Oliveira, Camila Domingues de
Avaliação das subpopulações de linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺ e da razão TCD4⁺ : TCD8⁺
na pré, trans e pós terapia em cães com demodicose generalizada / Camila
Domingues de Oliveira. -- 2010.
104 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson.

1. Cães. 2. Sarna demodécica animal. 3. Linfócitos T. 4. Citometria fluxo. I.
Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação das subpopulações de linfócitos TCD4+, TCD8+ e da razão TCD4+/TCD8+ na trans e pós terapia de cães com demodicidose generalizada", protocolado sob o nº1255/2007, utilizando 40 (quarenta) cães, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião da referida Comissão do dia 12 de dezembro de 2007.

We certify that the Research "Evaluation of lymphocytes subpopulation TCD4+, TCD8+ and ratio TCD4+/TCD8+ during and after therapy in dogs with generalized demodicidosis", protocol number 1255/2007, utilizing 40 (forty) dogs, under the responsibility Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 12/12/2007.

São Paulo, 14 de dezembro de 2007

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

HOSPITAL VETERINÁRIO

Ao Ilmo. Sr.

Prof. Dr. **Carlos Eduardo Larsson**

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto "Avaliação das subpopulações de linfócitos TCD4+, TCD8+ e da razão CD4+/CD8+", sob a sua responsabilidade, previamente aprovado pela Comissão de Bioética dessa Faculdade, foi analisado e atende as normas da Comissão de Ética desse Hospital, que acompanhará administrativamente sua execução.

Substituição do responsável, inserção de novos colaboradores e mudanças na metodologia proposta deverão ser imediatamente comunicados a esta Comissão, assim como as datas de suspensão ou término do projeto.

São Paulo, 05 de maio de 2008.

Prof. Dr. **Idércio Luiz Sinhorini**

Presidente da Comissão de Ética do HOVET - FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: OLIVEIRA, Camila Domingues

Título: Avaliação das subpopulações de linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺ e da razão TCD4⁺:TCD8⁺ na pré, trans e pós terapia em cães com demodicidose generalizada

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIAS

Ao meu Deus, pelo presente maior que é a vida, que me ama com amor eterno, que me abençoa e alarga-me as fronteiras, cuja mão é comigo e que me preserva do mal (I Livro de Crônicas 4:9)

Aos meus pais, José Antônio e Zulmira, como forma de agradecimento e reconhecimento, por todo amor, apoio e dedicação, e ao meu amado Douglas, que renovou a minha vida, que me faz feliz a cada novo dia. Amo vocês!

Ao querido prof. Larsson, o meu muito obrigado, pela confiança, oportunidade e todos os ensinamentos, por ter me inspirado a seguir a “especialidades das especialidades”: a dermatologia veterinária. Obrigado por ser uma constante fonte de inspiração e exemplo profissional. Me sinto honrada em poder fazer parte do “time” dos Larssons.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e ao Departamento de Clínica Médica, pela aceitação no Programa de Pós-graduação em Clínica Veterinária.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo suporte financeiro, através da concessão de Auxílio Pesquisa (processo: 2007/ 58607-7) e bolsa de mestrado (processo: 2007/ 56881-4), que permitiram o desenvolvimento deste projeto.

À professora Dra. Maristela Martins de Camargo pela amizade e fundamental colaboração no desenvolvimento deste projeto, bem como pela disponibilização do Laboratório de Imunoregulação Molecular, no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Ao querido professor Marconi Rodrigues de Farias, pelas valiosas sugestões na elaboração da dissertação.

À todos os professores do Departamento de Clínica Médica da FMVZ/USP, especialmente aos mestres Profa. Dra. Alice M.M. P. Della Libera, Prof. Dr. Fernando José Benesi, Profa. Dra. Mitika K. Hagiwara, Prof. Dr. Eduardo H. Birgel Junior, pela transmissão de valiosos ensinamentos que auxiliaram na elaboração desta dissertação.

À Agener União Saúde Animal, pelo apoio no desenvolvimento deste projeto.

Aos proprietários e aos pacientes que possibilitaram a realização deste trabalho.

Aos animais, que sempre me cativaram de uma forma especial, e motivaram a escolha desta nobre carreira.

Às médicas veterinárias do HOVET/USP: Bruna, Denise, Khadine, Paulinha, Vera e ao médico veterinário Guilherme, pelo encaminhamento dos casos e auxílio clínico.

Às técnicas do Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica da FMVZ/USP: Carmen, Clara, Cláudia, Creide, Dinda Marli, Maria Helena e Maria Luisa, pela colaboração nos exames laboratoriais.

Aos funcionários do HOVET/USP, principalmente, Antônio C. Malaquias (Toninho), Carlos (Carlito) e Geraldo N Tezzi, pelo auxílio na coleta das amostras.

À Adelaide Borges, secretária do programa de Pós-graduação do Departamento de Clínica Médica da FMVZ/USP, pela sua constante ajuda e pela sua linda cachorrinha Amy, participante do projeto de pesquisa.

Aos amigos da FMVZ/USP, que fizeram esta jornada muito mais alegre: Ângela, Arine, Cynthia, Cláudio, Daniela, Danielle, Fernando, Gustavo, Luis, Priscila, Simoni, Tio Chico. Sentirei saudades!

À bibliotecária Elza Faquim, pela revisão da dissertação e úteis sugestões.

A todos os meus familiares, em especial minha irmã Dani, e também aos meus amigos, pelo apoio, torcida e compreensão dos momentos de ausência.

RESUMO

OLIVEIRA, C. D. **Avaliação das subpopulações de linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺ e da razão TCD4⁺:TCD8⁺ na pré, trans e pós terapia em cães com demodicidose generalizada.** [Evaluation of CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes count and CD4⁺:CD8⁺ ratio throughout treatment in dogs with generalized demodicosis]. 2010. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A demodicidose é uma importante dermatopatia parasitária em cães. É decorrente da proliferação excessiva de ácaros comensais do gênero *Demodex* sp no tegumento canino. A manifestação clínica da demodicidose juvenil generalizada têm sido associada à disfunção imune hereditária de linfócitos T específica ao parasita, enquanto que, a demodicidose do adulto pode ser consequente a doenças imunossupressoras. A resposta imune celular é considerada crucial na defesa contra o parasita e, encontra-se comprometida em cães com demodicidose. Com o escôpo de se determinar se linfócitos sanguíneos periféricos, TCD4⁺, TCD8⁺ e a razão TCD4⁺:TCD8⁺ são bons indicadores da evolução clínica da doença e do estado imune de cães demodicidose generalizada, tais parâmetros foram quantificados em 16 animais com demodicidose generalizada, na pré, trans e pós terapia, e em outros 30 animais hígidos, utilizando-se da técnica de citometria de fluxo. Para as análises estatísticas comparativas, foram padronizados quatro momentos de observação dos animais com demodicidose, a saber: primeira consulta: quando do estabelecimento do diagnóstico; segunda consulta; consulta de obtenção do primeiro exame parasitológico negativo e, finalmente, naquela de estabelecimento da alta clínica, preconizada quando da ausência de evidenciação do ácaro no exame parasitológico cutâneo, por três consultas consecutivas. Os valores absolutos médios de linfócitos totais, linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ nos animais com demodicidose, mostraram-se inferiores àqueles do Grupo Controle em todos os momentos de observação. Somente os valores absolutos de linfócitos TCD4⁺, apresentaram diminuição significativa, em relação ao Grupo Controle, no momento da primeira consulta. Entre o Grupo Experimental, foi observado elevação significativa entre os valores absolutos dos linfócitos totais, TCD4⁺ e TCD8⁺, entre a primeira consulta e aquela de obtenção do primeiro exame parasitológico negativo, quando estes valores se

aproximaram daqueles observados no Grupo Controle. Paralelamente, evidenciou-se alta correlação da elevação dos número absoluto médio dos linfócitos TCD4+ e TCD8+, com a diminuição da contagem de ácaros. A razão TCD4+:TCD8+, não diferiu significativamente entre o Grupo Controle e Experimental. O tratamento da demodicidose não alterou a razão TCD4+: TCD8+. Não foi observado correlação entre o período necessário para o estabelecimento da alta clínica e a razão TCD4+:TCD8+. O comportamento dos linfócitos sanguíneos periféricos TCD4+, TCD8+, e da razão TCD4+:TCD8+, demonstra que a participação de outros mecanismos, que não a franca alteração destas subpopulações, sejam importantes na patogenia da doença. Em linhas gerais, não foram observadas diferenças significativas, nos valores dos linfócitos TCD4+, TCD8+ e a razão TCD4+:TCD8+, entre os animais do Grupo Controle, e os animais com demodicidose generalizada , de forma que, o uso da determinação destes parâmetros, é desaconselhado no monitoramento da evolução clínica e no estabelecimento do prognóstico, nos animais com demodicidose generalizada.

Palavras-chave: Cães. Sarna demodécica animal. Linfócitos T. Citometria de fluxo.

ABSTRACT

OLIVEIRA, C. D. **Evaluation of CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes count and CD4⁺:CD8⁺ ratio throughout treatment in dogs with generalized demodicosis.** [Avaliação das subpopulações de linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺, e da razão TCD4⁺:TCD8⁺ na pré, trans e pós terapia em cães com demodicidose generalizada]. 2010. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Demodicosis is a serious canine parasitic skin disease. It is caused by the presence of increased amounts of *Demodex* mite in the skin. Clinical signs of juvenile-onset generalized demodicosis are associated with specific hereditary dysfunction of T lymphocytes while adult-onset can be induced by immunosuppressive diseases. The cellular immunity is crucial in keeping low numbers of skin mites and it is depressed in dogs with generalized demodicosis. The aim of this study was to verify whether CD4⁺, CD8⁺ T-lymphocytes counts and CD4⁺:CD8⁺ ratio could be good indicators of disease progression and immune status in canine demodicosis. For this, using the flow cytometry technique, the CD4⁺, CD8⁺ T-lymphocytes counts and CD4⁺:CD8⁺ ratio of 16 dogs with generalized demodicosis were evaluated at four moments: first and second consultation, first time animal was presented without mites in skin scrapings and finally, on clinical improvement. These values were then compared with those of 30 controls healthy dogs. The absolute numbers of CD4⁺, CD8⁺ and total lymphocytes were lower than control healthy dogs at all moments of analysis. Only at the first consultation CD4⁺ lymphocyte counts was significantly lower than control group. Dogs with generalized demodicosis had significant increased counts of CD4⁺, CD8⁺ and total lymphocytes from the first consultation until the first negative skin scraping. At this point lymphocyte counts reached levels closest to control group ones. CD4 : CD8⁺ ratio didn't differ throughout treatment of canine demodicosis neither when average level for ill dogs were compared to with those healthy ones. Furthermore CD4⁺, CD8⁺ and CD4:CD8⁺ ratio didn't correlated with time taken for successful treatment completion and so they couldn't be used as prognosis predictor. A high correlation between increased of CD4⁺, CD8⁺ T-lymphocytes counts and decreased mites counts was observed in dogs with generalized demodicosis. Circulating lymphocyte subpopulations are therefore similar in dogs with canine demodicosis and healthy dogs and there is no correlation

between clinical status or response to therapy and the lymphocytes subpopulations counts. We can then conclude that CD4+, CD8+ T-lymphocytes counts and CD4+:CD8+ ratio cannot be used as parameters to predict progression of an individual patient in a clinical context.

Key words: Dogs. Animal demodectic mange. T Lymphocytes. Flow Cytometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Animal com sarna demodécica generalizada e piodermite superficial. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010.....	55
Figura 2 -	Animal com sarna demodécica generalizada e piodermite profunda. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010.....	56
Figura 3 -	Células mononucleares do sangue periférico pela citometria de fluxo. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010.....	60
Figura 4 -	Quantificação dos linfócitos sanguíneos periféricos TCD4+, TCD8+. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010.....	60

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Distribuição (%) dos espécimes caninos com perfeita definição racial, acometidos por demodicidose generalizada. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010.....	54
Gráfico 2 -	Valores absolutos médios, variação mínima e máxima dos linfócitos totais, dos animais do Grupo Controle e nas quatro consultas de avaliação pré-estabelecidas dos cães com demodicidose generalizada. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010.....	61
Gráfico 3 -	Valores relativos médios, variação mínima e máxima dos linfócitos totais, dos animais do Grupo Controle e nas quatro consultas de avaliação pré-estabelecidas dos cães com demodicidose generalizada. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010.....	61
Gráfico 4 -	Valores absolutos médios, variação mínima e máxima dos linfócitos TCD4 ⁺ , dos animais do Grupo Controle e nas quatro consultas de avaliação pré-estabelecidas dos cães com demodicidose generalizada. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010.....	62
Gráfico 5 -	Valores relativos médios, variação mínima e máxima dos linfócitos TCD4 ⁺ , dos animais do Grupo Controle e nas quatro consultas de avaliação pré-estabelecidas dos cães com demodicidose generalizada. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010.....	63
Gráfico 6 -	Valores absolutos médios, variação mínima e máxima dos linfócitos TCD8 ⁺ , dos animais do Grupo Controle e nas quatro consultas de avaliação pré-estabelecidas dos cães com demodicidose generalizada. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010.....	64
Gráfico 7 -	Valores relativos médios, variação mínima e máxima dos linfócitos TCD8 ⁺ , dos animais do Grupo Controle e nas quatro consultas de avaliação pré-estabelecidas dos cães com demodicidose generalizada. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010.....	64
Gráfico 8 -	Valores absolutos médios, variação mínima e máxima, da razão entre os linfócitos TCD4 ⁺ : TCD8 ⁺ , dos animais do Grupo Controle e nas quatro consultas de avaliação pré-estabelecidas do Grupo Experimental. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010.....	65

Gráfico 9 -	Evolução dos valores absolutos dos linfócitos TCD4+, TCD8+, e da contagem total de ácaros, do momento do diagnóstico até a alta clínica, dos animais com demodicidose generalizada. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010.....	66
-------------	---	----

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 - Animais com demodicidose generalizada constituintes do Grupo Experimental, atendidos no Serviço de Dermatologia do VCM e do HOVET/USP, segundo os dados de identificação, do manto piloso diagnóstico e evolução do quadro clínico. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010..... 52
- Quadro 2 - Animais hígidos constituintes do Grupo Controle, segundo os dados de identificação, de definição racial e sexual, de faixa etária, e da caracterização do manto piloso, reunidos no período de novembro de 2008 a dezembro de 2009. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010..... 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores absolutos e relativos médios, desvio-padrão, e variação máxima e mínima, dos linfócitos totais, linfócitos TCD4+, linfócitos TCD8+, e da razão TCD4+:TCD8+, dos animais do Grupo Controle e do Grupo Experimental, na primeira e segunda consulta, consulta de obtenção do primeiro exame parasitológico negativo e naquela do estabelecimento da alta clínica. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010.....	59
Tabela 2 -	Correlação entre a contagem de ácaros observada na primeira consulta dos animais com demodicidose generalizada, e os valores absolutos e relativos dos linfócitos TCD4+, TCD8+, e da razão TCD4+:TCD8+. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010.....	66
Tabela 3 -	Cálculo de regressão linear entre os linfócitos TCD4+, TCD8+, e da razão TCD4+:TCD8+, observados na primeira consulta dos animais com demodicidose generalizada, em relação as semanas necessárias para o estabelecimento da alta clínica. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010.....	67
Tabela 4 -	Cálculo de regressão linear entre os linfócitos TCD4+, TCD8+, e da razão TCD4+:TCD8+, observados na última consulta dos animais com demodicidose generalizada, em relação as semanas necessárias para o estabelecimento da alta clínica. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010.....	67

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A -	Animais com demodicidose, excluídos do projeto, segundo os dados de identificação, manto piloso, diagnóstico e motivo da exclusão. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010.....	87
APÊNDICE B -	Valores individualizados do hemograma e da contagem de plaquetas dos animais com demodicidose generalizada, observados na primeira consulta. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010.....	88
APÊNDICE C -	Valores individualizados do hemograma e da contagem de plaquetas, dos animais com demodicidose generalizada, observados na segunda consulta. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010.....	89
APÊNDICE D -	Valores individualizados do hemograma e da contagem de plaquetas dos animais com demodicidose generalizada, observados na consulta de obtenção do primeiro exame parasitológico de raspado cutâneo negativo. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010.....	90
APÊNDICE E -	Valores individualizados do hemograma e da contagem de plaquetas dos animais com demodicidose generalizada, observados na consulta de estabelecimento da alta clínica. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010.....	91
APÊNDICE F -	Valores individualizados da bioquímica sérica dos animais com demodicidose generalizada. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010.....	92
APÊNDICE G -	Dados individualizados dos parâmetros físicos das amostras de urina dos animais com demodicidose generalizada. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010	93
APÊNDICE H -	Dados individualizados dos parâmetros químicos das amostras de urina dos animais com demodicidose generalizada. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010	94
APÊNDICE I -	Dados individualizados do sedimento urinário das amostras de urina dos animais com demodicidose generalizada. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010	95
APÊNDICE J -	Valores individualizados do exame coproparasitológico dos animais com demodicidose generalizada. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010.....	96
APÊNDICE K -	Valores individualizados do hemograma e da contagem de	

	plaquetas, dos animais hígidos constituintes do Grupo Controle. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010.....	97
APÊNDICE L -	Valores individualizados da bioquímica sérica dos animais hígidos constituintes do Grupo Controle. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010.....	98
APÊNDICE M -	Valores individualizados do leucograma e da quantificação dos linfócitos sanguíneos periféricos TCD4+, TCD8+ e da razão TCD4+:TCD8+ dos animais hígidos, constituintes do Grupo Controle. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010.....	99
APÊNDICE N -	Valores individualizados do leucograma e da quantificação dos linfócitos sanguíneos periféricos TCD4+, TCD8+ e da razão TCD4+:TCD8+, observados na primeira consulta dos animais do Grupo Experimental. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010.....	101
APÊNDICE O -	Valores individualizados do leucograma e da quantificação dos linfócitos sanguíneos periféricos TCD4+, TCD8+ e da razão TCD4+ : TCD8+, observados na segunda consulta dos animais do Grupo Experimental. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010.....	102
APÊNDICE P -	Valores individualizados do leucograma e da quantificação dos linfócitos sanguíneos periféricos TCD4+, TCD8+ e da razão TCD4+ : TCD8+, observados na consulta de obtenção do primeiro exame parasitológico negativo dos animais do Grupo Experimental. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010.....	103
APÊNDICE Q -	Valores individualizados do leucograma e da quantificação dos linfócitos sanguíneos periféricos TCD4+, TCD8+ e da razão TCD4+ : TCD8+, observados na consulta de estabelecimento da alta clínica dos animais do Grupo Experimental. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Con A	Concanavalina A
FITC	Isoticianato de fluoresceína
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
HOVET	Hospital Veterinário
IL	Interleucina
IFN- γ	Interferon - gama
NK	Células Naturais “killers”
PE	Ficoeritrina
p.o	por via oral
“ <i>per os</i> ”	por via oral
PHA	Fito hemaglutinina
PWM	Extrato de “pokeweed”
SDL	Sarna demodécica localizada
SDG	Sarna demodécica generalizada
TCD4+	Linfócitos TCD4+
TCD8+	Linfócitos TCD8+
VCM	Departamento de Clínica Médica
TGF - β	Fator transformador de crescimento
TNF - α	Fator de necrose tumoral - alfa

LISTA DE SÍMBOLOS

+	Positivo
%	Valores relativos
N	Valores absolutos
>	Maior
<	Menor
=	Igual

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1 ETIOLOGIA	27
2.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E TERAPIA.....	28
2.3 IMUNOPATOGENIA.....	33
3 OBJETIVOS.....	42
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 AMOSTRAGEM	43
4.1.1 Grupo Controle	43
4.1.2 Grupo Experimental.....	44
4.2 EXAME PARASITOLÓGICO DE RASPADO CUTÂNEO	45
4.3 COLETA DE MATERIAL	45
4.4 AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA	45
4.5 BIOQUÍMICA SÉRICA.....	46
4.6 EXAME DE URINA.....	46
4.7 EXAME COPROPARASITOLÓGICO.....	47
4.8 IMUNOFENOTIPAGEM DE LINFÓCITOS SANGUÍNEOS PERIFÉRICOS	47
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
5 RESULTADOS.....	51
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRAGEM E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS ...	51
5.2 QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS SANGUÍNEOS PERIFÉRICOS.....	58
5.2.1 Valores absolutos de linfócitos totais	60
5.2.2 Valores relativos dos linfócitos totais.....	61
5.2.3 Valores absolutos dos linfócitos TCD4+.....	62
5.2.4 Valores relativos de linfócitos TCD4+	62
5.2.5 Valores absolutos dos linfócitos TCD8+	63
5.2.6 Valores relativos dos linfócitos TCD8+	64
5.2.7 Valores da razão entre os linfócitos TCD4+ : TCD8+	65
5.3 CORRELAÇÃO ENTRE A CONTAGEM DE ÁCAROS E OS VALORES ABSOLUTOS E RELATIVOS MÉDIOS DE LINFÓCITOS TCD4+, TCD8+, E DA RAZÃO TCD4+ : TCD8+	65
5.4 RELAÇÃO ENTRE A QUANTIFICAÇÃO DOS LINFÓCITOS SANGUÍNEOS PERIFÉRICOS ENTRE AS SEMANAS NECESSÁRIAS PARA O ESTABELECIMENTO DA ALTA CLÍNICA.	67
6 DISCUSSÃO	68
6.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRAGEM E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS ...	68

6.2 QUANTIFICAÇÃO DOS LINFÓCITOS SANGUÍNEOS PERIFÉRICOS.....	69
7 CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS.....	80
APÊNDICES.....	87

1 INTRODUÇÃO

A demodicidose é uma dermatopatia parasitária causada pela proliferação excessiva de ácaros comensais do gênero *Demodex* sp, que em condições normais, apresentam-se em número reduzido nos folículos pilosos do tegumento canino (SCOTT; MILLER JR.; GRIFFIN, 2001; GORTEL, 2006).

