

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO ELETROCARDIOGRÁFICA AMBULATORIAL
DE CÃES COM EHRLIQUIOSE MONOCÍTICA CRÔNICA

MAURÍCIO GIANFRANCESCO FILIPPI

Botucatu - SP

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO ELETROCARDIOGRÁFICA AMBULATORIAL
DE CÃES COM EHRLIQUIOSE MONOCÍTICA CRÔNICA

MAURÍCIO GIANFRANCESCO FILIPPI

Dissertação apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
para obtenção do título de Mestre.

Processo Fapesp nº2014/11219-6

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lucia Gomes
Lourenço

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Filippi, Maurício Gianfrancesco.

Avaliação eletrocardiográfica ambulatorial de cães com Ehrliquiose Monocítica Crônica / Maurício Gianfrancesco Filippi. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Maria Lucia Gomes Lourenço
Capes: 50501062

1. Eletrocardiografia ambulatorial. 2. Cães - Doenças. 3. Carrapato como transmissor de doenças. 4. Rhipicephalus sanguineus. 5. Cardiologia veterinária.

Palavras-chave: Biomarcadores cardíacos; Cão; Cardiologia; Holter; Rhipicephalus sanguineus.

Nome do autor: Maurício Gianfrancesco Filippi

Título: AVALIAÇÃO ELETROCARDIOGRÁFICA AMBULATORIAL DE CÃES
COM EHRLIQUIOSE MONOCÍTICA CRÔNICA

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Lucia Gomes Lourenço

Presidente e Orientadora

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ - UNESP - Botucatu

Prof. Dr. Antonio Carlos Paes

Membro

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ - UNESP - Botucatu

Prof. Dr. Rodrigo Predevello Franco

Membro

UNIMAR - Universidade de Marília

Data da defesa: 12 de dezembro de 2016

Dedicatória

Dedico essa obra a todas as pessoas que direta ou indiretamente me ensinam a me tornar uma pessoa melhor. A vida é um eterno aprendizado.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente essa obra à meus familiares, em especial meu pai Luiz Henrique e minha mãe Cláudia, por sempre me ensinarem com muito afeto, como ser uma pessoa e um profissional de caráter. Sem eles, eu seria metade da pessoa que sou hoje.

À meus irmãos, Matheus e Heitor, pela amizade fraterna e sincera sempre presente, e pelos memoráveis momentos de descontração

À meus colegas da República Bico do Corvo, pelo companheirismo sempre sincero, pelo apoio e por serem minha segunda família em Botucatu, desde 2009.

À minha namorada Camila, por ser a companheira e amiga que sempre sonhei em ter.

Aos colegas da banda Caravana, da qual faço parte, por me mostrarem o quanto a música é e sempre será importante em minha vida.

À minha orientadora e amiga, professora Maria Lucia Gomes Lourenço, pelos conhecimentos científicos adquiridos, pela paciência e pela confiança em mim instituída que me faltam palavras para descrever o quanto sou agradecido. Nunca me esquecerei dessa oportunidade, foi crucial para meu início profissional.

Ao professor Antonio Carlos Paes, pela oportunidade a mim confiada de utilizar cães atendidos no serviço de Moléstias Infecciosas, por não medir esforços em ajudar e ensinar, e por ser uma pessoa admirável.

- Ao médico cardiologista, professor Renato Teixeira Gonçalves, pelos ensinamentos sobre eletrofisiologia cardíaca prestados. Sem dúvida, um profissional competente, paciente e humilde da maneira que almejo ser futuramente.

- Às cardiologistas veterinárias, companheiras de pós-graduação, pela amizade e pelo auxílio tanto teórico quanto prático nas diversas atividades na universidade, e também pela paciência com este único mancebo do grupo.

- À Universidade Estadual Paulista - UNESP, em especial a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, pela estrutura disposta para que o estudo possa ter sido montado.

- Ao Programa de Pós graduação em Medicina Veterinária por todos os auxílios prestados.

- Ao Laboratório Clínico dessa mesma instituição, em especial à Professora Regina Takahira e os médicos veterinários residentes e funcionários que não mediram esforços para me auxiliar nas diversas análises hematológicas e bioquímicas que fiz.
- Ao laboratório de Endocrinologia Veterinária, em especial à Professora Fabiana Ferreira Souza e a Professora Eunice Oba, pela permissão e brilhante auxílio na realização das técnicas de ELISA para dosagem de biomarcadores.
- Aos médicos veterinários residentes e funcionários do serviço de Enfermidades Infecciosas, com os quais pude contar para a seleção dos animais para o estudo. Sem eles nada disso seria possível. Muito obrigado.
- Ao professor José Carlos de Figueiredo Pantoja, por todos os conhecimentos brilhantemente passados para mim sobre estatística e por sua competência e bondade no auxílio para realização da minha análise estatística.
- Aos proprietários dos cães que participaram do estudo, pela paciência e gentileza em ceder seus animais para a ciência. Agradeço também aos cães por permitirem a realização dos exames. Gostaria que eles soubessem que cães do mundo todo podem ter uma vida mais longa graças aos seus esforços.
- À médica veterinária e colega na linha de pesquisa sobre Ehrliquiose, Marília Salgado Caxito, pela união que sempre acrescenta e acrescentará em nossas pesquisas sobre Ehrliquiose que com certeza enriquece os estudos produzidos. Espero que sempre seja assim.
- À Fundação de Amparo a pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 2014/11219-6 por todo o apoio financeiro que fez possível a realização desse projeto.
- À todos meu muito obrigado!

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

Artigo 1. "Clinical aspects and cardiac biomarkers concentrations on dogs with chronic Monocytic Ehrlichiosis: a case control study"

Table 1. Mean and Standard Deviation of clinical parameters analysed of both groups and the result os statistical test. 45

Table 2. Mean and Standard Deviation of hematological parameters analysed of both groups and the result os statistical test 46

Table 3. Mean and Standard Deviation of biochemical parameters analysed of both groups and the result os statistical test.....47

Artigo 2. "24-hour ambulatory ECG Holter and Heart Rate Variability Analysis of chronic Ehrlichiosis-induced myocarditis."

Table 4. Mean and Standard Deviation of hematological parameters analysed of both groups and the result os statistical test.....70

Table 5. Mean and Standard Deviation of electrocardiographic parameters analysed of both groups and the result os statistical test.....71

Table 6. Mean and Standard Deviation of time domain heart rate variability (HRV) parameters analysed of both groups and the result os statistical test..72

LISTA DE GRÁFICOS

Capítulo II

Artigo 1. "Clinical aspects and cardiac biomarkers concentrations on dogs with chronic Monocytic Ehrlichiosis: a case control study"

Fig.1. Relative frequency of clinical signs and pathological conditions in 20 natural cases of chronic canine ehrlichiosis (G1).....48

Fig. 2. Survival Analysis of the sick group (G1) during 28-day follow up.....49

Fig. 3. Sample distribution of CK-MB (UI/L) concentration between groups..50

Fig. 4. Sample distribution of Cardiac Troponin ICK-MB (ng/dL) concentration between groups.....51

Fig. 5. Survival Analysis of the sick group according with the cTnI concentration. Log-ranked test comparing the two curves showed a p value of 0,6.....52

Fig. 6. Sample distribution of NT-proBNP concentration between groups...53

Artigo 2. "24-hour ambulatory ECG Holter and Heart Rate Variability Analysis of chronic Ehrlichiosis-induced myocarditis."

Fig.1. Survival Analysis according to the base rythm showed on convencional ECG on the sick group.....73

Fig. 2. Percentage of ECG changes on Dogs with Chronic Monocytic Ehrlichiosis.....74

Fig. 3. Prevalence of arrhythmias during 24-hour recording on the sick group.....75

Fig. 4. Prevalence of arrhythmias on the sick group according to the categories established on the Holter exam.....76

Fig. 5. Survival analysis according to presence of arrhythmias on 24-hour Holter recording. log-ranked test showed a p value of 0,45. 77

Anexos

Figura 1. Posicionamento dos eletrodos de acordo com as cores A) Hemitórax direito; B) Hemitórax esquerdo.....125

Figura 2. Métodos utilizados para dosagem de CKMB. A) Analisador bioquímico automático Cobas Mira plus®; B) Kit utilizado para análise de CKMB Bioclin ®.....126

Figura 3. Métodos utilizados para dosagem de cTnI. A) Kit utilizado para a dosagem VIDAS® High sensitive Troponin I tes; tB)Analisador automático Mini-Vidas®.....126

Figura 4. Kit ELISA N-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide (NTProBNP)® da empresa Cloud Clone Corp utilizado para dosagem sérica de NT-proBNP.....126

Figura 5. Cão com Ehrliquiose Monocítica Crônica. A) Estado geral alerta; B) Presença de petéquias em região medial de membro pélvico direito.....127

Figura 6. Cão com Ehrliquiose Monocítica Crônica. A) Apatia; B)Palidez de mucosa oral. 127

Figura 7. Uveíte em cão com Ehrliquiose Monocítica Crônica 127

Figura 8. Animais saudáveis pertencentes do grupo controle.....128

Figura 9. Traçado eletrocardiográfico de um cão do grupo doente com taquicardia sinusal (FC = 186 bpm) e presença de extrassístole ventricular esquerda ao centro. (Derivação II; velocidade: 25 mm/ms; sensibilidade: 1 mV= 1cm).....128

Figura 10. Traçado eletrocardiográfico de um cão do grupo doente com bloqueio atrioventricular de primeiro grau. No detalhe: intervalo PR medindo 135 ms. (Derivação II; velocidade: 25 mm/ms; sensibilidade: 1 mV= 1cm)....128

Figura 11. Traçado eletrocardiográfico de um cão do grupo doente com taquicardia sinusal, (FC = 180 bpm). (Derivação II; velocidade: 25 mm/ms; sensibilidade: 1 mV= 1cm).....129

Figura 12. Traçado eletrocardiográfico de um cão do grupo doente com presença de pausa sinusal (Derivação II; velocidade: 25 mm/ms; sensibilidade: 1 mV= 1cm).	129
Figura 13. Dados de variabilidade de frequência cardíaca de um cão do grupo controle, e histograma dos intervalos NN durante 24 horas.	129
Figura 14. Dados de variabilidade de frequência cardíaca de um cão do grupo controle, contendo análise estatística e histograma dos intervalos NN durante 24 horas no canto inferior direito.	130
Tabela 1. Dados descritivos dos animais selecionados para compor o grupo doente (G1).	131
Tabela 2. Dados descritivos dos animais selecionados para compor o grupo controle (G2).....	132
Gráfico 1. Análise da Frequência absoluta de dados de anamnese. Comparação entre grupo de animais e não sobreviventes aos 28 dias de tratamento ($p < 0,05$).....	132
Gráfico 2. Análise da frequência relativa (%) geral de dados de exame físico. Comparação entre o subgrupo de animais vivos e o subgrupo de animais mortos durante os 28 dias de observação.....	133
Gráfico 3. Curva de sobrevida em função da presença ou não de êmese. (Teste de Log-rank. $p = 0,0972$; $p < 0,05$).....	133
Gráfico 4. Curva de sobrevida em função da presença ou ausência de cansaço fácil à anamnese. (Teste de Log-rank. $p = 0,0379$; $p < 0,05$).....	134
Gráfico 5. Curva de sobrevida em função da presença ou ausência de fraqueza. (Teste de Log-rank; $p = 0,1446$; $p < 0,05$).....	134
Gráfico 6. Curva de sobrevida em função da atitude do animal (alerta ou apático) (Teste de Log-rank; $p = 0,851$; $p < 0,05$).....	134

Gráfico 7. Distribuição amostral dos valores de frequência cardíaca (bpm) entre os grupos doente e controle.....	135
Gráfico 8. Distribuição amostral dos valores de frequência respiratória (mpm) entre os grupos doente e controle.....	135
Gráfico 9. Distribuição amostral dos valores de pressão arterial sistêmica (mmHg) entre os grupos doente e controle.....	136
Gráfico 10. Distribuição amostral do número de hemácias ($\times 10^6$ / μ L) entre os grupos doente e controle.....	136
Gráfico 11. Distribuição amostral da concentração de hemoglobina (g/dL) entre os grupos doente e controle.....	137
Gráfico 12. Distribuição amostral do volume globular (%) entre os grupos doente e controle.....	137
Gráfico 13. Distribuição amostral do volume corpuscular médio (fL) entre os grupos doente e controle.....	138
Gráfico 14. Distribuição amostral da concentração de hemoglobina corpuscular média (g/dL) entre os grupos doente e controle.....	138
Gráfico 15. Distribuição amostral da concentração de proteína plasmática (g/dL) total entre os grupos doente e controle.	139
Gráfico 16. Distribuição amostral da largura das hemácias (RDW) (%) entre os grupos doente e controle.....	139
Gráfico 17. Distribuição amostral de plaquetas ($\times 10^3$ /mm ³) entre os grupos doente e controle.....	140
Gráfico 18. Distribuição amostral do número total de leucócitos ($\times 10^3$ / μ L) entre os grupos doente e controle.....	140
Gráfico 19. Distribuição amostral de número absoluto de neutrófilos segmentados ($\times 10^3$ / μ L)) entre os grupos doente e controle.....	140

Gráfico 20. Distribuição amostral do número absoluto de linfócitos ($\times 10^3 /\mu\text{L}$) entre os grupos doente e controle.....	141
Gráfico 21. Distribuição amostral do número absoluto de eosinófilos ($\times 10^3 /\mu\text{L}$) entre os grupos doente e controle.....	141
Gráfico 22. Distribuição amostral do número absoluto de monócitos ($\times 10^3 /\mu\text{L}$)entre os grupos doente e controle.....	142
Gráfico 23. Curva sobrevida dos animais do grupo doente em função do número de hemácias. (Teste de Long-rank; $p = 0,825$; $p < 0,05$).....	142
Gráfico 24. Curva sobrevida dos animais do grupo doente em função da contagem total de leucócitos. (Teste de Long-rank; $p = 0,37$; $p < 0,05$).....	142
Gráfico 25. Curva sobrevida dos animais do grupo doente em função da concentração de monócitos. (Teste de Long-rank; $p = 0,27$; $p < 0,05$).....	143
Gráfico 26. Curva sobrevida dos animais do grupo controle em função da intensidade da trombocitopenia. (Teste de Long-rank; $p = 0,16$; $p < 0,05$).	143
Gráfico 27. Gráfico da distribuição amostral da concentração de albumina (g/dL) entre os grupos doente e controle.....	143
Gráfico 28. Curva sobrevida dos animais do grupo doente em função da concentração de albumina. (Teste de Long-rank; $p = 0,57$; $p < 0,05$).....	144
Gráfico 29. Distribuição da concentração de globulina (g/dL) entre os grupos doente e controle.....	144
Gráfico 30. Curva de sobrevida dos animais do grupo controle em função da concentração de globulina. (Teste de Long-rank; $p = 0,3$; $p < 0,05$).....	144
Gráfico 31. Distribuição amostral da concentração de alanina aminotransferase (ALT) (UI/L) entre os grupos doente e controle.....	145
Gráfico 32. Distribuição amostral da concentração de fosfatase alcalina (FA) (UI/L) entre os grupos doente e controle.....	145

Gráfico 33. Gráfico da distribuição amostral da concentração de gama glutamil transferase (GGT) (UI/L) entre os grupos doente e controle.....	146
Gráfico 34. Distribuição amostral da concentração de uréia (mg/dL) entre os grupos doente e controle.....	146
Gráfico 35. Distribuição amostral da concentração de creatinina (mg/dL) entre os grupos doente e controle.....	146
Gráfico 36. Distribuição amostral da concentração de CK-MB (UI/L) entre os grupos doente e controle.....	147
Gráfico 37. Curva de sobrevida dos animais do grupo doente em função da concentração de CKMB. (Teste de Long-rank; $p = 0,86$; $p < 0,05$).....	147
Gráfico 38. Gráfico da distribuição amostral da concentração de troponina cardíaca I entre os grupos doente e controle.....	147
Gráfico 39. Curva de sobrevida dos animais do grupo doente em função da concentração de troponina cardíaca I. (Teste de Long-rank; $p = 0,60$; $p < 0,05$).....	148
Gráfico 40. Distribuição amostral da concentração de NT-proBNP entre os grupos doente e controle.....	148
Gráfico 41. Curva de sobrevida em dos animais do grupo doente em função da concentração de NT-proBNP. (Teste de Long-rank; $p = 0,07$; $p < 0,05$).....	148
Gráfico 42. Distribuição de frequências do ritmo cardíaco de base apresentado no eletrocardiograma nos animais do grupo doente.....	149
Gráfico 43. Distribuição amostral da frequência cardíaca (bpm) ao eletrocardiograma entre os grupos doente e controle.....	149
Gráfico 44. Distribuição amostral do eixo elétrico médio do complexo QRS (graus) ao eletrocardiograma entre os grupos doente e controle.....	149
Gráfico 45. Distribuição amostral da duração da onda P (ms) ao eletrocardiograma entre os grupos doente e controle.....	150

Gráfico 46. Distribuição amostral da duração do intervalo PR (ms) ao eletrocardiograma entre os grupos doente e controle.....	150
Gráfico 47. Distribuição amostral da duração do complexo QRS (ms) ao eletrocardiograma entre os grupos doente e controle.....	151
Gráfico 48. Distribuição da duração do intervalo QT (ms) ao eletrocardiograma entre os grupos doente e controle.....	151
Gráfico 49. Distribuição amostral da amplitude da onda P(mV) ao eletrocardiograma entre os grupos doente e controle.....	152
Gráfico 50. Distribuição amostral do valor de amplitude da onda Q (mV) ao eletrocardiograma entre os grupos doente e controle.....	152
Gráfico 51. Distribuição do valor de amplitude da onda R (mV) ao eletrocardiograma entre os grupos doente e controle.....	153
Gráfico 52. Distribuição do valor de amplitude da onda S (mV) ao eletrocardiograma entre os grupos doente e controle.....	153
Gráfico 53. Distribuição do valor da amplitude do infradesnivelamento do segmento ST (mV) ao eletrocardiograma entre os grupos doente e controle.....	154
Gráfico 54. Distribuição do valor da amplitude da onda T (mV) ao eletrocardiograma entre os grupos doente e controle.....	154
Gráfico 55. Distribuição amostral do valor de frequência cardíaca mínima (bpm) ao Holter entre os grupos doente e controle.....	154
Gráfico 56. Distribuição amostral do valor de frequência cardíaca média (bpm) ao Holter entre os grupos doente e controle.....	155
Gráfico 57. Distribuição amostral do valor de frequência cardíaca máxima (bpm) ao Holter entre os grupos doente e controle.....	155
Gráfico 58. Distribuição amostral do valor de NN médio ao Holter entre os grupos doente e controle.....	155

Gráfico 59. Distribuição amostral do valor de SDNN (ms) ao Holter entre os grupos doente e controle.....	156
Gráfico 60. Distribuição amostral do valor de SDANN (ms) ao Holter entre os grupos doente e controle.....	156
Gráfico 61. Distribuição amostral do valor de SDNN INDEX (ms) ao Holter entre os grupos doente e controle.....	156
Gráfico 62. Distribuição amostral do número de distâncias NN ao Holter entre os grupos doente e controle.....	157
Gráfico 63. Distribuição amostral dos valores de RMSSD (ms) ao Holter entre os grupos doente e controle.....	157
Gráfico 64. Distribuição amostral dos valores de TNN (ms) ao Holter entre os grupos doente e controle.....	157
Gráfico 65. Distribuição amostral dos valores de pnn50 (%) ao Holter entre os grupos doente e controle.....	158

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

° - Graus

ACVIM - American College of Veterinary Internal Medicine

ALT - alanina aminotransferase

AP - alkaline phosphatase

AST - aspartato aminotransferase

bpm - batimentos por minuto

BNP - peptídeo natriurético cerebral (Brain peptide natriuretic)

BUN - blood urea nitrogen

CHCM - concentração de hemoglobina corpuscular média

cTnI - troponina cardíaca I (Cardiac Troponin I)

CK-MB - creatinokinase MB

CME - canine monocytic ehrlichiosis

CPT - capillary refill time

dL - decilitro

DNA - ácido desoxirribonucleico (deoxyribonucleic acid)

ECC - escore de condição corporal

ECG - eletrocardiograma

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

ELFA - enzyme-linked fluorescent assay

EMC - erliquiose monocítica canina

FA - fosfatase alcalina

FAPESP - Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo

FMVZ- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

g - gramas

G - quantidade de giros

GGT - gama-glutamil transferase

HF - alta frequência (High Frequency)

HRV - heart rate variability

hscTnI - troponina cardíaca I ultra-sensível (High sensitive cardiac Troponin I)

Hz - Hertz

IL1 β - interleucina 1-Beta

IFN γ - interferon gama

kg - quilograma

L - litro

LF - baixa frequência (Low Frequency)

MHC II - complexos principais de histocompatibilidade tipo II (Major histocompatibility complex II)

mL - Mililitro

mm - milímetro

mm³ - milímetro cúbico

mmHg - milímetros de Mercúrio

mpm - movimentos por minuto

ms - milissegundos

mV - milivolt

ng - nanograma

nm - nanômetros

NN médio - valor médio dos intervalos NN

NT-proBNP - porção aminoterminal do peptídeo natriurético cerebral (N-terminal pro B-type natriuretic peptide)

PCR - reação em cadeia de polimerase (Polymerase Chain Reaction)

PCV - plasma cell volume

pmol - picomol

pnn50(%) - porcentagem de intervalos NN consecutivos maiores que 50 ms

RDW - distribuição das superfícies de eritrócitos (Red Cell Distribution Width)

RMSSD - raiz quadrada da média entre as diferenças ao quadrado dos intervalos NN consecutivos

RNA - ácido ribonucléico (ribonucleic acid)

S3 - terceiro som cardíaco

SD - standard deviation

SDNN - desvio padrão de todos os intervalos NN

SDANN - desvio padrão dos valores médios de intervalo NN obtidos a cada cinco minutos

SDNN index - média dos desvios padrão entre intervalos NN obtidos a cada cinco minutos

TNF α - fator de necrose tumoral alfa

UI - unidade internacional

UNESP - Universidade Estadual Paulista

ULF - ultrabaixa frequência (Ultralow frequency)

VCM - volume corpuscular médio

VFC - variabilidade da frequência cardíaca

VLF - muito baixa frequência (Very low frequency)

WBC - white blood cells count

SUMÁRIO

RESUMO	01
ABSTRACT	03
CAPÍTULO I. REVISÃO DE LITERATURA	05
1. Introdução	06
2. Revisão de Literatura	06
3. Objetivos	25
 CAPÍTULO II. TRABALHOS CIENTÍFICOS	 26
"Clinical aspects and cardiac biomarkers concentrations on dogs with chronic Monocytic Ehrlichiosis: a case control study"	27
"24-hour ambulatory ECG Holter and Heart Rate Variability Analysis of chronic Ehrlichiosis-induced myocarditis."	54
 CAPÍTULO III. DISCUSSÃO GERAL	 78
 CONCLUSÕES GERAIS	 95
 REFERÊNCIAS	 97
 ANEXOS	 123

FILIPPI, M.G. **Avaliação eletrocardiográfica ambulatorial de cães com Ehrliquiose Monocítica Crônica.** Botucatu, 2016. p. 180. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A monitorização eletrocardiográfica ambulatorial, ou método Holter, vem se mostrando como uma ferramenta eficaz na Medicina Veterinária para detectar lesões cardíacas precoces, não só por monitorar a atividade elétrica do coração, como também o controle do sistema nervoso autônomo desse órgão. Sabe-se também que as principais enfermidades infecciosas de cães, como a cinomose e a erliquiose monocítica canina (EMC) provocam lesões consideráveis no coração, comprovadas por exame histopatológico. Já está comprovada a ocorrência de miocardite na EMC, levando a frequente presença de alterações na geração e condução do impulso elétrico cardíaco.

O presente estudo analisou a atividade elétrica do coração durante 24 horas, com enfoque na prevalência de arritmias, estudo da variabilidade da frequência cardíaca e na concentração de biomarcadores de cães com EMC crônica (grupo doente) em comparação à animais saudáveis (grupo controle). Quarenta e cinco por cento dos animais do grupo doente possuíam alta frequência de arritmias, de origem supraventricular e ventricular, isoladas ou sustentadas, durante o estudo.

A média da concentração de troponina cardíaca I e de creatinokinase MB (CK-MB) foi significativa ($0,24 \text{ ng/mL} \pm 0,5$; $229 \pm 205 \text{ UI/mL}$) em comparação ao grupo controle ($0,042 \pm 0,07 \text{ ng/mL}$; $126 \pm 46,12 \text{ UI/mL}$). O desvio padrão da

média de todos os intervalos NN (SDNN) e a porcentagem de intervalos RR adjacentes com diferença de duração superior a 50 milissegundos (pnn50%) também foram extremamente singificativos (83 ± 65 e $14,56 \pm 20$) quando comparado aos animais saudáveis ($268 \pm 74,6$ e $55,87 \pm 12,8$), respectivamente.

Podemos concluir que a EMC crônica possui caráter arritmôgenico, onde há persistente lesão miocárdica e intensa estimulação do sistema nervoso autônomo simpático no coração.