Clinicamente a demodicidose pode ser reconhecida, segundo a distribuição lesional sob duas formas, classificadas como localizada ou generalizada. Na forma localizada da doença, são evidenciadas poucas lesões, geralmente alopecias, eritematosas e descamativas. Esta é, habitualmente, considerada como benigna e tem involução espontânea em 90% dos casos. A forma generalizada, por sua vez, acomete extensas regiões corpóreas, atingindo graves proporções, sendo frequentemente acompanhada de infecção bacteriana secundária, necessitando de tratamento acaricida e antibiótico efetivo (LEMARIE, 1996; SCOTT; MILLER JR.; GRIFFIN, 2001; GORTEL, 2006).

A demodicidose pode, ainda, ser classificada, segundo a faixa etária de ocorrência, em juvenil ou do adulto. Nesta última, doenças sistêmicas concorrentes e/ou uso de drogas imunomoduladoras, têm sido incriminadas como fator predisponente na grande maioria dos casos (LEMARIE, 1996; SCOTT; MILLER JR.; GRIFFIN, 2001; GORTEL, 2006).

A razão da multiplicação excessiva da população acariana com a consequente manifestação do quadro clínico de demodicose ainda permanece desconhecida, no entanto, acredita-se, que esta ocorra em consequência de quadro geneticamente herdado, de disfunção linfocitária especificamente direcionada ao parasita (SCOTT; MILLER JR.; GRIFFIN, 2001).

A resposta imune celular, é crucial na defesa do organismo contra parasitas, e nos cães com sarna demodécica, encontra-se aparentemente comprometida (HEALEY; GAAFAR, 1977). Os linfócitos de cães com demodicidose, segundo os trabalhos e tratados compulsados, da década de 70 e 90, apresentam notável supressão nos testes de linfoblastogênese *in vitro*, quando estimulados com distintos mitógenos, sobretudo naqueles animais que manifestam a forma generalizada da doença (SCOTT; FARROW; SCHULTZ, 1974; SCOTT; BAKER; SCHULTZ, 1976; BARRIGA et al., 1992; PAULIK et al., 1996a,b; MOJZISOVÁ et al., 1999). A

resposta de hipersensibilidade tardia, frente ao teste intradérmico com os mesmos mitógenos, também, encontra-se diminuída (SCOTT; FARROW; SCHULTZ, 1974; HEALEY; GAAFAR, 1977).

Cães com demodicidose, parecem apresentar fator imunossupressivo, presente no soro, cuja natureza ainda é incerta. Linfócitos de cães enfermos retornam sua atividade normal no teste de linfoblastogênese *in vitro*, quando cultivados frente a soro de cães hígidos, ao mesmo tempo que, linfócitos de cães hígidos apresentam supressão quando cultivados com soro de animais doentes. Também, observa-se que o soro de animais em plena remissão clínica da doença, perdem a capacidade de eliciar supressão linfocitária (CORBETT et al., 1975; HIRSH et al., 1975; SCOTT; BAKER; SCHULTZ, 1976; MILLER, 1979).

Assim sendo, animais com sarna demodécica teriam uma alteração dos linfócitos T, que permitiria a excessiva proliferação acariana. Estes, quando em grande número, produziram ou induziriam, um fator imunossupressivo, capaz de acentuar a supressão dos linfócitos (SCOTT; MILLER JR.; GRIFFIN, 2001). A presença de infecção bacteriana, frequentemente associada aos casos de demodicidose generalizada parece, também, contribuir para a referida imunossupressão linfocitária (BARTA et al., 1983).

Estudos enfocando a expressão de citocinas em cães com demodicose, sugerem que haja polarização da resposta TH2, em detrimento da resposta TH1, fato que poderia estar, também, associado à patogenia da sarna demodécica (LEMARIE; HOROHOV, 1996; TANI et al., 2005).

Enquanto, a resposta imune cutânea aponta para um importante envolvimento dos linfócitos T citotóxicos no combate ao parasita (CASWELL et al., 1995; CASWELL et al., 1997; DAY, 1997), sistemicamente, o comportamento dos linfócitos sanguíneos periféricos ainda permanece incerto. Os poucos estudos realizados até hoje, congregaram um pequeno número de animais acometidos ou, metodologicamente, não incluíram o seguimento clínico até a consecução das altas clínica ou parasitológica. Afora isso, os resultados dispostos, em tais trabalhos, se mostraram divergentes, apontando tanto para o aumento quanto para a diminuição da razão entre os linfócitos TCD4+ e TCD8+ (BURKETT et al., 1996; CASWELL, et al., 1997; FUKATA et al., 2005). Por sua vez, estudos congêneres realizados em pacientes humanos com demodicose, demonstraram diminuição significativa dos

linfócitos TCD3+, TCD4+, TCD8+ e células naturais “killers” (NK), sugerindo que estas subpopulações poderiam ser alvo da imunomodulação eliciada pelo ácaro (AKILOV; KAZANCEVA; VLASOVA, 2001; AKILOV; MUNCUOGLU, 2003; AKILOV; MUNCUOGLU, 2004; EL-BASSIOUNI et al., 2005).

Os linfócitos T, suas subpopulações e citocinas, são cruciais na determinação da evolução das infecções parasitárias. Suas funções efetoras e regulatórias, resultam tanto em resposta protetora efetiva ou, até mesmo, em uma resposta evidentemente patológica, capaz de promover ou perpetuar a doença (SHER; COFFMAN, 1992). A quantificação de linfócitos TCD4+, TCD8+, e a determinação da razão entre eles é uma forma de avaliação da integridade do sistema imune e da caracterização da resposta imunitária frente a processos infecciosos ou parasitários, fornecendo subsídios para a compreensão dos mecanismos patogênicos eliciados pelos agentes infecciosos, auxiliando também na consecução dos diagnóstico e prognóstico (BYRNE et al., 2000; CHABANNE et al., 2000; TARRANT, 2005). Com o escopo de averiguar se a quantificação dos linfócitos sanguíneos periféricos: TCD4+, TCD8+ e da razão TCD4+ : TCD8+, seriam bons indicadores da evolução clínica da doença e do estado imune do animal e se poderiam, portanto, ser utilizados como parâmetro na avaliação do tratamento e no estabelecimento do prognóstico, em animais com sarna demodécica, pretendeu-se determiná-los, através da técnica de citometria de fluxo, durante a pré, trans e pós terapia acaricida em cães com demodicidose generalizada.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ETIOLOGIA

A demodicidose canina, também conhecida como sarna: demodécica, folicular, negra, pustular ou pustulosa, é uma enfermidade parasitária, não zoonótica, e que representa uma importante e frequente dermatose na rotina dermatológica. Em levantamento de prontuário de casos realizado por Larsson, em 1995, no Serviço de Dermatologia do Hospital Veterinário da Universidade de São Paulo (HOVET/USP), a demodicidose representou 40% das doenças cutâneas parasitárias dos cães atendidos no Serviço. Também, na América do Norte, principalmente, no Sudeste e Sudoeste dos Estados Unidos, a demodicidose está entre as dez dermatopatias mais frequentes (SISCHO; IHRKE; FRANTI, 1989).

O agente etiológico, *Demodex canis*, é ácaro comensal do tegumento, presente em número reduzido nos folículos pilosos e nas glândulas sebáceas. Completa todo seu ciclo de vida no hospedeiro, sobrevivendo às custas de material sebáceo e de restos epidérmicos. No exame parasitológico de raspado cutâneo dos animais acometidos pela demodicidose generalizada, é possível visualizar, além da forma adulta octópode, ovos fusiformes, larvas hexápodes e ninfas com quatro pares de patas. Embora acredite-se que 30 a 80% da população canina seja portadora assintomática deste ácaro, sua presença, em tal condição, é de difícil comprovação. A proliferação excessiva do ácaro é responsável pelas manifestações clínicas da doença e acredita-se que esta ocorra em consequência a quadro, geneticamente herdado, de disfunção de linfócitos T específica ao parasita (SCOTT; MILLER JR.; GRIFFIN, 2001).

A transmissão do ácaro aos cães, ocorre no período neonatal, a partir do contato com as fêmeas portadoras sãs, convalescentes ou doentes, no decorrer do aleitamento (SCOTT; MILLER JR.; GRIFFIN, 2001; GINEL, 2006; GORTEL, 2006). Em filhotes natimortos ou naqueles nascidos a termo em parto cesáreo, seguido de aleitamento artificial, a evidenciação do ácaro não é possível (SCOTT; MILLER JR.; GRIFFIN, 2001). A demodicidose não é considerada contagiosa entre os animais

adultos e, até o momento, não há relatos de transmissão a seres humanos (LEMARIE, 1996).

Além do *Demodex canis*, outras duas espécies, morfometricamente distintas, foram descritas em cães com demodicose. Uma delas apresenta menor comprimento, com aproximadamente metade das dimensões da espécie *D. canis* e, ainda, permanece sem denominação própria. Ocorre, na maior parte das vezes, em associação à infecção por *Demodex canis* e diferentemente desta, parece habitar o estrato córneo e não os folículos pilosos, não havendo distinção aparente, quanto ao histórico e as manifestações clínicas, decorrentes do parasitismo por estas espécies (MASON, 1993; CHESNEY, 1999; GORTEL, 2006).

Recentemente, uma nova espécie de *Demodex*, tem sido associada a quadros de demodicose em cães adultos. Esta nova variedade, denominada *D. injai*, difere pelo seu longo comprimento, qual seja o dobro daquele do *Demodex canis*, dispondo-se, também, nos folículos pilosos e em glândulas sebáceas. A infestação por este ácaro já foi descrita em cães de distintas raças, porém os Terriers, e dentre eles, o West Highland White Terrier, têm sido os mais acometidos. Nos relatos brasileiros, foi descrita a infecção por *Demodex injai*, em caninos sem perfeita definição racial e nos cães das raças Fila Brasileiro e Cocker Spaniel (FARIA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2009; ZACCHÉ et al., 2009). As manifestações clínicas, decorrentes desta última espécie, são semelhantes àquelas acarretadas pelo *Demodex canis*, excetuada a predileção de localização dorsal das lesões e da presença de concomitante quadro de seborréia. A frequente associação com outras dermatopatias ou doenças sistêmicas, a apresentação topográfica atípica das lesões e a menor magnitude numérica dos ácaros, evidenciada no exame parasitológico, contribuem para que a infecção por este ácaro seja, aparentemente, subdiagnosticada (MUELLER; BETTENAY, 1999; HILLIER; DESCH, 2002; ROBSON et al., 2003; GORTEL, 2006; ORDEIX et al., 2009).

2.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E TERAPIA

De acordo com a distribuição corpórea, a demodicose pode ser

classificada em localizada ou generalizada. Estas formas, também diferem entre si, quanto a sua evolução, gravidade e prognóstico (SCOTT; MILLER JR.; GRIFFIN, 2001).

Embora não haja um critério uniforme para diferenciação entre as diferentes formas da doença, em geral, esta é classificada como localizada quando acomete uma região corpórea restrita, ou quando se apresenta como cinco a seis áreas lesadas (GINEL, 2006; GORTEL, 2006).

Na forma localizada da doença, são observadas áreas alopécicas circunscritas, eritematosas, descamativas, de distintos tamanhos, por vezes, hiperpigmentadas e crostosas, bem como com a presença de comedos. O prurido, nesta forma da doença, normalmente está ausente, exceto quando da presença de infecção bacteriana secundária, quando também é possível visualizar pápulas e pústulas. As lesões estabelecem-se, principalmente, na cabeça e na face, nesta última, em região periocular, perilabial ou massetérica. Os membros torácicos são frequentemente acometidos, enquanto que os pélvicos e a região dorsal apenas ocasionalmente apresentam lesões. Alguns animais podem, ainda, apresentar tão somente blefarodemodicidose, pododemodicidose ou otodemodicidose (LEMARIE, 1996; SCOTT; MILLER JR.; GRIFFIN, 2001; GINEL, 2006; GORTEL, 2006; SANTAREM, 2007).

A forma localizada da doença apresenta decurso evolutivo habitualmente benigno. Os animais podem intercalar períodos de melhora ou piora das lesões antes da plena remissão do quadro que ocorre de forma espontânea, em cerca de 90% dos casos (LEMARIE, 1996; SCOTT; MILLER JR.; GRIFFIN, 2001; GORTEL, 2006; SANTAREM, 2007).

Ao contrário do observado na forma localizada da demodicose, aquela dita generalizada, pode atingir graves proporções, constituindo-se, ainda hoje, em importante dermatopatia, tanto pela frequência com que ocorre quanto pela graves manifestações clínicas que elicia. Durante muitos anos foi considerada doença de mau prognóstico, frustrante para o clínico e desalentadora para os proprietários, devido ao seu longo, laborioso e custoso tratamento (PARADIS, 1999; SCOTT; MILLER JR.; GRIFFIN, 2001; SANTAREM, 2007).

Classifica-se, arbitrária, mas universalmente, como generalizada, aquela onde se evidencia mais de seis áreas de lesões, o acometimento de uma extensa região

corpórea e de duas ou mais patas (GINEL, 2006; GORTEL, 2006; SANTAREM, 2007).

Na forma generalizada da doença, a alopecia, a descamação e o eritema, são bem mais intensos, observando-se, também, por vezes, a presença de cilindros foliculares. A infecção bacteriana secundária é frequente, podendo variar desde uma foliculite superficial, caracterizada por pápulas, pústulas, crostas melicéricas, até quadros mais graves, acometendo planos mais profundos, manifestando-se como furunculose e celulite, resultando em edema, tratos fistulosos, com exsudato pio e/ou sanguinolento, crostas hemáticas e até dor. Com a cronicidade da infecção, a pele torna-se melanótica, queratótica e lignificada. Os quadros graves podem ser acompanhados de manifestações sistêmicas, tais como, letargia, hipertermia, depressão e linfadenopatia. O prurido é de intensidade variável estando, geralmente, associado à infecção bacteriana secundária (LEMARIE, 1996; SCOTT; MILLER JR.; GRIFFIN, 2001; GROSS et al., 2005; GORTEL, 2006; SANTAREM, 2007).

Dentre as bactérias isoladas, *Staphylococcus intermedius*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis*, são os microorganismos mais frequentemente observados (SCOTT; FARROW; SCHULTZ, 1974; HIRSH et al., 1975; LEMARIE; HOSGOOD; FOIL, 1996; SCOTT; MILLER JR.; GRIFFIN, 2001; GORTEL, 2006).

Alguns cães, com sarna demodécica generalizada (SDG), podem apresentar, concomitantemente às lesões corporais, a pododemodicose. Nesta, as regiões interdigitais, palmares ou plantares, bem como o leito ungueal são acometidos por eritema, edema, pápulas e, por vezes, tratos fistulosos, lesões estas dolorosas que, segundo a gravidade, podem culminar em impotência funcional dos membros locomotores (LEMARIE, 1996; SCOTT; MILLER JR.; GRIFFIN, 2001; GROSS et al., 2005; GORTEL, 2006; SANTAREM, 2007).

Em alguns casos, a pododemodicose ocorre como manifestação única da sarna demodécica generalizada ou como lesão remanescente desta forma da doença. A pododemodicose apresenta mau prognóstico, apresentando decurso evolutivo longo, demandando períodos prolongados de tratamento (LEMARIE, 1996; SCOTT; MILLER JR.; GRIFFIN, 2001; GORTEL, 2006).

Em relação a idade de aparecimento das lesões tegumentares, a demodicidose é classificada em juvenil, na qual as manifestações clínicas iniciam-se até os 12 primeiros meses de idade, para animais de raças de pequeno, médio ou grande porte, e até aos 18 meses de idade, para raças ditas gigantes (LEMARIE, 1996; SCOTT; MILLER JR.; GRIFFIN, 2001). Classifica-se como demodicidose do adulto, aqueles quadros com manifestação temporal posterior a estes períodos. Alguns autores, porém, consideram apenas como verdadeiros quadros de demodicidose do adulto, aqueles com início aos dois ou, somente, aos quatro anos de idade (DUCLOS; JEFFERS; SHANLEY, 1994; LEMARIE, 1996; SCOTT; MILLER JR.; GRIFFIN, 2001).

A primo manifestação em animais adultos é considerada incomum e alguns casos de apresentação da doença apenas na fase adulta, podem refletir quadros não diagnosticados no período juvenil ou, até mesmo, quadros tratados de forma inadequada, desencadeando recidivas na fase adulta (LEMARIE, 1996; SCOTT; MILLER JR.; GRIFFIN, 2001).

Nos casos de demodicidose do adulto, torna-se mandatória a investigação de doenças concomitantes que possam contribuir para o desenvolvimento desta dermatopatia. Neoplasias, doenças autoimunes, enfermidades debilitantes crônicas, endocrinopatias, leishmaniose visceral e, ainda, a utilização de terapia imunomoduladora são incriminados como fatores predisponentes para a ocorrência de demodicidose do adulto. Em geral, a eliminação de tais fatores, quando possível, auxilia o controle e, até mesmo, culmina na resolução do quadro tegumentar (SCOTT; MILLER JR.; GRIFFIN, 2001; GORTEL, 2006).

Em cerca de 50% dos casos de demodicidose do adulto, não é possível identificar a presença de uma enfermidade concomitante, no momento do diagnóstico, porém, estes animais devem permanecer sob monitorização, pois a sarna demodécica, pode anteceder, em muito, a manifestação de doenças sistêmicas de assentamento futuro. Esta forma da doença, dita idiopática, geralmente apresenta pior prognóstico (SCOTT; MILLER JR.; GRIFFIN, 2001).

A demodicidose apresenta nítida predisposição por cães de raça definida, de pelame curto, com até 18 meses de idade, acometendo, indistintamente, machos ou fêmeas. O componente hereditário é proposto pela prevalência elevada da doença em determinadas raças e linhagens caninas. Embora todo animal seja considerado

sujeito a demodicidose, e que a predisposição racial possa ser influenciada por diferenças geográficas, distintos estudos apontam algumas raças como sendo predispostas, tais como: Afghan Hound, Airedale Terrier, American Staffordshire Terrier, Beagle, Boxer, Boston Terrier, Bulldogue Inglês, Chihuahua, Cocker Spaniel, Collie, Dachshund, Dálmata, Doberman, Dogue Alemão, Old English Sheepdog, Malamute do Alaska, Pastor Alemão, Pug, Pointer Inglês, Scottish Terrier, Shar- Pei, Weimaraner e West Highland White Terrier (MILLER; WELLINGTON; SCOTT, 1992; LEMARIE, 1996; LEMARIE; HOSGOOD; FOIL, 1996; SCOTT; MILLER JR.; GRIFFIN, 2001; GINEL, 2006). Semelhantemente, no Brasil, em estudo conduzido por Delayte em 2002, também foram identificadas algumas destas raças, a saber: Boxer, Cocker Spaniel, Dachshund, Dálmata, Doberman, Dogue Alemão, Lhasa Apso, Pastor Alemão, Pit Bull, Poodle, Pug e Rottweiler.

Acredita-se que a predisposição genética à demodicose, seja transmitida por meio de herança autossômica recessiva. Em canis, onde a demodicose é observada regularmente, o afastamento da reprodução dos animais doentes e daqueles portadores sãos, é capaz de reduzir e, até mesmo, eliminar a ocorrência de demodicose (SCOTT; MILLER JR.; GRIFFIN, 2001; GORTEL, 2006).

Na terapêutica da sarna demodécica arrolam-se várias drogas, desde o clássico e ortodoxo protocolo tópico com amitraz, em solução aquosa, até o emprego das lactonas macrocíclicas, como as avermectinas (ivermectina, doramectina) e milbemicinas (moxidectina e milbemicina). Atualmente, este último grupo farmacológico, têm sido considerado como aquele de escolha para o tratamento da demodicose, tendo em vista sua boa eficiência, praticidade, custo aceitável e relativa segurança (DELAYTE, 2002; DELAYTE et al., 2006; GORTEL, 2006; PARADIS, 2008; SILVA, 2008).

As lactonas macrocíclicas são drogas derivadas de produtos da fermentação de actinomicetos do gênero *Streptomyces*, que atuam potencializando a ação neuronal mediada pelo ácido gama-aminobutírico – GABA (PARADIS, 1999; DELAYTE et al., 2006; GORTEL, 2006; PARADIS, 2008). Dentre as lactonas macrocíclicas, a ivermectina, têm sido a mais extensivamente utilizada, em todas as latitudes, no tratamento da demodicose canina, embora as outras lactonas apresentem resultados semelhantes. O período de tratamento, com o uso destes medicamentos varia de três até dez meses, resultando, em média de quatro a cinco

meses de terapia contínua. A interrupção do tratamento é realizada quando da obtenção consecutiva de três raspados negativos a intervalos mensais, correspondendo a alta clínica, enquanto que, a alta parasitológica somente é estabelecida decorridos 12 meses da alta clínica, sem a presença de recidivas (PARADIS, 1999; SCOTT; MILLER JR.; GRIFFIN, 2001; MUELLER, 2004; DELAYTE et al., 2006; GORTEL, 2006; PARADIS, 2008).

2.3 IMUNOPATOGENIA

Sendo o *Demodex canis* um ácaro comensal, virtualmente presente no tegumento canino, o porquê da progressiva evolução à doença em apenas alguns animais ainda permanece pouco compreendida, embora vários estudos tenham sido empreendidos para sua elucidação. Considera-se que a demodicidose é uma doença multifatorial, onde a interação de fatores genéticos, parasitários, imunológicos e predisponentes contribuam para a sua manifestação (SCOTT; MILLER JR.; GRIFFIN, 2001).

A ocorrência de demodicidose em apenas alguns cães de uma mesma ninhada e, portanto, expostos à mesma fonte de infecção e ao mesmo ambiente, permitiram que se inferisse que possíveis diferenças de virulência entre os ácaros, não seriam as responsáveis pela manifestação do quadro clínico (SCOTT; MILLER JR.; GRIFFIN, 2001).

A observação de que animais acometidos por neoplasias, doenças metabólicas graves e aqueles tratados com agentes imussupressores, tais como, soro antilinfocitário, glicocorticóides e azatioprina, desenvolviam ou pioravam o quadro de demodicidose, demonstraram a importância da resposta imune celular na defesa contra o parasita, sugerindo que a imunossupressão pudesse estar associada à patogenia da doença (HEALEY; GAAFAR, 1977; SCOTT; MILLER JR.; GRIFFIN, 2001; GORTEL, 2006). O sistema imune passou então, a ser alvo de numerosas pesquisas que, na tentativa de elucidar a patogenia da demodicidose,

abrangeram estudos desde a imunidade inata àquela adquirida dos cães acometidos.

Entretanto, embora a imunossupressão seja considerada um fator predisponente para a demodicose, nem todos os animais imunocomprometidos, desenvolvem esta dermatopatia e, tampouco, aqueles com demodicose, apresentam outras manifestações de imunossupressão, tais como: infecções oportunistas em distintos órgãos ou sistemas (SCOTT; MILLER JR.; GRIFFIN, 2001; GORTEL, 2006).

O estudo do sistema complemento e da atividade dos neutrófilos não demonstrou quaisquer anormalidades, que pudessem justificar o quadro clínico de demodicose. Da mesma forma, pacientes caninos com doenças neutrofílicas constitucionais, também não são susceptíveis ao desenvolvimento desta dermatopatia (SCOTT; BAKER; SCHULTZ, 1976; SCOTT; MILLER JR.; GRIFFIN, 2001). Em estudo, realizado há um decênio, a atividade dos neutrófilos apresentou-se diminuída somente em cães com sarna demodécica generalizada, com pelo menos cinco semanas de evolução, permanecendo inalterada naqueles com a forma localizada ou em fase inicial da forma generalizada, levando-se a concluir que, a disfunção dos neutrófilos seria um epifenómeno secundário ao processo da doença, dependente do tempo de evolução e do quadro lesional apresentados (MOJZISOVÁ et al., 1999).

Os estudos sobre a imunidade humoral, também não evidenciaram alterações que pudessem ser correlacionadas com o desenvolvimento da demodicose. Os plasmócitos foram encontrados em proporções adequadas na medula óssea, baço, fígado e linfonodos (SCOTT; BAKER; SCHULTZ, 1976). Níveis adequados de anticorpos são produzidos quando da imunização contra o vírus da hepatite infecciosa canina, da cinomose e do “Aleutian virus disease” (CORBERTT et al., 1975; SCOTT; MILLER JR.; GRIFFIN, 2001).

Os níveis das imunoglobulinas, IgA e IgM encontraram-se adequados em cães com demodicose, já aqueles de IgG mostraram-se duas vezes e meia mais aumentados em estudo conduzido com 10 cães com demodicose generalizada (LEMARIE, 1996). Estudos imunoistoquímicos, realizados em cortes de tecido cutâneo de cães com demodicose, identificaram rico infiltrado inflamatório, composto por células marcadas para IgG, principalmente das classes IgG2 e IgG4,

nas lesões de perifoliculite, foliculite e furunculose, bem como células marcadas para IgM e IgA, porém, em menor proporção (CASWELL et al., 1995; DAY, 1997). Nos cães com demodicidose generalizada, é possível observar alteração do padrão eletroforético das proteínas séricas, com elevação das frações alfa-2 e beta globulinas, e aumento variável da fração gama globulínica (SCOTT; FARROW; SCHULTZ, 1974; SCOTT; BAKER; SCHULTZ, 1976; HAGIWARA; GERMANO, 1977; FUKATA et al., 2005).

A imunidade mediada por células, no entanto, revelou-se comprometida tal como o evidenciado em resultados de distintas pesquisas. Embora os cães com demodicidose não sejam linfopênicos e que seus linfócitos T estejam presentes em adequada magnitude numérica nos órgãos do sistema retículo endotelial, sua função encontra-se flagrantemente alterada. Estudos que empregaram os testes de linfoblastogênese *in vitro* e o teste intradérmico, com o uso de diferentes mitógenos, para avaliação da atividade dos linfócitos, demonstraram imunossupressão da resposta linfocitária (SCOTT; FARROW; SCHULTZ, 1974; SCOTT; BAKER; SCHULTZ, 1976; BARRIGA et al., 1992; PAULIK et al., 1996a,b; MOJZISOVÁ et al., 1999).

Em estudos pretéritos, em que se investigou a imunidade celular, observou-se que linfócitos de cães, com SDG, apresentavam imunossupressão ao teste de linfoblastogênese *in vitro*, quando estimulados com os mitógenos fitohematoglutina (PHA), extrato de “pokeweed” (PWM) e concanavalina (Con A) e, ainda, que após a remissão clínica da doença, a atividade linfocitária retornava à normalidade (SCOTT; FARROW; SCHULTZ, 1974; SCOTT; BAKER; SCHULTZ, 1976). Nos animais que manifestavam a forma localizada da doença ou naqueles com os pródromos da forma generalizada, esta imunossupressão, contudo, não era observada (SCOTT; BAKER; SCHULTZ, 1976; BARRIGA et al., 1992). Paralelamente, outros estudos em que se empregou o teste intradérmico, também, permitiram que se observasse diminuição da atividade linfocitária, evidenciada pela supressão da hipersensibilidade tardia após a estimulação com os mitógenos Con A e PHA, ao passo que, a resposta de hipersensibilidade imediata, revelou-se pronunciada (SCOTT; FARROW; SCHULTZ, 1974; HEALEY; GAAFAR, 1977).

Também foi evidenciado que linfócitos de cães com demodicidose recuperavam a habilidade de proliferar quando cultivados frente ao soro provindo de

animais hígidos, ao passo que, linfócitos destes animais, apresentavam-se imunossuprimidos quando cultivados com soro de animais enfermos. Além disso, soro de animais em plena remissão clínica da doença perdiam a capacidade de suprimir a linfoblastogênese, tanto em cães saudáveis quanto naqueles em recuperação do quadro sintômato - lesional (CORBETT et al., 1975; HIRSH et al., 1975; SCOTT; BAKER; SCHULTZ, 1976; MILLER, 1979).

As observações iniciais de que o restabelecimento da resposta linfocitária coincidia com a melhora clínica do animal e que o grau de imunossupressão correlacionava-se com a gravidade da doença, resultaram na hipótese de que a imunossupressão, observada na demodicidose, seria induzida pelo parasita. Nos cães afetados, um retardo no desenvolvimento imune, permitiria uma rápida multiplicação e difusão do ácaro. Subsequentemente, os ácaros produziram ou induziram um fator imunossupressor solúvel interferindo, ainda mais, na resposta imune e resultando no quadro manifesto da doença (SCOTT; BAKER; SCHULTZ, 1976; MILLER, 1979; KRAWIEC; GAAFAR, 1980; SCOTT; MILLER JR.; GRIFFIN, 2001).

Este possível fator imunossupressor, presente no soro de cães com demodicidose, foi inicialmente associado ao aumento das frações alfa-2 e betaglobulina das proteínas séricas (SCOTT; BAKER; SCHULTZ, 1976), às imunoglobulinas e a complexos antígeno-anticorpos (CORBETT et al., 1975) sendo, posteriormente, correlacionado a fração betaglobulínica por Krawiec e Gaafar (1980). Destarte, sua real natureza é incerta até os dias de hoje.

Contrariando os achados dos estudos conduzidos até o final dos anos setenta, Barta et al. (1983), apenas observaram imunossupressão ao teste de linfoblastogênese, em cães com demodicidose associada às infecções bacterianas ou, tão somente, naqueles com piodermite, concluindo que, a imunossupressão seria conseqüente à infecção bacteriana e não devida a infestação pelo *Demodex canis*. Concluíram ainda, aqueles autores, que a imunossupressão correlacionava-se com a gravidade da infecção bacteriana. Barriga et al. (1992), em experimento em que incluíram apenas um animal com piodermite, observaram que neste, a resposta linfocitária, quando estimulada com Con A, mostrava-se superior aquela evidenciada em cão apenas com sarna demodécica generalizada. Posteriormente, Mojzisoová, Paulík e Baranová (1999), também não correlacionaram a imunossupressão,

observada em cães com sarna demodécica generalizada, com a presença de infecção bacteriana secundária.

Os experimentos realizados por Barriga et al. (1992) e Paulík et al. (1996 a), demonstraram imunossupressão da linfoblastogênese, em cães com sarna demodécica localizada ou generalizada, mas desprovidos de piodermite. A imunossupressão, observada naqueles estudos, ocorreu no decurso evolutivo da demodicidose, sendo mais grave em animais com SDG relativamente àqueles com SDL. Concluiu-se, portanto, que a imunossupressão não seria uma condição necessária para o desenvolvimento da demodicidose e sim que esta seria, induzida pelo parasita ou pela resposta imune do hospedeiro.

Burkett et al. (1996) estudaram o estado imune de cães com sarna demodécica juvenil generalizada, antes, durante e após seu tratamento. Aqueles autores, observaram que a resposta linfocitária no teste de linfoblastogênese *in vitro*, permanecia suprimida mesmo após a resolução do quadro de piodermite e da eliminação dos ácaros. A razão entre os linfócitos TCD4+ : TCD8+, por sua vez, apresentava-se elevada previamente à instalação de tratamento antibiótico e acaricida, normalizando-se após este ser concluído, sugerindo, aqueles autores, que estas subpopulações linfocitárias poderiam estar envolvidas no estabelecimento da demodicidose.

Um desequilíbrio entre as subpopulações de linfócitos T auxiliares (TCD4+) foi proposto por Lemarie e Horohov (1996), para explicar os achados de imunossupressão previamente relatados. Segundo aqueles autores, animais com demodicidose apresentariam diminuição da produção de interleucina 2(IL2), e da expressão de seu receptor (IL2R) na superfície dos linfócitos, sugerindo que a resposta TH1 nestes animais estaria suprimida. Segundo os autores, cães com SDG poderiam ter alguma anomalia na apresentação ou processamento de antígenos, resultando-em menor produção de IL2 que, por sua vez, refletiria em uma resposta TH1 inadequada, resultando em processo inflamatório capaz de acarretar dano tecidual, porém, incapaz de eliminar ou conter a proliferação do ácaro na pele, permitindo a instalação e perpetuação da doença.

Tani et al. (2002), também, estudando as citocinas que compõem o repertório das diferentes populações de linfócitos T auxiliares (TCD4+), identificaram aumento da expressão de RNA mensageiro para citocina IL5 e discreta diminuição da

transcrição das citocinas TNF- α e INF- γ , nos animais com demodicidose, em relação ao grupo controle. Além disso, a transcrição da citocina TGF- β , também, demonstrou estar elevada em cães com SDG, quando comparado ao grupo constituído por cães com SDL e ao grupo controle. Estes achados, corroboraram a hipótese levantada por Lemarie e Horohov (1996), no qual a resposta TH1 estaria suprimida em relação a resposta TH2, o que poderia estar associado à patogenia da doença.

Ainda, visando caracterizar as subpopulações linfocitárias, alguns poucos estudos, histológicos e imunoistoquímicos, das lesões induzidas pela demodicose, identificaram, dentre os padrões histológicos, a foliculite mural, como sendo um consistente e importante padrão lesional da doença ativa (CASWELL et al., 1995; CASWELL et al., 1997; DAY, 1997).

Na demodicidose, a foliculite mural é caracterizada, preponderantemente, pela infiltração de linfócitos citotóxicos (TCD3+TCD8+) na parede folicular, de forma similar à dermatite liquenóide de interface, com presença de degeneração hidrópica, apoptose dos queratinócitos foliculares e exocitose folicular, padrão este, frequentemente, associado às doenças, em que a resposta imune celular é reconhecidamente importante na sua patogenia (CASWELL et al., 1995; CASWELL et al., 1997; DAY, 1997; GROSS et al., 2005).

A presença de infiltrado linfocitário na parede folicular, caracteriza uma resposta imune celular ativa contra o epitélio folicular, onde os linfócitos T citotóxicos, possivelmente induzem à apoptose os queratinócitos alterados ou que expressem antígenos acarianos, representando tanto um mecanismo de controle da população acariana ou, ainda, uma resposta imune aberrante ao parasita, capaz de ocasionar dano tecidual, sem contudo, eliminá-lo (CASWELL et al., 1995; CASWELL et al., 1997).

O comportamento das subpopulações de linfócitos, também, foi avaliada no sangue periférico. A percentagem dos linfócitos TCD8+, apresentou-se elevada, em três dos quatro cães estudados por Caswell et al. (1997), resultando em razão TCD4+ : TCD8+ diminuída, sugerindo que a proliferação seletiva de linfócitos TCD8+, poderia ser importante no combate ao parasita. Estes achados diferiram do observado por Burkett et al. (1996) que, estudando o estado imune de cinco cães com demodicidose generalizada, antes, durante e no pós tratamento, detectaram aumento da razão TCD4+ : TCD8+ previamente à instalação de protocolo

terapêutico. Naquele estudo, somente três (60%) animais foram acompanhados até a alta clínica.

Fukata et al. (2005), por sua vez estudaram a razão entre os linfócitos sanguíneos periféricos, TCD4+ e TCD8+, durante o tratamento, em 18 cães com demodicose. Pelo resumo do trabalho, redigido em japonês, depreende-se que, a proporção entre estas subpopulações não diferiu naqueles animais com quadro juvenil relativamente aos cães com quadro adulto. Entretanto, em 11 animais adultos estudados, excetuando os quatro em que a administração prévia de glicocorticóides foi aventada, a razão entre estas subpopulações foi significativamente menor que aquela dos cães do grupo controle e naqueles com a forma juvenil. Naquele estudo, também, foi observado que a razão entre as subpopulações não se alterou pelo tratamento e, que em cães que apresentavam a razão entre os linfócitos TCD4+ e TCD8+ diminuída, a doença era refratária à terapia. Entretanto, ainda assim, pouco são os estudos enfocando o comportamento das subpopulações de linfócitos na patogenia da sarna demodécica. As pesquisas já realizadas, com tal intuito, contaram com número reduzidos de casos (BURKETT et al., 1996) ou não houve o acompanhamento dos animais até o momento da alta clínica (CASWELL et al., 1997). O único trabalho realizado, quantificando os linfócitos sanguíneos periféricos de cães com demodicose, do momento do diagnóstico até a alta clínica, infelizmente, foi redigido em língua japonesa, (FUKATA et al., 2005), sendo, portanto de leitura de difícil cotejamento.

Estudos enfocando a resposta imune em pacientes humanos acometidos por demodicose detectaram diminuição significativa do número de linfócitos TCD3+, TCD4+, TCD8+ e células “naturais killers” (NK), sem alteração, contudo, da proporção TCD4+ : TCD8+, sugerindo que os ácaros seriam capazes de modular a resposta imune do hospedeiro (AKILOV; KAZANCEVA; VLASOVA; 2001; AKILOV; MUMCUOGLU, 2004; EL-BASSIOUNI et al., 2005; MUNCUOGLU; AKILOV, 2005).

Em pacientes humanos com demodicose, que apresentam genótipos associadas a resistência ao desenvolvimento da doença, os linfócitos TCD8+ são encontrados em proporções adequadas, diferentemente daqueles com genótipos associados à susceptibilidade, que apresentam valores inferiores de linfócitos TCD8+, sugerindo ser esta população linfocitária importante no combate ao parasita (MUMCUOGLU; AKILOV, 2005).

O papel dos linfócitos T, de suas subpopulações e citocinas, como o já referido, são cruciais na determinação da evolução das doenças parasitárias, visto que são capazes de orquestrar a resposta imune do hospedeiro, através de suas funções efectoras e regulatórias, as quais culminam tanto em uma resposta protetora efetiva ou, alternativamente, até mesmo em resposta imune deletéria, capaz de promover ou perpetuar a doença (SHER; COFFMAN, 1992).

Os trabalhos realizados até o momento, demonstram que a resposta mediada por células é fundamental na manutenção de um número reduzido de ácaros no tegumento. Na demodicidose, esta resposta encontra-se suprimida, sobretudo, naqueles animais que manifestam a forma generalizada da doença. Tal imunossupressão ocorre, possivelmente, em decorrência da existência de uma “alteração”, geneticamente herdada, dos linfócitos T específica ao ácaro, que permitiria sua proliferação excessiva. Posteriormente, o ácaro induziria ou produziria um fator imunossupressivo presente no soro, contribuindo para a imunossupressão, a qual, também, seria agravada pela presença de infecção bacteriana. Esta alteração dos linfócitos T poderia ser consequente ao desequilíbrio entre suas subpopulações, linfócitos T citotóxicos (TCD8+) e auxiliares (TCD4+) ou, mais especificamente, entre os diferentes padrões de respostas de seus linfócitos T auxiliares, Th1 e Th2. Nos tecidos, o ácaro parece suscitar uma resposta imune celular importante, representando tanto um mecanismo de eliminação do parasita, como uma resposta aberrante à infestação pelo ácaro, capaz de contribuir para danos teciduais e, ao mesmo tempo, incapaz de eliminá-lo (SCOTT; MILLER JR.; GRIFFIN, 2001).

Tendo em vista o importante papel dos linfócitos no comportamento da evolução das infecções parasitárias e a escassez de estudos sobre as distintas populações linfocitárias na sarna demodécica, o presente estudo pretendeu contribuir para a compreensão da resposta imune suscitada pelo parasita e da patogenia no desenvolvimento da demodicidose.

A determinação dos linfócitos TCD4+ e TCD8+, bem como da razão entre estas subpopulações, pressupostamente permitiria avaliar a integridade do sistema imune e caracterizar o estado imune do animal frente à processos infecciosos e parasitários, refletindo tanto na instituição e manutenção da terapia a ser empregada, quanto na determinação da prognose do quadro clínico. Além disso, a

determinação das subpopulações linfocitárias, também poderia fornecer subsídios para a compreensão dos mecanismos patogênicos eliciados pelo ácaro.

3 OBJETIVOS

Determinar a proporção de linfócitos TCD4+, TCD8+ e da razão TCD4+ : TCD8+ no sangue periférico em cães com demodicidose generalizada, comparando-as com animais hígidos, visando verificar se tais subpopulações linfocitárias se alteram durante o tratamento do quadro tegumentar, e ainda, se seriam bons indicadores do estado imune e da evolução do quadro clínico dos animais acometidos. E, finalmente, se apresentam valor prognóstico quanto ao período de estabelecimento da alta clínica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo longitudinal controlado, no período de novembro de 2008 a dezembro de 2009, envolvendo cães com diagnóstico estabelecido de demodicidose generalizada e animais hígidos incluídos no estudo segundo critérios de seleção previamente estabelecidos. O protocolo de estudo foi aprovado pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em 14 de dezembro de 2008, sob o número 1255/2007

4.1 AMOSTRAGEM

4.1.1 Grupo Controle

Para a composição do Grupo Controle foram selecionados 30 animais hígidos, oriundos de canis de benemerência e de domicílios particulares paulistanos e campineiros. Somente animais desprovidos de histórico familiar de demodicidose e sem quadro pretérito desta dermatopatia foram incluídos no Grupo. Animais previamente expostos a áreas sabidamente de risco para infecção por leishmaniose e aqueles com histórico de ixodidiose, também foram excluídos quando da composição do Grupo Controle.

A higidez dos animais selecionados foi avaliada pela anamnese, exames físico e dermatológico e pelos subsidiários realizados, tais como: hemograma com contagem de plaquetas e avaliação bioquímica sérica das funções renal e hepática. Naqueles animais selecionados para compor o Grupo Controle, também, foi realizada a quantificação de linfócitos sanguíneos periféricos.

4.1.2 Grupo Experimental

Foram incluídos 16 animais com demodicidose generalizada, hígidos quanto aos demais sistemas orgânicos, selecionados durante o atendimento no Serviço de Dermatologia do Departamento de Clínica Médica (VCM) e do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP).

O diagnóstico de sarna demodécica foi estabelecido através de dados da anamnese, exames físico e dermatológico e pela evidenciação de ácaros do gênero *Demodex* no exame parasitológico de raspado cutâneo. Exames laboratoriais, tais como hemograma e contagem de plaquetas, e aqueles para determinação de perfil renal e hepático, exame de urina e coproparasitológico foram, também, realizados como meio de se averiguar a higidez dos animais quanto aos outros sistemas orgânicos.

Além destes exames, também, foram realizados testes sorológicos^{1,2} para leishmaniose e erliquiose, para aqueles animais expostos a áreas sabidamente de risco para leishmaniose e naqueles com histórico de infestação por ixodídeos.

Os animais incluídos no projeto de pesquisa foram avaliados mensalmente, por meio de exames físico, dermatológico, parasitológico de raspado cutâneo, hemograma com contagem de plaquetas e quantificação de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ até a data da alta clínica, a qual foi estabelecida quando da ausência de evidenciação de ácaros no exame parasitológico de raspado cutâneo, por três consultas consecutivas, em intervalo de 30 dias.

Os cães com diagnóstico estabelecido de sarna demodécica, foram tratados com ivermectina, em especialidade farmacêutica³ ou em formulação magistral, *per os*, na dose de 0,4 - 0,6 miligramas por quilograma de peso, a cada 24 horas até a data da alta clínica. Naqueles com presença de infecção bacteriana secundária, empregou-se cefalexina⁴, em especialidade farmacêutica, *per os*, 30 miligramas por quilograma de peso, a cada 12 horas, durante 30 dias consecutivos. Para todos os animais foram prescritos banhos semanais com xampu, tendo como princípio ativo

¹ ELISA (segundo técnica padronizada pelo Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas da Faculdade de Medicina/USP)

² RIFI (segundo técnica padronizada pelo Serviço de Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica da FMVZ/USP)

³ Mectimax[®] comprimidos de 3mg ou 12mg – Agener União Saúde Animal

⁴ Cefalexina genérica cápsulas 500mg – Medley; Rilexine[®] 300mg - Virbac Saúde Animal

peróxido de benzoíla⁵.