Palavras-chave: cão, erliquiose cronica, holter, troponina cardíaca I, creatinokinase MB, NT-proBNP

FILIPPI, M.G. **Ambulatory electrocardiographic evaluation of dogs with chronic monocytic Ehrlichiosis**. Botucatu, 2016. p. 180. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Ambulatorial electrocardiographic monitoring, or Holter method, has been shown to be an effective tool in veterinary medicine to detect early heart lesions, not only to monitor the electrical activity of the heart, but also to control the autonomic nervous system of this organ. It is also known that the main infectious diseases of dogs, such as canine distemper and canine monocytic ehrlichiosis (CME) cause considerable lesions in the heart, proven by histopathological examination. It has already been proven the occurrence of myocarditis in the CME, leading to frequent presence of changes in the generation and conduction of the cardiac electrical impulse. The present study analyzed the electrical activity of the heart during 24 hours, focusing on the prevalence of arrhythmias, heart rate variability study and the biomarkers concentration of dogs with chronic CME (sick group) compared to healthy animals (control group). Forty-five percent of the animals in the diseased group had a high frequency of arrhythmias during the study, originated from supraventricular and ventricular, isolated ou sustained.

The mean concentration of cardiac troponin I and creatinokinase MB (CK-MB) was significant ($0.24 \text{ ng / mL} \pm 0.5$; $229 \pm 205 \text{ IU / mL}$) compared to the control group ($0.042 \pm 0.07 \text{ ng / ML}$, $126 \pm 46.12 \text{ IU / mL}$). The standard deviation of the

mean of all NN (SDNN) intervals and the percentage of adjacent RR intervals with a duration difference greater than 50 milliseconds (pnn50%) were also extremely significant (83 ± 65 and 14.56 ± 20) when compared to Healthy animals (268 ± 74.6 , 55.87 ± 12.8), respectively. It can be concluded that chronic CME has an arrhythmogenic character, where there is persistent myocardial injury and intense stimulation of the sympathetic autonomic nervous system of the heart.

Key words: Cardiology, dog, ehrlichiosis, holter, cardiac biomarkers

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

1. INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por carrapatos vêm sendo constantemente estudadas há longo tempo, devido à alta prevalência na rotina da clínica de pequenos animais, principalmente nos países tropicais e subtropicais, onde a presença do carrapato transmissor é frequente. A ehrliquiose monocítica canina (EMC), em particular, possui alto potencial em causar danos ao miocárdio devido principalmente ao fator inflamatório e imunomediado importante que a bactéria *Ehrlichia canis* causa, e que ainda não está completamente esclarecido qual seu verdadeiro mecanismo fisiopatológico, mas parece haver um fator imunológico envolvido.

Esse estudo vem para acrescentar informações a respeito da miocardite da EMC especificamente na fase crônica da enfermidade, em que há hipoplasia medular nos cães, com a função de explorar com mais detalhes as lesões, juntamente com a repercussão que causam no coração e, nesse caso, na atividade elétrica e na via de condução do estímulo elétrico desse órgão, a título de obter valores prognósticos cardiovasculares importantes nesses animais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A Erliquiose Monocítica Canina (EMC) é uma enfermidade infecciosa de gravidade variável causada pelo microorganismo *Ehrlichia canis*, uma bactéria gram negativa intracelular obrigatória da família *Anaplasmataceae* presente nas células do sistema mononuclear fagocitário dos cães infectados na forma de conglomerados de corpúsculos elementares infectantes, circundados por

uma dupla membrana denominados mórulas (DUMLER et al., 2001; EVERMAN et al., 2012).

Os primeiros relatos dessa doença foram feitos na Argélia em 1935 (DONATIEN e LESTOQUARD, 1935). Ganhou relevância após a morte de centenas de cães militares da raça Pastor Alemão durante a guerra do Vietnam (HUXSOLL, et al. 1970). Desde então, vem sendo relatada em diversas regiões do mundo (BROQUI et al., 1989; MATTHEWMAN et al., 1993; PRETORIUS e KELLY, 1998; BATMAZ et al., 2001; SUTO et al., 2001) exceto na Austrália (MASON et al., 2001), comprovando a distribuição cosmopolita desse agente. Porém, essa enfermidade é mais prevalente em regiões tropicais e subtropicais (MORAES-FILHO et al., 2015).

No Brasil, sua primeira descrição foi feita em 1973 no estado de Minas Gerais (COSTA et al., 1973). Hoje se sabe que a doença é endêmica e relativamente frequente no país (VIEIRA et al, 2011), variando entre 4,8% de animais soropositivos no estado do Rio Grande do Sul (SAITO et al., 2008) até 42,5% no estado do Mato Grosso (SILVA et al, 2010).

A transmissão ocorre por meio de um vetor artrópode primário, que para os cães é o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. Esse parasita se infecta ao ingerir leucócitos infectados com a bactéria *E. canis* de cães na fase aguda ou subclínica da doença, período esse em que o patógeno está presente na corrente sanguínea (COHN, 2003). Como ocorre transmissão transestadial no carrapato, ou seja, uma vez inoculada a bactéria sobrevive após as sucessivas mudas de carapaças, o vetor pode retransmitir o agente pela saliva ao parasitar um outro cão que esteja saudável, reiniciando assim o ciclo biológico (DAVOUST et al., 2003).

Vale ressaltar que, apesar de haver evidências da presença da *E. canis* em ovários de carrapatos infectados, não há comprovação de que há transmissão transovariana do agente, mas uma vez infectado, o vetor pode retransmitir a bactéria por até 155 dias (GROVES et al., 1975; RIKIHISA, 1991; OLIVEIRA, 2016).

Os reservatórios naturais da *E. canis* são os animais da família *Canidae*, sendo os principais representantes dessa classe o coitote, a raposa, o chacal e principalmente o cão doméstico. No entanto, outros animais também podem carrear a bactéria (EVERMANN et al., 2012).

A principal razão pela qual esta bactéria causa a enfermidade clínica no cão está no fato de possuir a capacidade de resistir à destruição intramacrofágica na célula do hospedeiro e conseguir se multiplicar sem ser destruída (HARRUS, 2015). Isso ocorre porque esse patógeno lança mão de mecanismos de evasão que modulam a resposta imune do hospedeiro de uma certa forma que o agente consegue impedir sua ação sobre ele. Dentre esses mecanismos, está a inibição da formação do fagolisossomo a nível intracelular e da apoptose da célula infectada, variação do epítoto reconhecedor de antígeno, diminuição da expressão de complexos principais de histocompatibilidade do tipo II (MHC II) e diminuição de radicais reativos a oxigênio (MCBRIDE & WALKER, 2011; LIU et al., 2012).

Apesar do sistema imune do hospedeiro não ser capaz de eliminar a infecção pelos fatores citados acima, já está provado que mesmo assim o organismo reage com produção excessiva de imunoglobulinas e citocinas pró-inflamatórias sem que os mesmos logrem êxito em suas ações. Esse mecanismo induz reações imunomediadas no cão a tal ponto que não se sabe

se as lesões provocadas pela doença se dão pela ação direta da bactéria *E. canis* no hospedeiro ou pela desordem imunológica que a presença desse patógeno provoca. O resultado nesse caso é uma inflamação e destruição tecidual generalizada, com intensa vasculite em diversos órgãos, fato esse que justifica a gênese das manifestações clínicas de caráter sistêmico da doença (EVERMAN, 2012; HARRUS, 2015).

A EMC é caracterizada por três fases: aguda, subclínica e crônica, tendo como período de incubação cerca de oito a 20 dias (SYKES, 2010). A fase aguda corresponde ao período em que o micro-organismo *E. canis* começa a se disseminar pelos órgãos, principalmente linfonodos, baço e fígado até atingir o endotélio vascular, dos pulmões, rins e meninges, o que demora em média de duas a quatro semanas. O animal apresenta sinais clínicos como apatia, anorexia, vômitos, febre, descarga nasal e ocular, perda de peso, lesões oculares, linfadenopatias, hepatoesplenomegalia, dispnéia, espasmos musculares, hiperestesia, déficit de nervos cranianos e alterações laboratoriais como anemia normocítica normocrômica, leucopenia, leve proteinúria e principalmente trombocitopenia.

A fase subclínica caracteriza-se por trombocitopenia persistente, variável leucopenia e anemia com ausência de sinais clínicos e costuma durar cerca de seis a nove semanas. Após esse período, o cão pode eliminar por si só o agente, ou desenvolver a fase crônica da enfermidade. Sabe-se que há um significativo fator imunológico inato de cada animal, como a raça ou a idade, que o deixa incapaz de eliminar a bactéria completamente por si só e induz o desenvolvimento da fase crônica da enfermidade. Porém, esse mecanismo ainda é desconhecido (EVERMAN, 2012; HARRUS, 2016).

Na fase crônica, a bactéria está menos presente na circulação, porém está mais presente nos órgãos e tecidos, ou seja, as lesões já instaladas na fase aguda tendem a evoluir negativamente. Os sinais clínicos variam de brandos a graves, e o principal achado laboratorial é a pancitopenia (anemia, leucopenia e trombocitopenia) associada muitas vezes à mielossupressão, linfocitose, plasmocitose, tendências hemorrágicas, perda de peso, debilidade, uveíte anterior, hemorragias retinais, poliúria/polidipsia, sinais neurológicos compatíveis com meningoencefalite, polimiosite e edema.

As alterações bioquímicas que podem ser encontradas nessa fase incluem hipoalbuminemia, hiperglobulinemia normalmente relacionada a uma gamopatia monoclonal ou policlonal, aumento da atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e da fosfatase alcalina, proteinúria e menos frequente, aumento da concentração de uréia e creatinina (SYKES, 2010; KIKUCHI, 2015). O prognóstico nessa fase é reservado e o desfecho em casos graves costuma ser de óbito por hemorragia secundária à trombocitopatias e/ou doenças bacterianas oportunistas (EVERMANN et al., 2012).

O diagnóstico dessa afecção é baseado na anamnese, nos sinais clínicos e hematológicos, achados de sorologia (NEER, et al., 2002; COHN, 2003; HARRUS e WANER, 2011), podendo ser feita também a pesquisa do parasita no exame de esfregaço sanguíneo, no entanto essa técnica apresenta baixa sensibilidade. A confirmação do diagnóstico é feita associando-se os achados clínicos e laboratoriais com a identificação molecular do patógeno que, nesse caso, a mais utilizada pela alta sensibilidade e especificidade é a reação em cadeia de polimerase em duas etapas, ou *nested* PCR para

detecção de *E. canis* no sangue (DE MORAIS et al., 2004; HARRUS e WANER, 2011).

Atualmente, há um consenso a respeito do tratamento para essa enfermidade desde 2002 pelo ACVIM (American College of Veterinary Internal Medicine) que preconiza o uso de doxiciclina na dosagem de 10 mg/kg por via oral ou endovenosa a cada 24 horas durante 28 dias (NEER et al., 2002). O setor ambulatorial do serviço de enfermidades infecciosas dos animais domésticos da FMVZ/Unesp, em Botucatu, SP, Brasil utiliza a dose de 15 mg/kg a cada 24 horas por 30 dias e possuem resultados satisfatórios (SANTARÉM & AGUIAR, 2015). Porém durante a fase crônica, esse tratamento pode ser estendido por mais tempo e geralmente os cães não respondem devido à natureza multissistêmica do quadro e da mielossupressão instalada (EVERMAN et al., 2012; HARRUS, 2015).

Esse fármaco é um antimicrobiano bacteriostático semi-sintético da classe das tetraciclinas, que por ser lipossolúvel, é prontamente absorvida, atingindo concentrações intracelulares satisfatórias rapidamente. Essas condições são cruciais para a eliminação da bactéria no organismo do cão. (SPINOSA, 2011; EVERMAN et al., 2012; NEER et al., 2012; PAES, 2012). No entanto, a terapia com doxiciclina pode provocar efeitos colaterais como irritação gástrica e discreta hepatotoxicidade (CHAMBERS, 2001; RIVIERE e SPOO, 2003).

Algumas doenças infecciosas possuem grande potencial causador de lesões cardíacas, sendo a miocardite a mais comum delas (JANUS et al., 2014).

Por definição, miocardite é a inflamação do músculo cardíaco com potencial para prejudicar a função do miocárdio e que pode progredir para quadros de cardiomiopatia dilatada e insuficiência cardíaca congestiva crônica (ELAMM et al., 2012; KREJCI et al., 2016). O diagnóstico dessa condição é histológico, via biópsia endomiocárdica, ou post-mortem. Segundo a European Society of Cardiology, as evidências histológicas e imunohistoquímicas de miocardite são infiltrado linfocítico/eosinofílico, miocardite de células gigantes, processos granulomatosos ou necrotizantes e achados com característica de doença auto-imune no tecido (CAFORIO et al., 2013).

É importante citar que há significativos fatores imunológicos envolvidos na gênese das lesões no órgão. Dentre eles, é possível citar a concentração de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral α (TNF α), a interleucina 1 β (IL1 β), o interferon γ (IFN γ), a ação de células de defesa, como linfócitos, mastócitos e macrófagos e a presença de imunoglobulinas anti-células cardíacas. (YAMADA et al., 1994; CAIN et al., 1999; CAFORIO, 2002; MASON, 2003; BLYSZCZUK et al., 2009;).

Em cães com cinomose, está comprovado que uma grande parcela dos animais gravemente infectados apresentam lesões histopatológicas no miocárdio ventricular esquerdo e na região do nodo sinusal (REZENDE et al., 2009). A parvovirose, a leishmaniose, a babesiose e a doença de Chagas também são doenças comprovadamente causadoras de miocardite (HAYES et al., 1979; LOBETTI, 2005; COSTAGLIOLA et al., 2016; VITT et al., 2016).

PRICE & SAYER (1983) ao analisarem cães com EMC que vieram a óbito relataram a presença de hemorragia endocárdica e epicárdica. KITTLESON (1996) também relacionou a infecção por *E. canis* nos cães como

possível causa de lesões miocárdicas. No entanto, ainda não se sabe até que ponto estas lesões são primárias, pela ação do agente, ou secundárias à coagulação intravascular disseminada ou síndrome da resposta inflamatória sistêmica.

Alterações semelhantes, como miocardite, endocardite e arritmias foram encontradas em animais infectados por *Bartonella vinsonii* subespécie *berkhoffii* e espécies de alfa proteobactérias, como *Ehrlichia canis* e protozoários como *Babesia canis* e *Babesia gibsonii*, diagnosticados pela técnica de PCR no sangue e em tecidos. No entanto, a amplificação da amostra de DNA foi insuficiente para diferenciar de qual dessas três espécies se tratava (BREITSCHWERDT et al., 1999).

Casos graves de miocardite em Erliquiose humana causada pela bactéria *Ehrlichia chaffeensis* também são relatados, com evolução para óbito em um caso (WILLIAMS, 1995; HAVENS et al, 2012; NAYAK & SIMON, 2013). DEN TOOM (2016) relatou o caso de um cão com quadro de pneumonia intersticial e hipertensão pulmonar com remodelamento cardíaco direito de evolução aguda, com possível diagnóstico de Erliquiose devido ao achado sorológico e a remissão completa do quadro após terapia com doxiciclina, sildenafil e pimobendam.

Dados de exames histopatológicos do coração de 11 cães infectados exclusivamente por *E. canis* que vieram a óbito, revelaram alta porcentagem de necrose, infiltrado mononuclear perivascular e áreas de hemorragia em 82%, 73% e 82% respectivamente. Também foi verificado aumento significativo do índice apoptótico nesses animais (DINIZ, 2006).

Outro estudo analisou dados de necrópsia de 16 cães estritamente na fase crônica da EMC. Os dados encontrados foram de alterações vasculares em 68,75% desses cães, como edema, congestão, hemorragia, necrose, infiltrados neutrofílico, linfocitário, linfoplasmocitário, plasmocitário e misto. Além das alterações cardíacas, vale ressaltar a observação de hepatomegalia, esplenomegalia, e presença de glomerulonefrite em 100% dos animais avaliados (SANCHES, 2015). MACEDO (2015) também avaliou o coração de dois cães sob a mesma condição e também encontrou edema, infiltrados linfocitários e polimorfonucleares no tecido miocárdico.

Uma importante ferramenta não invasiva para identificar lesões miocárdicas em cães é a dosagem de biomarcadores como a Troponina Cardíaca I (cTnI), uma proteína contrátil que é liberada na circulação sanguínea quando há lesão com ruptura da membrana miocárdica. A dosagem desse biomarcador possui vantagens como: ser altamente sensível, específico, proporcional à injúria e persistir na circulação por tempo elevado (BABUIN, et al., 2005; O'BRIEN, et al., 2006a).

Na medicina, a dosagem da cTnI é o padrão ouro para detectar injúria miocárdica (O'BRIEN, 2006b, 2008; WELLS e SLEEPER, 2008), possuindo 100% de sensibilidade para casos de infarto agudo do miocárdio (THYGESEN et al., 2012).

Em cães essa ferramenta vem sendo utilizada há tempos e os estudos feitos até o presente momento concluíram que a dosagem da cTnI é de grande valia para detecção de lesões miocárdicas, tanto em doenças de origens cardíacas (OYAMA et al., 2004; LINDE et al., 2006; LINKLATER et al., 2007;

LEE et al., 2009; NOSZCZYKNOWAK, 2011), quanto não cardíacas (SCHOBER et al., 2002; SHAW et al., 2004; DINIZ et al., 2008).

Particularmente a endocardiose crônica da válvula mitral foi mais estudada devido a sua grande incidência e consequente importância em cães, observando-se que os níveis de cTnI costumam se elevar em animais com a doença em estado grave, ou seja, que apresentam insuficiência cardíaca congestiva concomitante, e naqueles com fibrose em miocárdio e músculos papilares, indicando importante valor prognóstico nessa doença (LJUNGVALL et al., 2010; FALK et al., 2013; POLIZOPOULOU et al., 2014).

A quantificação da cTnI pode ser realizada pelos diversos kits de ensaios imunoenzimáticos humanos, devido à alta homologia entre a sequência de aminoácidos dessa enzima em humanos, cães e gatos (95% e 96% respectivamente) (RISHNIW et al., 2004).

Um estudo realizado em 2011, relacionou a dosagem de cTnI em animais com desnivelamento do segmento ST, não identificando correlação significativa entre essas duas variáveis (SANTOS et al., 2011). Foram realizados também estudos correlacionando a dosagem desse biomarcador em cães com erliquiose monocítica e os autores mostraram que, dentre 150 animais infectados exclusivamente por *Ehrlichia canis*, cerca de 30% possuíam concentrações elevadas de cTnI (DINIZ et al., 2008).

Foram observadas também altas concentrações de cTnI, tanto em animais com mielossupressão (59% de 22 animais), como sem (45% de 22), resultantes da infecção por *E. canis*. No entanto, não houve diferença significativa entre esses dois grupos, indicando que possivelmente não há

relação entre o grau de lesão miocárdica e o estado mielossupressivo (KOUTINAS et al., 2012).

Outro biomarcador importante para o diagnóstico de lesões miocárdicas é a isoenzima creatinoquinase MB (CK-MB), uma molécula presente tanto no tecido cardíaco quanto em intestino e pulmões (LANDT et al., 1989; AKTAS et al., 1993), que costuma se elevar em resposta à isquemia/hipóxia miocárdica (BRAUNWALD e SOBEL, 1991). Em humanos é feita sua dosagem como um dos meios diagnósticos de infarto agudo do miocárdio (RAMOS e MAGALHÃES, 2002). Já em cães, há relatos de aumento na concentração de CK-MB em doenças que afetam o miocárdio (AKTAS et al., 1993; PINO et al., 2008), trauma direto ao coração (SCHOBER et al., 1999) e após administração de fármacos anestésicos (FRANCO et al., 2009).

É importante ressaltar, no entanto, que há algumas desvantagens na dosagem da CK-MB em comparação a cTnI, tanto em humanos quanto em cães, como não ser 100% específica ao miocárdio, podendo aumentar em casos de lesão ou doença muscular concomitante, pelo aparecimento retardado dessa enzima no sangue após uma lesão e dificuldade em detecção de pequenas lesões, pela ampla faixa de normalidade (GODOY et al., 1998; APPLE, 1999; SIM et al., 2008).

Há também outra classe de biomarcadores cardíacos que foram descobertos recentemente, que são os peptídeos natriuréticos. Essas proteínas, representadas principalmente pelo peptídeo natriurético cerebral (BNP) e sua porção inativa aminoterminal (NT-proBNP), costumam aumentar quando há sobrecargas tanto de volume quanto de pressão no coração (SILVA, 2014). Vem se mostrando de grande utilidade para identificar cardiopatias

crônicas/degenerativas em animais assintomáticos, diferenciar a tosse e dificuldade respiratória de origem cardíaca da pulmonar e também como indicador de prognóstico em doenças como estenose de válvula pulmonar, doença degenerativa crônica de válvula mitral e cardiomiopatia dilatada (CHETBOUL et al., 2009; SERRES et al., 2009; NOSZCZYK-NOWAK, 2011; SINGLETARY et al., 2012; KOBAYASHI et al., 2014).

Em boxers com cardiomiopatia arritmogênica, não foi observado aumento da concentração de NT-proBNP (BAUMWART et al., 2005).

Há algumas particularidades dessa dosagem, como por exemplo, a concentração de NT-proBNP pode aumentar discretamente em animais que apresentam azotemia (RAFFAN et al., 2009) e também podem diferir entre cães clinicamente normais de raças diferentes (SJÖSTRAND et al., 2014).

Está comprovado que o tempo de sobrevida para cães que possuem degeneração mixomatosa crônica de válvula mitral é menor quando ambas as concentrações de NT-proBNP e de troponina cardíaca I ultra-sensível (hscTnI) estão elevadas ou quando estas se elevam rapidamente, mostrando a importância da dosagem desses biomarcadores simultaneamente (HEZZEL et al., 2012).

A avaliação eletrocardiográfica é um exame complementar não invasivo que avalia a atividade elétrica do coração durante seu funcionamento, sendo de grande utilidade diagnóstica. Auxilia na detecção de diversas doenças cardíacas e extra cardíacas, sendo o exame de escolha para detecção e avaliação de distúrbios de ritmo e de condução do coração (TILLEY, 1992; COLEMAN AND ROBSON, 2005; FILIPPI, 2011).

A prevalência de alterações eletrocardiográficas espontâneas em cães sem doença cardíaca é cerca de 0,55% (PATTERSON et al., 1961). Segundo o mesmo estudo citado anteriormente (DINIZ et al, 2008) 35% dos 104 animais naturalmente infectados por *E. canis* possuíam alterações eletrocardiográficas, variando entre moderadas e graves, como complexos ventriculares prematuros, taquicardia supraventricular, taquicardia sinusal, ondas T altas e bloqueios do ramo direito do feixe de His, sendo as duas primeiras, associadas a valores elevados de cTnI. Essas informações mostram quão significativa foi a diferença entre ambos os estudos, deixando claro que há correlação entre a erliquiose e alterações eletrocardiográficas, porém ainda é desconhecida qual é a magnitude das arritmias.

A monitoração eletrocardiográfica ambulatorial ou método Holter é um exame complementar simples, não invasivo e de grande importância na rotina da clínica de pequenos animais, principalmente para identificar e quantificar arritmias e para a instituição e manutenção do tratamento antiarrítmico (PETRIE, 2005).

Essa ferramenta foi inventada em 1947 por Norman Jefferis Holter, justamente pela necessidade de registrar traçados eletrocardiográficos por períodos de tempo mais longos, uma vez que o registro convencional é limitado a em média dois minutos de duração. Esse tempo compreende 0,14% de todos os traçados gravados em um dia, ou seja, é muito pouco. Desde então, essa ferramenta foi aprimorada e vem sendo amplamente utilizada e estudada em seres humanos (BAROLD, 2005). Contudo em cães, relatos de seu uso datam da década de 80 (CALVERT et al., 1997).

Essa monitoração basicamente é realizada por um aparelho que registra a atividade elétrica cardíaca durante as atividades diárias normais do paciente (WARE, 2010). Baseado nos traçados obtidos é possível não apenas avaliar as características normais do eletrocardiograma, como também analisar o comportamento do sistema nervoso autônomo no coração desse paciente, por meio do histograma das distâncias RR e principalmente pelos índices da variabilidade da frequência cardíaca (CARARETO et al., 2007; CHOMPOOSAN et al., 2014).

As principais indicações para a realização desse exame são para diagnosticar arritmias intermitentes que não foram identificadas no ECG convencional e para poder correlacionar sinais clínicos como síncope e convulsões com a ocorrência de arritmias, como períodos de taquicardia ventricular ou parada sinusal por exemplo. A eletrocardiografia dinâmica também pode ser utilizado como fator decisivo na instituição de terapias antiarrítmicas, avaliação de sua eficácia, diagnóstico precoce de cardiomiopatias ocultas (principalmente a cardiomiopatia dilatada e arritmogênica) e detecção de arritmias graves em cães com doenças extra cardíacas como neoplasia, torção esplênica e doenças imunomediadas (GOODWIN, 1998; OLIVEIRA et al., 2011).

O relatório dos eventos ocorridos durante o exame de Holter é descritivo, tanto qualitativamente como quantitativamente. Nele consta principalmente qual foi o ritmo de base, a avaliação da condução atrial, atrioventricular e ventricular, a análise das extrassístoles, a relação dos achados eletrocardiográficos com os dados contidos no diário de atividades do paciente e também a análise dos índices de VFC (LORGA FILHO et al., 2013).

Um equipamento próprio para cães e gatos já está disponível nos dias de hoje, no entanto, os mais utilizados pelos médicos veterinários ainda são os de uso humano. Porém, como os softwares de análise automático foram desenvolvidos para humanos, é preciso revisar com bastante cuidado o exame, pois o cão apresenta algumas particularidades que são acusadas como sendo irregularidades quando na verdade não são. A principal delas é a arritmia sinusal, que é interpretada como extrassístoles supraventriculares (GOODWIN, 1998; MOÏSE, 1998; PETRIE, 2005).