4. 2 EXAME PARASITOLÓGICO DE RASPADO CUTÂNEO

O exame parasitológico foi realizado, em material provindo de raspado profundo de pele, até obtenção de sangramento capilar, de até três áreas lesadas. O material coletado foi depositado por sobre lâmina de microscopia, acrescido de hidróxido de potássio a 10%, e recoberto por lamínula (24mm x 24mm), sucedido pela análise em microscopia de luz, sob o aumento de 100x.

Todas as formas do ácaro, imaturas e maduras (ovos, larvas, ninfas, adultos) foram quantificadas durante a leitura do exame parasitológico. Para que não ocorresse erro durante a execução do exame foi estabelecido o início da contagem pela extremidade esquerda da lamínula, realizando movimentos alternados em “zigue-zague”, até a extremidade direita, de forma que toda a área, sob a lamínula, fosse examinada e os ácaros ali presentes contados.

4.3 COLETA DE MATERIAL

Para a execução do experimento foram coletados, por venopuntura jugular, dois mililitros de sangue periférico, imediatamente acondicionados em tubos de hemograma, contendo EDTA como anticoagulante, para avaliação hematológica e imunofenotipagem de linfócitos sanguíneos periféricos.

4.4 AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA

A contagem total de hemácias, leucócitos, plaquetas, e a determinação do

⁵Pertopic® - Agener União Saúde Animal; Peroxydex Spherulites® - Virbac Saúde Animal

volume globular (hematócrito), da concentração de hemoglobina, e o cálculo dos demais índices hematimétricos (volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração hemoglobínica corpuscular média) foram realizados em contador automático⁶.

A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada a partir de esfregaços sanguíneos, preparados a fresco, corados pelo método de Rosenfeld (BIRGEL, 1982), e examinados em microscopia de luz, sob objetiva de imersão (1000x).

4. 5 BIOQUÍMICA SÉRICA

A avaliação da função hepática foi realizada por meio da determinação da atividade sérica das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA), utilizando kits comerciais⁷.

Todas as mensurações foram efetuadas em analisador bioquímico automático⁸. A dosagem da proteína total foi realizada pelo método de biureto e a determinação da albumina pelo método do verde de bromocresol, rotineiramente empregados pelo Serviço de Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica da FAMVZ/USP.

A função renal foi avaliada pelos resultados da determinação da concentração de uréia e creatinina. Para determinação da concentração de uréia foi utilizado reagentes comerciais⁹, e para aquela da creatinina, utilizou-se solução de picrato alcalino, de acordo com a técnica descrita por Lutsgarten e Wenk, (1972).

4. 6 EXAME DE URINA

O exame de urina compreendeu a avaliação macroscópica, os exames físico

⁶ ABCTM -VET, ABX'S

⁷ Biosystems – Reagents & Instruments

⁸ LIASYS[®] (AMS – Analyser Medical System

⁹ DYASIS[®] - Diagnostic Systems

e químico, a análise do sedimento urinário. Na avaliação macroscópica, foram analisadas as características de cor, turbidez, odor e volume da amostra. O exame físico compreendeu a determinação da densidade urinária por refratometria. Já o exame químico, visou a determinação da concentração hirogeniônica, da presença de sangue, corpos cetônicos, bilirrubina, urobilinogênio e glicose urinária, sendo realizado através de fitas reagentes específicas¹⁰. O sedimento urinário, foi obtido após centrifugação, e analisado em microscopia de luz (aumento de 400x), para detecção de células, cristais, microrganismos eventualmente presentes.

4.7 EXAME COPROPARASITOLÓGICO

O exame coproparasitológico dos animais do Grupo Experimental, foram realizados pelo método de Willis-Mollay, rotineiramente executados pelo Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ/USP.

4.8 IMUNOFENOTIPAGEM DE LINFÓCITOS SANGUÍNEOS PERIFÉRICOS

Para a quantificação dos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, o sangue total periférico foi diluído em tampão fosfato salino (PBS), suplementado com 1% de soro fetal bovino¹¹ (PBS + 1% SFB) na proporção de 1:1, sendo, em seguida, cuidadosamente transferido sobre solução Ficoll¹² submetidos à centrifugação a 400 x g, durante 40min, 23°C para a separação das células mononucleares.

Após a centrifugação, as células mononucleares foram coletadas na interfase e lavadas por duas vezes, pela diluição em 15ml de PBS+1%SFB, seguida de centrifugação a 300 x g, durante 10min, a 23°C. Posteriormente, as células

¹⁰ Combur-Test - Boehringer Mannheim

¹¹ Foetal Bovine Serum – GIBCO, Invitrogen

¹² Ficoll Paque Plus™, GE Healthcare

mononucleares, não coradas pelo Azul de Tripán, foram contadas em câmara de Newbauer, e diluídas na concentração de 1×10^6 células por ml em tampão PBS +1% SFB. Para a imunofenotipagem foi utilizado 100µl de suspensão celular padronizada, seguido da adição de 1µl de anticorpo monoclonal anti-CD4 canino marcado com FITC¹³ e 2µl de anti-CD8 canino marcado com PE¹⁴, e incubados a temperatura ambiente, durante 30 minutos, em abrigo da luz.

Após o período de incubação, as amostras foram lavadas com PBS + 1% SFB e centrifugadas por 10 min, a 300 x g, à 23°C. Em seguida, foram submetidas à leitura pelo citômetro de fluxo¹⁵, sendo analisadas um total de 10.000 eventos. Os dados obtidos no citômetro de fluxo foram posteriormente analisados pelo software FlowJo¹⁶. A população de linfócitos foi selecionada segundo as características celulares de tamanho e granulosidade e, através desta seleção (gate), a percentagem de linfócitos TCD4+ e TCD8+ foi então obtida. Com estes percentis, os valores absolutos dos linfócitos TCD4+ e TCD8+ foram então calculados, a partir do número total de linfócitos, determinado previamente pela contagem diferencial dos leucócitos, realizados na confecção do hemograma.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Por ser o número de consultas necessárias tanto para a obtenção do primeiro exame parasitológico negativo como para o estabelecimento da alta clínica, individual e divergente, entre os animais do Grupo Experimental, para as análises estatísticas comparativas dos valores, absolutos e relativos, dos linfócitos totais, TCD4+, TCD8+, e da razão TCD4+ : TCD8+ deste Grupo, foi estabelecido quatro momentos distintos de observação dos animais com demodicidose.

O primeiro momento de análise, correspondeu à consulta inicial, na qual o diagnóstico de demodicose foi estabelecido e o protocolo terapêutico padrão instuído.

¹³ Clone YKIX302.9, Serotec

¹⁴ clone YCATE55.9, Serotec

¹⁵ FACSCalibur, Becton Dickinson Immunocytometry System

¹⁶ Versão 4.4.4' Treestar

O segundo ponto de análise estabelecido, foi aquele da segunda consulta, que teve como objetivo, avaliar a possível influência das infecções bacterianas nas subpopulações linfocitárias. Na primeira consulta, aqueles animais que apresentaram infecção bacteriana concomitante a demodicidose, no momento do diagnóstico, foram devidamente tratados com antibióticos associada à terapia acaricida, propiciando resolução total do quadro de piodermite, permanecendo, portanto, na segunda consulta, tão somente as manifestações lesionais decorrentes da sarna demodécica.

A consulta em que se obteve o primeiro exame parasitológico cutâneo negativo, correspondeu ao terceiro momento de análise, de forma a avaliar o perfil imunitário dos animais do Grupo Experimental, quando estes então apresentavam-se livres do ácaro pela primeira vez.

E, finalmente, o quarto momento de submissão à análise empregada, foi o da consulta em que a alta clínica foi preconizada, a saber, quando os animais apresentavam completa remissão do quadro tegumentar e ausência de evidenciação do ácaro no exame parasitológico cutâneo em três consultas consecutivas.

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio de software estatístico SPSS 13.0. Para a avaliação do grau de aderência à distribuição normal, utilizou-se o teste de Shapiro-Wilks. Foi adotado um grau de significância mínimo de 5% em todas as análises (LEVIN; FOX, 2004).

A análise dos dados foi realizada inter-Grupos, avaliando cada um dos momentos de observação dos animais do Grupo Experimental frente ao Grupo Controle, e intra-Grupos, comparando os resultados obtidos nas diferentes consultas de observação entre os animais do Grupo Experimental.

Na análise intra-Grupos, ou seja entre os distintos momentos de observação do Grupo Experimental, os dados que apresentaram distribuição normal foram submetidos ao modelo geral linear para medidas repetidas (análise de variância), com posterior cálculo das diferenças entre os momentos através do LSD (Least Significant Difference). Por sua vez, os dados que apresentaram distribuição não-paramétrica foram avaliados pelo teste de Friedman, seguido do teste de Wilcoxon, quando aquele demonstrou-se significativo (LEVIN; FOX, 2004).

Para a avaliação inter-Grupos, ou seja, entre os animais do Grupo Controle e os diferentes momentos de observação do Grupo Experimental, foi aplicado o Teste de “t” para amostras independentes, para análise das variáveis de distribuição

normal, e o teste de MannWhitney para as variáveis não paramétricas (LEVIN; FOX, 2004).

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRAGEM E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

No decorrer do desenvolvimento do trabalho, foram primitivamente selecionados 40 animais para a desejada inclusão no Grupo Experimental, porém, destes, 24 (60%) cães foram excluídos por diferentes motivos, quer por desistência por parte dos proprietários em comparecer aos retornos aprazados (8 – 33%), quer pelo diagnóstico *a posteriore* de outras enfermidades concomitantes (13 – 54%) ou, ainda, pela perpetuação do quadro de demodicidose, ao final do período de observação pré determinado (3 – 13%). No apêndice A estão arrolados os dados dos animais excluídos, segundo a identificação, diagnóstico e motivo de exclusão.

Ao final do projeto de pesquisa, 16 animais que apresentavam tão somente sarna demodécica generalizada, eventualmente, associada à infecção bacteriana secundária, completaram o projeto. No quadro 1, dispõem-se os animais incluídos no estudo, segundo os dados coligidos na resenha, o diagnóstico estabelecido e a evolução do quadro clínico. Os resultados dos exames laboratoriais, tais como: hemograma, biquímica sérica, exame de urina e coproparasitológico, estão dispostos, respectivamente, nos apêndices B a J.

Dos animais com demodicidose generalizada, apenas dois (12%) não apresentaram definição racial precisa. Dentre os 14 animais de raça definida, ora reunidos, as raças Dálmata (3 – 19%), Bulldogue Inglês (2 – 12,5%) e Pug (2 – 12,5%) foram aquelas três mais frequentes (Gráfico 1).

(continua)

Animal	Prontuário	Definição Racial	Idade (meses)	Sexo	Comprimento Do Pelame	Piodermite	Otodemodicidose	Pododemodicidose	Prurido	Início do Quadro	Número de consultas para o 1º EPRC negativo	Número de consultas para a alta clínica	1º EPRC negativo (semanas)	Alta clínica (semanas)
Amy	201167	SRD	6	F	C	PP	-	-	-	J	6	8	21	30
Apolo	197632	Bulldogue Ingles	72	M	C	PS	-	P	-	A	5	7	14	23
Billy	198879	Dálmata	15	M	C	PS	-	-	P	J	5	7	19	28
Billy preto	197103	Dálmata	15	M	C	PS	P	-	P	J	2	4	5	16
Hans	191342	Bull Terrier	51	M	C	PP	-	P	P	A	3	5	10	19
July	198130	Lhasa Apso	30	M	L	PS	-	-	-	A	4	6	16	22
Liona	197114	Pastor Alemão	58	F	L	PP	-	-	-	J	3	5	12	21
Marcelo	200515	Pug	20	M	C	-	-	-	P	J	5	7	19	27
Marley	198492	Labrador	3	M	C	-	P	-	P	J	2	4	5	16
Meg	201683	Pug	8	F	C	PP	-	-	P	J	4	6	14	23
Nick	203152	Yorkshire Terrier	8	M	L	PS	P	-	P	J	3	5	10	19

(conclusão)

Animal	Prontuário	Definição racial	Idade (meses)	Sexo	Comprimento Do Pelame	Piodermite	Otodemodicidose	Pododemodicidose	Prurido	Início do Quadro	Número de consultas para o 1º EPRC negativo	Número de consultas para a alta clínica	1º EPRC negativo (semanas)	Alta clínica (semanas)
Onix	178401	SRD	48	M	C	-	-	-	-	J	3	5	10	20
Penelope	202999	Boxer	6	F	C	PS	P	-	P	J	4	6	14	20
Phyto	197104	Dálmata	15	M	C	PS	P	-	P	J	2	4	5	16
Pingo	202725	Cocker spaniel	60	M	L	PS	P	P	P	A	3	5	9	18
Spyke	201217	Bulldogue Ingles	6	M	C	PS	-	-	P	J	3	5	9	18

Nota: M = macho C = pelame curto J = quadro juvenil
F= fêmea L = pelame longo PS = piodermite superficial
EPRC: = exame parasitológico de raspado cutâneo

A = quadro adulto
PP = piodermite profunda

P = presente
- = ausente

Quadro 1 - Animais com demodicidose generalizada, constituintes do Grupo Experimental, atendidos no Serviço de Dermatologia do VCM e HOVET/USP, segundo os dados de identificação, manifestações clínicas, do diagnóstico, evolução do quadro clínico e alta (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010

Gráfico 1 - Distribuição (%) dos espécimes caninos com perfeita definição racial, acometidos por demodicidose generalizada. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010

Em relação a caracterização sexual dos animais incluídos no projeto, evidenciou-se predomínio de machos (12 – 75%), em relação às fêmeas (4 – 25%). Os animais de pelame curto (12 – 75%), prevaleceram, comparativamente, aos cães de manto piloso longo (4 – 25%).

Quanto ao início de manifestação da demodicidose, 12 (86%) animais apresentaram o quadro, ainda, na fase juvenil, e apenas quatro (84%) eram de demodicidose da faixa etária adulta. Destaque-se que, dentre os animais classificados como quadro adulto, dois deles (July, Apolo), foram adquiridos pelos seus proprietários tardiamente, sendo desconhecido a história pregressa da doença.

Quanto a faixa etária dos animais com demodicidose, dez (62%) estavam na faixa de idade até 24 meses, cinco (31%) entre 26 a 71 meses e um (6%) com idade igual ou superior a 72 meses.

Os animais com sarna demodécica generalizada, apresentaram desde o acometimento de extensas regiões corpóreas até quadro lesional universal, caracterizadas por alopecia, eritema, descamação, presecção de comedos e cilindros foliculares, pápulas, pústulas, crostas melicéricas e hemáticas e, por vezes, hiperqueratose e hiperpigmentação. Naqueles animais com infecção bacteriana considerada profunda, também, evidenciou-se a presença de tratos fistulosos, com exsudação piossanguinolenta e edema. O prurido, de intensidade de leve a moderada, foi referido em 11 (69%) dos animais na primeira consulta, sobretudo

naqueles animais que apresentaram piodermite. As típicas otodemodicidose e pododemodicidose, foram observadas respectivamente, em 38% (seis) e 19% (três) dos casos.

Dos 16 animais com demodicidose, arrolados no Grupo Experimental, 13 (81%) também apresentavam manifestações de piodermite concomitante ao quadro de sarna demodécica. Dentre estes, a piodermite superficial (Figura 1) foi observada em nove animais (69%), enquanto que a infecção, dita profunda (Figura 2), foi identificada apenas em quatro (31%) deles.

Figura 1 – Animal (Billy prontuário HOVET: 198879) com sarna demodécica generalizada e piodermite superficial: Dálmata, 15 meses de idade. Apresentando áreas alopecica circunscritas e disseminadas, de aspecto eritemato- descamativo, quando a primeira consulta. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010

Figura 2 – Animal (Amy, prontuário HOVET: 201167) com sarna demodécica generalizada e piodermite profunda: SRD, 8 meses de idade. Apresentando quando da primeira consulta: alopecia, intenso eritema, exsudado purulento e crostas hemo-melicéricas em região cervical ventral. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010

Os animais com demodicose foram acompanhados, mensalmente, por meio de exames físico, dermatológico, parasitológico e complementares, até o estabelecimento da alta clínica. O número de consultas necessárias, para que se obtivesse o primeiro exame parasitológico negativo, e para que se alcançasse a alta clínica, foi variável entre os animais do Grupo Experimental, sendo o número médio, respectivamente de, quatro e seis consultas.

Com o protocolo terapêutico empregado, o período médio para obtenção do primeiro exame parasitológico cutâneo negativo foi de 12 semanas (5 – 21 semanas), enquanto que o período médio para o estabelecimento da alta clínica, foi de 21 semanas (16-30 semanas). Os efeitos adversos à lactona macrocíclica empregada, foram observados em apenas um (6%) animal (Liona), que apresentou prostração, incoordenação motora e sonolência, que cessaram após a redução da dosagem do acaricida.

Já, o Grupo Controle foi composto por 30 cães hígidos, segundo a avaliação resultante dos exames físico e laboratorial. Não houve distinção sexual entre os animais do Grupo Controle. Neste Grupo, 19 (63%) animais apresentavam definição racial precisa, englobando caninos com raças semelhantes àsquelas observadas no Grupo Experimental, tais como: Boxer, Cocker Spaniel, Dálmata, Bulldogue Inglês, Labrador, Pug, Lhasa Apso, Pastor Alemão. A faixa etária dos animais do Grupo Controle, variou entre cinco e 84 meses, sendo que 12 (40%) deles apresentavam até 24 meses de idade. No quadro 2, dispõem-se os 30 animais constituintes do

Grupo Controle, reunidos no período de novembro de 2008 a dezembro de 2009, segundo a identificação, definição racial, faixa etária (em meses) e caracterização do manto piloso. Os resultados dos exames complementares, tais como: hemograma e bioquímica sérica estão dispostos, respectivamente, nos apêndices de K a L.

Número	Animal	Definição Racial	Sexo	Idade (meses)	Comprimento do pelame
1	Bobi	Teckel	M	108	C
2	Boris	Bulldogue Inglês	M	8	C
3	Boris	SRD	M	36	C
4	Bone	Boxer	M	6	C
5	Branca	Lhasa Apso	F	30	L
6	Branquinha	SRD	F	84	C
7	Bruttus	Bulldogue	M	72	C
8	Jaque	SRD	F	24	C
9	Juca	SRD	M	60	L
10	Kelsin	Cocker	M	28	L
11	Lola	SRD	F	12	C
12	Luft	Labrador	M	60	C
13	Maezinha	SRD	F	36	C
14	Minie	Beagle	F	24	C
15	Mushu	Lhasa Apso	M	28	L
16	Myries	Pug	F	6	C
17	Napoli	Cocker	M	60	L
18	Nutella	Bulldogue Inglês	F	7	C
19	Panda	Dálmata	F	24	C
20	Pink	Pug	F	48	C
21	Rambo	SRD	M	12	C
22	Serena	SRD	F	96	C
23	Simon	Labrador	M	5	C
24	Theo	Teckel	M	15	C
25	Tosca	SRD	F	48	C
26	Vicky	Poodle	F	60	C
27	Vicky	Dálmata	F	24	C
28	Ziggy	SRD	M	84	L
29	Zuinha	SRD	F	48	C
30	Wolf	Pastor	M	48	L

SRD = sem definição racial M=macho F= fêmea L = pelame longo C = pelame curto

Quadro 2 – Animais hígidos, constituintes do Grupo Controle, segundo os dados de identificação, de definição racial e sexual, de faixa etária e da caracterização do manto piloso. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010

5.2 QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS SANGUÍNEOS PERIFÉRICOS

A média dos valores, absolutos e relativos, o desvio-padrão, e a variação, máxima e mínima, dos linfócitos totais, linfócitos TCD4+, linfócitos TCD8+, e da razão TCD4+:TCD8+, dos animais dos Grupos Controle e Experimental, ao longo das consultas (primeira e segunda consulta, consulta de obtenção do primeiro exame parasitológico negativo e naquela de estabelecimento da alta clínica), estão dispostos na tabela 1. Nos apêndices de N a Q, estão dispostos os valores individuais da quantificação dos linfócitos sanguíneos periféricos dos animais do Grupo Controle e Experimental, em todas as quatro consultas de observação pré-estabelecidas.

Todos estes parâmetros, foram submetidos à análises estatísticas comparativas entre os Grupos (Controle e Experimental) e entre as diferentes consultas pré-estabelecidas deste último Grupo, quais sejam: primeira e segunda consulta, consulta da obtenção do primeiro exame parasitológico cutâneo negativo e consulta naquela onde a alta clínica foi estabelecida.

Nas análises entre o Grupo Experimental, somente os valores absolutos e relativos dos linfócitos TCD4+ apresentaram distribuição normal em todas as consultas, sendo analisado pelo modelo geral linear para as medidas repetidas (análise de variância), seguida do cálculo das diferenças através do LSD (Least Significant Difference). Os demais parâmetros, de distribuição não paramétrica, foram analisados através do teste de Friedman, seguido do teste de Wilcoxon.