A frequência cardíaca no cão pode variar entre valores próximos de 40 batimentos por minuto (bpm) no período de sono, ou chegar a 300 bpm em exercícios extenuantes. Pausas de dois a quatro segundos são também esperadas (MOÏSE, 1988; GOODWIN, 1998). Algumas arritmias esporádicas podem ocorrer durante a gravação em animais clinicamente saudáveis de, tais como extrassístoles ventriculares monomórficas, bloqueios atrioventriculares de segundo grau e extrassístoles supraventriculares (ULLOA et al., 1995).

Outra modalidade importante que o software analisa é a variabilidade da frequência cardíaca. Essa consiste na estimativa com base em cálculos matemáticos da variação que ocorre no automatismo do coração a cada batimento, levando em consideração as distâncias entre ondas R normais (distância RR ou NN), ou seja, entre batimentos cardíacos regulares (MARÃES, 2010; TONELLO et al., 2014).

Hoje se sabe que os batimentos cardíacos são dependentes da geração de impulsos de despolarização involuntária no nodo sinusal, comandado pelo sistema nervoso autônomo. O sistema nervoso simpático, mediado pela ação da adrenalina e da noradrenalina, tem a função de aumentar a frequência de

despolarizações, enquanto o sistema nervoso parassimpático, mediado pela acetilcolina e pela ação do nervo vago, tem a de diminuir. A frequência cardíaca é resultante, portanto, do balanço autonômico entre esses dois sistemas (TILLEY, 1992; KITTLESON, 1998; MARÃES, 2010), sendo a ativação parassimpática a que prevalece em situações normais (MALIK et al., 1996).

A variabilidade da frequência cardíaca avalia justamente a maneira que esta se comporta durante as diferentes fases do dia, principalmente durante o estado de sono e vigília (CALVERT, 1998).

O cálculo dos índices de VFC pode ser realizado de duas maneiras, uma utilizando o domínio do tempo e outra o domínio da frequência. O primeiro leva em consideração cálculos estatísticos obtidos sobre os intervalos RR normais e o segundo nas frequências cardíacas sendo transformadas em potência, para análise no poder espectral (CALVERT, 1998).

Na análise do domínio do tempo, as variáveis estudadas são diversas, representadas pelo valor médio dos intervalos NN (NN médio), desvio padrão entre todos os intervalos NN (SDNN), desvio padrão dos valores médios de intervalo NN obtidos a cada cinco minutos (SDANN), média dos desvios padrão entre intervalos NN obtidos a cada cinco minutos (SDNN index), raiz quadrada da média entre as diferenças ao quadrado dos intervalos NN consecutivos (rMSSD) e porcentagem de intervalos consecutivos maiores que 50 ms (pNN50) (OLIVEIRA et al., 2012).

Os índices SDNN, SDANN, SDNN index analisam variações entre batimentos a longo prazo. São úteis para avaliar ambos os sistemas (simpático e parassimpático), no entanto não é possível distinguir a partir deles se a

diminuição da VFC é devido a um aumento do tônus simpático ou uma diminuição do tônus parassimpático. Já os índices rMMSD e pNN50 são variáveis que levam em consideração alterações curtas e rápidas entre intervalos RR adjacentes, sendo possível avaliar a partir desses valores a ação parassimpática (tônus vagal) e a respiração (GOODWIN, 1998; MALIK, 1996; MARÃES, 2010).

Na análise do domínio da frequência, a variabilidade da frequência cardíaca é analisada conforme sua oscilação periódica em frequências diferentes durante o exame. A obtenção desses dados basicamente é realizada pelo método de densidade de potência espectral e envolve cálculos matemáticos complexos. A VFC é dividida, portanto, em dois grandes grupos, um componente de alta frequência e um de baixa frequência (VANDERLEY, et al., 2009).

O componente de alta frequência ou high frequency (HF) compreende a mudanças que ocorrem na faixa de 0,15 a 0,4 Hz e estão relacionados com a atividade parassimpática sobre o coração. Já o componente de baixa frequência ou low frequency (LF) compreende a mudanças que ocorrem na faixa de 0,04 a 0,15 Hz e estão relacionados com ambas as atividades simpática e parassimpática, com predomínio da primeira. A relação entre os dois componentes de baixa e alta frequência (LF/HF) fornece informações valiosas a respeito do balanço autonômico (CALVERT, 1998; VANDERLEY, 2009; MARÃES, 2010).

Existem também dois outros componentes – o de muito baixa frequência ou very low frequency (VLF) e o de ultrabaixa frequência ultra low frequency (ULF), mas como a função de ambos é incerta, estes não são muito utilizados

(MALIK e CHAIRMAN 1996). No entanto, sabe-se que a VLF está relacionada com a regulação da temperatura corporal, do tônus vasomotor periférico e do sistema renina angiotensina (AKSELROD et al., 1985).

Em humanos esses índices são muito utilizados, principalmente para avaliar o risco de eventos cardiovasculares precoces como a insuficiência cardíaca congestiva, onde o coração começa a falhar na função de bombear o sangue, mas não o suficiente para acarretar em sinais clínicos (MARÃES, 2010).

Nessa fase, o controle autonômico já se altera, pois o coração ativa mecanismos compensatórios para compensar o baixo débito cardíaco, sendo um deles a maior ativação simpática no órgão e, conseqüentemente, menor ativação parassimpática. Essa mudança é vista pela diminuição da variabilidade da frequência cardíaca. Essa ferramenta também é usada como marcador prognóstico de pacientes que sofreram infarto agudo do miocárdio (BARROS E BRITO, 2005).

Em cães, estudos recentes mostraram que os índices de VFC no domínio do tempo diminuem em animais que apresentavam cardiopatias em fases avançadas, como a endocardiose de válvula mitral e cardiomiopatia arritmogênica do ventrículo direito, mostrando que de fato, os valores se alteram quando começam a apresentar graus leves de insuficiência cardíaca congestiva com ativação de mecanismos compensatórios (CHAMAS 2011; RASMUSSEN et al., 2014). Foi observado também que animais obesos não cardiopatas, com valores de escore de condição corporal (ECC - PURINA®/ LAFLAMME et al., 1994) de 8 e 9 apresentaram valores diminuídos de VFC em comparação a animais de escore menor (ECC 5) (MAZINI, 2011).

Por fim, CALVERT e colaboradores em 2000 realizaram um estudo em cães da raça Doberman Pinscher, apresentando cardiomiopatia dilatada leve a moderada ao exame ecodopplercardiográfico e observaram que a VFC não se alterou, justamente pois apesar de existir doença cardíaca nesses cães, não foi suficiente para provocar insuficiência do órgão e ativar os mecanismos compensatórios.

3. OBJETIVOS

Gerais: Estudo eletrocardiográfico de cães com Erliquiose Monocítica Crônica associado à concentração sérica dos biomarcadores cardíacos, CKMB, Troponina Cardíaca I e NT-proBNP.

Específicos:

- Avaliar a frequência e magnitude das arritmias durante as 24 horas de gravação.
- Observar o balanço autonômico em resposta às lesões e alterações encontradas.
- Alterações dos biomarcadores cardíacos e de sua relação com parâmetros clínicos, hematológicos, eletrocardiográficos e índices de VFC.
- Estimativa de possíveis fatores de risco na doença.

CAPITULO II

TRABALHOS CIENTÍFICOS

Artigo a ser enviado para a revista "The Veterinary Journal".

Normas:

https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/623077?generatepdf=true

Original Article

"Clinical aspects and cardiac biomarkers concentrations on dogs with chronic Monocytic Ehrlichiosis: a case control study"

M.G. Filippi ^a, A.C. Paes ^b, M.G.S. Charlier ^c, E. Oba ^d, F.F. Souza ^e, R. Takahira ^f, M.L.G. Lourenço ^{g*}

^a Veterinary Clinic Department, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, SP, Prof. Doutor Walter Mauricio Correa St. Botucatu 18618-681, Brazil - mauriciofilippi@terra.com.br

^b Department of Veterinary Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, SP, Prof. Doutor Walter Mauricio Correa St. 18618-681, Brazil - paesacmi@fmvz.unesp.br

^c Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, SP, Prof. Doutor Walter Mauricio Correa St 18610-970, Brazil - murilocharliervet@hotmail.com

^d Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, SP, Prof. Doutor Walter Mauricio Correa St 18610-970, Brazil - euniceoba@fmvz.unesp.br

^e Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, SP, Prof. Doutor Walter Mauricio Correa St 18610-970, Brazil - fafesouza@hotmail.com

^f Veterinary Clinic Department, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, SP, Prof. Doutor Walter Mauricio Correa St. Botucatu 18618-681, Brazil - takahira@fmvz.unesp.br

^{g*} Veterinary Clinic Department, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, SP, Prof. Doutor Walter Mauricio Correa St. Botucatu 18618-681, Brazil - mege@fmvz.unesp.br

* Corresponding author. Tel.: +55 14 3880-2044.

E-mail address: mege@fmvz.unesp.br (M.L.G. Lourenço)

44 *Abstract*

45 Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME) is a prevalent systemic disease
46 worldwide that causes lesions due to direct agent injury and secondary autoimmune
47 lesions in the dog. It is known the occurrence of myocarditis in this cases.

48 The present study analyzed the clinical, haematological, biochemistry and analysis of
49 cardiac biomarkers data, Creatinokinase-MB (CKMB), Cardiac Troponin I (cTNI) and
50 N-terminal pro B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) of 20 naturally infected dogs on
51 the chronic phase of CME at the initial attendance (G1) and a follow-up of 28 days was
52 made. This data was compared with a control group of ten healthy animals. Eight of the
53 20 dogs (40%) died after 28 day monitoring. Anorexia, emesis, fatigue,
54 hypoalbuminemia, heart murmurs and raise of Alanine Aminotransferase (ALT) and
55 Alkaline Phosphatase (AP) were common signs encountered. Fatigue was statistic
56 predictor of mortality. The mean concentration of cTNI and CKMB was significant (0.24
57 $\text{ng / mL} \pm 0.5$; $229 \pm 205 \text{ IU / mL}$) compared to the control group ($0.042 \pm 0.07 \text{ ng /}$
58 mL ; $126 \pm 46 . 12 \text{ IU / mL}$). No differences were found between the concentration of
59 NT-proBNP on G1 (135.46 ± 29.7) and G2 (138.28 ± 19.77). This data suggest that
60 chronic CME causes persistent myocardial injury, with no signs of pressure/volume
61 overload. Fatigue demonstrated a possible risk factor for survival.

62

63 Key words: myocarditis, cardiac troponin I, CKMB, NT-proBNP, chronic Ehrlichiosis

64

65

66

67

68 **Introduction**

69 Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME) is an infectious disease of worldwide
70 distribution caused by the obligated intracellular bacteria *Ehrlichia canis* and is
71 transmitted by the tick *Rhipicephalus sanguineus*. The chronic phase of the disease is the
72 most serious, responsible for high mortality rates, but still unknown what are the factors
73 that trigger it. The main theory is an immune disorder involved (DUMLER et al., 2001;
74 EVERMAN et al., 2012).

75 This bacteria uses of evasion mechanisms to multiply and spread in the body of
76 the dog, which is obligated to produce inflammatory factors, which is not only
77 ineffective in destroying the agent but also produce intense inflammation, vasculitis and
78 destruction of many organs and tissues caused by the action of the agent and for
79 autoimmune factors (HARRUS, 2015; HARRUS, 2016). Apathy, anorexia,
80 splenomegaly, hemorrhagic tendencies, pancytopenia, hypoalbuminemia and increased
81 in serum alanine aminotransferase activity are frequent changes of dogs at that stage
82 (MYLONAKIS et al., 2004). Myocarditis also occur at CME, as in other infectious
83 diseases, such as Babesiosis, Parvovirus, Chagas disease, Leishmaniosis and
84 Leptospirosis (HAYES et al., 1979; LOBETTI, 2005; DINIZ et al., 2008;
85 COSTAGLIOLA et al., 2016; VITT et al., 2016).

86 Therefore, the aims of this study were using 20 dogs naturally infected by
87 chronic CME to: (1) evaluate clinical, hematological and biochemical parameters, (2)
88 evaluate the degree of myocardial injury search for signs of volume/pressure in the heart
89 by the CKMB, cTnI and NT-proBNP concentration and (3) analyze the survival rate of
90 the sick dogs and identify possible risk factors for mortality in this phase of the disease.

91

92 **Matherial and Methods**

93 *Animals*

94 20 sick dogs were selected for the study, of several breeds, maximum age of 5
95 years and varied body weight, attended in the Department of Veterinary Hygiene and
96 Public Health of the Veterinary Hospital of the Schooll of Veterinary Medicine and
97 Animal Science, São Paulo State University (FMVZ UNESP), in Botucatu between July
98 2014 and July 2016 to compose the sick Group of animals (G1). Inclusion criteria
99 adopted followed a previous classification (MYLONAKIS et al., 2004): (1) Clinical
100 signs such as apathy, anorexia, splenomegaly, hemorrhagic tendencies and historical of
101 tick infestation; (2) hematologic changes that indicate bone marrow hypoplasia, such as
102 nonregenerative anemia ($PCV \leq 25\%$), leukopenia ($WBC \leq 3,000 \text{ cels}/\mu \text{ L} <$) with
103 reduction of all cell lines (neutrophils, lymphocytes, eosinophils and monocytes), severe
104 thrombocytopenia (platelet count $< 20,000/\mu \text{L}$); (3) molecular findings of nested PCR
105 positive for *Ehrlichia canis* in whole blood sample.

106 The exclusion criteria adopted was dogs aged more than 5 years, who were in
107 therapy with antibiotics that destroy *E. canis* (Tetracyclines or Chloramphenicol), or
108 had previous heart disease or a negative nested PCR for *Ehrlichia canis*.

109 Ten healthy animals kindly provided by their owners served as a control group
110 (G2). In all 30 animals were carried out all the tests proposed in the following order:
111 data collection of anamnesis, determination of arterial blood pressure, physical
112 examination, precise cardiopulmonary auscultation, and blood collection for
113 hematologic and biochemical analysis, PCR analysis and dosage of cardiac biomarkers.
114 Control animals that showed any changes in one of these parameters were excluded
115 from the analysis. The Ethics Committee on the use of Animals approved the study –
116 CEUA-FMVZ-Unesp Botucatu protocol number 83/2014 because it is in accordance

117 with the ethical principles on animal experimentation.
118 For the animals to participate in the study, it was necessary that the owner give the
119 authorization, by signing the informed consent form

120

121

122 *Collection and analysis of biological material*

123 Ten milliliter of blood approximately were collected from each animal selected
124 by venipuncture of the jugular with disposable syringes. The material collected was
125 immediately divided into aliquots added in two tubes, one containing EDTA-K2 as an
126 anticoagulant for hematologic and molecular analysis and another tube with a
127 coagulation activator gel for serum biochemical, CK-MB, cTnI and NT-proBNP
128 evaluation. The hematological analysis, was performed according to the following
129 steps:

130 1) Plasma cell Volume (PCV) determined by the microhaematocrit technique;
131 (2) Plasma protein concentration by the plasma's refractometry technique; (3) Total
132 count of red blood cells and white blood cells by electronic cell counter pocH-100iV[®]
133 and the leukocyte differentiation obtained by 100 count cells in blood smear; (4)
134 quantification of platelet count in Neubauer Chamber with a 1% ammonium oxalate as a
135 diluent. It was also search the organism *Ehrlichia canis* in blood smear slide.

136 The biochemical analysis was the determination of blood urea nitrogen (BUN),
137 creatinine, alanine and aspartate aminotransferase, (ALT and AST), alkaline
138 phosphatase (AP), total protein and albumin . After centrifugation of samples for 10
139 minutes the 1532 X G, dosages was made by automatic biochemical Analyzer Cobas
140 Mira Plus (Roche).

141

142 *Molecular Diagnostic*

143 The molecular diagnosis by PCR (Polymerase chain reaction) was conducted in
144 private lab, The PCR technique used for detection of *Ehrlichia canis* was the nested
145 PCR, as the previously described (WEN et al., 1997). On the first step, DNA was
146 extracted from positive blood smears as a template for amplify a fragmentation of 16S
147 rRNA gene using especific primer ECC and ECB. This technique will detect bacteria
148 from genera Ehrlichia, E. canis, E. chaffensis, E. muris and Neorickettsia helminthoeca.
149 The second step uses the same technique, although with diferent primers and DNA
150 template, HE-3/ECA and the DNA obtained on the previous step, respectively. This will
151 differentiate *E. canis* samples from the other *Ehrlichia* members.

152

153 *Dosage of CK-MB*

154 The determination of serum CK-MB was held at the laboratory The method used
155 was the kinetic-UV through commercial kit (CK MB-1 – UV – K069 Bioclin) in
156 automatic biochemical Analyzer Cobas Mira Plus (Roche)

157

158 *Dosage of Cardiac Troponin I (cTnI)*

159 The determination of cardiac troponin I was made by the authomatizes
160 imunoassay analyzer mini-VIDAS (Biomeri  ux). The technique used was the ELFA
161 (Enzyme-Linked Fluorescent Assay).

162

163 *Dosage of NT-proBNP*

164 The determination of the NT-proBNP concentrarion was performed by the
165 enzyme immunoassay method, sandwich type, or ELISA method, with Enzyme-linked

166 Immunosorbent kit Assay for N-Terminal Pro Brain Natriuretic Peptide (CloudClone
167 Corp). The reading of the absorbance plate was made at 450 nm.

168

169 *Statistical analysis*

170 For the qualitative data of anamnesis and physical examination of the animals of
171 G1, descriptive analysis and Fischer exact test were done to compare relative
172 frequencies of each character between animals, which survived the 28 days of
173 observation and those who died during this period.

174 For quantitative data, such as hematological and biochemical parameters and
175 dosage of the biomarkers, the Kruskal-Wallis test was performed to analyze if the data
176 follow Gaussian distribution. Then, the comparative distribution of values between G1
177 and G2 was done using the t-test for independent samples for parametric data and the
178 Mann-Whitney test for nonparametric. Correlation studies, through the Pearson test was
179 made, being the significant results shown below.

180 Kaplan-Meier survival curves were developed to compare under various
181 conditions the animals of G1, which survived the 28 days of observation and those who
182 came to death during this period. Significant differences between curves were analyzed
183 by the log-ranked test. The graphs and statistical tests were made with the aid of the
184 statistical software analyser. The level of significance was $p\text{-value} < 0.05$.

185

186

187 **Results**

188 The twenty animals of the G1 consisted of ten males and ten females, varied
189 pure breeds (8/20), such as Labrador Retriever, Yorkshire Terrier, Pug, Schnauzer,
190 Lhasa Apso, Border Collie, Bull Terrier and Pitbull along. The frequency of mixed
191 breed dogs was (12/20). The mean and range of age (year) and body weight was 2.7 (0.4
192 – 6 years) and 11.17 (2.6 – 24.8 kg) respectively. The 10 animals evaluated in the
193 control group, were 5 males and 5 females, of pure breeds (7/10), such as Labrador
194 Retriever, Cocker Spaniel, Yorkshire Terrier, Border Collie, Pitbull, German Shepherd,
195 Australian Collie along with mixed breed dogs (3/10). The mean and range of age and
196 body weight was 1.5 (0.75 – 5 years) and 23.01 (4.5 – 35 Kg) respectively.

197

198 *Clinical Parameters*

199 The collection of data about anamnesis of the animals of the sick group, was at
200 the time of attendance. This analysis were not made for the control group because they
201 were healthy. The distribution of the frequency analysis is exposed in Fig. 1.

202 The owners of animals with chronic CME reported more frequently the presence
203 of hiporexia (75%), weight loss (45%), fatigue and weakness (35% for both) and on the
204 other hand, low frequency (30%) of bleeding tendencies, ophthalmologic (25%) and
205 articular (10%) lesions. There were no reports about coughing and/or sneezing. Only
206 four animals (20%) had this disease previously. The survival curve of the animals of G1
207 is exposed in Fig.2.

208 As the mortality rate was 8 eight of 20 animals (40%) during the period of 28
209 days they were observed, frequency analysis was conducted on two subgroups
210 separately, one of survival patients and other from died patients. The purpose was to

211 compare the frequencies of each other, using the Fischer's exact test. This case, only
212 fatigue was close to a significative difference ($p=0,06$).

213 The analysis shows that emesis, fatigue and weakness was the characteristics
214 that differ between the two subgroups. In these cases, Kaplan-Meier curves were
215 developed, in order to determine whether these items were related to decreased survival.
216 Although all of them differed subjectively, fatigue had estatistical difference ($p =$
217 0.037).

218 The same procedure was done for the data obtained of physical examination.
219 High relative frequencies could be observed on the general state characteristic, where 11
220 of the 20 dogs (55%) were apatic, eight dogs (40%), with modified capillary refill time
221 (CPT) on five (25%) the value was 1 second and one and three seconds on three animals
222 (15%). Eighteen dogs (90%) had increased to one or more lymph nodes.

223 Cardiac auscultation revealed a high incidence of changes, 13/20 dogs (65%)
224 presented at least one,being the most common the presence of grade III or IV/VI
225 holossystolic murmur in mitral and tricuspid focus. In three cases (15%), it was possible
226 to detect presence of S3, the gallop rhythm. About pulmonary auscultation, there was an
227 incidence of pulmonary crackles in six animals (30%), more common in cranial lobes.

228 Data from the abdominal palpation showed changes in 17 of 20 dogs (85%)
229 studied. In most cases, an organomegaly on the ventral epigastric region, suggesting
230 hepatomegaly and/or splenomegaly. Another common change was abdominal pain .

231 The corporal condition of the dogs was also subjectively evaluated and showed
232 that 10 of them (50%), were in a low condition, considered skinny. The analysis of
233 quantitatives variables of physical exam of both groups are exposed on table 1.
234 Significative differences were found on the systolic blood pressure and heart rate
235 characteristic. The respiratory rate was not different.

236

237 *Hematological parameters*

238 The hematological quantitative variables of both groups are arranged on the
239 table 4. The results were statistically lower in all counts compared to the healthy
240 animals. But the changes were part of the inclusion criteria. Kaplan-Meier curves were
241 performed for all counts. It is worth mentioning that only the curves as a function of the
242 concentration of monocytes and platelets counts diverged subjectively, but the p value
243 found to log test ranked was 0.26 and 0.17.

244

245 *Biochemical parameters*

246 The values of biochemical analysis of both groups, including the values of
247 concentrations of biomarkers, are set out in table 5.

248 The analysis of albumin and globulin, showed values statistically smaller and
249 larger as compared to the control group, respectively. These data show that animals
250 chronic infected are hypoalbuminemic and hyperglobulinemic, ranging from 1,1-2,9
251 and 2.9 g/dL. About the hepatic function enzymes, it was possible to observe that the
252 ALT and AF values were, on average, larger than the reference interval (30 and 40%,
253 respectively), but only the second one was statistically different, compared to G2.

254 According to markers of renal function, BUN and creatinine remained, on
255 average, within the reference value for the species in both groups. Five dogs (25%)
256 were with BUN values above the reference value, being the biggest one of 107 mg/dL.
257 Already in relation to creatinine values, four dogs (20%) showed decreased values of
258 that substance. In both cases, there was no statistically significant difference in
259 comparison with the control group.

260 Among cardiac biomarkers evaluated, the concentration of the MB isoenzyme of
261 creatine kinase (CKMB), on G1 was, on average, greater than the reference values in
262 11/20 (55%) dogs and statistically different from G2. By comparing the concentration
263 of CKMB in dogs with and without weight loss revealed no significant difference
264 between groups ($p = 0.33$). The sample distribution of the values is Fig. 3.

265 About the dosages of cardiac troponin I, the data obtained from animals of G1
266 have shown increasing concentration in seven (35%) of the studied dogs and were
267 statistically higher than the G2. There was extreme values recorded, like dogs with
268 concentration of 0.46, 0.9 and 2.14 ng/mL. Below the Fig. 4 shows the sampling
269 distribution of the values on both groups. The survival analysis performed comparing
270 dogs with high and low concentrations of cTnI are shown on Fig. 5. Dogs who showed
271 high concentrations of this biomarker, subjectively came to death in shorter period of
272 time (up to 5 days of observation).

273 The values of NT-proBNP is shown in the Fig. 6. There were no increased
274 above the reference values in the G1 and significant difference between G1 and G2.

275 **Discussion**

276 The clinical aspects of the dogs of the study in question, at first demonstrated
277 clinical signs and physical examination data similar to that found in previous clinical
278 studies involving ehrliquiosis (FRANK and BREITSCHWERDT., 1999; MYLONAKIS
279 et al., 2004). Possible risk factors identified by survival curve were fatigue, weakness,
280 emesis, but only the first significant. Although there are reports of lung lesions seen in
281 histopathological and/or image scans at CME (CODNER et al., 1985; FRANK &
282 BREITSCHWERDT, 1999; EVERMAN, 2012), and presence of lung crackles in 6/20
283 (30%) of the dogs, there was no report of cough/sneeze.

284 The increased CRT and presence of systolic murmur to varying degrees, in 40%
285 and 65% of cases respectively. The possible conditions associated are diverse, since
286 anemia until cardiac diseases (WARE, 2010). Knowing the condition of anemia,
287 hypoproteinemia, and increased sympathetic tone of animals of G1 and the fact that
288 only young dogs were included, this change does not reflect heart disease specifically.

289 Between the possible causes of death of the dogs were central nervous system
290 disorders (1/8), systemic inflammatory response syndrome (3/8) and sudden death (4/8).
291 Of the surviving animals, 3/10 improved clinically and hematologically, 6/10 have
292 improved but remained pancytopenic and 3/10 lost contact.