Tabela 1 - Valores absolutos e relativos médios, desvio-padrão, e variação máxima e mínima, dos linfócitos totais, linfócitos TCD4+, linfócitos TCD8+, e da razão TCD4+:TCD8+, dos animais do Grupo Controle e do Grupo Experimental, na primeira e segunda consulta, na consulta de obtenção do primeiro exame parasitológico negativo e naquela do estabelecimento da alta clínica. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010

Parâmetros Linfocitários		GRUPO CONTROLE			GRUPO EXPERIMENTAL											
					Primeira Consulta			Segunda Consulta			1º EPRC negativo*			Consulta da alta clínica		
		Média	DV	Variação	Média	DV	Variação	Média	DV	Variação	Média	DV	Variação	Média	DV	Variação
Linfócitos totais	N	2814	1541	7350-1053	1867	1220	4872-438	2238	833	3724-688	2738	1148	4752-990	2058	947	3906-595
	%	27,3	11,0	50-10	14,4	11,6	41-2	20,25	6,9	36-8	25,1	11,3	48-10	21,5	10,6	42-7
Linfócitos TCD4+	N	880	484	2235-287	618	408	1673-180	737	225	1142-296	962	370	1874-437	690	357	1408-199
	%	33,2	10,5	58,4-13,4	34,4	10,4	59,3-19,1	35,1	9,8	57-16,3	36,5	7,4	51,1-25,3	34,9	11,2	58,4-13,4
Linfócitos TCD8+	N	636	626	3008-100	411	337	1478-126	497	206	993-150	600	393	1858-233	421	354	1656-126
	%	20,5	9,8	49-9,5	23,0	9	44,3-10,1	23,7	9,6	43,8-10,5	21,8	7,3	39,1-10,5	19,9	7,3	42,4-11,6
Razão TCD4+: TCD8+	N	1,90	0,981	3,96 -0,39	1,77	1,05	4,75 – 0,54	1,70	0,74	3,29 -0,55	1,83	0,62	3,08-0,67	1,89	0,72	3,96-0,58

M = média DV= desvio- padrão Variação = variação máxima e mínima * consulta de obtenção do primeiro exame parasitológico cutâneo negativo

As figuras 3 e 4, meramente ilustram a resultante do procedimento de quantificação dos linfócitos sanguíneos periféricos realizado no software Flow Jo.

Figura 3 - Células mononucleares do sangue periférico pela citometria de fluxo: seleção da população linfocitária segundo as características celulares de tamanho e granulocidade. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010

Figura 4 - Quantificação dos linfócitos sanguíneos periféricos pela citometria de fluxo: dois cães com sarna demodéica generalizada. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010

5.2.1 Valores absolutos de linfócitos totais

Os valores absolutos médios dos linfócitos totais não diferiram significativamente entre os Grupos. Porém, no Grupo Experimental, os valores dos linfócitos totais, permaneceram inferiores aqueles do Grupo Controle, em todas as consultas.

No Grupo Experimental, na consulta do primeiro exame parasitológico negativo (Gráfico 2), a contagem média dos linfócitos totais foi, significativamente, superior daquela observada na primeira consulta e na alta clínica ($p\text{-value} \geq 0,05$).

* p- value <0,05 : entre a consulta correspondente ao primeiro exame parasitológico negativo e a primeira consulta e àquela da alta clínica, do Grupo Experimental

Gráfico 2 – Valores absolutos médios, e variação mínima e máxima, dos linfócitos totais dos animais do Grupo Controle e, nas quatro consultas de avaliação pré-estabelecidas do Grupo Experimental. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010

5.2.2 Valores relativos dos linfócitos totais

Em relação ao número relativo de linfócitos sanguíneos periféricos, observou-se que os valores da primeira e da segunda consulta do Grupo Experimental, diferiram significativamente (p-value <0,05) daqueles evidenciados no Grupo controle, bem como daqueles resultantes da consulta de obtenção do primeiro exame parasitológico negativo e da alta clínica, dos animais do Grupo Experimental (Gráfico 3).

*p-value <0,05: entre a primeira consulta e o Grupo Controle, e entre os demais momentos de observação do Grupo Experimental

**p-value <0,05: entre a segunda consulta e o Grupo Controle, e entre a consulta do primeiro exame parasitológico negativo do Grupo Experimental

Gráfico 3 – Valores relativos médios, e variação mínima e máxima, dos linfócitos totais dos animais do Grupo Controle e nas quatro consultas de avaliação pré-estabelecidas, do Grupo Experimental. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010

5.2.3 Valores absolutos dos linfócitos TCD4+

Foi evidenciado diminuição significativa do número absoluto médio dos linfócitos TCD4+, entre os cães dos Grupos Controle e Experimental, apenas no momento da primeira consulta. Porém, observou-se que os valores deste parâmetro permaneceram inferiores ao Grupo Controle em todas as outras consultas do Grupo Experimental, exceto naquela do primeiro exame parasitológico negativo, onde a contagem média dos linfócitos TCD4+ foi discretamente superior ao Grupo Controle.

Entre as diferentes consultas do Grupo Experimental, pode-se observar, que a contagem média do número dos linfócitos TCD4+ (Gráfico 4), no momento do primeiro exame parasitológico negativo foi superior, diferindo significativamente, das outras observações.

*p- value <0,05: entre a primeira consulta do Grupo Experimental e Grupo Controle

** p-value <0,05: entre a consulta do primeiro exame parasitológico negativo e as demais consultas do Grupo Experimental

Gráfico 4 – Valores absolutos médios, variação mínima e máxima, dos linfócitos TCD4+, dos animais do Grupo Controle e nas quatro consultas de avaliação pré- estabelecidas do Grupo Experimental. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010

5.2.4 Valores relativos de linfócitos TCD4+

Não foram observadas diferenças significativas, no que tange aos valores percentuais de linfócitos TCD4+, entre os animais do grupo Controle e Grupo Experimental, e tampouco entre as distintas consultas de avaliação deste último Grupo (Gráfico 5).

Gráfico 5 – Valores relativos médios, variação mínima e máxima, dos linfócitos TCD4+, dos animais do Grupo Controle, e nas quatro consultas de avaliação pré-estabelecidas, do Grupo Experimental. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010

5.2.5 Valores absolutos dos linfócitos TCD8+

Não houve diferença significativa entre os valores absolutos médios do linfócitos TCD8+ entre os Grupos Controle e Experimental. No Grupo experimental, a contagem de linfócitos TCD8+, na consulta do primeiro exame parasitológico cutâneo negativo, foi superior em relação a primeira consulta e a alta clínica (Gráfico 6).

*p- value <0,05: entre a consulta do primeiro exame parasitológico negativo e a primeira consulta e a alta clínica do Grupo Experimental.

Gráfico 6— Valores absolutos médios, variação mínima e máxima, dos linfócitos TCD8+, dos animais do Grupo Controle e nas quatro consultas de avaliação pré-estabelecidas do Grupo Experimental. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010

5.2.6 Valores relativos dos linfócitos TCD8+

Não foram evidenciadas diferenças significativas entre a percentagem de linfócitos TCD8+ dos animais do Grupo Controle em relação ao Grupo Experimental e tampouco entre as diferentes consultas do Grupo Experimental (Gráfico 7).

Gráfico 7 – Valores relativos médios, variação mínima e máxima, dos linfócitos TCD8+, dos animais do Grupo Controle e nas quatro consultas de avaliação pré-estabelecidas do Grupo Experimental. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010

5.2.7 Valores da razão entre os linfócitos TCD4+ : TCD8+

A razão entre os linfócitos TCD4+ : TCD8+, não revelou diferenças significativas entre os animais dos Grupos Controle e Experimental. Também não foram observadas diferenças significativas, entre as diferentes consultas de observação do Grupo Experimental (Gráfico 8).

Gráfico 8 – Valores absolutos médios, variação mínima e máxima, da razão entre os linfócitos TCD4+: TCD8+, dos animais do Grupo Controle e nas quatro consultas de avaliação pré-estabelecidas do Grupo Experimental. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010

5.3 CORRELAÇÃO ENTRE A CONTAGEM DE ÁCAROS E OS VALORES ABSOLUTOS E RELATIVOS MÉDIOS DE LINFÓCITOS TCD4+, TCD8+, E DA RAZÃO TCD4+ : TCD8+.

A correlação entre a contagem de ácaros observada no momento do diagnóstico e os valores absolutos médios de linfócitos TCD4+, TCD8+ observados na primeira consulta, demonstrou-se elevada (Tabela 2), porém não significativa ($p\text{-value} \geq 0,05$).

Tabela 2 - Correlação entre a contagem de ácaros observadas na primeira consulta dos animais com demodicidose e os valores, absolutos e relativos, dos linfócitos TCD4+, TCD8+, e da razão TCD4+ : TCD8+. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010

Parâmetros		Valor da correlação	p-value
Linfócitos TCD4+	N	-0,869	0,329
	%	-0,875	0,321
Linfócitos TCD8+	N	-0,923	0,251
	%	0,355	0,769
Razão TCD4+:TCD8+	N	-0,149	0,905

No gráfico 9, é representada a evolução do número absoluto dos linfócitos TCD4+, TCD8+, e da contagem total de ácaros evidenciada no exame parasitológico de raspado cutâneo, da primeira consulta até o estabelecimento da alta clínica dos animais com demodicose generalizada.

Gráfico 9 - Evolução dos valores absolutos dos linfócitos TCD4+, TCD8+, e da contagem total de ácaros, do momento do diagnóstico até a alta clínica, dos animais com demodicose generalizada. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010

5.4 RELAÇÃO ENTRE A QUANTIFICAÇÃO DOS LINFÓCITOS SANGUÍNEOS PERIFÉRICOS ENTRE AS SEMANAS NECESSÁRIAS PARA O ESTABELECIMENTO DA ALTA CLÍNICA.

Os valores obtidos na contagem de linfócitos TCD4+, TCD8+ e da razão TCD4+ : TCD8+, não apresentaram relação significativa com o período necessário para o estabelecimento da alta clínica, segundo os cálculos de regressão linear, realizados na primeira (Tabela 3) e na última consulta (Tabela 4), entre os valores, absolutos e relativos, de linfócitos TCD4+, TCD8+ e da razão TCD4+ : TCD8+, e as semanas necessárias para o estabelecimento da alta clínica.

Tabela 3 – Cálculo de regressão linear entre os linfócitos TCD4+, TCD8+, e da razão TCD4+ : TCD8+, observados na primeira consulta dos animais com demodicidose generalizada em relação as semanas necessárias para o estabelecimento da alta clínica. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010

Parâmetros		Coeficientes	Erro padrão	t	p-value
Linfócitos TCD4+	N	0.000	.007	-.055	.957
	%	0.272	.188	1.448	.178
Linfócitos TCD8+	N	0.011	.008	1.384	.197
	%	-.562	.258	-2.178	.054
Razão TCD4+:TCD8+	N	-4.435	3.099	-1.431	.183
Constante		27.975	5.816	4.810	.001

Tabela 4 – Cálculo de regressão linear entre os linfócitos TCD4+, TCD8+, e da razão TCD4+ : TCD8+, observados na última consulta dos animais com demodicidose generalizada em relação as semanas necessárias para o estabelecimento da alta clínica. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010

Parâmetros		Coeficientes	Erro padrão	t	p-value
Linfócitos TCD4+	N	-.011	.011	-.927	.376
	%	0.656	.707	.928	.375
Linfócitos TCD8+	N	0.020	.021	.945	.367
	%	-1.081	1.248	-.866	.407
RTCD4+:TCD8+	N	-8.184	9.818	-.834	.424
Constante		33.846	17.399	1.945	.080

6 DISCUSSÃO

6.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRAGEM E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A caracterização dos animais com demodicose generalizada (Quadro 1), em relação as definições racial e etária, comprimento do manto piloso observados no Grupo Experimental, estão em concordância com os dados dispostos na bibliografia especializada. Os animais de raça definida, foram os mais acometidos, sendo as raças observadas, dentre os animais incluídos neste estudo, similares àquelas previamente relatadas como predispostas ao desenvolvimento de demodicose, tais como: Dálmata, Bulldogue Inglês, Pug, Pastor Alemão, Lhasa Apso, Cocker Spaniel, Boxer (MILLER; WELLINGTON; SCOTT, 1992; LEMARIE; HOSGOOD; FOIL, 1996; SCOTT; MILLER JR.; GRIFFIN, 2001; GROSS et al., 2005).

Aparentemente, observou-se predomínio de machos em relação as fêmeas, porém, quando a análise da definição racial é estendida para o conjunto de animais com demodicose, incluídos e excluídos, acompanhados durante o período experimental, o percentual de fêmeas eleva-se para 40%, ao invés dos 25% observados no conjunto de animais que finalizaram o projeto.

Mais uma vez, a percentagem de manifestação do quadro de demodicose na fase juvenil, sobrepôs-se àquela da fase adulta, sendo a faixa etária de até 24 meses a mais acometida, tal como já relatado por distintos autores (LEMARIE; HOSGOOD; FOIL, 1996; SCOTT; MILLER JR.; GRIFFIN, 2001).

A frequente associação das infecções bacteriana aos casos de demodicose generalizada já é relatada de longa data e assim, tal como o disposto na bibliografia especializada, no presente estudo, também foi ela evidenciada na grande maioria dos casos. Ressalta-se, ainda, que a maior parte dos animais incluídos no presente trabalho, passaram por atendimento veterinário prévio (13 – 81%), tendo sido submetidos a distintos protocolos terapêuticos sem sucesso, sendo então conduzidos ao Serviço de Dermatologia da FMVZ/USP em fase mais avançada da doença, o que pode explicar a frequente associação de piodermite nos animais com demodicose generalizada deste estudo (SCOTT; MILLER JR.; GRIFFIN, 2001).

O período médio para obtenção do primeiro exame parasitológico negativo de 12 semanas e para o estabelecimento da alta clínica de 21 semanas, foi semelhante àquele relatado por outros autores. Poucos foram os efeitos colaterais advindos do uso deste protocolo terapêutico, que uma vez mais, provou-se ser eficaz, prático e seguro (PARADIS, 1999; MULLER, 2004; DELAYTE et al., 2006; GORTEI, 2006; PARADIS, 2008).

6.2 QUANTIFICAÇÃO DOS LINFÓCITOS SANGUÍNEOS PERIFÉRICOS

Os parasitas, de forma geral, são reconhecidos pela sua capacidade peculiar de modular a resposta imune do hospedeiro, de forma a garantir sua sobrevivência. Uma infecção “bem sucedida”, é aquela que garante a permanência do parasita no hospedeiro sem contudo prejudicá-lo a ponto de culminar em sua morte, de forma a garantir, por um período mais longo possível, a perpetuação de seu ciclo de vida. Os hospedeiros, por sua vez, na sua luta contra os patógenos, objetivam elaborar uma resposta imune eficaz, capaz de reconhecê-los, limitá-los e/ou eliminá-los, sem contudo gerar uma resposta nociva para si próprio (WIKEL, 1984; WIKEL, 1999; WIKEL; ALARCON-CHAIDEZ, 2001, BELKAID; SUN; BOULADOX, 2006; TIZARD, 2009).

Durante o processo evolutivo, os parasitas desenvolveram mecanismos de evasão da resposta imune humoral e celular eliciada. Diversas são as estratégias utilizadas pelos parasitas para este fim, tais como: variação antigênica, interferência no processo de apresentação de antígenos, alteração das respostas linfocitárias, modulação do sistema complemento, alteração da produção ou indução de citocinas, imunossupressão ou imunotolerância. Durante uma infecção parasitária, a modulação do sistema imune do hospedeiro, pelo parasita, é alcançada através de interações complexas entre o parasita, seus produtos e as respostas imunes, inata e adquirida, do suscetível, visando recriar um ambiente propício para sua perpetuação (WIKEL, 1984; WIKEL; ALARCON-CHAIDEZ, 2001; BELKAID; SUN; BOULADOX, 2006).

O ácaro *Demodex canis*, assim como é bem peculiar a outros parasitas, demonstra evidências de possuir a capacidade de modular o sistema imune canino

(WIKEL, 1984). A infestação por este ácaro, tem sido repetidamente associada à diminuição da resposta dos linfócitos sanguíneos periféricos à distintos mitógenos, tal como o evidenciado pelos testes de linfoblastogênese *in vitro* e ao teste intradérmico (SCOTT; FARROW; SCHULTZ, 1974; SCOTT; BAKER; SCHULTZ, 1976; HEALEY; GAAFAR, 1977; BARRIGA, et al., 1992; PAULIK et al., 1996 a, b; MOJZISOVÁ, et al., 1999). O soro de animais com demodicidose, em franca fase da doença, também exibem capacidade de imunossuprimir linfócitos de animais saudáveis, sugerindo que o ácaro *Demodex canis*, seria capaz de produzir ou induzir um fator imunossupressor (CORBETT et al., 1975; HIRSH et al., 1975; SCOTT; BAKER; SCHULTZ, 1976; MILLER, 1979).

A quantificação dos linfócitos sanguíneos periféricos é utilizada como forma de se avaliar a imunocompetência e de caracterizar a resposta imune suscitada durante os processos infecciosos (BYNE et al., 2000; CHABANE et al., 2000; TARRANT, 2005). Estudos sobre a quantificação de linfócitos sanguíneos periféricos em cães com demodicidose, revelam tanto o aumento (BURKETT et al., 1996) quanto a diminuição da razão entre os linfócitos TCD4⁺ : TCD8⁺ (CASWELL et al., 1997; FUKATA et al., 2005), sugerindo que estas subpopulações sofreriam alterações durante a parasitose por este ácaro. Estudos realizados, em pacientes humanos acometidos por demodicidose, que utilizaram esta metodologia, demonstraram que os linfócitos sanguíneos periféricos e suas diferentes subpopulações parecem ser moduladas por estes ácaros (AKILOV; KAZANCEVA; VLASOVA, 2001; AKILOV; MUNCUOGLU, 2004; EL-BASSIOUNI et al., 2005; MUNCUOGLU; AKILOV, 2005).

Em linhas gerais, no presente estudo, foram observados valores absolutos médios de linfócitos totais, linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺ nos cães do Grupo Experimental, inferiores àqueles do Grupo Controle ($p - \text{value} \leq 0,05$), em todos os momentos de observação. Nos animais com demodicidose, observou-se a elevação de todos estes parâmetros, entre o momento do diagnóstico (primeira consulta) até a obtenção do primeiro exame parasitológico negativo, quando tais valores mais se aproximaram daqueles observados no Grupo Controle, ao mesmo tempo que, paralelamente, foi evidenciada alta correlação entre a diminuição da contagem total de ácaros e a elevação do número absoluto de linfócitos totais, TCD4⁺, TCD8⁺ (Tabela 2). Estes achados, podem sugerir uma possível ação moduladora do ácaro *Demodex canis* sobre sistema imune, não sendo contudo capaz de suprimí-lo.

Distintos trabalhos em que se estudaram pacientes humanos, infestados por *D. folliculorum* e *D. brevis*, demonstraram diminuição significativa dos valores dos linfócitos TCD3+, TCD4+, TCD8+ e células NK, quando comparados a grupo controles (AKILOV; KAZANCEVA; VLASOVA, 2001; AKILOV; MUNCUOGLU, 2004; EL-BASSIOUNI et al., 2005; MUNCUOGLU; AKILOV, 2005), permitindo que se concluísse que o ácaro parece ser capaz de modular a resposta imune do hospedeiro em prol de seu próprio benefício e, ainda que, estes linfócitos parecem ser o alvo da imunossupressão eliciada pelos ácaros (EL-BASSIOUNI et al., 2005).

Pôde-se observar que o número absoluto de linfócitos TCD4+, no momento do diagnóstico da demodicose (primeira consulta), diferiu significativamente ($p < 0,05$), quando comparado ao Grupo Controle e com a consulta de obtenção do primeiro exame parasitológico negativo (Gráfico 4) o que, também, pode sugerir uma possível ação moduladora do ácaro sobre esta população. Permite-se, ainda, comentar que no momento da primeira consulta, grande parte dos animais (81%) do Grupo Experimental, apresentavam quadro de piodermite, superficial ou profunda, concomitante à demodicose, podendo ser a infecção bacteriana e não o ácaro, a responsável pela diminuição dos valores dos linfócitos TCD4+. Barta et al. (1983), em seu estudo, somente observaram imunossupressão, no teste de linfoblastogênese *in vitro*, em cães com demodicose associada à infecção bacteriana, concluindo que esta, seria conseqüente à infecção bacteriana e não decorrente da infestação pelo *Demodex canis*.

No presente estudo, após o tratamento e resolução do quadro de piodermite, a contagem de linfócitos TCD4+, aumentou nos animais com demodicose, conforme evidenciado na segunda consulta, permanecendo, contudo, com valores inferiores ao observado no Grupo Controle (Gráfico 4). Somente no momento do primeiro exame parasitológico negativo, o número de linfócitos TCD4+, aumentou de forma a sobrepujar àquele do Grupo Controle. Burkett et al. (1996) evidenciaram que a resposta dos linfócitos de cães com demodicose associado à infecção bacteriana, encontrava-se suprimida ao teste de linfoblastogênese *in vitro* e que a instituição de terapia, com antibióticos com a conseqüente resolução do quadro de piodermite, era capaz de aumentar a resposta linfocitária, sem contudo, igualá-la ao seu grupo controle. Segundo as conclusões daqueles autores, tanto as infecções bacterianas, quanto os ácaros poderiam influenciar as populações linfocitárias.

Burkett et al. (1996), também, observaram aumento significativo da razão entre os linfócitos TCD4⁺ : TCD8⁺, nos animais com demodicidose generalizada associada à infecção bacteriana e relataram que após o tratamento e resolução do quadro bacteriano, alguns animais apresentaram diminuição desta proporção, enquanto, outros, permaneceram com a razão elevada entre estas supopulações de linfócitos.

Os linfócitos TCD4⁺, são células que apresentam funções efectoras e regulatórias que são cruciais para a integridade do sistema imune, sendo capazes de orquestrar a resposta imune, através da secreção de distintas citocinas, que resultam na ativação de diversos mecanismos, humorais e celulares, contra os patógenos. A diminuição dos linfócitos TCD4⁺ é capaz de influenciar nas respostas, do sistema imune inato e adquirido (SHER; COFFMAN, 1992).

A imunossupressão relativa aos linfócitos T, observada nos pacientes humanos com demodicidose foi associada à apoptose linfocitária por Akilov e Mumcuoglu (2004). Tais autores evidenciaram que, além da diminuição dos linfócitos TCD3⁺, TCD4⁺, TCD8⁺ e células NK, a apoptose linfocitária era duas e meia vezes maior nos pacientes com demodicidose em relação ao grupo controle. Nos indivíduos acometidos, o aumento da apoptose, correlacionava-se positivamente com o incremento da densidade acariana, concluindo aqueles autores, que os ácaros poderiam ser os responsáveis pela indução da apoptose linfocitária, resultando em imunossupressão, que permitiria, conseqüentemente, sua sobrevivência no hospedeiro.

Akilov e Mumcuoglu (2003) formularam, ainda, a hipótese, de que as células NK seriam importantes no combate e na eliminação do parasita. Nos pacientes humanos, portadores de genótipos susceptíveis ao desenvolvimento de demodicidose, foi demonstrada correlação positiva com baixos valores de células NK. Akilov e Mumcuoglu (2004) evidenciaram diminuição do número de células NK em pacientes com demodicidose e, também, observaram correlação positiva entre o aumento da população de ácaros, com o incremento das células NK, sugerindo a participação destas no combate ao parasita. Segundo Akilov e Mumcuoglu (2003) a desintegração de partes dos ácaros, resultaria na ativação das células NK, que, em suas ações de combate ao parasita, acarretaria danos não somente aos ácaros mas, também, a população de linfócitos comprometidas com sua eliminação

É reconhecido que, os linfócitos T e células NK ativadas, em suas respostas efectoras, secretam citocinas do tipo IFN- γ , TNF- α , além de perforinas e granzimas, capazes de induzir apoptose (WINAU et al., 2005). Os helmintos, pelo seu grande tamanho, não são passíveis de serem eliminados através de mecanismos de fagocitose, resultando na ativação de mecanismos potentes e até tóxicos para sua eliminação (MEEUSEN, 1999; TIZARD, 2009). Portanto, é plausível, que o mesmo ocorra com o *Demodex canis*, que à semelhança dos helmintos, é um parasita de grande porte, de comportamento extracelular, revestido por uma cutícula resistente, cuja eliminação constitui-se em um grande desafio para o hospedeiro. No presente estudo a contagem de células NK não foi realizada, sendo desconhecida se, as alterações observadas nas pesquisas conduzidas em pacientes humanos acometidos por demodicose em relação as células NK, também, seriam observadas em cães com demodicose.

Outras evidências da capacidade de modulação da resposta imune pelo ácaro foram demonstradas por Corbett et al. (1975); Hirsh et al. (1975) e Scott, Baker e Schultz (1976). Tais autores, observaram que soro de animais com demodicose suprimiam a resposta linfocitária à mitógenos, tanto em animais enfermos quanto naqueles hígidos. Também observaram que, após a remissão do quadro clínico de demodicose, estes soros perdiam o potencial de imunossupressão, sugerindo, os autores, que os ácaros seriam responsáveis pela produção ou indução de um fator imunossupressivo, cuja natureza permanece até hoje incerta. Uma estratégia comum de evasão da resposta imune utilizada pelos parasitas, é a modulação dos mecanismos de regulação do sistema imunológico, que pode ser alcançado através da indução direta de citocinas, tais como: como IL10 e TGF- β , que apresentam propriedades antiinflamatórias, e atuam de forma a prevenir as respostas imunopatológicas, mantendo a homeostase do hospedeiro. O aumento da expressão destas citocinas proporciona condições favoráveis à sobrevivência e disseminação dos parasitas. É reconhecido que em grande número de infecções parasitárias, linfócitos T regulatórios, produtores de IL10 e TGF-beta, são gerados a partir de linfócitos T convencionais presentes nos tecidos, frente à condições específicas, tais como: exposição repetitiva de antígenos, apresentação de antígenos “inadequados”, e presença de IL10, situações estas evidenciadas nas infecções parasitárias, em que o sistema imune é cronicamente exposto a antígenos parasitários (BELKAID; SUN; BOULADOUX, 2006). Tani et al. (2002) evidenciaram

aumento da expressão de RNA mensageiro da citocina TGF-beta, em cães com sarna demodécica generalizada, seguida da diminuição desta expressão naqueles cães que apresentaram remissão do quadro clínico. Também observaram discreta diminuição da expressão de RNA mensageiro das citocinas TNF- α e IFN- γ nos animais enfermos. Lemarie e Horovov (1996), evidenciaram diminuição da expressão da interleucina-2 e de seu receptor, na superfície dos linfócitos de animais com demodicidose generalizada, citocina esta passível de ser inibida pela TGF-beta. Segundo Tani et al. (2005), o aumento de TGF- β poderia estar associado à imunossupressão observada em cães com demodicose. Quiçá poderia ser esta citocina o fator imunossupressivo, pressupostamente, presente no soro de animais com demodicose, relatado por outros autores (CORBETT et al., 1975; HIRSH et al., 1975; SCOTT; BAKER; SCHULTZ, 1976).

Os linfócitos TCD8+, têm sido associado por alguns autores, como possível partícipe do mecanismo de defesa no combate e eliminação do parasita. Caswell et al. (1997), avaliando as subpopulações de linfócitos sanguíneos periféricos em cães com demodicose, observaram aumento seletivo desta população em três (75%) dos quatro cães por ele estudados. Propuseram então, que a expansão desta subpopulação no sangue periférico, juntamente com a presença de infiltrado linfocitário, com predomínio de linfócitos TCD3+ TCD8+, na parede folicular, comporia um mecanismo importante no controle ao ácaro. Porém, vale ressaltar que, a quantificação de linfócitos sanguíneos periféricos foi realizada em pequeno número de animais por aquele autor, e que o seu grupo controle foi composto por apenas cinco caninos, obtendo valores, absolutos e relativos, de linfócitos TCD8+, bem inferiores, quando comparados àqueles observados no Grupo Controle do presente estudo (14,6% - $0,38 \times 10^9/\mu\text{l}$ *versus* 20,3% - $0,63 \times 10^9/\mu\text{l}$, respectivamente).

Mumcuoglu e Akilov (2005), também associaram os linfócitos TCD8+, com uma maior capacidade de controle e eliminação dos ácaros. Em seus estudos, observaram que, pacientes humanos, com genótipos associados a resistência ao desenvolvimento de demodicidose, que apresentavam valores de linfócitos TCD8+ dentro dos parâmetros de normalidade, manifestavam lesões menos graves e extensas, com menor número de ácaros, ao passo que, pacientes portadores de genótipos associados à susceptibilidade à demodicose, apresentavam valores de linfócitos TCD8+ inferiores, desenvolvendo lesões de maior grau de magnitude, além de maior densidade de ácaros. No presente estudo, os valores absolutos dos

linfócitos TCD8+, nos caninos com demodicose foram, também, inferiores àqueles observados no Grupo Controle, em todos os momentos do seguimento clínico (Gráfico 9), ao mesmo tempo que observou-se aumento significativo do número de linfócitos TCD8+ da primeira consulta até àquela de obtenção do primeiro exame parasitológico negativo.

Os linfócitos TCD8+, além de propiciar um mecanismo protetor, poderiam estar associados a uma resposta imunomediada prejudicial no combate ao parasita, segundo o sugerido por Caswell et al. (1997), que evidenciaram a presença de folliculite mural do tipo liquenóide e apoptose de queratinócitos nas lesões ativas de demodicose.

Alternativamente, a observação, ora evidenciada, de valores absolutos médios inferiores de linfócitos totais, TCD4+, TCD8+ no Grupo Experimental, em relação ao Grupo Controle, poderia ser interpretada como uma consequência ao decurso da demodicose, ao invés de corresponder a uma possível ação moduladora do parasita. A diminuição inespecífica dos linfócitos T e de suas subpopulações, já foi relatada em pacientes humanos hospitalizados com distintas enfermidades, tais como: infecções bacterianas e virais, septicemia, falência múltipla de órgãos, tuberculose, queimaduras e traumatismos. Esta depleção inespecífica dos linfócitos T em quadros de doença aguda, seria consequente ao aumento da marginação e sequestro dos linfócitos nos tecidos, processo dependente da interação dos linfócitos com as moléculas de adesão na superfície das células endoteliais. A expressão destas moléculas é regulada por uma variedade de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, tais como IL-1 e fator de TNF- α . O aumento destas citocinas em pacientes com doença aguda poderia aumentar a expressão destas moléculas de adesão entre linfócitos e células endoteliais, incrementando sua migração e o sequestro dos linfócitos aos tecidos (FEENEY et al., 1995).

A razão entre as subpopulações de linfócitos TCD4+ e TCD8+ não se mostrou alterada entre os cães dos Grupos Controle e Experimental. De igual forma, estudos conduzidos em pacientes humanos com demodicose, também não detectaram alteração desta razão (AKILOV; MUNCUOGLU, 2004; EL-BASSIOUNI et al., 2005; MUNCUOGLU; AKILOV, 2005). Os poucos estudos conduzidos com pacientes caninos, demonstram resultados divergentes. Bukett et al. (1996), estudando cães com sarna demodécica generalizada e piodermite, evidenciaram

aumento da proporção TCD4⁺ : TCD8⁺ previamente à instalação de protocolo terapêutico. Caswell et al. (1997) observaram diminuição desta razão em três dos quatro cães estudados. Fukata et al. (2005), estudando 18 cães com demodicose generalizada (sete cães com a forma juvenil e 11 com quadro adulto), não observaram diferenças significativas desta proporção entre estes dois grupos, porém, em sete dos animais adultos, a proporção foi significativamente menor que àquela dos animais hígidos e com o quadro juvenil. Segundo aqueles autores japoneses, a razão entre estas subpopulações, não se alterou com o tratamento e, nos cães que apresentavam menor razão entre estas células, a doença mostrou-se refratária à terapia. No presente estudo, a razão entre os linfócitos TCD4⁺ : TCD8⁺, não se alterou significativamente com o tratamento e, também, não pôde ser correlacionada com o período de estabelecimento para alta clínica.

Vale ressaltar que, conclusões unicamente apoiadas neste parâmetro, devem ser motivo de cuidadosa reflexão, visto que, a razão entre os linfócitos TCD4⁺ : TCD8⁺, podem encontrar-se dentro dos valores de normalidade, mesmo quando estas populações estejam alteradas (AKILOV; MUMCUOGLU, 2004; EL-BASSIOUNI et al., 2005; MUNCUOGLU; AKILOV, 2005). Além disso, ampla faixa de variação desta proporção é observada na população canina (BURKETT et al., 1996; BYRNE et al., 2000; FALDYNA et al., 2001; HASEGAWA, 2002) estando, também, já demonstrado que a faixa etária dos animais é capaz de influenciar na razão entre estas subpopulações, de tal forma, que animais mais velhos, fisiologicamente, apresentam diminuição desta razão quando comparado a cães jovens (FALDYNA et al., 2001). Assim, conclusões baseadas neste parâmetro, devem ser elaboradas à luz destas peculiaridades.

Uma consideração extremamente importante, quando se pretende avaliar o sistema imune canino, através da determinação dos linfócitos sanguíneos periféricos, de forma a utilizá-los como auxílio diagnóstico e no monitoramento nas doenças infecciosas é que, estes parâmetros, têm se revelado fisiologicamente bastante variáveis na população canina, com ampla gama de valores, desvios padrões e faixa de referências. Estes parâmetros são, também, influenciados por diferenças raciais, etárias e até mesmo sexuais (BYRNE, et al., 2001; HASEGAWA, 2002; TARRANT, 2005; MIRANDA, et al., 2007). Em virtude destas características, a própria composição dos animais dos grupos controle e experimental, podem influenciar nos resultados obtidos, como o já relatado por Faldyna et al. (2001), e

Miranda et al. (2007). Em concordância, com tais autores, neste estudo os valores, absolutos e relativos, dos linfócitos TCD4+ e TCD8+ dos animais constituintes dos Grupos Controle e Experimental, compostos por cães com distintas características raciais,sexuais e etárias, também, mostrou-se bem variável. Esta variação fisiológica, existente entre os linfócitos TCD4+ e TCD8+ na população canina, pode ser uma explicação plausível quanto ao fato de não se ter observado diferenças significativas destes parâmetros.

Quando da alta clínica, os valores dos linfócitos totais, TCD4+, TCD8+, dos animais do Grupo Experimental, diferiram significativamente, daqueles observados no momento do primeiro exame parasitológico negativo, porém, permaneceram dentro da faixa de normalidade para a espécie e sem diferença significativa em relação ao Grupo Controle. Naquele momento, os animais encontravam-se completamente recuperados do quadro lesional tegumentar, sem a evidenciação de ácaros no exame parasitológico cutâneo, já há três meses consecutivos, e plenamente hígidos pela avaliação dos exames físico e subsidiários, sendo esta aparente “queda”, atribuída a variação fisiológica do compartimento linfocitário. Além disso, a evolução destes parâmetros, do Grupo Experimental, após a alta clínica é desconhecida, assim como o é, nos animais do Grupo Controle, que foram analisados em apenas um momento. Análises posteriores destes parâmetros, nestes dois Grupos, auxiliariam a compreensão do comportamento dos linfócitos e facilitariam a compreensão do significado clínico e imunológico deste achado. Burkett et al. (1996), estudando a razão entre os linfócitos TCD4+ : TCD8+ e a atividade linfocitária ao teste de linfoblastogênese *in vitro*, em animais com demodicose, observaram que mesmo após a eliminação dos ácaros e a recuperação do quadro clínico, a supressão dos linfócitos naquele teste, era ainda, evidente sem, também, aquele autor, conseguir explicar o significado clínico da alteração. Concluíram, os autores, que a recidiva do quadro clínico de demodicose, poderia relacionar-se com a persistência da imunossupressão.

Os linfócitos TCD4+ e TCD8+, são importantes células regulatórias e efetoras do sistema imune. A avaliação destas subpopulações é útil na compreensão das respostas imunes contra os parasitas. Os achados deste estudo sugerem que a participação de outros mecanismos, que não a franca alteração destas subpopulações, seriam importantes na patogenia da doença. De forma que, novas pesquisas com o uso de antígeno purificado do *Demodex canis*, afora estudos mais

aprofundandos sobre as subpopulações de linfócitos T auxiliares, tais como pesquisas sobre perfil de citocinas das subpopulações de linfócitos Th1 e TH2, bem como estudos que caracterizem os genótipos dos animais acometidos, em semelhança, aos executados em medicina humana, poderiam fornecer novas pistas sobre a patogenia da demodicidose canina.

7 CONCLUSÃO

Baseando-se nos resultados obtidos, em função da metodologia proposta e adotada, no presente estudo, pôde-se concluir que no geral, não foram observadas diferenças significativas entre os valores, absolutos e relativos, dos linfócitos TCD4+, TCD8+ e da razão TCD4+ : TCD8+, entre os animais do Grupo Controle e Experimental, em todos os momentos de observação do seguimento clínico. Os valores dos linfócitos TCD4+, TCD8+ e da razão TCD4+ : TCD8+ não apresentaram correlação com o período para estabelecimento da alta clínica.

Assim sendo, o uso da determinação dos linfócitos sanguíneos periféricos TCD4+, TCD8+, e da razão TCD4+ : TCD8+, é desaconselhado para o monitoramento da evolução clínica e determinação do prognóstico em relação as semanas necessárias para o estabelecimento da alta clínica dos animais com sarna demodécica generalizada.

REFERÊNCIAS

AKILOV, O. E.; KAZANCEVA, S. V.; VLASOVA, AI. Particular features of immune response after invasion of different species of human *Demodex* mites. **Russian Journal Immunology**, v. 6, n. 4, p. 399-404, 2001.

AKILOV, O. E.; MUMCUOGLU, K. Y. Association between human demodicosis and HLA clas I. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 28, p. 70-73, 2003.

AKILOV, O. E.; MUMCUOGLU, K. Y. Immune responses in demodicosis. **European Academy Dermatology Venereology**, v. 18, p. 440-444, 2004.

BARRIGA, O.O.; AL-KHALIDI N. W.; MARTIN S.; WYMAN, M. Evidence of immunosuppression by *Demodex canis*. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 32, p. 37-46, 1992.

BARTA, O.; WALTMAN, C.; OYEKAN, P. P.; MCGRATH, R. K.; HRIBERNIK, T. N. Lymphocyte transformation suppression caused by pyoderma failure to demonstrate it in uncomplicated demodectic mange. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 6, p. 9-17, 1983.

BELKAID, Y.; SUN, C. M.; BOULADOUX, N. Parasites and immunoregulatory T cells. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, p. 406-412, 2006.

BIRGEL, E. H. Hematologia clínica veterinária. In: CONFERÊNCIA ANUAL DA SOCIEDADE PAULISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1982, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982. p. 50.

BURKETT, G.; FRANK, L. A.; BAILEY, E. M.; SCHMEITZEL, L. P.; KANIA, S.A. Immunology of dogs with juvenile-onset generalized demodicosis as determined by lymphoblastogenesis and CD4:CD8 analysis. **Veterinary Allergy & Clinical Immunology**, v. 4, n. 2, p. 46-52, 1996.

BYRNE, K. M.; KIM, H. W.; CHEW, B. P.; REINHART, G. A.; HAYEK, M. G. A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 73, n. 2, p. 167-182, 2000.

CASWELL, J. L.; YAGER, J. A.; FERRER, L.; WEIR, J. A. M. Canine demodicosis: a re-examination of the histopathologic lesions and description of the

immunophenotype of infiltrating cells. **Veterinary Dermatology**, v. 6, n. 1, p. 9-19, 1995.

CASWELL, J. L.; YAGER, J. A.; PARKER W. M.; MOORE, P. F. A prospective study of the immunophenotype and temporal changes in the histologic lesions of canine demodicosis. **Veterinary Pathology**, v. 34, p. 279-287, 1997.

CHABANNE, L.; BONNEFONT, C.; BERNAUD, J.; RIGAL, D. Clinical applications of flow cytometry and cell immunophenotyping to companion animals (dog and cat). **Method in Cell Science**, v. 22, p. 199-207, 2000.

CHESNEY, C. J. Short form of *Demodex* species mite in the dog: occurrence and measurements. **Journal of Small Animal Practice**, v. 40, p. 58-61, 1999.

CORBETT, R.; BANKS, K.; HINRICHS, D.; BELL, T. Cellular immune responsiveness in dogs with demodectic mange. **Transplantation proceedings**, v. 7, n. 4, p. 557 – 559, 1975.

DAY, M. J. An immunohistochemical study of the lesions of demodicosis in the dog. **Journal Comparative Pathology**, v. 116, p. 203-216, 1997.

DELAYTE, E. H. **Contribuição ao estudo do diagnóstico e do tratamento da demodicidose canina generalizada**. 2002 .119f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade São Paulo, São Paulo, 2002.

DELAYTE, E. H.; OTSUKA, M.; LARSSON, C. E.; CASTRO, R. C.: Eficácia das lactonas macrocíclicas sistêmicas (ivermectina e moxidectina) na terapia da demodicidose canina generalizada. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 31-38, 2006.

DUCLOS, D. D.; JEFFERS, J. G.; SHANLEY, K. J. Prognosis for treatment of adult onset demodicosis in dogs:34 cases (1979-1990). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 204, p. 616, 1994.

EL-BASSIOUNI, S. O.; AHMED, J. A. A.; YOUNIS, A. I.; ISMAIL, M. A.; SAADAWI, A. N.; BASSIOUNI, S. O. A study on *Demodex folliculorum* mite density and immune response in patients with facial dermatoses. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 35, n. 3, p. 899-910, 2005.

FARIA, M. R.; WERNER, J.; SANTAREM, V. A.; CHOQUE, K. C. Demodicidose canina secundário ao *Demodex injai*: relatos de casos originais no Brasil. Canine Demodicosis secondary to *Demodex injai*: original reports in Brazil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS E PEQUENOS ANIMAIS, 27f , 2006. Vitória. **Anais....** 2006.

FEENEY, C.; BRYZMAN, S. P. A; KONG, L.; BRAZIL, H.; DEUTSCH, R.; FRITZ, L. T-lymphocyte subsets in acute illness. **Critical Care Medicine**, v. 23, n. 10, p. 1680-1685, 2005

FUKATA, T.; FUOKI, S.; YOSHIKAWA, H.; KAMBAYASHI, Y.; KITO, K.; KITAGAWA, H. Significance of the CD4/CD8 Lymphocytes Ratio in Dogs Suffering from Demodicosis. **Journal of the Japan Veterinary Medical Association**, v. 58, n. 2, p. 113-116, 2005. Abstract.

GINEL, P. J. Demodicosis canina. **Waltham focus**, v. 6, n. 2, p. 2-7, 1996.

GORTEL, D. V. M. Updates in canine demodicosis. **Veterinary Clinics North America: Small Animal Practice**, v. 36, p. 229-241, 2006.

GROSS; T. L.; IHRKE, P. J.; WALDER, E. J.; AFFOLTER, V.K. **Skin diseases of the dog and the cat**: clinical and histopathologic diagnosis. 2 ed. Oxford: Blackwell Science, 2005p. 442 - 446.

HAGIWARA, M. K.; GERMANO, P. M. L. Eletroforese em acetato de celulose das proteínas séricas de cães normais e de cães com sarna demodécica. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 11, p. 69-81, 1974.

HEALEY, M. C.; GAAFAR, S. M. Immunodeficiency in canine demodectic mange I. Experimental production of lesions using antilymphocyte serum. **Veterinary Dermatology**, v. 3, p. 121-131, 1977.

HEALEY, M. C.; GAAFAR, S. M. Immunodeficiency in canine demodectic mange II. Skin reactions to phytohemagglutinin and concanavalin A. **Veterinary Parasitology**, v. 3, p. 133-140, 1977.

HILLIER, A.; DESCH, C. E. Large-bodied *Demodex* mite infestation in 4 dogs, **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 220, n. 5, p. 623 – 627, 2002.

HIRSH, D. C.; BAKER, B. B.; WIGER, N.; YASKULSKI, S.; OSBURN, B. I. Suppression of in vitro lymphocyte transformation by serum from dogs with generalized demodicosis. **American Journal Veterinary Researches**, v. 36, p. 1591 - 1595, 1975.

JOHNSTONE, I. P. Doramectin as a treatment for canine and feline demodicosis. **Australian Veterinary Practitioner**, v. 32, n. 3, p. 98-103, 2002.

KRAWIEC, D. C.; GAAFAR, S. M. Studies on the immunology of canine demodicosis. **Journal American Animal Hospital Association**, v. 16, p. 669-676, 1980.