293 It is worth mentioning that, although the chronic phase is not confirmed by bone
294 marrow cytology, the experimental group used was similar to that used in previous
295 studies (MYLONAKIS, 2004; 2011) of chronic phase considering hematologic and
296 biochemical changes (severe pancytopenia, hypoalbuminemia and increased in ALT,
297 ALP Pactivity), so we will consider the dogs with medullary hypoplasia.

298 It was observed that the percentage of raised values of CKMB concentrations
299 were higher compared to those of cTnI, probably due to the CKMB half-life in the body

300 is larger (12 hours) than the troponin (2 hours) (DUNN et al., 2011; LANG &
301 WÜRZBURG, 1982). According to an experimental study, these two biomarkers rise
302 when there is maximum myocarditis damage, which decreases after the injury. The
303 observed increase shows that there is indeed constant destruction, necrosis, edema and
304 remodeling of myocardial fibers probably secondary to progressive and intense
305 infiltration of mononuclear cells, vasculitis, hemorrhages in myocardium and action of
306 immunoglobulins (DINIZ, 2008). However, the inconclusive survival analysis shows
307 that despite the injury, the biomarkers have prognostic value on this case or larger studies
308 is needed to detect a difference if there is one.

309 As the NT-proBNP rise when there is stress condition by volume/pressure on
310 atrial and ventricular chambers (OMLAND et al., 2009), we can say that there was no
311 such event in dogs of this study. However, a few observations can be made: it is
312 important to note that the concentration of NT-proBNP not only suffer from weekly
313 differences on each animal, also varies considerably according to the dog breed
314 (KELLIHAN et al., 2009; SJOSTRAND et al., 2014). Therefore, in order to compare
315 the elevation of this biomarker front the disease in question will be given attention to
316 value sampling distribution between the groups.

317 So far, although several authors related the rise of this biomarker on dogs with
318 cardiomyopathies (CHETBOUL et al., 2009; SERRES et al., 2009; NOSZCZYK-
319 NOWAK, 2011; SINGLETARY et al., 2012; KOBAYASHI et al., 2014), no studies
320 correlate these biomarkes with myocarditis.

321

322

323 **Conclusions**

324

325 We concluded that chronic EMC indeed causes clinical and laboratory changes
326 as depression, weight loss, and splenomegaly, pancytopenia, hypoalbuminemia and
327 heart murmurs. The myocardial lesions are frequent and poor clinical condition and/or
328 high heart rate during the day are proportional to the concentration of cTnI. There were
329 no evidence signs of volume/pressure overload. The presence of hypoalbuminemia and
330 significant decrease of platelet count and showed as potentials risk factors for CME.

331

332 **Conflict of interest statement**

333 None of the authors has any financial or personal relationships that could
334 inappropriately influence or bias the content of the paper.

335 **Acknowledgements**

336 This study was supported by the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de
337 São Paulo (FAPESP) - nº 2014/11219-6; 2015/16376. São Paulo /SP - Brazil.

338 **References**

- 339 BROWN, S.; ATKINS, C.E.; BAGLEY, R.; CARR, A.; DAVIDSON, M.; EGNER, B.;
340 ELLIOT., HENIK, R. Guidelines for the Identification, Evaluation, and
341 Management of Systemic Hypertension in Dogs and Cats. *Journal of Veterinary*
342 *Internal Medicine*, v. 21, p.542-558, 2007.
- 343
344 AKTAS, D.M.; AUGUSTE, D.; LEFEBVRE, H.P.; TOUTAIN, P.L.; BRAUN, J.P.
345 Creatine kinase in the dog: a review. *Veterinary Research Communications*,
346 v.17, n.5, p.353-369, 1993.
- 347
348 CHETBOUL, V.; SERRES, F.; TISSIER, R.; LEFEBVRE, H. P.; SAMPEDRANO, C.
349 C.; GOUNI, V.; POUJOL, L.; HAWA, G.; POUCHOLON, J. Association of
350 plasma Nterminal pro-B-type natriuretic peptide concentration with mitral
351 regurgitation severity and outcome in dogs with asymptomatic degenerative
352 mitral valve disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.23, p.984–994,
353 2009.
- 354 CODNER, E.C.; ROBERTS, R.E.; AINSWORTH, A.G. Atypical findings in 16 cases
355 of canine ehrlichiosis. *Journal of American Veterinary Medical Association*,
356 v.186, n.2, 1985.

357

358 COSTAGLIOLA, A.; PIEGARI, G.; OTROCKA-DOMAGALA, I.; CICCARELLI,
359 D.; IOVANE, V.; OLIVA, G.; RUSSO, V.; RINALDI, L.; PAPPARELLA,
360 S.; PACIELLO, O. Immunopathological Features of Canine Myocarditis
361 Associated with *Leishmania infantum* Infection. *Biomed Research International*,
362 v. 2016, p.1-6, 2016.

363

364 DINIZ, P.P.V.P.; DE MORAIS, H.S.A.; BREITSCHWERDT, E.B.; SCHWARTZ, D.S.
365 Serum Cardiac Troponin I Concentration in Dogs with Ehrlichiosis. *Journal of*
366 *Veterinary Internal Medicine*, v. 22, p.1136-1143, 2008.

367

368 DUMLER, J. S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P.; DASCH, G.A.; PALMER, G.H.;
369 RAY, S.C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F.R. Reorganization of genera in
370 the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales:
371 unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with
372 *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species
373 combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective
374 synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and*
375 *Evolutionary Microbiology*, v. 51, n.6, p. 2145-2165, 2001.

376

377 DUNN, M.E.; COLUCIO, D.; HIRKALER, G.; MIKAELIAN, I.; NICKLAUS, R.;
378 LIPSHULTZ, S.E.; DOSSEGGER, L.; REDDY, M.; SINGER, T.; GENG, W.
379 The Complete Pharmacokinetic Profile of Serum Cardiac Troponin I in the Rat
380 and the Dog. *Toxicology Science*, v.123, n.2, p.368-373 , 2011.

381

382 ELAMM, C.; FAIRWEATHER, D.; COOPER, LT. Pathogenesis and diagnosis of
383 myocarditis. *Heart*, v. 98, n. 11, p.835-840, 2012.

384

385 EVERMANN, J. F.; SELLON R.K.; SYKES, J.E. Viral, Rickettsial, and Chlamydial
386 Diseases. In: *Greene – Infectious Diseases of the dog and cat*. 4^a ed – Elsevier
387 Saunders, p.227-259, 2012.

388

389 FRANK, J.R.; BREITSCHWERDT, E.B. A Retrospective Study of Ehrlichiosis in 62
390 Dogs from North Carolina and Virginia. *Journal of Veterinary Internal*
391 *Medicine*, v.13, p. 194-201, 1999.

392

393

394 HARRUS, S., WANER, T. Diagnosis of monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*):
395 An overview. *The Veterinary Journal*, v.187, p. 292-296, 2011.

396

397 HARRUS, S. Perspectives on the pathogenesis and treatment of canine monocytic
398 ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). *The Veterinary Journal*, v.203, n.3, p.239-240,
399 2015.

400

401 HAYES, MA.; RUSSELL, RG.; BABIUK, LA. Sudden death in young dogs with
402 myocarditis caused by parvovirus. *Journal of the American Veterinary Medical*
403 *Association*, v. 174, n. 11, p. 1197-1203, 1979.

404

405

406 LANG, H.; WURZBURG, U. Creatine kinase, an enzyme of many forms. *Clinical*
407 *Chemistry*, v. 28, p.1439-1447, 1982.

408
409 LOBETTI, RG. Cardiac involvement in canine babesiosis. Journal of the South African
410 Veterinary Association, v. 76, n. 1, p. 4-8, 2005.
411
412 KELLIHAN, H.B.; OYAMA, M.A.; REYNOLDS, C.A.; STEPIEN, R.L. Weekly
413 Variability of plasma and serum NT-proBNP measurements in normal dogs.
414 Journal of Veterinary Cardiology, v.11, p.593-597, 2009.
415
416 KOUTINAS, K.C.; MYLONAKIS, M.E.; O'BRIEN, P.J.; LEONTIDES, L.;
417 SIARKOU, V.I.; BREITSCHWERDT, E.B.; KOUTINAS, A.F. Serum cardiac
418 troponin I concentrations in naturally occurring myelossuppressive and non-
419 myelossuppressive canine monocytic ehrlichiosis. The Veterinary Journal, n. 194,
420 p. 259-261, 2012.
421
422 MYLONAKIS, M.E.; KOUTINAS, A.F.; BREITSCHWERDT, E.B.; HEGARTY,
423 B.C.; BILLINIS, C.D.; LEONTIDES, L.S.; KONTOS, V.S. Chronic Canine
424 Ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): A Retrospective Study of 19 Natural Cases.
425 Journal of the American Animal Hospital Association, v.40, p. 174-184, 2004.
426
427 OMLAND, T.; LEMONS, J.A.; SABATINE, M.S.; CHRISTOPHI, C.A.; RICE, M.M.;
428 JABLONSKI, K.A.; TJORA, S.; DOMANSKI, M.J.; GERSH, B.J.;
429 ROULEAU, J.L.; PFEFFER, M.A.; BRAUNWALD, E. Sensitive Cardiac
430 Troponin T Assay in Stable Coronary Artery Disease. The New England Journal
431 of Medicine, v.361, p.2538-2547, 2009.
432
433 PINO, O.V.; LI, E.O.; ALVARADO, A.S.; FERNÁNDEZ, V.P.; DÁVILA, R.F.;
434 GAVIDIA, C.C. Determinación de los niveles séricos de enzimas cardíacas em
435 perros adultos com enfermedad cardiovascular. Revista de Investigaciones
436 Veterinarias del Peru, v.19, n.2, p.144-147, 2008.
437
438 NOSZCZYK-NOWAK, A. NT-pro-BNP and troponin I as predictors of mortality in
439 dogs with heart failure. Poland Journal Veterinary Science, v.14, n.4, p.551-556,
440 2011.
441
442 SJÖSTRAND, K.; WESS, G.; LJUNGVALL, I.; HÄGGSTRÖM, J.; MERVEILLE,
443 A.C.; WIBERG, M.; GOUNI, V.; LUNDGREN WILLESEN, J.; HANÅS, S.;
444 LEQUARRÉ, A.S.; MEJER SØRENSEN, L.; WOLF, J.; TIRET, L.;
445 KIERCZAK, M.; FORSBERG, S.; MCENTEE, K.; BATTAILLE, G.;
446 SEPPÄLÄ, E.; LINDBLAD-TOH, K.; GEORGES, M.; LOHI, H.;
447 CHETBOUL, V.; FREDHOLM, M.; HÖGLUND, K. Breed differences in
448 natriuretic peptides in healthy dogs. Journal of Veterinary Internal Medicine,
449 v.28, n.2, p.451-457, 2014.
450
451 SINGLETARY, G.E.; MORRIS, N.A.; LYNNE O'SULLIVAN, M.; GORDON, S.G.;
452 OYAMA, M.A. Prospective evaluation of NT-proBNP assay to detect occult
453 dilated cardiomyopathy and predict survival in Doberman Pinschers. Journal of
454 Veterinary Internal Medicine, v.26, n.6, p.1330-1336, 2012.
455
456 SERRES, F.; POUCHOLON, J-L.; POUJOL, L.; LEFEBVRE, HP.; TRUMEL, C.;
457 DASTE, T.; SAMPEDRANO, CC.; GOUNI, V.; TISSIER, R.; HAWA, G.;

458 CHETBOUL, V. Plasma N-terminal pro-B-type natriuretic peptide
459 concentration helps to predict survival in dogs with symptomatic degenerative
460 mitral valve disease regardless of and in combination with the initial clinical
461 status at admission. *Journal of Veterinary Cardiology*, v. 11, p.103-121, 2009.
462
463 VITT, JP.; SAUNDERS, AB.; O'BRIEN, MT.; MANSELL, J.; AJITHDOSS,
464 DK.; HAMER, SA. Diagnostic Features of Acute Chagas Myocarditis with
465 Sudden Death in a Family of Boxer Dogs. *Journal of Veterinary Internal*
466 *Medicine*, v. 30, n. 4, p.1210-1215, 2016.
467
468 WARE, W.A. Diagnostic tests for the cardiovascular system. In: NELSON, R.W.;
469 COUTO, C.G. *Small Animal Internal Medicine* 4th. Elsevier Saunders, p.31-32,
470 2010.
471

472

473

474

475

476

477

478 **Table 1**

479 Mean and standard deviation of clinical parameters analysed of both groups

Clinical Parameters	Sick Group	Control Group	P value
Heart rate (bpm)	142.1 ± 32.4	110 ± 20.5	0.0103 ^{a*}
Respiratory Rate (mpm)	83.2 ± 58.9	47.75 ± 43.14	0.1196 ^b
Systolic Blood Pressure (mmHg)	121.93 ± 20.2	142,5 ± 14.57	0.079*

480 ^a t test for independent samples

481 ^b Mann-Whitney test

482 * p<0,05

483

484

485 **Table 2.**

486 Mean and standard deviation of hematological parameters analysed of both groups

Hematological Parameters	Sick Group	Control Group	P value	Reference ^a
Red Blood cells (x 10 ⁶ /mm ³)	2.97 ± 0.28	7.48 ± 0.67	< 0.0001*** ^c	5.5 - 8.5
Haemoglobin (g/dL)	6.4 ± 2.62	16.98 ± 1.24	< 0.0001*** ^c	12.0 - 18.0
PCV (%)	19.8 ± 7.71	47.1 ± 3.38	< 0.0001*** ^c	37.0 - 55.0
MCV (fl)	68.18 ± 8.1	63.17 ± 4.1	0.08 ^b	60.0 - 77.0
MCHC (g/dL)	32.11 ± 1.7	36.08 ± 1.89	< 0.0001*** ^b	32.0 - 36.0
Total protein (g/dL)	6.56 ± 1.45	6.8 ± 0.58	0.39 ^c	6.0 - 8.0
RDW (%)	16.57 ± 3	11.17 ± 1.16	< 0.0001*** ^c	12.0 - 15.0
Platelet Count (x 10 ³ /μL)	11.52 ± 9.35	271 ± 84.84	< 0.0001*** ^c	160.0 - 430.0
White Blood cells (x 10 ³ /μL)	1.5 ± 2.09	10.97 ± 2.10	<0.0001*** ^c	6.0 - 17.0
Segmented Neutrophils (x 10 ³ /μL)	1.17 ± 1.6	6.75 ± 1.48	< 0.0001*** ^c	0 - 0.3
Lymphocytes (x 10 ³ /μL)	0.19 ± 0.39	2.41 ± 0.69	< 0.0001*** ^c	1.0 - 4.8
Eosinophilies (x 10 ³ /μL)	0.01 ± 0.04	1.1 ± 0.64	< 0.0001*** ^c	0.1 - 1.25
Monocytes (x 10 ³ /μL)	0.12 ± 0.2	0.69 ± 0.4	< 0.0001*** ^c	0.15 - 1.35

487 ^a Weiss DJ, Wardrop KJ, *Schalm's Veterinary Hematology*, 6th Ed., Wiley-Blackwell, 2010

488 ^b t test for independent samples

489 ^c Mann-Whitney test

490 p<0,05

491

492 **Table 3.**

493 Mean and standard deviation of biochemical parameters analysed of both

Biochemical Parameters	Sick Group	Control Group	P value	Reference ^a
Albumin (g/dL)	2.1 ± 0.54	3.5 ± 0.27	< 0.0001*** ^b	2.6 - 3.3
Globulin (g/dL)	3.67 ± 1.55	2.58 ± 0.44	0.0396* ^b	2.7 - 4.4
ALT (UI/L)	93.95 ± 82.7	41.7 ± 6.9	0.213 ^b	21 - 73
ALP (UI/L)	174.45 ± 202.83	49.7 ± 44.2	0.0004*** ^b	20 - 156
GGT (UI/L)	2.06 ± 4.4	1.34 ± 0.95	0.7132 ^b	1.2 - 6.4
BUN (mg/dL)	47.07 ± 27.36	35.15 ± 9.56	0.618 ^b	21.4 - 59.9
Creatinine (mg/dL)	0.78 ± 0.36	0.9 ± 0.28	0.359 ^b	0.5 - 1.5
CKMB	229 ± 205.9	126 ± 46.12	0.0408* ^b	47 - 184 ^d
NT-proBNP (pmol/L)	135.46 ± 29.7	138.28 ± 19.77	0.46 ^c	403 - 980 ^e
Cardiac Troponin I (ng/dL)	0.2493 ± 0.50	0.042 ± 0.08	0.05* ^b	≤ 0.11 ^f

494 ^aKaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 6th Ed., Academic Press, 2008/

495 ^bMann-Whitney test / ^c t test for independent samples / ^d Pino et al, 2008/ ^eSjostrand et al., 2014.^fOyama & Sisson,
496 2004. (p<0,05)

497

498

499

500

501

502

503

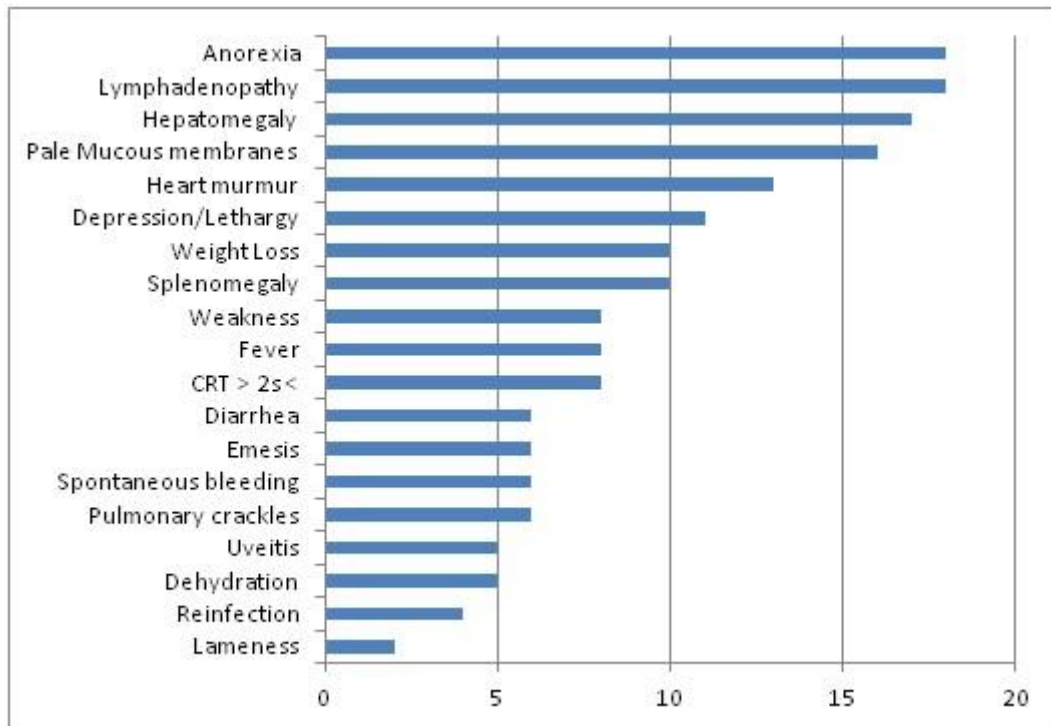
504

505

506

507 **Fig. 1**

508 Relative frequency of clinical signs and pathological conditions in 20 natural cases of
509 chronic canine ehrlichiosis (G1).

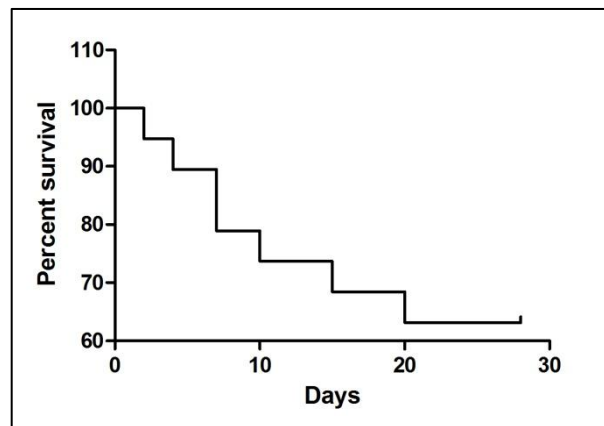


510

511

512 **Fig. 2**

513 Survival analysis of the sick group (G1) during 28-day follow up.



514

515

516

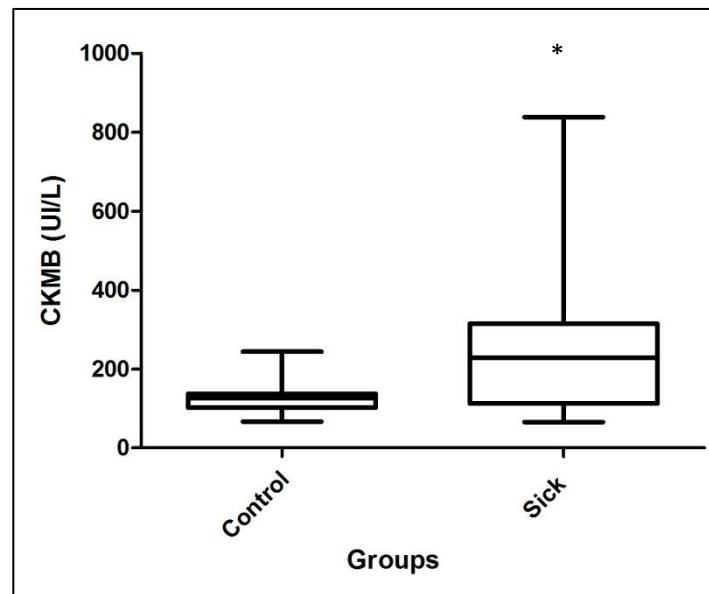
517

518

519

520 **Fig. 3**

521 Sample distribution of CK-MB (UI/L) concentration between groups.

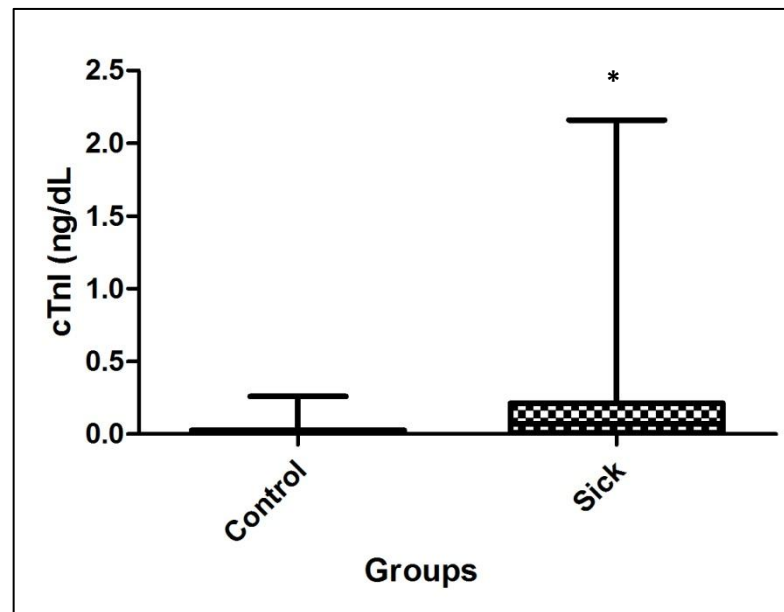


522

523

524 **Fig. 4**

525 Sample distribution of cardiac Troponin I (ng/dL) concentration between groups.

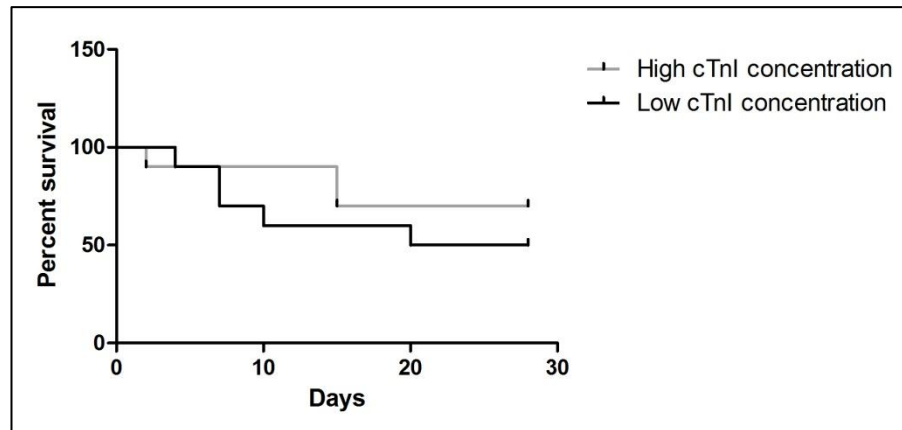


526

527

528 **Fig. 5**

529 Survival Analysis of the sick group according with the cTnI concentration. Log-ranked
530 test comparing the two curves showed a p value of 0,6

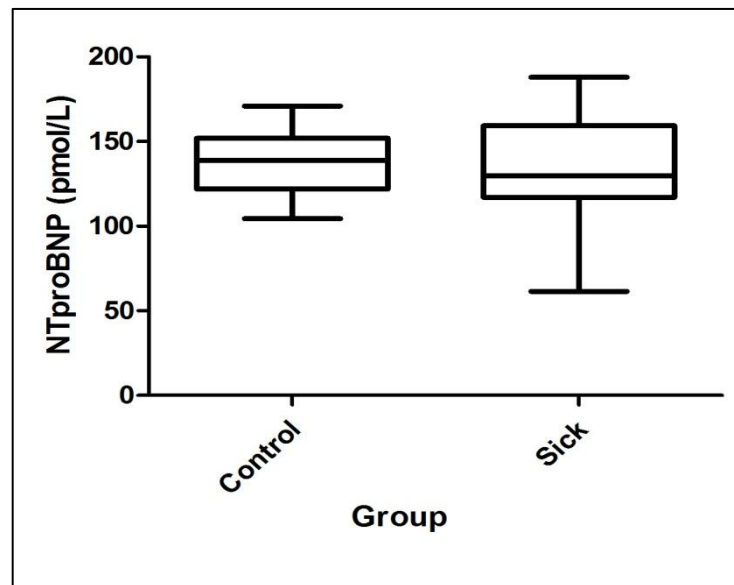


531

532

533 **Fig. 6**

534 Sample distribution of NT-proBNP concentration between groups.



535

536

537

538

539

540

541

542

Artigo a ser enviado para a revista "The Veterinary Journal".