LARSSON, C. E. Dermatoparasitoses de cães e gatos: patogenia, diagnóstico diferencial e saúde pública. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 4, n. 2, p. 216-270, 1995.

LEMARIE, S. L. Canine Demodicois. **Small Animal Parasitology**, v. 18, n. 4, p. 354-367, 1996.

LEMARIE, S. L.; FOIL, C. S.; HOROHOV, D. W.: Evaluation of interleukin-2 production and interleukin -2 receptor expression in dogs with generalized demodicosis. **Veterinary Dermatology**, v. 7, p. 213 -219, 1996.

LEMARIE, S. L.; HOSGOOD, G.; FOIL, C. S. A retrospective study of juvenile and adult-onset generalized demodicosis in dogs (1986-91). **Veterinary Dermatology**, v. 7, p. 3 - 10, 1996.

LEVIN, J. FOX, J. C. **Estatística Aplicada às Ciências Humanas**. São Paulo: Pearson Education, 2004.

LUTSGARTEN, J. A.; WENK, R. E. Simple, rapid, kinetic method for serum creatinine measurement data using SAS procedures. **Journal of Animal Science**, v. 18, n. 11, p. 1419-1422, 1972.

MASON, K.V. A new species of *Demodex* mite with *D. canis* causing canine demodicosis: a case report. **Veterinary Dermatology**, v. 4, p. 37, 1993.

MEEUSEN, E. N. T. Immunology of helminth infections, with special reference to immunopathology. **Veterinary Parasitology**, v. 84, p. 259-273, 1999.

MILLER JR., W. H.; WELLINGTON, J. R.; SCOTT, D. W. Dermatologic disorders of Chinese Shar peis: 58 cases (1981-1989). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 200, n. 7, p. 986-990, 1992.

MIRANDA, S.; MARTORELL, S.; COSTA, M.; FERRER, L.; RAMIS, A. Characterization of circulating lymphocyte subpopulations in canine leishmaniasis throughout treatment with antimonials and allopurinol. **Veterinary Parasitology**, v. 144, p. 251-260, 2007.

MOJZISOVÁ, J.; PAULÍK, S.; BARANOVÁ, D. Impairment of neutrophil and lymphocyte functions in dogs with uncomplicated and pyoderma complicated demodicosis. **Veterinarni Medicina – Czech**, v. 44, n. 1, p. 19-24, 1999.

MUELLER, R.S.; BETTENAY, S.V.; An unusual presentation of canine demodicosis caused by a long-bodied *Demodex* mite in a Lakeland Terrier. **Australian Veterinary Practitioner**, v. 29, p. 128-131, 1999.

MUELLER, R.S. Treatment protocols for demodicosis: an evidence-based review. **Veterinary Parasitology**, v. 15, n. 15, p. 75-89, 2004.

MUMCUOGLU, K. Y.; AKILOV, O. E. The role of HLA A2 and Cw2 in the pathogenesis of human demodicosis. **Dermatology**, v. 210, p. 109- 114, 2005.

OLIVEIRA, C. D.; SEIXAS, G.; LARSSON, C. E.; YAZBEK, A. V. B.; MARUYAMA, S.; LUCARTS, L. E. B.; FERNANDEZ, L. T. Qual o seu diagnóstico? cão com pododermatite. **Revista A Hora Veterinária**, v. 173, p. 43 , 2009.

ORDEIX, L.; BARDAGI, M.; SCARAMPELLA, F.; FERRER, L.; FONDATI, A. *Demodex injai* infestation and dorsal greasy skin and hair in eight wirehaired fox terrier dogs. **Veterinary Dermatology**, v. 20, p. 267-272, 2009.

PARADIS, M. New approaches to the treatment of canine demodicosis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 29, n. 6, p. 1425-1436, 1999.

PARADIS, M. Macrocyclic lactones in canine and feline dermatology: 25 years later. In: WORLD CONGRESS OF VETERINARY DERMATOLOGY. 2008. Hong Kong. **Proceedings....** 2008. 377p.

PAULÍK, S.; MOJZISOVÁ, J.; BAJOVÁ, V.; BARANOVÁ, D. Lymphocyte blastogenesis to concanavalin A in dogs with localized demodicosis according to

duration of clinical disease. **Veterinarni Medicina - Czech**, v. 41, p. 245-249, 1996.a

PAULÍK, S.; MOJZISOVÁ, J.; BAJOVÁ, V.; BARANOVÁ, D.; PAULÍKOVÁ, I.: Evaluation of canine lymphocyte blastogenesis prior and after *in vitro* suppression by a dog demodicosis using ethidium bromide fluorescence assay. **Veterinarni Medicina (Prah)**, v. 41, n. 1, p. 7-12, 1996 b

ROBSON, D. C.; BURTON, G. G.; BASSETT, R.; SHIPSTONE, M.; MUELLER, R. Eight cases of Demodicosis caused by a long-bodied *Demodex* species (1997-2002). **Australian Veterinary Practitioner**, v. 33, n. 2, p. 64-74, 2003.

SANTAREM, V. Demodíose canina: revisão. **Revista Clínica Veterinária**, n. 69, p. 86-96, 2007.

SHER, A.; COFFMAN, R. L. Regulation of immunity to parasites by t cells and t cell-derived cytokines. **Annual Review Immunology**, v. 10, p. 385-409, 1992.

SILVA, R. P. B. **Tratamento da sarna demodécica canina pela doramectina em doses calculadas por extrapolação alométrica interespecífica**. 2008. 80 f. Dissertação (Mestre em Ciências). Universidade Paranaense, Umuarama, 2008.

SISCHO, W. M.; IHRKE, P. J.; FRANTI, C. E. Regional distribution of ten common skin diseases in dogs. **Journal Veterinary American Medical Association**, v. 195, p. 752-756, 1989.

SCOTT, D. W.; FARROW, B. R. H.; SCHULTZ, R. D. Studies on the therapeutic and immunologic aspects of generalized demodectic mange in the dog. **Journal American Animal Hospital Association**, v. 10, p. 233-244, 1974.

SCOTT, D. W.; BAKER, E.; SCHULTZ, R. D. Further studies on the therapeutic and immunologic aspects of generalized demodectic mange in the dog. **Journal American Animal Hospital Association**, v. 12, p. 203-213, 1976.

SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E. **Small animal dermatology**. 6th ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2001. p. 457–474.

TANI, K.; MORIMOTO, M.; HAYASHI, T.; INOKUMA, H.; OHNISHI, T.; HAYASHIYA, S.; NOMURA, T.; NAKAICHI, M.; TAURA, Y. Evaluation of cytokine messenger RNA expression in peripheral blood mononuclear cells from dogs with canine demodicosis. **Journal Veterinary Medicine Science**, v. 64, n. 6, p. 513-518, 2002.

TARRANT, J. M. The role of flow cytometry in companion animal diagnostic medicine. **The Veterinary Journal**, v. 170, p. 278-288, 2005.

WIKEL, S. Immunomodulation of host responses to ectoparasite infestation – an overview. **Veterinary Parasitology**, v. 14, p. 321-339, 1984.

WIKEL, S. K. Modulation of the Host Immune System by Ectoparasitic Arthropods. **BioScience**, v. 49, n. 4, p. 311-320, 1999.

WIKEL, S. K.; ALARCON-CHAIDEZ, F. J. Progress toward molecular characterization of ectoparasite modulation of host immunity. **Veterinary Parasitology**, v. 101, p. 275-287, 2001.

WINAU, F.; HEGASY, G.; KAUFMANN, S. H. E.; SCHAIBLE, U. E. No life without death – apoptosis as prerequisite for T cell activation. **Apoptosis**, v. 10, p. 707-715, 2005.

WOLFE, J. H.; HALIWELL, R. E. W. Total hemolytic complement values in normal and diseased dog populations. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 1, p. 287 - 298, 1980.

ZACHE, E.; FRIESEN, R.; BACCHI, R.; FARIAS, M. R. Canine otodemodicosis due to *Demodex injai* mite – case report. **Clínica Veterinária**, v. 14, p. 47, 2009. Supplement. Trabalho apresentado no 34th World Small Animal Veterinary Association Congress, 2009. São Paulo.

APÊNDICE A - Animais com demodicidose, excluídos do projeto, segundo os dados de identificação, manto piloso, de diagnóstico e motivo da exclusão. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010

Número	Animal	Prontuário	Definição Racial	Idade (meses)	Sexo	Comprimento do Pelame	Manifestação demodiciose	Piodermite	Início do Quadro	Motivo da exclusão
1	Marvin	200113	Bull Terrier	24	M	C	G	PS	A	Leishmaniose
2	Kenzo	197831	Shar pey	4	M	C	G	PS	J	Desistência
3	Urso	167665	Bull Terrier	60	M	C	G	PS	A	Desistência
4	Mel	198769	Pug	48	F	C	G	PP	J	Desistência
5	Doca	195930	Cocker	132	F	L	L	PP	A	Leishmaniose
6	Susy	199394	SRD	6	F	C	G	PS	J	Erlichiose
7	Menina	199535	Fox Terrier	6	F	C	L	-	J	Leishmaniose
8	Dara	200451	Fila Brasileiro	144	F	C	G	PS	A	Neoplasia
9	Romeu	202156	SRD	60	M	L	G	-	A	Erlichiose
10	Princesa	200030	Beagle	144	F	C	G	PP	A	Neoplasia
11	Snoop	197255	SRD	120	M	L	G	PS	A	Desistencia
12	Toquinho	198425	SRD	6	M	C	G	PS	J	Erlichiose
13	Winnie	178557	Collie	144	M	L	L	-	A	Leishmaniose
14	Kiara	198736	Poodle	96	F	C	L	PP	A	Erlichiose
15	Marie	200637	Poodle	96	F	C	G	-	A	Erlichiose
16	Tata	203009	SRD	6	F	L	G	PP	J	Desistencia*
17	Arthur	203430	SRD	4	M	C	G	PS	J	Desistência*
18	Baby	193324	Bull Terrier	24	M	C	G	PS	J	Persistência**
19	Ifa	204368	SRD	8	M	L	L	-	J	Desistencia*
20	Bebe	203455	Poodle	60	M	C	G	PS	A	Persistência**
21	Nina	203924	Yorkshire	24	F	L	G	PP	J	Persistência**
22	Friky	113868	Poodle	132	C	C	G	Ps	A	Leishmaniose
23	Rocky	199364	Bulldogue	72	C	C	G	PP	A	Leishmaniose
24	Kally	198842	Inglês Pitbull	72	C	C	G	-	A	Desistência

Nota: M = macho C= pelame curto G = sarna demodécica generalizada
F= fêmea L = pelame longo L = sarna demodécica localizada
* desistência do proprietário quanto ao comparecimento dos retornos aprazados
** persistência de positividade ao exame parasitológico ao final do experimento

J = quadro juvenil SRD = sem definição racial
A = quadro adulto - = ausente
PS = piodermite superficial
PP = piodermite profunda

APÊNDICE B – Valores individualizados do hemograma e da contagem de plaquetas dos animais com demodicidose generalizada, observados na primeira consulta. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010

Animal	Hemácias ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (%)	Plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$)
Amy	6,1	42	13,8	68,85	22,62	32,86	346
Apolo	5,6	36	11,7	64,29	20,89	32,5	444
Billy	5,9	40	13,2	67,80	22,37	33	323
Billy	5,0	33	10,9	66,00	21,80	33,03	207
Hans	5,6	37	12,5	66,07	22,32	37,78	397
July	6,1	41	13,9	67,21	22,79	33,9	311
Liona*	4,5	30	10,1	66,67	22,44	33,67	295
Marcelo	6,6	49	16,4	74,24	24,85	33,47	514
Marley	5,8	34	11	58,62	18,97	32,35	453
Meg	5,7	40	13,3	70,18	23,33	33,25	271
Nick	6,5	47	15,3	72,31	23,54	32,55	342
Onix	7,1	50	17,4	70,42	24,51	34,8	223
Penelope	5,0	32	12,4	64,00	24,80	38,75	401
Pingo	4,2	28	9,9	66,67	23,57	35,36	436
Phyto	5,9	41	13,9	69,49	23,56	33,9	386
Spyke	5,9	42	14,4	71,19	24,41	34,29	488

*Animal Liona: reticulócitos 0,7% - 31500

Valores de referência = Hemácias = ($5,0 - 8,0 \times 10^6/\text{mm}^3$) Hematócrito (Ht) = 37 – 54%
Hemoglobina = 12-18g% Volume corpuscular médio (VCM) = 60 – 77 Hemoglobina
corpuscular média (HCM) = 22 – 27pg Concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM)
= 31 – 36%

APÊNDICE C – Valores individualizados do hemograma e da contagem de plaquetas dos animais com demodicidose generalizada, observados na segunda consulta. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010

Animal	Hemácias ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (%)	Plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$)
Amy	5,9	41	14,7	69,49	24,92	35,85	332
Apolo	5,7	36	12,1	63,16	21,23	33,61	450
Billy	6,3	43	13,6	68,25	21,59	31,63	468
Billy	5,9	39	12,8	66,1	21,69	32,82	328
Hans	6,6	46	15,5	69,7	23,48	33,7	380
July	6,5	43	15,5	66,15	23,85	36,05	174
Liona	6,1	44	14,3	72,13	23,44	32,5	473
Marcelo	6,1	44	15,5	72,13	25,41	35,23	461
Marley	5,3	32	10,5	60,38	19,81	32,81	460
Meg	5,5	36	12,6	65,45	22,91	35,00	548
Nick	6,6	49	15,6	74,24	23,64	31,84	326
Onix	7,4	49	16,7	66,22	22,57	34,88	247
Penelope	7,3	49	16	67,12	21,92	32,65	291
Pingo	6,0	39	13,3	65,00	22,17	34,1	317
Phyto	6,3	44	14,5	69,84	23,02	32,95	370
Spyke	5,4	38	13	70,37	24,07	34,21	499

Valores de referência = Hemácias = ($5,0 - 8,0 \times 10^6/\text{mm}^3$) Hematócrito (Ht) = 37 – 54%
Hemoglobina = 12-18g% Volume corpuscular médio (VCM) = 60 – 77 Hemoglobina
corpuscular média (HCM) = 22 – 27pg Concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM) = 31 – 36%

APÊNDICE D – Valores individualizados do hemograma e da contagem de plaquetas dos animais com demodicidose generalizada, observados na consulta de obtenção do primeiro exame parasitológico negativo. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010

Animal	Hemácias ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (%)	Plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$)
Amy	6,6	49	16,8	74,24	25,45	34,29	273
Apolo	6,7	45	15,6	67,16	23,28	34,67	418
Billy	7,9	54	16,7	68,35	21,14	30,93	247
Billy	5,9	39	12,8	66,1	21,69	32,82	328
Hans	6,8	47	16,2	69,12	23,82	34,47	442
July	6,5	44	14,6	67,69	22,46	33,18	205
Liona	6,9	47	15,3	68,12	22,17	32,55	223
Marcelo	6,2	46	16,6	74,19	26,77	36,09	609
Marley	5,3	32	10,5	60,38	19,81	32,81	460
Meg	6,5	46	15,4	70,77	23,69	33,48	425
Nick	6,5	43	15,3	66,15	23,54	33,58	244
Onix	7,4	52	17,9	70,27	24,19	34,42	204
Penelope	6,4	44	14,1	68,75	22,03	32,05	296
Pingo	5,5	36	12,3	65,45	22,36	34,17	356
Phyto	6,3	44	14,5	69,84	23,02	32,95	370
Spyke	6,4	45	15,8	70,31	24,69	35,11	524

Valores de referência = Hemácias = ($5,0 - 8,0 \times 10^6/\text{mm}^3$) Hematócrito (Ht) = 37 – 54%
 Hemoglobina = 12-18g% Volume corpuscular médio (VCM) = 60 – 77 Hemoglobina
 corpuscular média (HCM) = 22 – 27pg Concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM) =
 31 – 36%

APÊNDICE E – Valores individualizados do hemograma e da contagem de plaquetas dos animais com demodicidose generalizada, observados na consulta de estabelecimento da alta clínica. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010

Animal	Hemácias ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (%)	Plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$)
Amy	6,5	48	16,9	73,85	26,00	35,21	251
Apolo	6,5	41	14,5	63,08	22,31	35,37	369
Billy	7,8	51	18,2	65,38	23,33	35,69	335
Billy	7,3	48	15,2	65,75	20,82	31,67	249
Hans	6,3	45	15,7	71,43	24,92	34,89	330
July	6,1	41	14,4	67,21	23,61	35,12	196
Liona	6,9	47	16,1	68,12	23,33	34,26	297
Marcelo	5,7	42	13,6	73,68	23,86	32,38	464
Marley	6,5	41	14,3	63,08	22,00	34,98	362
Meg	5,3	38	13,4	71,70	25,28	35,26	440
Nick	6,9	49	15,6	71,01	22,61	31,84	289
Onix	8,3	58	19,5	69,88	23,49	33,62	209
Penelope	6,1	41	13,5	67,21	22,13	32,93	276
Pingo	6,1	42	14,1	68,85	23,11	33,57	366
Phyto	6,6	45	15,0	68,18	22,73	33,3	290
Spyke	6,1	41	14,6	67,21	23,93	35,61	419

Valores de referência= Hemácias = ($5,0 - 8,0 \times 10^6/\text{mm}^3$) Hematócrito (Ht) = 37 – 54%
Hemoglobina = 12-18g% Volume corpuscular médio (VCM) = 60 – 77 Hemoglobina
corpuscular média (HCM) = 22 – 27pg Concentração hemoglobínica corpuscular média
(CHCM) = 31 – 36%

APÊNDICE F - Valores individualizados da bioquímica sérica dos animais com demodicidose generalizada. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010

Animal	Proteína total (g/dl)	Albumina (g/dl)	ALT (U/L)	FA (U/L)	Uréia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)
Amy	5,0	3,2	65,4	18,4	23,3	0,6
Apolo	8,8	2,7	16,6	16,9	32,2	1,0
Billy	9,2	2,6	49,2	22,8	35,4	1,0
Billy	7,0	3,0	16,6	20,4	29,1	0,9
Hans	7,5	2,9	19,9	11,6	31,0	1,1
July	7,5	2,9	13,4	39,7	42,2	0,7
Liona	5,8	2,8	14,3	53,9	26,6	0,8
Marcelo	8,1	3,1	32,1	58,1	46,5	0,9
Marley	5,0	2,8	15,0	60,8	24,3	0,6
Meg	6,0	2,5	23,1	32,4	32,5	0,8
Nick	6,9	2,7	29,2	24,0	27,4	0,5
Onix	6,3	2,9	22,4	25,4	28,1	1,1
Penelope	6,9	2,0	17,3	59,6	19,4	0,5
Phyto	8,5	2,9	6,7	11,2	37,2	1,0
Pingo	8,1	1,9	14,9	20,4	34,6	0,6
Spyke	6,1	2,8	13,1	63,9	16,9	0,8

Valores de referência = Alanina amino transferase (ALT) = até 50 UL Fosfatase alcalina (FA) = até 130 Proteínas total = 5,5 – 8,0 g/dl Albumina = 2,5 – 4,5 g/dl Uréia = até 40mg/dl Creatinina = até 1,5 – 2,0mg/dl

APÊNDICE G – Dados individualizados dos parâmetros físicos das amostras de urina dos animais com demodicidose generalizada. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010

Animal	Cor	Odor	Aspecto	Densidade
Amy	Amarelo citrino	"sui generis"	Ligeiramente turvo	1,030
Apolo	Amarelo citrino	Aliáceo	Ligeiramente turvo	1,043
Billy	Amarelo citrino	"sui generis"	Ligeiramente turvo	1,040
Billy preto	Amarelo citrino	"sui generis"	Ligeiramente turvo	1,036
Hans	...	...	...	...
July	Amarelo ouro	"sui generis"	Ligeiramente turvo	1,050
Liona	Amarelo citrino	Aliáceo	Ligeiramente turvo	1,030
Marcelo	...	...	...	...
Marley	Amarelo citrino	"sui generis"	Ligeiramente turvo	1,035
Meg	Amarelo citrino	"sui generis"	Ligeiramente turvo	1,027
Nick	Amarelo ouro	"sui generis"	Turvo	1,048
Onix	Amarelo citrino	"sui generis"	Límpido	1,02
Penelope	Amarelo citrino	"sui generis"	Ligeiramente turvo	1,050
Pingo	Amarelo ouro	Aliáceo	Turvo	1,046
Phyto	Amarelo citrino	Aliáceo	Turvo	1,037
Spyke	...	...	...	...

Nota: ... dado inexistente

APÊNDICE H – Dados individualizados dos parâmetros químicos das amostras de urina dos animais com demodicose generalizada. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010

Animal	pH	Proteínas	Glicose	Corpos cetônicos	Urobilino gênio	Pigmentos Biliares	Hemoglobina
Amy	6,5	-	-	-	-	-	-
Apolo	7,0	+	-	-	-	-	-
Billy	7,0	-	-	-	-	-	-
Billy preto	6,0	-	-	-	-	-	-
Hans	...	...	...	...	...	...	...
July	6,0	+	-	-	-	-	+
Liona	7,0	-	-	-	-	-	-
Marcelo	...	...	...	...	...	...	...
Marley	9,0	+	-	-	-	-	-
Meg	6,0	-	-	-	-	-	-
Nick	5,5	+	-	-	-	+	++
Onix	8,0	neg	neg	neg	neg	neg	+++
Penelope	7,5	-	-	-	-	-	-
Pingo	7,0	+	...	...	...	+	-
Phyto	6,0	-	-	-	-	-	+
Spyke	...	...	...	...	...	...	...