Normas:

https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/623077?generatepdf=true

Original Article

"24-hour ambulatory ECG Holter and heart rate variability analysis of chronic Ehrlichiosis-induced myocarditis."

M.G. Filippi ^a, A.C. Paes ^b, M.G.S. Charlier ^c, E. Oba ^d, F.F. Souza ^e, R. Takahira ^f, M.L.G. Lourenço ^{g*}

^a Veterinary Clinic Department, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, SP, Prof. Doutor Walter Mauricio Correa St. Botucatu 18618-681, Brazil - mauriciofilippi@terra.com.br

^b Department of Veterinary Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, SP, Prof. Doutor Walter Mauricio Correa St. 18618-681, Brazil - paesacmi@fmvz.unesp.br

^c Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, SP, Prof. Doutor Walter Mauricio Correa St 18610-970, Brazil - murilocharliervet@hotmail.com

^d Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, SP, Prof. Doutor Walter Mauricio Correa St 18610-970, Brazil - euniceoba@fmvz.unesp.br

^e Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, SP, Prof. Doutor Walter Mauricio Correa St 18610-970, Brazil - fafesouza@hotmail.com

^f Veterinary Clinic Department, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, SP, Prof. Doutor Walter Mauricio Correa St. Botucatu 18618-681, Brazil - takahira@fmvz.unesp.br

^{g*} Veterinary Clinic Department, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, SP, Prof. Doutor Walter Mauricio Correa St. Botucatu 18618-681, Brazil - mege@fmvz.unesp.br

* Corresponding author. Tel.: +55 14 3880-2044.

E-mail address: mege@fmvz.unesp.br (M.L.G. Lourenço)

581 *Abstract*

582 Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME) is a prevalent systemic disease
583 worldwide caused by the obligate intracellular bacterium *Ehrlichia canis*. It has already
584 been proved the occurrence of myocarditis with high prevalence of arrhythmias in dogs
585 affected by this disease in the acute and chronic phases. The aim of this study is to
586 analyze the type and frequency of arrhythmias by conventional and ambulatory
587 electrocardiography (24-hour Holter) and heart rate analysis by the time domain Heart
588 Rate Variability (HRV) of dogs with chronic CME. Nine of 20 dogs (45%) showed high
589 frequency of arrhythmias during 24 hours of recording - varying between first and
590 second degree atrioventricular block, ventricular and supraventricular ectopic events
591 and sinus tachycardia. No sinus pauses were observed. One dog presented 120 episodes
592 of nonsustained ventricular tachycardia and two sustained. Eight dogs (40%) died
593 before the 28 days of treatment. HRV data in short and long term, represented by the
594 SDNN (ms), SDANN (ms) and pnn50 (%) were also extremely significative (83 ± 65 ;
595 56.05 ± 37.3 and 14.56 ± 20 respectively) compared to healthy animals (268 ± 74.6 ;
596 168.3 ± 39.14 and 55.87 ± 12.8 respectively). Chronic CME has an arrhythmogenic
597 character, persistent myocardial injury and intense stimulation of the sympathetic
598 autonomic nervous system in the heart.

599 Key words: Electrocardiography, SDNN, Arrhythmias, Sympathetic autonomic nervous
600 system, Time domain.

601

602

603

604

605 **Introduction**

606 Chronic Monocytic Ehrlichiosis is a potentially fatal condition of this worldwide
607 infectious disease that may cause persistent pancytopenia, with or without medullar
608 aplasia, leading to a high chance of mortality to the affected dogs. The main factor
609 behind the development of this phase is still unknown, although there is a theory that
610 indicates an immunological factor involved (DUMLER et al., 2001; EVERMAN et al.,
611 2012). Depression, bleeding tendencies and weight loss are the main clinical signs,
612 consequence of the immune-mediated inflammatory lesions and vasculitis that affects the
613 majority of organs, even the bone marrow (MYLONAKIS et al., 2004; RUNGSIIPAT
614 et al., 2008).

615 Infectious diseases, commomly represented by the Parvovirus, canine distemper
616 and the Chagas disease (HAYES et al. .1979; REZENDE et al., 2009; VITT et al.,
617 2016) have high potential of causing myocardial lesions, being myocarditis the most
618 common of them (JANUS et al., 2014).

619 Myocarditis is an inflammation of the heart muscle that can potentially damage
620 the myocardial contraction and may progress to dilated cardiomyopathy and chronic
621 congestive heart failure (ELAMM et al., 2012; KREJCI et al., 2016). It has already
622 been proven high incidence of rhythm and conduction disturbances in conventional
623 ECG of naturally infected dogs in acute phase of CME, but the severity of these
624 arrhythmias is still unknown. Therefore, the objectives of this study are to examine the
625 frequency and type of arrhythmias found in conventional and ambulatory ECG (Holter
626 method) during 24 hours of 20 dogs naturally infected by CME in the chronic phase;
627 analyze the autonomic balance on the heart rate - using the indexes of time domain heart
628 rate variability; and analyze the mortality of the animals during a 28-days follow-up.

629

630 **Matherial and Methods**

631 *Animals*

632 Twenty sick dogs attended in the Department of Veterinary Hygiene and Public
633 Health of the Veterinary Hospital of the College of veterinary medicine and Animal
634 Science, São Paulo State University (FMVZ UNESP) in Botucatu between July 2014
635 and July 2016, were selected for the study to compose the sick group of animals (G1).
636 They had diferent breeds, maximum age of 5 years and varied body weight.

637 Inclusion criteria adopted followed a previous classification (MYLONAKIS et
638 al., 2004): (1) Clinical signs such as depression, anorexia, splenomegaly, bleeding
639 tendencies and historical of tick infestation; (2) hematologic changes that indicate bone
640 marrow hypoplasia, such as nonregenerative anemia ($PCV \leq 25\%$), leukopenia ($WBC \leq$
641 $3,000 \text{ cels}/\mu\text{L}$ <) with reduction of all cell lines, severe thrombocytopenia (platelet
642 count $< 20,000/\mu\text{L}$); (3) molecular findings of *nested* PCR positive for *Ehrlichia canis*
643 in whole blood sample.

644 The exclusion criteria adopted were: dogs aged more than 5 years, who were in
645 therapy with antibiotics that destroy *E. canis* (Tetracyclines or Chloramphenicol), had
646 previous heart disease detected on echocardiogram, like valve diseases, or a negative
647 *nested* PCR for *Ehrlichia canis*.

648 Ten healthy animals kindly provided by their owners served as the control group
649 (G2). In all 30 dogs were performed all exams proposed in the following order:
650 Determination of arterial blood pressure, physical examination, precise
651 cardiopulmonary auscultation and echocardiogram, blood collection, five-minute
652 recording of conventional ECG and 24-hour Holter monitoring. Control animals that

presented any changes in one of these parameters were excluded from the study. The Ethics Committee on the use of Animals approved the study – CEUA-FMVZ-Unesp Botucatu protocol number 83/2014 because it is in accordance with the ethical principles on animals. The owners had to sign an informed consent form to authorize their dogs to participate the study.

Systolic Arterial Blood Pressure Measurement

The non-invasive systolic blood pressure was the first examination, in order to minimize stress-related factors, to avoid overestimated values. The device used was an ultrasonic vascular doppler (Parks model 811-B), according to techniques already proposed (HABERMAN et al. 2006; BROWN et al. 2007; GAROFALO et al., 2012).

Collection and analysis of biological material

Approximately ten milliliters of blood were collected from each animal by jugular venipuncture. The material collected was immediately added in a tube containing EDTA-K2 as an anticoagulant for hematologic and molecular analysis. The hematological analysis was performed according to the following steps: (1) Plasma cell Volume (PCV) by the microhaematocrit technique, (2) Plasma protein concentration by the plasma's refractometry technique, (3) total count of red blood cells and white blood cells by electronic cell counter pocH-100iV and the leukocyte differentiation obtained by 100 count cells in blood smear (4) quantification of platelet count in Neubauer Chamber with a 1% ammonium oxalate as a diluent. It was also made the search for *Ehrlichia canis* in blood smear.

676 *Molecular Diagnostic*

677 The molecular diagnosis by PCR (Polymerase chain reaction) was conducted in
678 a private lab. The technique used for detection of *Ehrlichia canis* was the *nested* PCR,
679 as previously described (WEN et al., 1997). On the first step, DNA was extracted from
680 positive blood smears as a template to amplify a fragment of 16S rRNA gene using
681 specific primer ECC and ECB and detect bacteria from genera *Ehrlichia*. The second
682 step uses the same technique, although with different primers, HE-3/ECA, and the DNA
683 obtained on the previous step. This process will differentiate *E. canis* samples from the
684 other *Ehrlichia* members.

685

686 *Conventional electrocardiographic evaluation*

687 The conventional ECG evaluation was performed by digital electrocardiograph
688 (ECGPCVet,TEB) of 12 channels, calibrated to 1 mV/cm and 50 mm/s speed of
689 registry. The exam was performed in lateral recumbency, according to the technique
690 previously described. (EDWARDS, 1987; TILEY, 1992). The analysis were performed
691 on a standard 10-lead ECGs (DI, DII, DIII, aVR, aVL, aVF, rV2, V2, V4, and V10)
692 during five minutes. The analysis of the amplitudes (mV) and durations (ms) of the
693 waves were made on DII lead. The base rhythm, heart rate and the mean electrical axis
694 of the QRS complex were the principal information obtained (TILLEY, 1992; FILIPPI,
695 2011). Rhythm and conduction disturbances were reported and classified separately.

696

697 *Ambulatory Electrocardiographic monitoring (Holter System)*

698 The Holter data acquisition was made by human three-channel digital device
699 Cardiolight (Cardios, SP, Brazil). The four electrodes were positioned in a horizontal
700 plane around the fifth intercostal space on both sides of the thorax. The data recorded
701 were analysed automatically by the Cardiosmart 550®(Cardios, SP, Brazil) and
702 corrections were made manually. The main parameters evaluated were the base rhythm,
703 minimum, mean and maximal heart rate, pauses longer than two seconds, the presence
704 of abnormalities and the description of supraventricular and ventricular ectopic events
705 when occurred. The limit of artifacts accepted were less than 5%.

706

707 *Heart Rate Variability (HRV)*

708 The time domain HRV values analyzed were:(1) the standard deviation of all
709 RR intervals (SDNN), (2) the standard deviation of the average RR interval taken every
710 five minutes (SDANN), (3) the average standard deviation of RR intervals taken every
711 five minutes (SDNN INDX), (4) the square root of the average of the amount of the
712 difference of squares of adjacent RR intervals (rMSSD) and (5) the percentage of
713 differences greater than 50 ms between adjacent RR intervals (pNN50).

714

715 *Statistical analysis*

716 The quantitative data analysed were the systolic blood pressure,
717 electrocardiographic parameters and the values obtained by the time domain heart rate
718 variability. Data normality were evaluated by Shapiro-Wilk test. For parametric and
719 non-parametric values, a t test for independent samples and a Mann-Whitney test were
720 performed, respectively, to detect statistical differences between the sick (G1) and the

control (G2) group. Kaplan-Meier survival curves were developed to compare under various conditions the animals of G1 that died and survived during the 28 days follow-up. and a log-ranked test were developed to to detect statistical differences between curves . The level of significance was set at $p < 0.05$.

Results

Animals

Twenty sick animals were evaluated, 10 males and 10 females, 8/20 of pure breeds, such as Labrador Retriever, YorkShire Terrier, Pug, Schnauzer, Lhasa Apso, Border Collie, Bull Terrier and Pitbull, and 12/20 were mixed breed. The mean and range of age (year) and body weight (kg) was 2.7 (0.4 – 6) and 11.17 (2.6 –24.8) respectively. About the 10 animals evaluated in the control group, there were 5 males and 5 females, 7/10 were pure breeds, such as Labrador Retriever, Cocker Spaniel, Yorkshire Terrier, Border Collie, Pitbull, German Shepherd, Australian Collie along and 3/10 were mixed breed (3/10). The mean and range of age (years) and body weight (kg) was 1.5 (0.75 – 5) and 23.01 (4.5 –35) respectively. The haematologic quantitative variables of both groups are showed on Table 1.

Analysis of blood pressure and conventional ECG

The mean and standard deviation (SD) of the non-invasive systolic blood pressure (mmHg) in the G1 and G2 were 121.93 ± 20.2 and 142.5 ± 14.57 respectively. The statistical test showed significantly difference ($p = 0.01$). The predominant rhythm of the ECG was sinus arrhythmia, sinus and sinus tachycardia in 30%, 45% and 25% respectively on G1 and 70%, 30% and 0% respectively on G2.

744 The rhythm of sinus arrhythmia predominated in animals of the control group
745 (70%) and this pattern differed of the sick dogs. Therefore, a survival curve was
746 performed for the dogs according to the ECG rhythm and the results are presented in
747 Fig. 1. Subjectively, sinus tachycardia revealed as a possible factor for mortality because
748 of the high incidence on G1 animals during the 28-day follow-up (3/8). However, the
749 result was not significant ($p = 0.31$). Nine dogs (45%) showed arrhythmias in the
750 conventional five-minutes ECG. The Fig. 2 exemplifies the percentage of changes
751 encountered.

752 The relationship between durations and amplitudes of the ECG waves are
753 presented on Table 2. Although subjectively highest heart rate of animals of G1
754 compared to the G2, it has not been shown statistically among the sample distributions.
755 None of the values revealed above the reference value of the specie, except for two dogs
756 that showed high PR interval (> 130 ms), consequence of a first degree atrioventricular
757 block. However, the amplitude of P and R wave of the G1 were statistically lower
758 compared to the G2.

759 Ventricular repolarization analysis showed that there were no ST segment
760 abnormalities, like elevation or depression, beyond the normal limit on the sick group
761 and the values did not show statistical difference compared to the control. The increase
762 of the T wave amplitude occurred in 10 dogs (50%) of the sick group. Comparing this
763 data with the control group, that the incidence was 1 dog (10%) by the Fischer's exact
764 test, showed that the difference was statistically different ($p = 0.048$).

765

766 *Holter and Heart Rate Variability (HRV) Analysis*

767 On G1, nine dogs (45%) showed high frequency of arrhythmias. Their precise
768 classification are presented in the Fig. 3. For the quantitative analysis of the events, the
769 animals were classified into three categories(Fig.4). (1) Category 0: presence of 15
770 isolated events, or in pairs. Absence of ventricular tachycardia and/or supraventricular
771 tachycardia. (2) Category 1: presence of 15 to 200 events alone or in pairs or presence
772 of supraventricular tachycardia or nonsustained ventricular tachycardia. (2) Category 2:
773 the presence of more than 200 events and presence of supraventricular tachycardia or
774 sustained or nonsustained ventricular tachycardia.

775 The supraventricular arrhythmias, occurred in the form of isolated ectopic events
776 and in pairs, not exceeding the count of 20 events in nine of the 20 animals (45%).
777 Periods of supraventricular tachycardia occurred in three cases (15%), two of them
778 showed a simply moment of short duration and in one case there were twelve times of
779 moderate duration, approximately five seconds each. One dog that died during the 28
780 days, showed countless atrial originated escapes during the 24 hours recording.

781 The ventricular arrhythmias occurred as isolated ectopic events and pairs in
782 small count, not exceeding 25 events in seven of the 20 animals (35%). In two (10%),
783 occurred in moderate amount - not exceeding 200 isolated events. There was a high
784 count of events in two dogs (10%): in one case, 7578 ectopic events occurred and in
785 another, not only 6418 isolated events but also 150 periods of nonsustained ventricular
786 tachycardia and two sustained, lasting approximately 30 minutes each. Sinus pauses
787 greater than two seconds did not occur. Determination of cardiac troponin I in dogs of
788 category 2 of arrhythmias was made and showed on that the dog who presented large
789 periods of sustained ventricular tachycardia, the value was 2.14 ng/mL.

790 The analysis of mortality (Fig. 5) showed that the presence of arrhythmias was
791 not associated with increased mortality, but subjectively, after the first seven days of
792 treatment, less dogs with arrhythmias died. About the time domain indexes of heart rate
793 variability calculated, the data are presented in table 3. All HRV mean values, SDNN,
794 SDANN, SDNNi, RMSSD and pnn50 obtained of the sick group dogs were extremely
795 minor compared to the limits of reference for the specie - except the number of NNs,
796 value extremely related with heart rate, that was higher than the upper limit of
797 normality. When comparing this data with the control group, an extremely significant
798 difference was observed in all values.

799 Discussion

800 It has already been proved that histological alterations in the heart are frequent at
801 CME and that especially in the chronic phase, the mononuclear infiltrate, edema and
802 necrosis are prominent (ELAMM et al.. 2012; SANCHES, 2015).

803 The systolic blood pressure were significantly lower in the sick group of
804 animals. Although diminished, no hypotension or hypertension was observed in those
805 dogs. A previous study observed hypertension in 12% of the dogs affected by CME,
806 which was not found a possible cause (DINIZ, 2006). A possible explanation to this
807 case is that chronically infected animals have low blood pressure due to the factors as
808 anemia, hypoalbuminemia, dehydration, possible cardiac hypocontractility and release
809 of inflammatory factors in the circulation (DINIZ et al., 2008).

810 Few changes were observed on the analysis of the electrocardiographic
811 measures specifically, mainly about the amplitude of P, R and T waves. An hypothesis
812 for the reduction of the amplitude of the P and R waves may be the opposite seen in
813 volume overloads - which would be dehydration. However, reports in humans show that
814 this condition tends to increase the amplitude of the wave Q, R and S (SALTYKOV et

815 al., 2007). A recent study also visualized this difference, but both follow without
816 explanation.

817 About the ventricular repolarization, in that case represented by the 50% of the
818 chronically CME dogs which presented higher T waves, this results were greater than
819 the frequency of 8,7% described in acute CME dogs (DINIZ et al., 2008). This finding
820 may be explained by anemia and heart disease. What can be observed in human studies
821 is that there is a T wave inversion in 23% of patients who have chronic anemia
822 (STANOJEVIĆ & STANKOV, 1997). About myocarditis, there is evidence showing
823 relationship between this inversion and areas of contrast enhancement on the heart in
824 MRI examination, one of the terms used by cardiologists to identify myocarditis
825 (NUCIFORA et al., 2013). So possibly this increase is explained by the sum of a
826 haematological condition and a heart disease.

827 Electrocardiographic changes found in 45% of chronically infected dogs were
828 greater than that described on the 35% affected in the acute phase (DINIZ et al., 2008).
829 The types of arrhythmias itself were similar among them, showing that the degeneration
830 and disruption of myocardial fibres caused by myocarditis can harm not only the
831 conduction system, as well as generate ectopic foci capable of trigger serious
832 tachyarrhythmias (SINAGRA et al., 2016).

833 The fact that the dogs presented supraventricular tachycardia and high count of
834 ectopic events, however at isolated character, is not sufficient to increase the
835 concentration of cardiac troponin I and the dog with sustained ventricular tachycardia
836 showed a significant increase. Those findings suggest that serious tachyarrhythmias are
837 harmful to the heart by causing structural damage in that organ.

838 Despite the fact of ventricular tachycardia being associated with poor prognosis
839 in human cases of myocarditis caused by Chagas disease and high risk of sudden death

840 (ALI et al., 1989; TÁVORA et al., 1999), the presence of arrhythmias of greater
841 importance was not observed as a risk factor for the animals who died on this study. The
842 dog who presented severe arrhythmias survived during the 28 days of observation and
843 then a follow-up was not possible.

844 The heart rate increase is a consequence of physiological exacerbated
845 stimulation of the autonomic nervous system and can occur due to cardiac and
846 extracardiac changes, as excitement, fever, hypovolemia, pain or as a signal of early
847 heart failure (HADLOCK, 2000; TARALOV et al., 2015).

848 The sum of clinical conditions installed on chronically CME alter the autonomic
849 balance of the heart, increasing considerably the sympathetic participation and
850 decreasing participation of the parasympathetic system. .

851 The time domain indexes of HRV, even those that analyses the long term
852 sympathetic stimulation, differences during the circadian rhythm, like the mean NN and
853 SDNN. The short term stimulation, that detect smalls differences observed during the
854 respiratory movements, represented by the SDANN and SDNNi were reduced. The
855 relation with the parasympathetic indexes, which are sensitive to detect variations
856 between NN intervals, like the pNN50 and RMSSD index, were also diminished.

857 HRV studies about heart diseases in dogs also show that, in fact, the more
858 sympathetic participation, higher is the compensation of the heart and the greater is the
859 risk of developing congestive heart failure (PEREIRA et al.,2008; FLAMES, 2012).
860 The decrease of these values were related to decompensation of heart disease in humans
861 with idiopathic dilated cardiomyopathy (GOLDMAN et al., 1999). Even with no
862 significant relevance, it is possible to observe subjective relation of low rates of HRV
863 indexes with short term mortality in this study, but it requires a larger sample group to
864 show a significant difference.

865 **Conclusions**

866 The frequency of arrhythmias in dogs with chronic monocytic ehrlichiosis is
867 high, the intensity varied from mild to severe. There are important sympathetic
868 dominance regulating the autonomic nervous system of the heart rate at that stage. Part
869 of this change is related to anemia and hypoalbuminemia of dogs, and the other
870 secondary of myocarditis. The severity of arrhythmias are proportional to the
871 myocardial injury.

872

873 **Conflict of interest statement**

874 None of the authors has any financial or personal relationships that could
875 inappropriately influence or bias the content of the paper.

876 **Acknowledgements**

877 This study was supported by the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de
878 São Paulo (FAPESP) - Process n° 2014/11219-6; 2015/16376-5 São Paulo /SP - Brazil.

879 **References**

- 880 Brown, S., Atkins, C.E., Bagley, R., Carr, A., Davidson, M., Egner, B., Elliot., Henik,
881 R., 2007. Guidelines for the Identification, Evaluation, and Management of
882 Systemic Hypertension in Dogs and Cats. *Journal of Veterinary Internal*
883 *Medicine* 21, 542-558.
884
885 Diniz, P.P.V.P., 2006. Miocardite em cães com Ehrlichiose Monocítica Canina. Thesis,
886 PhD of Veterinary Medicine - São Paulo State University, Brazil.
887
888 Diniz, P.P.V.P., De morais, H.S.A., Breitschwerdt, E.B.; Schwartz, D.S., 2008. Serum
889 Cardiac Troponin I Concentration in Dogs with Ehrlichiosis. *Journal of*
890 *Veterinary Internal Medicine* 22, 1136-1143.
891
892 Dumler, J. S., Barbet, A.F., Bekker, C.P., Dasch, G.A., Palmer, G.H., Ray, S.C.,
893 Rikihisa, Y., Rurangirwa, F.R., 2001. Reorganization of genera in the families
894 Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of
895 some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and
896 Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and

897 designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of
898 *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary*
899 *Microbiology* 51, 2145-2165.

900

901 Edwards, N.J. Bolton's Handbook of Canine and Feline Electrocardiography. 2nd Edn.
902 W.B. Saunders Company, Toronto, ON, Canadá, 381 p.

903

904 Elamm, C., Fairweather, D., Cooper, L.T., 2012. Pathogenesis and diagnosis of
905 myocarditis. *Heart* 98, 835-840.

906

907 Filippi, L.H. (Ed). Eletrocardiograma na medicina veterinária, 1st Edn. Roca, São
908 Paulo, SP, Brazil, pp. 128-135.

909

910 Garofalo, N.A., Neto, F.J.T., Alvaides, R.K., Oliveira, F.A., Pignaton, W., Pinheiro,
911 R.T., 2012. Agreement between direct, oscillometric and Doppler ultrasound
912 blood pressures using three different cuff positions in anesthetized dogs.
913 *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 39, 324-334.

914

915 Goldman, L.E., Sahlas, D.J., Sami, M., 1999. A case of thyrotoxicosis and reversible
916 systolic cardiac dysfunction. *The Canadian Journal of Cardiology* 15, 811-814.

917

918 Haberman, C.E., Kang, C.W., Morgan, J.D., Brown, S.A., 2006. Evaluation of
919 oscillometric and Doppler ultrasonic methods of indirect blood pressure
920 estimation in conscious dogs. *The Canadian Journal of Veterinary Research* 70,
921 211-217.

922

923 Hadlock, D.J., 2000. Sinus tachycardia. In: Tilley, L.P., Smith, J.R., (Eds). The five
924 minute veterinary consult: canine and feline, 2nd edn. Williams & Wilkins,
925 Philadelphia, PA, USA, pp. 380.