Nota: Proteína: Traços = < 30mg/dl; + = 30 mg/dl; ++ = 100mg/dl; +++ = 500mg/dl

Glicose: + = 50mg/dl; ++ = 100mg/dl, +++ = 300mg/dl; ++++ = 10000mg/dl

Sensibilidade da bilirrubina = 0,5 – 5mg/dl

... dado inexistente – valor nulo

APÊNDICE I – Valores individualizados do sedimento urinário dos animais com demodicose generalizada. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010

Animal	Hemácias	Leucócitos	Cilindros	Cristais	Células	Bactérias	Observações
Amy	raras	raros	-	-	U raras	raras	-
Apolo	raras	raros	-	-	U raras	raras	S + G
Billy	0-2	2-4		Fosfato triplo + Urato amônio +++	U raras	+	S +
Billy preto	2-4	0-2	-	-	U raras E raras	+	S +
Hans	...	...	...	...	...	...	...
July	8-10	0-2	-	-	U	raras	-
Liona	raras	raros	-	-	U raras	raras	-
Marcelo	...	...	...	...	...	...	...
Marley	0-2	0-2	-	Fosfato amorfo ++ Fosfato triplo ++	U raras	+	-
Meg	raras	0-2	-	-	E + U raras	raras	-
Nick	25 - 30	2 - 4	-	-	U raras	+	-
Onix	raras	raros	-	-	U raras	raras	-
Penelope	raras	raros	-	Fosfato triplo +	-	raras	-
Pingo	0 - 2	10 - 15	-	Fosfato triplo ++ Fosfato amorfo +++	...	+++	+
Phyto	4-6	0-2		Urato amorfo	U raras	++	S +++
Spyke	...	...	...	...	...	...	...

Nota: U = células de descamação das vias urinárias EP = células de descamação do epitélio renal
S = espermatozoides G = gotículas de gordura

APÊNDICE J – Resultados individualizados do exame coproparasitológico, realizado nos animais com demodicidose generalizada. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010

Prontuário	Animal	Resultado do Exame Coproparasitológico
201167	Amy	Negativo
197632	Apolo	Negativo
198879	Billy	Negativo
197103	Billy	Negativo
191342	Hans	Negativo
198130	July	Negativo
197114	Liona	Negativo
200515	Marcelo	Negativo
198842	Marley	---
201683	Meg	---
203152	Nick	<i>Demodex sp, Neospora sp, Hamondia sp</i>
178401	Onix	Negativo
202999	Penelope	<i>Demodex sp</i>
202725	Pingo	Negativo
197104	Phyto	Negativo
201217	Spyke	Negativo

Nota: ----- = dado inexistente

APÊNDICE K - Valores individualizados do hemograma e da contagem de plaquetas dos animais hígidos, constituintes do Grupo Controle. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010

Animal	Hemácias ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	Ht (%)	Hg (g %)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (%)	Plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$)
Bobí	7,2	52	72,2	17,4	24,2	33,5	362
Boris (Bulldogue)	7,1	49	17,0	69,0	23,9	34,7	371
Boris (SRD)	7,7	56	18,0	72,7	23,4	32,1	261
Boxer	5,7	38	13,8	66,5	24,4	36,8	369
Branca	7,4	50	17,0	68,4	23,0	33,7	454
Branquinha	7,6	55	17,5	72,4	23,0	31,8	239
Bruttus	7,3	50	16,2	68,5	22,2	32,4	539
Jaque	8,0	54	17,6	67,5	22,0	32,6	192
Juca	7,5	54	17,4	72,0	23,2	32,2	162
Kelsin	7,6	54	17,0	71,4	23,6	33,0	332
Lola	5,5	38	12,9	69,8	23,5	33,8	241
Luft	6,2	41	13,9	66,5	22,3	33,6	281
Maezinha	7,6	57	17,9	75,0	23,6	31,4	216
Minie	6,4	44	14,8	68,6	23,1	33,7	386
Mushu	6,6	47	15,4	71,0	23,1	32,6	358
Myries	5,5	40	12,8	72,7	23,2	32,0	373
Napoli	4,9	35	11,5	71,4	23,5	32,9	434
Nutella	6,4	45	14,6	70,3	22,8	32,4	713
Panda	5,2	39	12,4	75,0	23,9	31,8	155
Pug	6,0	42	13,8	70,0	23,0	32,9	606
Rambo	5,4	39	12,3	71,4	22,6	31,7	330
Serena	7,3	57	17,2	78,1	23,6	30,2	264
Simon	6,3	44	15,2	69,3	24,2	34,9	310
Theo	7,6	51	16,3	67,4	21,5	32,0	301
Tosca	7,2	53	16,8	73,6	23,3	31,7	227
Vicky (Poodle)	6,9	48	16,6	69,6	24,1	34,6	470
Vicky (Dámata)	6,1	45	14,7	72,9	23,9	32,8	369
Ziggy	6,5	44	14,9	67,7	22,9	33,9	213
Zuinha	6,2	44	14,5	71,9	23,5	32,7	231
Wolf	8,0	50	17,5	62,5	21,9	35,0	390

Valores de referência = Hemácias = ($5,0 - 8,0 \times 10^6/\text{mm}^3$) Hematócrito (Ht) = 37 – 54%
 Hemoglobina = 12-18g% Volume corpuscular médio (VCM) = 60 – 77 Hemoglobina
 corpuscular média (HCM) = 22 – 27pg Concentração hemoglobínica corpuscular média
 (CHCM) = 31 – 36%

APÊNDICE L – Valores individualizados da bioquímica sérica dos animais hígidos, constituintes do Grupo Controle. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010

Animal	Proteína Total (g/dl)	Albumina (g/dl)	ALT (U/L)	FA (U/L)	Uréia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)
Bobí	7,8	3,1	22,4	29,5	60,4	0,88
Boris Bulldogue	6,9	2,8	21,0	35,4	48,2	0,77
Boris 2	7,2	3,2	32,7	15,3	36,3	0,68
Boxer	6,9	2,6	33,5	51,8	45,4	0,51
Branca	7,4	3,2	24,5	3,4	40,5	0,65
Branquinha	6,8	3,4	25,6	40,5	32,8	1,15
Bruttus	7,5	2,7	23,1	26,1	34,2	0,76
Jaque	6,2	3,1	23,8	23,4	60,9	1,64
Juca	6,4	3,1	39,8	21,9	31,5	1,54
Kelsin	8,2	3,2	22,1	24,3	44,7	0,52
Lola	7,4	3,2	24,5	3,4	40,5	0,65
Luft	6,3	2,9	22,1	20,7	50,1	1,23
Maezinha	6,8	3,2	19,4	8,1	34,8	1,20
Minie	7,7	3,1	24,9	64,7	27,2	0,59
Mushu	7,8	3,5	29,6	12,9	42,4	0,36
Myries	6,5	3,0	14,6	50,3	25,3	0,69
Napoli	6,4	1,9	12,3	25,2	19,0	0,60
Nutella	7,0	2,7	14,5	26,5	49,5	0,77
Panda	8,5	2,9	26,0	16,1	25,2	0,85
Pug	7,9	2,9	19,5	14,4	36,6	0,68
Rambo	7,5	3,0	17,0	37,4	43,1	0,60
Serena	7,4	3,1	17,8	21,5	23,0	1,16
Simon	7,1	3,1	19,0	59,4	29,0	0,65
Theo	7,0	3,0	37,6	22,5	45,2	0,65
Tosca	7,2	3,3	26,5	43,6	32,1	1,06
Vicky Poodle	7,1	3,2	50,5	9,5	29,5	0,70
Vicky Dalmata	6,8	2,9	11,5	22,6	62,3	0,80
Ziggy	7,3	2,9	17,7	11,3	42,0	1,50
Zuinha	7,7	2,9	18,1	13,0	54,3	0,80
Wolf	7,1	3,1	20,2	4,8	39,6	1,00

Valores de referência = Alanina amino transferase (ALT) = até 50 UL Fosfatase alcalina (FA) = até 130
 Proteínas total = 5,5 – 8,0 g/dl Albumina = 2,5 – 4,5 g/dl Uréia = até 40mg/dl Creatinina = até 1,5 – 2,0mg/dl

APÊNDICE M – Valores individualizados do leucograma e da quantificação dos linfócitos sanguíneos periféricos TCD4+, TCD8+ e da razão TCD4+ : TCD8+, dos animais do Grupo Controle . (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010

(continua)

Animal	Leucócitos totais		Neutrófilos segmentados		Eosinófilos		Monócitos		Linfócitos totais		Linfócitos TCD4+		Linfócitos TCD8+		Razão TCD4: TCD8
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	N	
Bobi	6000	67	4020	5	300	6	360	22	1320	27,9	368	23,5	310	1,19	
Boris															
Bulldogue	10500	47	4935	7	735	2	210	44	4620	27,8	1284	12	554	2,31	
Boris SRD	6000	67	4020	5	300	6	360	22	1320	40,7	538	16,2	214	2,51	
Boxer	14700	41	6027	3	441	6	882	50	7350	13,4	985	26,8	1970	0,5	
Branca	11500	54	6210	8	920	2	230	36	4140	31,4	1300	36,5	1511	0,86	
Branquinha	9700	63	6111	0	0	7	679	30	2910	21,6	629	13,9	404	1,55	
Bruttus	10800	63	6804	6	648	2	216	29	3132	22,7	711	49	1535	0,46	
Jaque	10700	62	6634	12	1284	4	420	22	2354	38,8	913	9,79	230	3,96	
Juca	10300	58	5974	7	721	10	1030	25	2575	48,3	1244	14,5	373	3,33	
Kelsin	12000	68	8160	12	1440	6	720	14	1680	36,2	608	19,1	321	1,89	
Lola	8900	55	4895	0	0	2	178	43	3827	58,4	2235	15,6	597	3,74	
Luft	7400	67	4958	0	0	6	444	27	1998	40,6	811	15,8	316	2,56	
Maezinha	10000	67	6700	7	700	7	700	19	1900	21,6	410	13,9	264	1,55	
Minie	9500	75	7125	3	285	4	380	18	1710	34,9	598	23	393	1,51	
Mushu	6000	57	3420	8	480	3	180	31	1860	28,6	532	15,4	286	1,85	
Myries	12900	60	7740	7	903	5	645	28	3612	19,6	708	15	542	1,3	
Napoli	7600	71	5396	6	456	4	304	19	1444	29,9	432	23,2	335	1,28	
Nutella	10100	61	6161	1	101	7	707	31	3131	32,6	1021	16,9	529	1,93	

(Conclusão)														
Animal	Leucócitos totais	Neutrófilos segmentados		Eosinófilos		Monócitos		Linfócitos totais		Linfócitos TCD4 ⁺		Linfócitos TCD8 ⁺		Razão TCD4 ⁺ : TCD8 ⁺
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	N
Panda	16000	54	8640	2	320	4	640	40	6400	18,4	1178	47	3008	0,39
Rambo	12300	68	8364	3	369	1	123	28	3444	44,6	1536	19,7	678	2,26
Serena	13300	64	8512	16	2128	8	1064	12	1596	28,9	461	30,4	485	0,95
Simon	12500	58	6000	2	250	4	500	36	4500	28,7	1292	19,7	887	1,45
Theo	10100	51	5151	0	0	2	202	47	4747	37,4	1775	20,6	978	1,81
Tosca	8000	72	5760	2	160	9	720	15	1200	23,9	287	12,7	152	1,88
Vicky Poodle	8500	72	6120	1	85	4	340	23	1955	35,3	690	22,5	440	1,57
Vicky Dálmata	9900	60	5940	11	1089	2	198	27	2673	40,7	1088	13,3	356	3,06
Ziggy	3900	53	2067	10	390	10	390	27	1053	34,3	361	9,54	100	3,59
Zuinha	7800	49	3822	5	390	5	390	41	3198	50,6	1618	26,3	841	1,92
Wolf	12900	72	9288	15	1935	3	387	10	1290	26	335	24,2	312	1,07
Média	10027	62	6092	6	572	5	497	28	2816	32,5	880	20,6	636	1,90

Valores de referência = Leucócitos totais = 6.000 – 15.000/mm³ Neutrófilos segmentados = 3.000 – 11.800/mm³ Eosinófilos = 0 - 750/mm³
 Monócitos = 0 - 800/mm³ Linfócitos totais = 1.500 – 5.000/mm³

APÊNDICE N – Valores individualizados do leucograma e da quantificação dos linfócitos sanguíneos periféricos TCD4+, TCD8+ e da razão TCD4+ : TCD8+, observados na primeira consulta dos animais do Grupo Experimental. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010

Animal	Leucócitos totais		Neutrófilos segmentados		Eosinófilos		Monócitos		Linfócitos totais		Linfócitos TCD4+		Linfócitos TCD8+		Razão TCD4+: TCD8
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	N	
Amy	6800	55	3740	7	476	4	272	34	2312	37,9	876	23,3	539	1,63	
Apolo	13900	71	9869	0	0	5	695	24	3336	23,8	794	44,3	1478	0,54	
Billy	13500	86	11610	0	0	6	810	8	1080	34,6	374	16,7	180	2,07	
Biily preto	21900	86	18834	10	2190	2	438	2	438	41	180	28,7	126	1,43	
Hans	15000	85	12750	1	150	7	1050	7	1050	22,4	235	36,4	382	0,62	
Juli	9000	76	6840	0	0	7	630	17	1530	59,3	907	16,6	254	3,57	
Liona	27300	87	23751	2	546	5	1365	5	1365	37,6	513	28,1	384	1,34	
Marcelo	17400	63	10962	2	348	7	1218	28	4872	25,6	1247	17,7	862	1,45	
Marley	8500	46	3910	1	85	12	1020	41	3485	48	1673	10,1	352	4,75	
Meg	17200	68	11696	1	172	13	2236	18	3096	23,5	728	11,3	350	2,08	
Nick	19300	78	1504	5	965	9	1737	8	1544	33,8	522	28,2	435	1,20	
Onix	12200	80	9760	0	0	11	1342	9	1098	40,2	441	19,9	219	2,02	
Penelope	14900	79	11771	2	298	13	1937	6	894	30,9	276	19,1	171	1,62	
Pingo	13900	79	10981	1	139	9	1251	11	1529	37,2	569	27,3	417	1,36	
Phyto	15400	89	13706	4	616	2	308	5	770	35,6	274	23,9	184	1,49	
Spyke	18500	78	14430	0	0	14	2590	8	1480	19,1	283	16,6	246	1,15	
Média	15294	75	11007	2	374	8	1181	14	1867	34,4	618	23,0	411	1,77	

Valores de referência = Leucócitos totais = 6.000 – 15.000/mm³ Neutrófilos segmentados = 3.000 – 11.800/mm³ Eosinófilos = 0 - 750/mm³
Monócitos = 0 - 800/mm³ Linfócitos totais = 1.500 – 5.000/mm³

APÊNDICE O - Valores individualizados do leucograma e da quantificação dos linfócitos sanguíneos periféricos TCD4+, TCD8+ e da razão TCD4+ : TCD8+, observados na segunda consulta dos animais do Grupo Experimental. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010

Animal	Leucócitos totais		Neutrófilos segmentados		Eosinófilos		Monócitos		Linfócitos totais		Linfócitos TCD4+		Linfócitos TCD8+		Razão TCD4+: TCD8+
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N
Amy	7000	47	3290	5	350	12	840	36	2520	34	857	18,8	474		1,81
Apolo	10900	75	8175	0	0	3	327	22	2398	22,8	547	41,4	993		0,55
Billy	14300	76	10868	1	43	6	858	17	2431	40,3	980	21,8	530		1,85
Biily preto	19200	73	14016	9	1728	5	960	13	2496	36,2	904	19,6	489		1,85
Hans	10900	76	8284	2	218	2	218	20	2180	36,7	800	30,9	674		1,19
Juli	7300	77	5621	2	146	3	219	18	1314	57	749	17,3	227		3,29
Liona	8900	77	6853	1	89	2	178	20	1780	28,1	500	43,8	780		0,64
Marcelo	14400	65	9360	6	864	10	1440	19	2736	35	958	19,3	528		1,81
Marley	13100	66	8646	2	262	5	655	27	3537	32,3	1142	10,5	371		3,08
Meg	13300	66	8778	0	0	6	798	28	3724	24,1	897	11,5	428		2,10
Nick	10600	75	7950	2	212	4	424	19	2014	41,8	842	31,7	638		1,32
Onix	8600	81	6966	4	344	7	602	8	688	43	296	21,8	150		1,97
Penelope	7700	71	5467	0	0	7	539	22	1694	36,2	613	28,8	488		1,26
Pingo	7600	67	5092	4	304	10	760	19	1444	45,9	663	25,8	373		1,78
Phyto	15500	80	12400	6	930	4	620	10	1550	32,5	504	21,1	327		1,54
Spyke	12700	69	8763	1	127	4	508	26	3302	16,3	538	14,4	475		1,13
Média	11375	71	8158	3	351	6	622	20	2238	35,1	737	23,7	497		1,70

Valores de referência = Leucócitos totais = 6.000 – 15.000/mm³ Neutrófilos segmentados = 3.000 – 11.800/mm³ Eosinófilos = 0 - 750/mm³
Monócitos = 0 - 800/mm³ Linfócitos totais = 1.500 – 5.000/mm³

APÊNDICE P - Valores individualizados do leucograma e da quantificação dos linfócitos sanguíneos periféricos TCD4+, TCD8+ e da razão TCD4+:TCD8+, observados na consulta de obtenção do primeiro exame parasitológico negativo dos animais do Grupo Experimental. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010

Animal	Leucócitos totais		Neutrófilos segmentados		Eosinófilos		Monócitos		Linfócitos totais		Linfócitos TCD4+		Linfócitos TCD8+		Razão TCD4+:TCD8+
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N
Amy	6900	49	3381	6	414	5	345	40	2760	39,4	1087	19,0	524		2,07
Apolo	9900	42	4158	4	396	6	594	48	4752	26,2	1245	39,1	1858		0,67
Billy	10700	75	8025	1	107	3	321	21	2247	34,9	784	16,5	371		2,12
Biily preto	19200	73	14016	9	1728	5	960	13	2496	36,2	904	19,6	489		1,85
Hans	13600	80	10880	3	408	2	272	15	2040	41,3	843	28,4	579		1,45
Juli	6700	72	4824	0	0	4	268	24	1608	51,1	822	18,9	304		2,70
Liona	8400	74	6216	1	84	4	336	21	1764	33,8	596	35,5	626		0,95
Marcelo	17500	53	9275	7	1225	15	2625	25	4375	32,4	1418	20,6	901		1,57
Marley	13100	66	8646	2	262	5	655	27	3537	32,3	1142	10,5	371		3,08
Meg	13500	73	9855	3	405	5	675	19	2565	30,6	785	14,6	374		2,10
Nick	9100	69	6279	2	182	6	546	23	2093	32,9	689	23,1	483		1,42
Onix	9900	71	7029	3	297	16	1584	10	990	44,1	437	23,5	233		1,88
Penelope	8400	52	4368	3	252	14	176	31	2604	48,3	1258	18,8	490		2,57
Pingo	10600	52	5512	2	212	4	424	42	4452	42,1	1874	22,0	979		1,91
Phyto	15500	80	12400	6	930	4	620	10	1550	32,5	504	21,1	327		1,54
Spyke	12400	62	7688	2	248	4	496	32	3968	25,3	1004	17,3	686		1,46
Média	11588	65	7660	3	447	6	681	25	2738	36,5	962	21,8	600		1,83

Valores de referência = Leucócitos totais = 6.000 – 15.000/mm³ Neutrófilos segmentados = 3.000 – 11.800/mm³ Eosinófilos = 0 - 750/mm³
Monócitos = 0 - 800/mm³ Linfócitos totais = 1.500 – 5.000/mm³

APÊNDICE Q - Valores individualizados do leucograma e da quantificação dos linfócitos sanguíneos periféricos TCD4+, TCD8+ e da razão TCD4+:TCD8+, observados na consulta de estabelecimento da alta clínica dos animais do Grupo Experimental. (FMVZ/USP, 2008 – 2009). São Paulo, 2010

Animal	Leucócitos totais		Neutrófilos Segmentados		Eosinófilos		Monócitos		Linfócitos totais		Linfócitos TCD4+		Linfócitos TCD8+		Razão TCD4: TCD8
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N
Amy	6200	49	3038	4	428	7	434	40	2480	41,9	1039	20,8	516		2,01
197632	9300	55	5115	0	0	3	279	42	3906	24,8	969	42,4	1656		0,58
198879	8100	69	5589	3	243	8	648	20	1620	42,5	689	21,2	343		2,0
197103	10700	66	7062	7	749	5	535	22	2354	29,3	690	18,2	428		1,61
191342	13700	83	11371	4	548	6	822	7	959	37,8	363	26,5	254		1,43
198130	7500	84	6300	2	150	3	225	11	825	56,1	463	15,3	126		3,67
197114	7900	78	6162	2	158	8	632	12	948	21	199	20,7	196		1,01
200515	12900	63	8127	3	387	18	2322	16	2064	19,4	400	13,5	279		1,44
198842	13200	63	8316	0	0	12	1584	25	3300	42,2	1393	15,9	525		2,65
201683	8800	60	5280	4	352	7	616	29	2552	26,3	671	11,6	296		2,27
203152	8400	65	5460	7	588	2	168	26	2184	31	677	19,7	430		1,57
178401	8500	88	7480	0	0	5	425	7	595	43,6	259	22,9	136		1,9
202999	8300	57	7731	2	166	8	664	33	2739	51,4	1408	19,5	534		2,64
202725	10100	76	7676	3	303	6	606	15	1515	42,1	638	22,6	342		1,86
197104	15000	65	9750	4	600	11	1650	20	3000	22,3	669	14,3	429		1,56
201217	9900	72	7128	5	495	4	396	19	1881	26,9	506	13,1	246		2,05
Média	9906	68	6974	3	323	7	750	22	2058	34,9	689	19,9	421		1,89

Valores de referência = Leucócitos totais = 6.000 – 15.000/mm³ Neutrófilos segmentados = 3.000 – 11.800/mm³ Eosinófilos = 0 - 750/mm³
Monócitos = 0 - 800/mm³ Linfócitos totais = 1.500 – 5.000/mm³