926

927 Hayes, M.A., Russell, R.G., Babiuk, L.A., 1979. Sudden death in young dogs with
928 myocarditis caused by parvovirus. *Journal of the American Veterinary Medical*
929 *Association* 174, 1197-1203.

930

931 Janus, L., Noszczyk-nowak, A., Nowak, M., Cepiel, A., Ciaputa, R., Pastwska, U.,
932 Dziegiel, P., Jablonska, K., 2014. Myocarditis in dogs: etiology, clinical and
933 histopathological features (11 cases: 2007-2013). *Irish Veterinary Journal* 67, 1-
934 8.

935 Krejci, J., Mlejnek, D., Sochorova, D., Nemec, P., 2016. Inflammatory
936 Cardiomyopathy: A Current View on the Pathophysiology, Diagnosis, and
937 Treatment. *Biomed Research International* 2016, 1-11.

938

939 Mylonakis, M.E., Koutinas, A.F., Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C., Billinis, C.D.,
940 Leontides, L.S., Kontos, V.S., 2004. Chronic Canine Ehrlichiosis (*Ehrlichia*
941 *canis*): A Retrospective Study of 19 Natural Cases. *Journal of the American*
942 *Animal Hospital Association* 40, 174-184.

943

944 Nucifora, G., Miani, D., Di chiara, A., Piccoli, G., Artico, J., Puppato, M., Slavich, G.,
945 De biasio M., Gasparini, D., Proclemer, A., 2013. Infarct like Acute
946 Myocarditis: Relation Between Electrocardiographic Findings and Myocardial

947 Damage as Assessed by Cardiac Magnetic Resonance Imaging. Clinical
948 cardiology 36, 146-152.
949

950 Pereira, Y.M., Wooley, R., Culshaw, G., French, A., Martin, M., 2008. The vasovagal
951 tonus index as a prognostic indicator in dogs with dilated cardiomyopathy.
952 Journal of Small Animal Practice 49, 587-592.
953

954 Rezende, R.S., Coelho, H.E., Kamimura, R., Severino, R.S., Oliveira, P.C.L., Medeiros,
955 A.A., Magalhães, A.O.C., 2009. Análise microscópica do miocárdio ventricular
956 esquerdo em cães soropositivos para cinomose. Pesquisa Veterinária Brasileira
957 29, 117-119.
958

959 Sanches, C.D.C. 2015. Estudo histopatológico das lesões viscerais da Ehrliquiose
960 Monocítica Canina na fase Crônica. Thesis, PhD of Veterinary Medicine - São
961 Paulo State University, Brazil.
962

963 Sinagra, G., Anzini, M., Pereira, N.L., Bussani, R., Finocchiaro, G., Bartunek, J.,
964 Merlo, M., 2016. Myocarditis in clinical practice. Mayo Clinic Proceedings,
965 pp.1-11.
966

967 Stanojević, M., Stankov, S., 1997. Electrocardiographic changes in patients with
968 chronic anemia. Srpski Arhiv Za Celokupno Lekarstvo 126, 461-466.
969

970 Tilley, L.P., 1992. (Eds) Essentials of canine and feline electrocardiography. 3rd edn.
971 Lea and Febiger, Philadelphia, PA, USA:, 470 p.
972

973 Vitt, J.P., Saunders, A.B., O'brien, M.T., Mansell, J., Ajithdoss, D.K., Hamer, S.A.,
974 2016. Diagnostic Features of Acute Chagas Myocarditis with Sudden Death in a
975 Family of Boxer Dogs. Journal of Veterinary Internal Medicine 30, 1210-1215.
976

977 Wen B., Rikihisa, Y., Mott, J.M., Greene, R., Kim, H.Y., Zhi, N., Couto, G.C., Unver,
978 A., Bartsch R., 1997. Comparison of nested PCR with
979 immunofluorescent antibody assay for detection of Ehrlichia canis infection in
980 dogs treated with doxycycline, Journal of Clinical Microbiology 35, 1852-1855.
981
982
983
984
985
986
987

988

989

990

991

992 **Table 1**

993 Mean and Standard Deviation of hematological parameters analysed of sick and control.

994 p values represents the results of the statistical tests.

Hematological Parameters	Sick Group	Control Group	P value	Reference^a
Red Blood cells (x 10⁶/mm³)	2.97 ± 0.28	7.48 ± 0.67	< 0.0001*** ^c	5.5 - 8.5
Haemoglobin (g/dL)	6.4 ± 2.62	16.98 ± 1.24	< 0.0001*** ^c	12.0 - 18.0
PCV (%)	19.8 ± 7.71	47.1 ± 3.38	< 0.0001*** ^c	37.0 - 55.0
VCM (fl)	68.18 ± 8.1	63.17 ± 4.1	0.08 ^b	60.0 - 77.0
CHCM (g/dL)	32.11 ± 1.7	36.08 ± 1.89	< 0.0001*** ^b	32.0 - 36.0
Total protein (g/dL)	6.56 ± 1.45	6.8 ± 0.58	0.39 ^c	6.0 - 8.0
RDW (%)	16.57 ± 3	11.17 ± 1.16	< 0.0001*** ^c	12.0 - 15.0
Platelet Count (x 10³/μL)	11.52 ± 9.35	271 ± 84.84	< 0.0001*** ^c	160.0 - 430.0
White Blood cells(x 10³/μL)	1.5 ± 2.09	10.97 ± 2.10	<0.0001*** ^c	6.0 - 17.0
Segmented Neutrophils (x 10³/μL)	1.17 ± 1.6	6.75 ± 1.48	< 0.0001*** ^c	0 - 0.3
Lymphocytes (x 10³/μL)	0.19 ± 0.39	2.41 ± 0.69	< 0.0001*** ^c	1.0 - 4.8
Eosinophilies (x 10³/μL)	0.01 + 0.04	1.1 ± 0.64	< 0.0001*** ^c	0.1 - 1.25
Monocytes (x 10³/μL)	0.12 ± 0.2	0.69 ± 0.4	< 0.0001*** ^c	0.15 - 1.35

995 ^a Weiss DJ, Wardrop KJ, *Schalm's Veterinary Hematology*, 6th Ed., Wiley-Blackwell, 2010

996 ^b t test for independent samples

997 ^c Mann-Whitney test

998 p<0,05

999 **Table 2**

1000 Mean and Standard Deviation of electrocardiographic parameters analysed of sick and
 1001 control groups. p values represents the results of the statistical tests.

Parameters	Sick Group	Control Group	P value	Reference ^a
Heart Rate ECG	138.11 ± 31.27	125.5 ± 16.5	0.2864 ^b	70 - 160
Mean Electrical Axis	67.1 ± 20.3	61 ± 3.16	0.286 ^b	40 - 100
P wave - Duration	48.6 ± 3.60	49.3 ± 3.68	0.567 ^b	30 - 50
PR Interval	96.2 ± 4.47	100.6 ± 5	0.5496 ^c	60 - 130
QRS complex - Duration	54.95 ± 6.56	56.3 ± 3.77	0.5538 ^c	Até 50
QT Interval	196.4 ± 27	206.7 ± 8.7	0.248 ^b	150 - 250
P wave - Amplitude	0.148 ± 0.04	0.2 ± 0.04	0.00024*** ^c	<0.4
Q wave - Amplitude	0.152 ± 0.13	0.243 ± 0.2	0.328 ^b	0 - 0.5
R wave - Amplitude	0.97 ± 0.44	1.14 ± 0.18	0.035* ^b	0.5 - 2.5
S wave - Amplitude	0.135 ± 0.2	0.088 ± 0.05	0.845 ^b	0 - 0.3
ST segment Depression	0.054 ± 0.04	0.048 ± 0.45	0.73 ^c	< 0.15
T wave - Amplitude	0.02 ± 0.16	0.005 ± 0.09	0.6608 ^c	<25% onda R

^a TILLEY, L.P. Essentials of canine and feline electrocardiography. 3 ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 470 p.; 1992 /

^b Mann-Whitney test

^c t test for independent samples. (p<0,05)

Table 3

Mean and Standard Deviation of time domain heart rate variability (HRV) parameters analysed of sick and control groups. p values represents the results of the statistical tests.

HRV Parameters	Sick Group	Control Group	P value	Reference ^a
Mean HR	139.05 ± 28,58	86 ± 13,3	< 0,0001*** ^b	81 - 105
Minimal HR	74,2 ± 18,53	38,5 ± 6,9	< 0,0001*** ^c	30 - 58
Maximal HR	225,4 ± 25,3	249,1 ± 1,9	0,0111* ^c	235 - 250
Mean NN	467,15 ± 104,48	747 ± 117,6	< 0,0001*** ^b	482 - 845
SDNN	83 ± 65	268 ± 74,6	< 0,0001*** ^b	322,3 ± 137,4
SDANN	56,05 ± 37,3	168,3 ± 39,14	< 0,0001*** ^b	148 - 202
SDNN INDX	57,55 ± 55,9	216,9 ± 74,28	< 0,0001*** ^b	161 - 359
NNs (x 10³)	165,81 ± 36,73	101,47 ± 28,60	< 0,0001*** ^b	79 - 130
RMSSD	55,2 ± 50	146,9 ± 45,5	0,0002*** ^c	90 - 155
TINN	267,37 ± 113,38	648,88 ± 238,97	< 0,0001*** ^c	-
pNN50	14,56 ± 20,1	55,87 ± 12,8	< 0,0001*** ^c	48 - 69

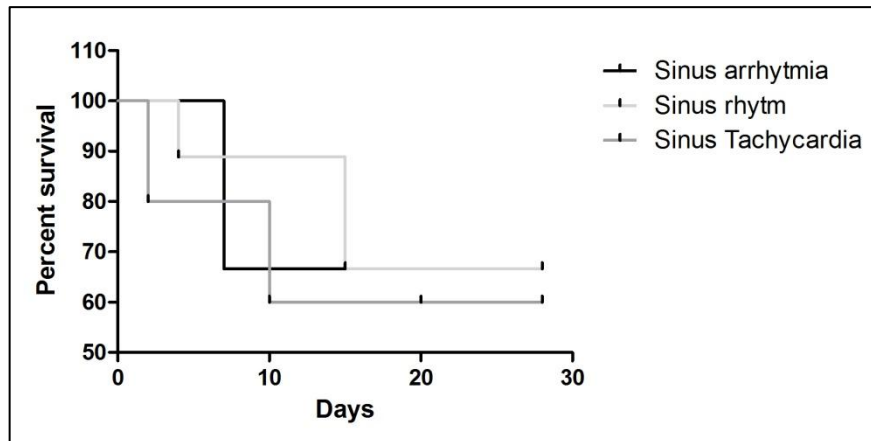
^aVeterinary Cardiology Service - FMVZ UNESP Botucatu

^b t test for independent samples

^c Mann-Whitney test. (p<0,05)

1017 **Fig. 1**

1018 Graphic of Survival Analysis according to the base rythm showed on convencional
1019 ECG on the sick group (G1).

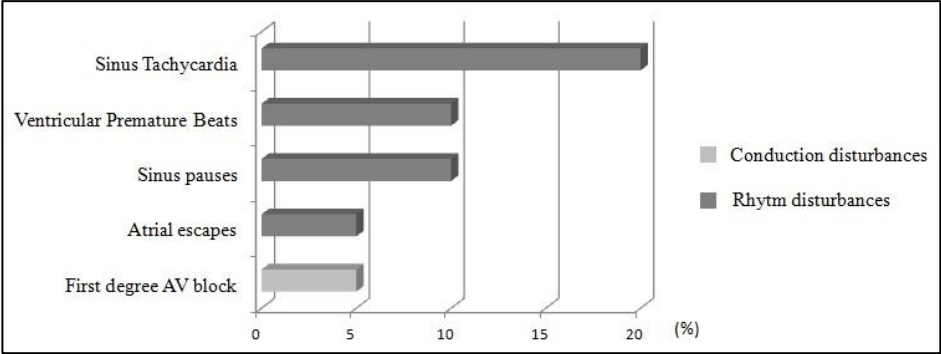


1020

1021

1022 **Fig. 2**

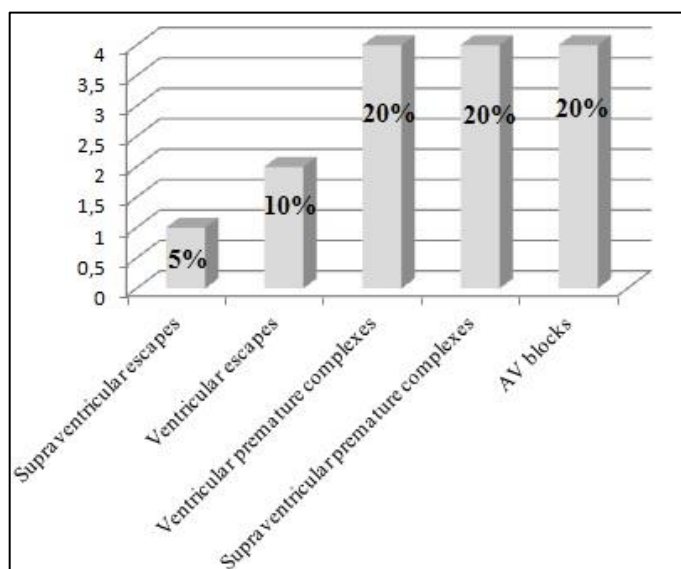
1023 Graphic of the Percentage of ECG changes on Dogs with Chronic Monocytic
1024 Ehrlichiosis in five minutes.



1038 **Fig. 3**

1039 Graphic of prevalence of arrhythmias during 24-hour recording on the sick group.

1040

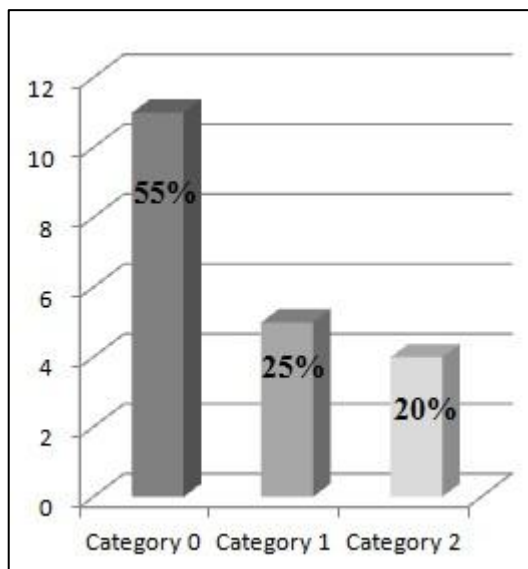


1041

1042

1043 **Fig. 4**

1044 Graphic of prevalence of arrhythmias on the sick group according to the categories
1045 established on the Holter exam.



1046

1047

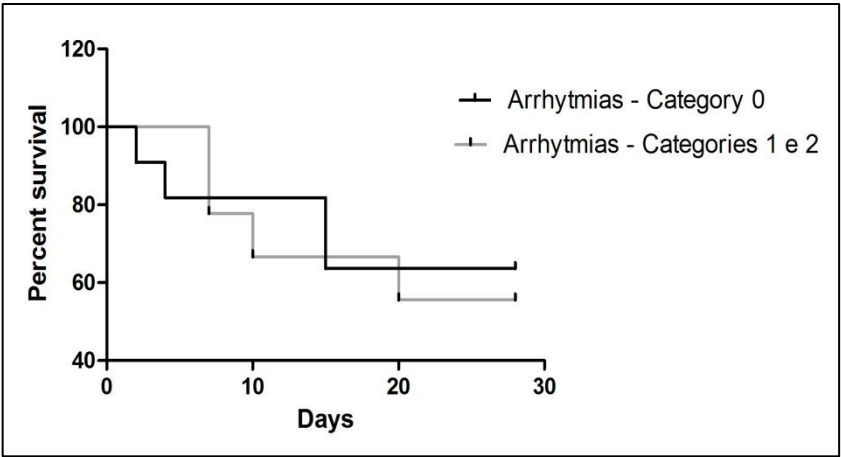
1048

1049

1050 **Fig. 5**

1051 Graphic of survival analysis according to presence of arrhythmias on 24-hour Holter
1052 recording. log-ranked test showed a p value of 0,45.

1053



1054

1055

1056

1057

1058

1059

1060

1061

1062

1063

1064

1065

CAPÍTULO III

DISCUSSÃO GERAL

A Ehrliquiose Monocítica Canina é uma doença infecciosa comum em cães que habitam regiões tropicais e subtropicais do mundo. A principal característica dessa enfermidade é o seu caráter sistêmico, ativação excessiva do sistema imune, produção de citocinas pró-inflamatórias (principalmente TNF- α , proteína C reativa e IL-1 β) e imunoglobulinas em excesso que acabam culminando com a inflamação e infiltração de células mononucleares em diversos órgãos e tecidos. Na fase crônica em particular, as alterações se encontram mais a nível tecidual, como consequência da constante infiltração celular (HARRUS, 2015).

No coração, já está provado que alterações histológicas são frequentes na EMC e que, principalmente na fase crônica, o infiltrado mononuclear, a necrose e o edema predominam. Estudos relacionando a miocardite em humanos, mostra que a EMC é responsável pelas fases da doença onde há ação secundária de citocinas pró-inflamatórias e fatores imunomediados relacionado lesão secundárias a agentes imunomediados, que segundo o estudo, seria a fase 1 e 2 do desenvolvimento da doença (ELAMM et al., 2012).

6.1 Aspectos clínicos

Os aspectos clínicos dos cães do estudo em questão, a princípio demonstraram dados semelhantes ao encontrados em estudos clínicos anteriores envolvendo erliquiose, como apatia (55%), anorexia (90%), palidez de mucosas (80%), emagrecimento progressivo (45%), e tendências hemorrágicas (30%). É interessante salientar que, de acordo com o estudo de Frank e Breitschwerdt (1999), a porcentagem de sinais clínicos é

proporcionalmente menor, havendo 34% dos animais em anorexia, 31% apáticos e 24% com emagrecimento progressivo, mas nesse estudo os cães estavam em diversas fases da EMC. Já Mylonakis et al. (2004), ao avaliarem 19 cães estritamente na fase crônica da doença, observaram alterações semelhantes ao desse estudo, com exceção da porcentagem de cães com petéquias e sufusões ter sido maior (10 dos 19 cães), podendo ser devido ao critério de seleção desses autores ter sido mais focado na presença de sangramentos espontâneos.

Não foi possível desenvolver curvas de sobrevida para comparar os quesitos coloração de mucosas, presença de sopro cardíaco, porém subjetivamente observou-se que quanto menos coradas as mucosas e quanto mais frequente o sopro cardíaco, maior foi a mortalidade dos cães. Portanto essas alterações foram consideradas como possíveis fatores de risco para óbito nessa doença. Interessante observar que a presença de cansaço fácil pelo proprietário foi um relato comum dos cães que não sobreviveram aos 28 dias de tratamento e que talvez seja o reflexo de que a repercussão da doença é maior.

Nesse estudo observou-se alta ocorrência de crepitações (30%) em auscultação pulmonar, sem necessariamente o proprietário relatar queixas respiratórias como tosse e/ou espirros. Mas é preciso salientar que apesar dos não demonstrarem sinais clínicos detectáveis pelo dono, a EMC aguda e crônica é comumente associada a pneumopatias secundárias à vasculite, infiltração bacteriana nos alvéolos pulmonares e edema pela baixa pressão oncótica nos alvéolos pulmonares. Dados de literatura de fato corroboram que essas alterações existem. Frank e Breitschwerdt (1999) e Codner et al. (1985)

radiografaram o tórax de cães com Erliquiose e o resultado foi a presença de padrão intersticial pulmonar difuso nesses animais. Os achados de necropsia de cães que vieram a óbito devido à Ehrliquiose crônica mostram também incidência de broncopneumonia em 93,75% dos casos que, juntamente com o descrito por Everman (2012), demonstrando que a pneumonia intersticial é uma alteração comum. Portanto, apesar dos cães não apresentarem sinais clínicos de afecções respiratórias, há lesões a se considerar nesse órgão.

Alterações cardio-circulatórias como aumento do tempo de preenchimento capilar e presença de sopro sistólico à auscultação em graus variados, em 40% e 65% dos casos respectivamente, precisa ser salientada devida à alta ocorrência. Essas alterações foram vistas por Frank e Breitschwerdt (1999), que relataram a presença de sopro cardíaco em 11 dos 62 cães avaliados (17%), contudo a faixa etária diferia, favorecendo a maior incidência de doenças cardíacas degenerativas associadas, como também pelo fato de alguns cães possuírem diagnóstico concomitante de dirofilariose, sendo difícil relacionar essa alteração com a Erliquiose especificamente.

Segundo Ware (2010), os diagnósticos diferenciais de sopro cardíaco em hemitórax esquerdo seriam sopros fisiológicos, advindos de anemia, febre, à fístula arteriovenosa, hipoalbuminemia, elevado tônus simpático, e os que refletem uma condição cardíaca seria a degeneração valvar mitral, seguida de estenose de valvas semilunares e a cardiomiopatia dilatada.

Sabendo-se que a presença de sopro à auscultação está relacionado com hematócrito baixo em filhotes e que a anemia crônica normovolêmica e hipoalbuminemia diminuem a viscosidade sanguínea e produzem um estado hiperdinâmico nas câmaras cardíacas e que os animais doentes avaliados não

possuíam achados ecocardiográficos de doenças cardíacas degenerativas prévias (SZATMÁRI et al., 2015; FOWLER & HOLMES, 1975; SPOTSWOOD et al., 2006;), que é responsável pela origem do sopro à auscultação, conclui-se que a origem do sopro tenha um fator fisiológico importante que explica a alta incidência de alterações (BAVENGES et al., 2011).

A esplenomegalia e hepatomegalia, apesar de serem relatadas em menor frequência por estudos anteriores de Frank e Breitsch1werdt (1999) e Mylonakis et al. (2004), em nosso estudo estavam presentes na grande maioria dos animais (85%). Porém, dados recentes de necropsia mostraram que de fato, a frequência é alta em animais cronicamente infectados, sendo hepatomegalia e a esplenomegalia presente em 100% dos cães (SANCHES, 2015).

Dos animais sobreviventes que puderam ser acompanhados por mais tempo, foi possível observar que três (25%) responderam ao tratamento e os parâmetros hematológicos normalizaram-se, quatro (50%) permaneceram pancitopênicos durante meses, quando foi perdido o contato e em três casos (25%), o animal não foi mais acompanhado após os 28 dias. Esses dados mostram quão importante e irreversível é a mielofitose induzida por essa doença.

6.2. Análise hematológica

Foi possível observar que, para hemácias e leucócitos, o valor diminuído em particular não se relacionou com aumento ou diminuição da sobrevivência, visto a semelhança entre as curvas. Já em relação às plaquetas, observou-se o mesmo padrão. A menor concentração plaquetária não apenas esteve

relacionada com menor sobrevida, como também os cães vieram a óbito em período de tempo mais curto. Apesar do valor do teste estatístico não ter revelado diferença, é possível relacionar como possível fator de risco, sabendo-se do fato que quanto mais trombocitopênicos os animais, maior a chance de desenvolverem quadros sistêmicos agudos, como a coagulação intravascular imunomediada.

A análise hematológica dos cães, apenas elucidou alterações já previstas, pelo fato de estarem vinculadas aos fatores de inclusão do estudo. Sobre a série vermelha, foi visto que 10 deles (50%) apresentaram concentração de hemácias abaixo de $2,5 \times 10^6/\text{mm}^3$ e um deles chegando a $0,9 \times 10^6/\text{mm}^3$. Pancitopenia importante, caracterizada nesse caso por trombocitopenia moderada a intensa, diminuição de todas as linhagens celulares leucocitárias e anemia arregenerativa de caráter importante, mostra que há hipoplasia medular, apesar de não confirmada citologicamente (SYKES, 2012; EVERMAN, 2012). No entanto, Mylonakis et al. (2004; 2011), com o mesmo grupo experimental, ou seja, cães naturalmente infectados em fase crônica, mostraram que de fato essas alterações hematológicas são reflexo da hipoplasia medular que a doença causa, provocando diminuição de todas as linhagens celulares: eritróides, mielóides e megacariócitos.

6.3. Análise Bioquímica

Sobre a análise bioquímica de função hepática e análise das frações protéicas, também se observou aspectos comuns em cães acometidos pela fase crônica da enfermidade (MYLONAKIS et al., 2004; 2011; KOUTINAS et al., 2012), A presença de hipoalbuminemia (16/20 - 80%), hiperglobulinemia

(4/20 - 20%), hipoproteinemia (7/20 - 35%), hiperproteinemia (1/20 - 1%), aumento leve de ALT (8/20 - 40%) e FA (6/20 - 30%) refletem que, de fato, são achados compatíveis com animais em EMC crônica. À análise da curva de sobrevida, é possível observar que cães hipoalbuminêmicos vieram mais a óbito durante os primeiros dez dias de tratamento, mesmo as curvas não sendo estatisticamente significativa, essa alteração sugere que seja mais um parâmetro que reflete um estado geral ruim que predispõe a morte. Na fração globulina, na média, os valores encontrados no G1 estão dentro da faixa da normalidade, sendo que quatro cães (20%) apresentaram valores acima, com valor máximo de 7,4 g/dL em um cão do subgrupo vivo e três (15%) apresentando valores abaixo, com valor mínimo de 2 g/dL.

Dados sobre a função renal, o aumento leve da concentração de uréia em cinco cães (25%) e de creatinina em um (5%) assemelha-se a estudos anteriores, que relatam ocorrência de uremia leve a moderada em 35% e 21% e de creatinina em 11% e 29%, respectivamente (HARRUS et al., 1997; FRANK & BREITSCHWERDT, 1999). Porém como já mencionado, esses estudos envolveram animais em todas as fases da doença. Estudos envolvendo a fase crônica, mostram que há glomerulonefrite em 100% dos cães, porém nesses animais a porcentagem de aumento da concentração de uréia e creatinina foram relativamente baixas, 39% e 25% respectivamente (KIKUCHI, 2015). Outro estudo envolvendo essa fase mostrou aumento desses marcadores de função renal em 38% e 11% respectivamente (MYLONAKIS et al., 2004). Todos esses dados mostram que de fato há lesão renal, sem necessariamente ser suficiente para induzir insuficiência desse órgão.

6.3.1 - Troponina Cardíaca I (cTnI)

No presente estudo, 35% dos cães apresentaram valores elevados de cTnI, também significativamente diferentes do grupo controle. O animal que atingiu a concentração máxima de cTnI foi o que apresentou maior quantidade de arritmias, em diversos momentos de taquicardia ventricular não sustentada por tempo prolongado ao Holter e será abordado adiante. Já o segundo animal a apresentar mais arritmias, teve também menor quantidade de plaquetas e hemácias, 2.525/mm³ e 900.000/mm³, respectivamente.

Koutinas et al. (2012) dosaram cTnI de cães em fase aguda e crônica, ou seja, fase mielossupressiva e não-mielossupressiva e observaram aumento em relação ao grupo controle em ambos os casos, porém os grupos não diferiram entre si, mostrando a EMC causa lesão constante em miocárdio nas duas fases. De fato a troponina é um marcador de lesão miocárdica aguda. Estudos relacionando miocardite sob diversas condições, infecciosas ou imunomediadas, mostram que de fato essa proteína se eleva, costuma haver melhora quando o tratamento para a causa agressora é feito e que valores altos de cTnI ao primeiro atendimento estão relacionados com mortalidade(LOBETTI et al., 2012; CARTWRIGHT, et al., 2015; HAMACHER et al., 2015).

Essas informações complementam o que foi visto nesse estudo e levantam a hipótese de que após dado início ao tratamento, esses valores tendem a diminuir. Em relação à mortalidade, a análise da curva de sobrevida não mostrou relação entre cães que vieram a óbito e concentrações altas desse biomarcador, comprovando que, apesar de esta proteína permanecer elevada, ela em si não se mostrou preditora de sobrevida em cães cronicamente infectados.

6.3.2 - Creatinoquinase-MB (CKMB)

As concentrações de CK<B de 760 e 838 UI/L, ambos no subgrupo vivo, não se relacionaram com presenças de arritmias ao Holter, ou aumentos concomitantes de Troponina Cardíaca I. Porém o primeiro valor coincidiu com maior concentração de NT-proBNP (187,53 pmol/L). Os valores estatisticamente significativos mostram que esse biomarcador está aumentado em animais com EMC crônica.

Observou-se que a porcentagem de valores alterados da concentração de CKMB foram maiores em comparação com os de cTnI, provavelmente devido à meia-vida no organismo ser maior do que a da troponina, sendo 12 e duas horas respectivamente (DUNN et al., 2011; LANG & WÜRZBURG., 1982). De acordo com o Bachmaier et al. (1995) em estudo experimental induzindo miocardite em ratos, o aumento na concentração de CKMB e troponina cardíaca são significativamente sensíveis para a detecção de miocardites induzidas, exatamente no período onde estava ocorrendo máximo dano ao miocárdio para em seguida voltar a diminuir após a lesão. Os dados de cães com EMC crônica mostram portanto que de fato há dano por ruptura e necrose de miócitos. Apesar de se tratar de uma fase crônica, há constante destruição, necrose, edema e remodelamento das fibras miocárdicas provavelmente secundária a intensa e progressiva infiltração de células mononucleares, vasculite, hemorragias em miocárdio e a ação de imunoglobulinas (DINIZ, 2006). Essa informação complementa o que já foi visto na literatura, ou seja,

que na fase crônica existem importantes lesões histológicas já citadas anteriormente (SANCHES, 2015).

6.3.3. NT-proBNP

A porção amino-terminal do peptídeo natriurético cerebral (NT-proBNP) já se enquadraria em uma classe mais sensível de lesão cardíaca, sendo que o principal estímulo para sua produção seria o estresse crônico na parede ventricular e na parede atrial em diástole, normalmente consequência de condições cardíacas que provocam sobrecargas de volume e/ou de pressão, capaz de identificar cardiomiopatias ocultas (OMLAND et al., 2009). Os valores de referência utilizados foram os estabelecidos pelo estudo de Sjostrang e colaboradores (2014), ao analisarem a concentração desse biomarcador de 535 cães saudáveis de raças, pesos e idades diferentes.

Parâmetros como cansaço fácil à anamnese e presença de arritmias não estavam relacionados com os valores mais altos registrados. No presente estudo, não houve diferença significativa entre os animais doentes e controle. É importante salientar que a concentração de NT-proBNP além de sofrer diferenças semanais para cada animal, também varia consideravelmente de acordo com a raça do cão (KELLIHAN et al., 2009; SJOSTRAND et al., 2014). Portanto, afim de comparar a elevação desse biomarcador frente a doença em questão, será dada atenção ao valor distribuição amostral entre os grupos.

Até o momento, apesar de diversos autores relacionarem o aumento desse biomarcador com cardiomiopatias em cães (CHETBOUL et al., 2009; SERRES et al., 2009; NOSZCZYK-NOWAK, 2011; SINGLETARY et al., 2012; KOBAYASHI et al., 2014), houve um estudo que visualizou aumento de NT-

proBNP em animais com babesiose em graus diversos, porém houveram controvérsia nos dados, devido aos animais apresentarem azotemia pré-renal mas que, segundos os autores não estava relacionado com o aumento desse biomarcador (LOBETTI et al., 2012).

6.4 - Parâmetros Pressóricos e Eletrocardiográficos

Os valores de pressão arterial sistólica foram significativamente menores nos animais do grupo doente. Levando em consideração valores normais de PAS para cães de 90 a 180 mmHg (HABERMAN et al., 2005; BROWN et al., 2007; GAROFALO et al., 2012), não se observou hipotensão ou hipertensão nos cães, com exceção de dois (10%) que apresentaram valores no limite inferior da normalidade, um pertencente ao subgrupo vivo e um do morto.

Até então, observou-se apenas cães hipertensos (12%) acometidos por EMC em estudo feito por Diniz (2006), porém não foi possível estabelecer uma causa para essa condição. Justifica-se que os animais cronicamente infectados possuam diminuição da pressão arterial devido não apenas a pior condição clínica comparado à cães em fase aguda, como também a uma soma de fatores como principalmente fatores que interferem na dinâmica sanguínea, como a anemia e a hipoalbuminemia, fatores que diminuem a pressão oncótica do sangue. Também é importante citar a ocorrência de possível hipocontratilidade cardíaca e liberação de fatores inflamatórios na circulação (DINIZ et al., 2008; MYLONAKIS et al., 2011).

Dados a respeito da pressão arterial sistólica (PAS) não invasiva mostram que de fato esses animais apresentam diminuição da pressão

sanguínea mais expressiva quando comparado aos animais saudáveis, sem, no entanto, nenhum deles estar hipotenso ou hipertenso.

Sobre a análise das ondas eletrocardiográficas especificamente, poucas alterações foram observadas, principalmente a respeito da despolarização/repolarização atrial e despolarização ventricular. Como segundo Tilley (1992), aumentos na duração e amplitude dessas ondas e desvios do eixo elétrico médio do complexo QRS são sugestivos basicamente de sobrecarga de câmaras, ou seja, reflexo de remodelamento cardíaco, é possível afirmar que não há alterações eletrocardiográficas que justifiquem aumento de câmaras. Vale ressaltar que, apesar das durações dos complexo QRS de ambos os grupos serem superiores aos de referência, é importante levar em consideração o fato de a gravação das ondas pelo método digital aumenta a duração em aproximadamente 10 ms da onda P e do complexo QRS (Wolf et al., 2000) e, portanto, são consideradas como dentro da normalidade para cães.

Uma hipótese para a diminuição da amplitude das ondas P e R seria o oposto visto em sobrecargas de volume, que seria a desidratação. No entanto, relatos em humanos mostram que essa condição costuma aumentar a amplitude da onda Q, R e S (SALTYKOVA et al., 2007), deixando essa teoria pouco provável e essa condição segue sem explicação.

Quanto à alteração de repolarização, observada na onda T em 50% dos cães estudados, nossos resultados foram superiores aos descritos por DINIZ (2006), que encontrou porcentagem de 8,7% em animais infectados somente por *E. canis*. Hipóteses lançadas para esse achado seriam a anemia e doença cardíaca, que nesse caso seria a miocardite. O que pôde ser observado é que

em estudos humanos, há inversão de onda T em 23% de pacientes que possuem anemia crônica (STANOJEVIĆ & STANKOV, 1997). Em relação a miocardites, há evidências que mostram relação entre essa alteração e áreas de realce de contraste em exames de ressonância magnética, um dos quesitos utilizados por cardiologistas para identificar miocardite (NUCIFORA et al., 2013). Apesar de não haver diferença significativa do valor de cTNI ($p = 0,14$) entre cães com ou sem aumento de onda T, é possível afirmar que a soma entre a condição hematológica e a doença cardíaca sejam a gênese dessa alteração.

6.5 Análise das arritmias

Sobre a ocorrência de arritmias no ECG convencional e no exame de Holter, foi visto que esses exames foram complementares no diagnóstico desses distúrbios, sendo que na maioria dos cães (75%) que foram diagnosticados com altas contagens de eventos arrítmicos no ECG ambulatorial, foi visto também ao menos um evento no ECG convencional. Porém, foi possível observar também que o animal com as arritmias mais graves no Holter, ou seja, períodos de taquicardia ventricular sustentada em diversos momentos, apresentou traçado eletrocardiográfico convencional sem alterações. Essa informação reforça a característica intermitente das arritmias e a importância da monitorização contínua de cães com doenças cardíacas e extracardíacas que predispõem a sua ocorrência, pois podem não aparecerem no eletrocardiograma convencional.

Alterações eletrocardiográficas anteriormente descritas em animais com EMC, exibiram frequência de aproximadamente 35% dos casos (DINIZ, 2006).

No presente estudo, a frequência de alterações foi maior, estando presente em 45% dos cães. As alterações em si foram semelhantes, como taquicardia sinusal, extrassístoles, que nesse caso foram ventriculares ao invés de supraventriculares, e bloqueios de condução, como o bloqueio atrioventricular de primeiro grau. Ao compararmos com a frequência de arritmias espontâneas de 0,55% estudadas por Patterson (1961) em 2710 cães saudáveis, é possível perceber a magnitude dessas alterações.

A eletrocardiografia contínua demonstrou, como citado acima, que as arritmias foram semelhantes às encontradas no eletrocardiograma convencional, contudo em maior proporção. Extrassístoles ventriculares e supraventriculares isoladas, bloqueio atrioventricular de primeiro grau frequente, escapes atriais e períodos de taquicardia supraventricular não sustentada e ventricular sustentada, mostram o quanto a degeneração e desestruturação das fibras miocárdicas causadas pela miocardite pode prejudicar não apenas o sistema de condução do estímulo elétrico, como também predispor a gênese de focos ectópicos ao ponto de gerar taquiarritmias graves (SINAGRA et al., 2016).

Esses dados mostram quão significativo são essas alterações e que de fato ocorrem com certa frequência em pacientes humanos que sofrem de miocardite por esse mesmo mecanismo de ação (MARQUES et al., 2013; PETERS, 2016; ANDERSON et al., 2014; ZHANG et al., 2014).

Sobre a relação com os biomarcadores, Diniz et al., (2009) observaram diferença significativa de cães com arritmias graves, como a taquicardia supraventricular com valores altos de concentração de troponina cardíaca I em comparação com cães sem arritmias. Wess et al., (2011) ao avaliarem cães

da raça Doberman Pinscher observaram que a presença de mais de 100 extrassístoles ventriculares no exame de Holter foi suficiente para detectar diferença significativa na concentração de NT-proBNP em comparação com cães saudáveis da mesma raça.

Comparando com o estudo realizado, de fato no cão que apresentou arritmias graves ao Holter (períodos de taquicardia ventricular sustentada), observou-se alta concentração de cTnI sem no entanto aumentar a de CKMB. Mas os cães com extrassístoles isoladas, taquicardias supraventriculares curtas e com bloqueios atrioventriculares sem importância clínica, mostraram valores baixos desse biomarcador.

Esses dados apontam para o fato de que, sob a mesma condição de lesão cardíaca instituída, ou seja, a miocardite, eventos ectópicos isolados, ou eventos taquicárdicos de origem supraventricular não aumentaram os níveis de cTnI comparado eventos taquicardicos ventriculares por tempo prolongado.

Apesar da taquicardia ventricular, estar associada com mau prognóstico em seres humanos com miocardite causada por doença de Chagas e alto risco de morte súbita (LU et al., 1989; TÁVORA et al., 1999), não foi observado a presença de arritmias como fator de risco para os animais que vieram a óbito desse estudo. O cão que apresentou arritmia grave sobreviveu durante os 28 dias de observação e logo em seguida não foi possível mais acompanhá-lo.

6.6. Análise da frequência cardíaca

Com base em nossos resultados, é interessante observar a respeito dos dados sobre a frequência cardíaca dos animais do grupo doente, que a média dos valores se encontra fora dos limites de referência, sendo que as

frequências médias e mínimas estão acima do limite superior, e que a frequência máxima se encontra abaixo.

A frequência cardíaca é um parâmetro que pode ser modificado frente a diversas alterações cardíacas e extracardíacas, como excitação, febre, hipovolemia, dor ou como descompensação de uma cardiopatia prévia (HADLOCK, 2000), sendo o responsável por essa última condição a estimulação fisiológica exacerbada do sistema nervoso autônomo simpático frente a estímulos como a hipóxia e a hipoperfusão tecidual (TARALOV et al., 2015).

Os animais acometidos pela EMC em fase crônica, como já citado, possuem uma somatória de condições clínicas instaladas, que juntas alteram o balanço autonômico do coração, aumentando consideravelmente a participação simpática e diminuindo a participação do sistema parassimpático.

Sobre os índices da VFC no domínio do tempo, é possível afirmar que mesmo aqueles que refletem a estimulação simpática a longo tempo, ou seja, diferenças durante o ciclo circadiano, como o NN médio e o SDNN e, aqueles a curto prazo, ou seja, diferenças que se observam durante a respiração, como o SDANN e SDNNi já se encontravam diminuídos. Já em relação aos índices que refletem a ativação parassimpática, que são sensíveis em detectar variações entre intervalos NN, como o pnn50 e o RMSSD, também se mostraram diminuídos. Resumindo, a análise de VFC nesses animais mostrou pouca variação à curto e a longo prazo, consequência de uma estimulação do sistema nervoso autônomo simpático importante.

Estudos de VFC relacionando cardiopatias em cães, como a endocardiose mitral, a cardiomiopatia arritmogênica do Boxer e principalmente a cardiomiopatia dilatada, de fato mostram que quanto maior a participação simpática, maior o risco do desenvolvimento de insuficiência cardíaca congestiva (PEREIRA et al., 2008; CHAMAS, 2012). Em humanos, os índices da VFC no domínio do tempo em pacientes com cardiomiopatia dilatada idiopática foram menores nos pacientes com descompensação a longo prazo, em comparação com os pacientes em que esse fato não ocorreu (GOLDMAN et al., 1999). No presente estudo, foi possível observar que, a curva de sobrevida dos animais com os índices mais baixos de SDNN e pnn50 não diferiu estatisticamente do maior valor, no entanto vieram a óbito mais rápido, mostrando que provavelmente esteja relacionado com maior mortalidade nesses casos.

CONCLUSÕES GERAIS

Com base nas condições em que o presente estudo foi realizado, as conclusões obtidas foram:

- A frequência de arritmias em cães com Ehrliquiose Monocítica crônica é alta, e a predominância foram as de origem supraventricular e ventricular, isoladas ou sustentadas.

- Há um predomínio simpático importante na regulação autonômica da frequência cardíaca dos com a doença nessa fase, sendo que uma parte dessa alteração está relacionada à diversos fatores, como principalmente a anemia e a hipoalbuminemia dos cães.

- Cães cronicamente infectados pela EMC sofrem lesões miocárdicas, confirmada pelo aumento de CKMB e Troponina Cardíaca I.

- Fatores como anemia, hipoalbuminemia, e o grau importante da trombocitopenia mostraram como possíveis fatores preditivos negativos de sobrevida, principalmente durante os primeiros sete dias de tratamento na EMC crônica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKSELROD, S.; GORDON, D.; MADWED, J.; SNIDMAN, N.C.; SHANNON, D.C.; COHEN, R.J. Hemodynamic regulation: investigation by spectral analysis. *American Journal of Physiology*, v.249, n.18, p.867-875, 1985.

AKTAS, D.M.; AUGUSTE, D.; LEFEBVRE, H.P.; TOUTAIN, P.L.; BRAUN, J.P. Creatine kinase in the dog: a review. *Veterinary Research Communications*, v.17, n.5, p.353-369, 1993.

ANDERSON, B.R; SILVER, E.S.; RICHMOND, LIBERMAN, L. Usefulness of Arrhythmias as Predictors of Death and Resource Utilization in Children With Myocarditis. *The American Journal of Cardiology*, v. 114, n.9, p. 1400-1405, 2014.

APPLE, F.S. Tissue specificity of cardiac troponin I, cardiac troponin T and creatine kinase-MB. *Clinica Chimica Acta*, v. 284 p. 151-159, 1999.

BABUIN, L.; JAFFE, A.S. Troponin: The biomarker of choice for the detection of cardiac injury. *Canadian Medical Association Journal*, v.173, p.1191–1202, 2005.

BACHMAIER, K.; MAIR, L.; OFFNER, F.; PUMMERER, C.; NEU, N. Serum Cardiac Troponin T and Creatine Kinase–MB Elevations in Murine Autoimmune Myocarditis. *Circulation*, v.92, p.1927-1932, 1995.

BAROLD, S.S. Norman J. "Jeff" Holter - "Father" of ambulatory ECG monitoring. *Journal of Interventional Cardiac Electrophysiology*, n. 14, p.117-118, 2005.

BATMAZ, H.; NEVO, E.; WANER, T.; SENTURK, S.; YILMAZ, Z.; HARRI, S. Seroprevalence of Ehrlichia canis antibodies among dogs in Turkey. Veterinary Record, v. 148, p. 665-666, 2001.

BARROS, V.C.V.; BRITO, M.R. Estudo da variabilidade da frequência cardíaca no paciente após infarto agudo do miocárdio. Revista da Sociedade Mineira de Cardiologia. Disponível em:

[http://www.bibliomed.com.br/lib/showdoc.cfm?LibDocID=13320&ReturnCatID=14138 &action=full](http://www.bibliomed.com.br/lib/showdoc.cfm?LibDocID=13320&ReturnCatID=14138&action=full)

BAUMWART, R.D.; MEURS, K.M. Assessment of plasma brain natriuretic peptide concentration in Boxers with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. American Journal of Veterinary Research, v.66, n.12, p.2086-2089, 2005.

BAVEGEMS, V.C; DUCHATEAU, L; POLIS, I.E; VANHAM, L.M; DE RICK, A.F; SYS, S.U. Detection of innocent systolic murmurs by auscultation and their relation to hematologic and echocardiographic findings in clinically normal Whippets. Journal of the American Veterinary Medical Association, v. 238, n.4, p. 468-471.

BLYSZCZUK, P.; KANIA, G.; DIETERLE, T.; MARTY, RR.; VALAPERTI, A.; BERTHONNECHE, C.; PEDRAZZINI, T.; BERGER, CT.; DIRNHOFER, S.; MATTER, CM.; PENNINGER, JM.; LÜSCHER, TF.; ERIKSSON, U. Myeloid Differentiation Factor-88/Interleukin-1 Signaling Controls Cardiac Fibrosis and Heart Failure Progression in Inflammatory Dilated Cardiomyopathy. Circulation Research, v. 105, n. 9, p.912-920, 2009.

BOSWOOD, A. Biomarkers in cardiovascular disease: Beyond natriuretic peptides. Journal of Veterinary Cardiology, v.11, p.23–32, 2009.

BRAUNWALD, E.; SOBEL, BE. Fluxo sanguíneo coronário e isquemia miocárdica. In: BRAUNWALD, E. Tratado de Medicina Cardiovascular. São Paulo: Roca, 1991. p.1248-1280, 1991.

BREITSCHWERDT, E.B.; ATKINS, C.E.; BROWN, T.T.; KORDICK, D.L.; SNYDER, P.S. Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii and related members of the alpha subdivision of the Proteobacteria in dogs with cardiac arrhythmias, endocarditis, or myocarditis. Journal of Clinical Microbiology, n. 37, p.3618–3626, 1999.

BROWN, S.; ATKINS, C.E.; BAGLEY, R.; CARR, A.; DAVIDSON, M.; EGNER, B.; ELLIOT., HENIK, R. Guidelines for the Identification, Evaluation, and Management of Systemic Hypertension in Dogs and Cats. Journal of Veterinary Internal Medicine, v. 21, p.542-558, 2007.

BROUQUI, P.; RAOULT, D.; VIDOR, E. Lack of co-transmission of Rickettsia conorii and Ehrlichia canis in human beings in the south of France. European Journal of Epidemiology, v.5, p.11011-11012, 1989.

CAIN, BS.; MELDRUM, DR.; DINARELLO, CA.; MENG, X; JOO, KS.; BANERJEE, A; HARKEN, AH. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta synergistically depress human myocardial function. Critical Care Medicine, v. 27, n. 7, p. 1225-1404, 1999.

CAFORIO, AL.; MAHON, NJ.; TONA, F.; MCKENNA, WJ. Circulating cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy and myocarditis: pathogenetic and clinical significance. European Journal of Heart Failure, v. 4, n. 4, p.411-417, 2002.

CAFORIO, AL.; PANKUWEIT, S.; ARBUSTINI E.; BASSO, C.; GIMENO-BLANES, J.; FELIX, SB.; FU, M.; HELIÖ, T.; HEYMANS, S.; JAHNS,

R.; KLINGEL, K.; LINHART, A.; MAISCH, B.; MCKENNA, W.; MOGENSEN, J.; PINTO, Y.M.; RISTIC, A.; SCHULTHEISS, H.P.; SEGGEWISS, H.; TAVAZZI, L.; THIENE, G.; YILMAZ, A.; CHARRON, P.; ELLIOTT, P.M.; European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of myocarditis: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *European Heart Journal*, v. 34, n. 33, p.2636-2648, 2013.

CALVERT, C.A.; HALL, G.; JACOBS, G.; PICKUS, C. Clinical and pathologic findings in Doberman Pinschers with occult cardiomyopathy that died suddenly or developed congestive heart failure: 54 cases (1984 – 1991). *Journal of the American Veterinary Association*, v. 210, n.4, p. 505-511, 1997.

CALVERT, C.A.; JACOBS, G.J. Heart rate variability in Doberman Pinschers with and without echocardiographic evidence of dilated cardiomyopathy. *American Veterinary Association*, v. 61, n.5, p. 506-511, 2000.

CALVERT, CA. Heart rate variability. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.1, n. 1, p. 72-82, 2008.

CARARETO, R.; SOUXA, M.G.; ZACHEU, J.C.; AGUIAR, A.J.A.; CAMACHO, A.A. Variabilidade da frequência cardíaca em cães anestesiados com infusão contínua de propofol e sulfentanil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.59, n. 2, p.329-332, 2007.

CARTWRIGHT, J.A.; GOW, D.J.; GOW, A.G.; HANDEL, I.; REED, N.; BROWN, A.J.; CASH, R.; FOOTE, A.; MACKENZIE, D.; BELL, R.; MELLANBY, R.J. Serum cardiac troponin I concentrations decrease following treatment of primar

y immune-mediated haemolytic anaemia. Journal of Small Animal Practice, v. 56, n. 8, p. 516-520, 2015.

CHAMAS, PPC. Estudo do eletrocardiograma ambulatorial, eletrocardiograma de alta resolução (ECGAR) e variabilidade da frequência cardíaca como indicadores prognósticos na cardiomiopatia arritmogênica de cães Boxer. (Tese Doutorado) – Teses e Dissertações – Livraria Digital – Universidade de São Paulo, 2011.

CHAMBERS, H.F. Antimicrobial agents – protein synthesis inhibitors and miscellaneous agents. In: Hardman, J.G., Limbud, L.E., Goodman e Gilman's – The Pharmacological basis of therapeutics. 1. Ed. New York: McGraw-Hill; 2001.

CHETBOUL, V.; SERRES, F.; TISSIER, R.; LEFEBVRE, H. P.; SAMPEDRANO, C. C.; GOUNI, V.; POUJOL, L.; HAWA, G.; POUCHELON, J. Association of plasma N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration with mitral regurgitation severity and outcome in dogs with asymptomatic degenerative mitral valve disease. Journal of Veterinary Internal Medicine, v.23, p.984–994, 2009.

CHOMPOOSAN, C.; BURANAKARL, C.; CHAIYABUTR, N.; CHANSAISAKORN, W. Decreased sympathetic tone after short-term treatment with enalapril in dogs with mild chronic mitral valve disease. Research in Veterinary Science, v.96, n. 2, p.347-354, 2014.

CODNER, E.C.; ROBERTS, R.E.; AINSWORTH, A.G. Atypical findings in 16 cases of canine ehrlichiosis. Journal of American Veterinary Medical Association, v.186, n.2, 1985.

COLEMAN, M.G.; ROBSON, M.C. Evaluation of six-lead electrocardiograms obtained from dogs in a sitting position or sternal recumbency. American Journal of Veterinary Research, v.66, n.2, p.233-237, 2005.

COHN, L.A. Ehrlichiosis and related infections. The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice. 2003, v.33, n.4, p.863-884.

COSTA, J. O.; GUIMARÃES, M.P.; SILVA, M.; BATISTA Jr, J.A. Ehrlichia canis infection in a dog in Belo Horizonte- Brazil. Arquivos Escola Veterinária UFMG, v. 25, p.199-200, 1973.

COSTAGLIOLA, A.; PIEGARI, G.; OTROCKA-DOMAGALA, I.; CICCARELLI, D.; IOVANE, V.; OLIVA, G.; RUSSO, V.; RINALDI, L.; PAPPARELLA, S.; PACIELLO, O. Immunopathological Features of Canine Myocarditis Associated with Leishmania infantum Infection. Biomed Research International, v. 2016, p.1-6, 2016.

DAVOUST, B. L'ehrlichiose canine. Le Point Veterinaire, Rueil Malmaison, v. 25, n. 151, p. 43-51, 1993.

DE MORAIS, H.S.A.; HOSKINS, J.; ALMOSNY, N.R.P.; LABARTHE, N.V. Diretrizes gerais para diagnóstico e manejo de cães infectados por Ehrlichia spp. Clínica Veterinária, v.9, n.48, p 28-30, 2004.

DINIZ, P.P.V.P. Miocardite em cães com Ehrliquiose Monocítica. (Tese Doutorado) – FMVZ - UNESP Botucatu, 2006..

DINIZ, P.P.V.P.; DE MORAIS, H.S.A.; BREITSCHWERDT, E.B.; SCHWARTZ, D.S. Serum Cardiac Troponin I Concentration in Dogs with Ehrlichiosis. Journal of Veterinary Internal Medicine, v. 22, p.1136-1143, 2008.

DONATIEN, A.; LESTOQUARD, A. Existence en Algerie d'une rikettsia du chien. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, n. 28, p. 418-419, 1935

DUMLER, J. S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P.; DASCH, G.A.; PALMER, G.H.; RAY, S.C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F.R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 51, n.6, p. 2145-2165, 2001.

DUNN, M.E.; COLUCIO, D.; HIRKALER, G.; MIKAELIAN, I.; NICKLAUS, R.; LIPSHULTZ, S.E.; DOSSEGGER, L.; REDDY, M.; SINGER, T.; GENG, W. The Complete Pharmacokinetic Profile of Serum Cardiac Troponin I in the Rat and the Dog. Toxicology Science, v.123, n.2, p.368-373, 2011.

EDWARDS, N.J. Bolton's Handbook of Canine and Feline Electrocardiography. 2 ed. Philadelphia Saunders Company, 1987.

ELAMM, C.; FAIRWEATHER, D.; COOPER, L.T. Pathogenesis and diagnosis of myocarditis. Heart, v. 98, n. 11, p.835-840, 2012.

EVERMANN, J. F.; SELLON R.K.; SYKES, J.E. Viral, Rickettsial, and Chlamydial Diseases. In: Greene – Infectious Diseases of the dog and cat. 4^a ed – Elsevier Saunders, p.227-259, 2012.

FALK, T.; LJUNGVALL, I.; ZOIS, N.E.; HÖGLUND, K.; OLSEN, L.H.; PEDERSEN HD.; HÄGSTRÖM, J. Cardiac troponin-I concentration, myocardial arteriosclerosis, and fibrosis in dogs with congestive heart failure because of

myxomatous mitral valve disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, n. 27: p.500–506, 2013

FILIPPI, L.H. *Eletrocardiograma na medicina veterinária* ed 1. São Paulo. Editora Roca, 2011.

FOWLER, N.O.; HOLMES, J.C. Blood viscosity and cardiac output in acute experimental anemia. *Journal of Applied Physiology Published*, v.39, n.3, p.453-456, 1975.

FRANCO, L.G.; FIORAVANTI, M.C.S.; DAMASCENO, A.D.; BORGES, A.C.; SOARES, L.K.; RABELO, R.E.; SILVA, L.A.F. Assessment of serum enzymatic markers of cardiomyocytes injury in female dogs submitted to ketamine S(+), atropin and xylazine association. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.24, n.1, p.36-42, 2009.

FRANK, J.R.; BREITSCHWERDT, E.B. A Retrospective Study of Ehrlichiosis in 62 Dogs from North Carolina and Virginia. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.13, p. 194-201, 1999.

GAROFALO, N.A.; NETO, F.J.T.; ALVAIDES, R.K.; OLIVEIRA, F.A.; PIGNATON, W.; PINHEIRO, RT. Agreement between direct, oscillometric and Doppler ultrasound blood pressures using three different cuff positions in anesthetized dogs. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, v. 39 p. 324-334, 2012.

GODOY, M.F; BRAILE, D.M.; NETO, J.P. Troponina como marcador de injúria celular miocárdica. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v.71, n.4, p.629-633, 1998.

GOLDMAN, L.E.; SAHLAS, D.J.; SAMI, M. A case of thyrotoxicosis and reversible systolic cardiac dysfunction. *The Canadian Journal of Cardiology*, v.15, n.7, p.811-814, 1999.

GOODWIN, JK. Holter monitoring and cardiac event recording. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.28, n.6, p. 1391-1402, 1998.

GROVES M.G.; DENNIS G.L.; AMYX, H.L.; HUXSOLL, D.L. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). *American Journal of Veterinary Research*, v. 36, n.7, p. 937-940, 1975.

HABERMAN, C.E.; KANG, C.W.; MORGAN, J.D.; BROWN, S.A. Evaluation of oscillometric and Doppler ultrasonic methods of indirect blood pressure estimation in conscious dogs. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, n.70, p 211-217, 2006.

HADLOCK, D.J. Sinus tachycardia. In: Tilley, L.P.; SMITH, J.R.; F.W.K. (Eds). *The five minute veterinary consult: canine and feline*. 2.ed. Philadelphia: Willians & Wilkins, p.380, 2000.

HAMACHER, L.; DORFELT, R.; MULLER, M.; WESS, G. Serum Cardiac Troponin I Concentrations in Dogs with Systemic Inflammatory Response Syndrome, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 29, p. 164-170, 2015.

HARRUS, S.; KASS, P.H.; KLEMENT, E.; WANER, T. Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. *The Veterinary Record*, v.141, n.14, p.360-363, 1997.

HARRUS, S.; WANER, T.; AIZENBERG, J.; FOLEY, J.; POLAND, A.; BARK, H. Amplification of Ehrlichial DNA from Dogs 34 Months after Infection with *Ehrlichia canis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.36, p. 73-76, 1998.

HARRUS, S., WANER, T. Diagnosis of monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. *The Veterinary Journal*, v.187, p. 292-296, 2011.

HARRUS, S. Perspectives on the pathogenesis and treatment of canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). *The Veterinary Journal*, v.203, n.3, p.239-240, 2015.

HAVENS, N. S.; KINNEAR, B. R.; MATO, S. Fatal Ehrlichial Myocarditis in a Healthy Adolescent: A Case Report and Review of the Literature. *Clinical Infectious Diseases*, v. 54, n. 8, p.113-114, 2012.

HAYES, MA.; RUSSELL, RG.; BABIUK, LA. Sudden death in young dogs with myocarditis caused by parvovirus. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 174, n. 11, p. 1197-1203, 1979.

HEZZEL, M.J.; BOSWOOD, A.; CHANG, Y.M.; MOONARMART, W.; SOUTTAR, K.; ELLIOT, J. The combined prognostic potential of serum high-sensitivity cardiac troponin I and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentrations in dogs with degenerative mitral valve disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 26, n.2, p.302-311, 2012.

HUXSOLL, D. L.; HILDEBRANDT, P.K.; NIMS, R.M.; WALKER, J.S. Tropical canine pancytopenia. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, v. 157, n. 11, p.1627-1632, 1970.

JANUS, L.; NOSZCZYK-NOWAK, A.; NOWAK, M.; CEPIEL, A.; CIAPUTA, R.; PASTWSKA, U.; DZIEGIEL, P.; JABLONSKA, K. Myocarditis in dogs: etiology, clinical and histopathological features (11 cases: 2007-2013). *Irish Veterinary Journal*, v. 67, n. 28, 2014.

KELLIHAN, H.B.; OYAMA, M.A.; REYNOLDS, C.A.; STEPIEN, R.L. Weekly Variability of plasma and serum NT-proBNP measurements in normal dogs. *Journal of Veterinary Cardiology*, v.11, p.593-597, 2009.

KIKUCHI, E.S.C. Glomerulopatias Secundárias à Ehrlichiose Monocítica Crônica. Dissertação. Repositório Institucional UNESP - FMVZ UNESP Botucatu, 2015.

KITTLESON, M.D. Eletrocardiography: basic concepts, diagnosis of chamber enlargement, and intraventricular conduction disturbances. In: KITTLESON, M.D; KIENLE, R.D. *Small animal cardiovascular medicine*. St. Louis: Mosby, p.72-94, 1998.

KOBAYASHI, K.; HORI, Y.; CHIMURA, S. Plasma N-Terminal Pro B-Type Natriuretic Peptide Concentrations in Dogs with Pulmonic Stenosis. *Journal of Veterinary Medical Science*, doi: <http://dx.doi.org/10.1292/jvms.13-0554>, 2014.

KOUTINAS, K.C.; MYLONAKIS, M.E.; O'BRIEN, P.J.; LEONTIDES, L.; SIARKOU, V.I.; BREITSCHWERDT, E.B.; KOUTINAS, A.F. Serum cardiac troponin I concentrations in naturally occurring myelosuppressive and non-myelosuppressive canine monocytic ehrlichiosis. *The Veterinary Journal*, n. 194, p. 259-261, 2012.

KREJCI, J; MLEJNEK, D.; SOCHOROVA, D.; NEMEC, P. Inflammatory Cardiomyopathy: A Current View on the Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. *Biomed Research International*, v. 2016, p.1-11, 2016.

KUMAR, A.; VARSHNEY, J.P.; PATRA, R.C. A comparative study on oxidative stress in dogs infected with *Ehrlichia canis* with or without concurrent infection with *Babesia gibsoni*. *Veterinary Research Community*, n.30 p.917–920, 2006.

LAFLAMME, D.P.; KUHLMAN, G.; LAWER, D.F.; KEALY, R.D.; SCHMIDT, D.A. Obesity management in dogs. *Veterinary Clinical Nutrition*, v.1, p.59-65, 1994.

LAKKAWAR AW, Nair MG, Varshney KC, et al. Pathology of canine monocytic ehrlichiosis in a German Shepherd dog. *Slovenian Veterinary Research*, n.40, p.123–132, 2003.

LANDT, Y.; VAIDYA,HC.; PORTER, SE.; DIETZLER, DN.; LADENSON, JK. Immunoaffinity purification of creatine kinase-MB from human, dog and rabbit heart use of a monoclonal antibody specific for CK-MB. *Clinical Chemistry*, v.35, n.6, p.985-989, 1989.

LANG, H.; WURZBURG, U. Creatine kinase, an enzyme of many forms. *Clinical Chemistry*, v. 28, p.1439-1447, 1982.

LEE, S.; PAK, S.-I.; HYUN, C. Evaluation of changes in cardiac biomarker concentrations and enzyme activities in serum after short- and long-duration transcutaneous cardiac pacing in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, n. 70, p. 599–603, 2009.

LINDE, A.; SUMMERFIELD, N.J.; SLEEPER, M.M.; WRIGHT, F.B.; CLIFFORD, C.A.; MELGAREJO, T.; KNIGHT, D.H. Pilot study on cardiac troponin I levels in dogs with pericardial effusion. *Journal of Veterinary Cardiology*, n. 8, p. 19–23, 2006.

LINKLATER, A.K.J.; LICHTENBERGER, M.K.; THAMM, D.H.; TILLEY, L.; KIRBY, R. Serum concentrations of cardiac troponin I and cardiac troponin T in dogs with class IV congestive heart failure due to mitral valve disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, n. 17, p. 243–249, 2007.

LJUNGVALL I.; HÖGLUND, K.; TIDHOLM, A.; OLSEN, AH.; BORGARELLI, M.; VENGE, P.; HÄGSTRÖM, J. Cardiac Troponin I is associated with severity of myxomatous mitral valve disease, age, c-reactive protein in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.24, p.153-159, 2010.

LOBETTI, RG. Cardiac involvement in canine babesiosis. *Journal of the South African Veterinary Association*, v. 76, n. 1, p. 4-8, 2005.

LOBETTI, R.G.; KIRBERGER, R.; KELLER, N.; KETTNER, F.; DVIR, E. NT-proBNP and cardiac troponin I in virulent canine babesiosis. *Veterinary Parasitology*, v. 190, p. 333-339, 2012.

LORGA FILHO, A.; CINTRA, F.D.; LORGA, A.; GRUPI, C.J.; PINHO, C.; MOREIRA, D.A.R.; FILHO, D.C.S.; BRITO, F.S.; KRUSE, J.C.L.K.; NETO, J.S. Recomendações da sociedade brasileira de arritmias cardíacas para serviços de holter. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*, v.101, n.2, p.101-105, 2013.

LUU, M.; STEVENSON, W.G.; STEVENSON, L.W.; BARON, K.; WALDEN, J. Diverse mechanisms of unexpected cardiac arrest in advanced heart failure. *Circulation*, v.80, n.6, p.1675-1680, 1989.

MALIK, M.; CHAIRMAN, M.D. Heart rate variability: Standards of measurement physiological interpretation and clinical use. *European Heart Journal*, v. 17, p. 354381, 1996.

MARÃES, V.R.F.S. Frequência cardíaca e sua variabilidade: análises e aplicações. *Revista Andaluza de Medicina Del Deporte*, v. 3, n. 1, p. 33-42, 2010.

MARQUES, J.; MENDOZA, I.; NOYA, B.; ACQUATELLA, H.; PALACIOS, I.; MARQUES-MEJIAS, M. ECG Manifestations of the Biggest Outbreak of

Chagas Disease due to Oral Infection in Latin-America. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. v.101, n.3, p. 249-254, 2013.

MASON, R.J.; LEE, J.M.; CURRAN, J.M.; MOSS, A.; VAN DER HEIDE, B.; DANIELS, P.W. Serological survey for *Ehrlichia canis* in urban dogs from the major population centers of northern Australia. *Australian Veterinary Journal*, n. 79 p. 559-562, 2001.

MASON, JW. Myocarditis and dilated cardiomyopathy An inflammatory link. *Cardiovascular Research*, v. 60, n. 1, p.5-10, 2003.

MATTHEWMAN, L.A.; KELLY, P.J.; MAHAN, S.M.; SEMU, D.; TAGWIR, M.; BOBADE, P.; BROUQUI, P.; MASON, P.R.; RAOULT, D. Western blot and indirect fluorescent antibody testing for antibodies reactive with *Ehrlichia canis* sera from apparently healthy dogs in Zimbabwe. *Journal of South African Veterinary Association*, v. 64, p. 111-115, 1993.

MAZINI, AM. Avaliação da ocorrência de arritmias e da variabilidade da frequência cardíaca em cães obesos pelo método Holter. (Dissertação) - Teses e Dissertações – Livraria Digital – Universidade de São Paulo, 2011.

MOÏSE, NS. Diagnosis and management of canine arrhythmias. In: Fox RP.; Sisson, D.; Moïse NS. *Textbook of canine and feline cardiology: Principles and Clinical Practice*. 2. Ed., Philadelphia: W.B. Saunders Company, p. 331-332, 1988.

MYLONAKIS, M.E.; KOUTINAS, A.F.; BREITSCHWERDT, E.B.; HEGARTY, B.C.; BILLINIS, C.D.; LEONTIDES, L.S.; KONTOS, V.S. Chronic Canine Ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): A Retrospective Study of 19 Natural Cases. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v.40, p. 174-184, 2004.

MYLONAKIS, M.E.; CERON, J.J.; LEONTIDES, L.; SIARKOU, V.I.; MARTINEZ, S.; TVARIJONAVICIUTE, A.; KOUTINAS, A.F.; HARRUS, S. Serum Acute Phase Proteins as Clinical Phase Indicators and Outcome Predictors in Naturally Occuring Canine Monocytic Ehrlichiosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.25, p. 811-817, 2011.

NAYAK, SU.; SIMON, GL. Myocarditis after Trimethoprim/Sulfamethoxazole Treatment for Ehrlichiosis. *Emerging Infectious Diseases*, v. 19, n. 12, p.1975-1977, 2013.

NEER, T.M., E. B. BREITSCHWERDT, R. T. GREENE, AND M. R. LAPPIN. Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. American College of Veterinary Internal Medicine. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, n. 16 p. 309–315, 2002.

NOSZCZYK-NOWAK, A. NT-pro-BNP and troponin I as predictors of mortality in dogs with heart failure. *Poland Journal Veterinary Science*, v.14, n.4, p.551-556, 2011.

NUCIFORA, G.; MIANI, D.; DI CHIARA, A.; PICCOLI, G.; ARTICO, J.; PUPPATO, M.; SLAVICH, G.; DE BIASIO M.; GASPARINI, D.; PROCLEMER, A. Infarct like Acute Myocarditis: Relation Between Electrocardiographic Findings and Myocardial Damage as Assessed by Cardiac Magnetic Resonance Imaging. *Clinical cardiology*, v. 36, n. 3, p. 146-152, 2013.

O'BRIEN P.J.; DAMERON, G.W.; BECK, M.L.; KANG, Y.J.; ERICKSON, B.K.; DIBATISTA, T.H.I.; MILLER, K.E.; JACKSON, K.N.; MITTELSTADT, S. Cardiac troponin I is a sensitive, specific biomarker of cardiac injury in laboratory animals. *American Association for Laboratory Animal Science*, n.40, p. 153–171, 2006a.

O'BRIEN, P.J. Blood cardiac troponin in toxic myocardial injury: archetype of a translational, safety biomarker. *Expert Reviews in Molecular Diagnostics*, n.6, p. 685–702, 2006b. . O'BRIEN, P.J. Cardiac troponin is the most effective translational safety biomarker for myocardial injury in cardiotoxicity. *Toxicology*, n. 245, p. 206– 218, 2008.

OLIVEIRA, M.S.; MUZZI, R.A.L.; ARAÚJO, R.B.; MUZZI, L.A.L; NOGUEIRA, R.; GIANNICO, A.T. Holter em animais de companhia – indicações clínicas e avaliação da variabilidade da frequência cardíaca. *Clínica Veterinária*, n.92, p. 78-86, 2011.

OLIVEIRA, M.S.; MUZZI, R.A.L.; ARAÚJO, R.B.; MUZZI, L.A.L.; FERREIRA, D.F.; NOGUEIRA, R.; SILVA, E.F. Heart rate parameters of myxomatous mitral valve disease in dogs with and without heart failure obtained using 24-hour Holter eletrocardiography. *Veterinary Record*, v.170, n.24, p.622, 2012.

OLIVEIRA, B.C.M. Detecção Molecular de *Ehrlichia canis* em cães e em órgãos de seus respectivos carrapatos. (Dissertação). Teses e Dissertações - UNESP - Araçatuba. 2016.

OMLAND, T.; LEMONS, J.A.; SABATINE, M.S.; CHRISTOPHI, C.A.; RICE, M.M.; JABLONSKI, K.A.; TJORA, S.; DOMANSKI, M.J.; GERSH, B.J.; ROULEAU, J.L.; PFEFFER, M.A.; BRAUNWALD, E. Sensitive Cardiac Troponin T Assay in Stable Coronary Artery Disease. *The New England Journal of Medicine*, v.361, p.2538-2547, 2009.

OYAMA, M.A.; SISSON, D.D. Cardiac troponin-I concentration in dogs with cardiac disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.18, n.6, p. 831-839, 2004.

PAES, A.C. Tetraciclina. Em: Barros CM; Di Stasi, LC. Farmacologia Veterinária Barueri/SP - Editora Manole, p. 378-386, 2012.

PATTERSON, D.F.; DETWEILER, D.K.; HUBBEN, K.; BOTTS, R.P. Spontaneous abnormal cardiac arrhythmias and conduction disturbances in the dog (a clinical and pathological study of 3000 dogs). American Journal of Veterinary Research, v.22, p.355, 1961.

PEREIRA, Y.M.; WOOLEY, R.; CULSHAW, G.; FRENCH, A.; MARTIN, M. The vasovagal tonus index as a prognostic indicator in dogs with dilated cardiomyopathy. Journal of Small Animal Practice, v.49, p.587-592, 2008.

PETERS, S. Differential diagnosis of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy and granulomatous myocarditis by advanced ECG analysis. International Journal of Cardiology, v. 209, p. 255-257, 2016.

PETRIE, J-P. Practical Application of Holter Monitoring in Dogs and Cats. Clinical Techniques in Small Animal Practice, v.20, n.3, p.173-181, 2005.

PINO, O.V.; LI, E.O.; ALVARADO, A.S.; FERNÁNDEZ, V.P.; DÁVILA, R.F.; GAVIDIA, C.C. Determinación de los niveles séricos de enzimas cardíacas en perros adultos con enfermedad cardiovascular. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, v.19, n.2, p.144-147, 2008.

POLIZOPOULOU, Z.S.; KOUTINAS, C.K.; DASOPOULOU, A.; PATSIKAS, M.; YORK, M.; ROMAN, I.; GANDHI, M.; PATEL, S.; KOUTINAS, A.F.; O'BRIEN, P.J. Serial analysis of serum cardiac troponin I changes and correlation with clinical findings in 46 dogs with mitral valve disease. Veterinary Clinical Pathology ISSN 0275-6382, 2014.

PRETORIUS, A.M.; KELLY, P.J. Serological survey for antibodies reactive with *Ehrlichia canis* and *E. chaffeensis* in dogs from the Bloemfontein area, South Africa. *Journal of South African Veterinary Association*, v. 69, p.126-128, 1998.

PRICE, J.E.; SAYER, P.D. Canine ehrlichiosis. In: KIRK, R.W. *Current Veterinary therapy*. 8 ed. Philadelphia: W.B. Saunders, p.1197-1201, 1983.

RAFFAN, E.; LOUREIRO, J.; DUKES-MCEWAN, J.; FONFARA, S.; JAMES, R.; SWIFT, S.; BEXFIELD, N.; HERRTAGE, M.E.; ARCHER, J. The Cardiac Biomarker NT-proBNP Is Increased in Dogs with Azotemia. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.23, p.1184-1189, 2009.

RAMOS, R.F.; MAGALHÃES, H.M. Infarto agudo do miocárdio; novos métodos de diagnóstico e prognóstico. In: TIMERMAM, A.; CÉSAR, L.A.M. *Manual de Cardiologia (SOCESP)*. São Paulo: Atheneu, p. 147-151, 2000.

RASMUSSEN, C.E.; FALK, T.; PETRIC, A.D.; SCHALDEMOSE, M.; ZOIS, N.E.; MOESGAARD, S.G.; ABLAD, B.; NILSEN, H.Y.; LJUNVALL, I.; HÖGLUND, K.; HÄGGSTRÖM, PEDERSEN, H.D.; BLAND, J.M.; OLSEN, L.H. Holter Monitoring of Small Breed Dogs with Advanced Myxomatous Mitral Valve Disease with and without a History of Syncope. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.28, p.363-370, 2014

REZENDE, R.S.; COELHO, H.E.; KAMIMURA, R.; SEVERINO, R.S.; OLIVEIRA, P.C.L.; MEDEIROS, A.A.; MAGALHÃES, A.O.C. Análise microscópica do miocárdio ventricular esquerdo em cães soropositivos para cinomose. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.29, n.2, p. 117-119, 2009.

RIKIHISA, Y. The tribe *Ehrlichiae* and *Ehrlichial* Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 4, n.3, p. 286-308, 1991.

RISHNIW, M.; BARR, S.C.; SIMPSON, K.W.; WINAND, N.J.; WOOTTON, J.A.M. Cloning and sequencing of the canine and feline cardiac troponin I genes. *American Journal of Veterinary Research*, n. 65, p.53–58, 2004.

RIVIERE, JE, SOOP, J.W. Antibióticos tetraciclina. In: Adams, HR. *Farmacologia e terapêutica em veterinária*. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003.

SAITO, T. B.; CUNHA-FILHO, N.A.; PACHECO, R.C.; FERREIRA F.; PAPPEN, F.G.; FARIAS, N.A.R.; LARSOON, C.E.; LABRUNA, M.B. Canine Infection by *Rickettsiae* and *Ehrlichiae* in Southern Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 70, n. 1, p. 102-108, 2008.

SANCHES, C.D.C. Estudo histopatológico das lesões viscerais da Ehrliquiose Monocítica Canina na fase Crônica. (Tese Doutorado) - Repositório UNESP - Universidade Estadual Paulista UNESP - Botucatu/SP, 2015.

SANTARÉM, V.A.; AGUIAR, D.M. Erliquiose Canina. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C. *Doenças Infecciosas em animais de produção e de companhia*. 1ª ed - Grupo gen - Roca, p. 95 - 111, 2015.

SANTOS, A.L.F.; LARSSON, M.H.M.A.; PEREIRA, G.G.; SANTOS, M.M.; GUTIERREZ, V.C.R. Dosagem sérica de troponina I em cães com desnivelamento do segmento ST utilizando quimioluminescência. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.63, n.6, p.1330-1336, 2011.

SCHOBBER, K.E.; KIRBACH, B.; OECHTERING, G. Noninvasive assessment of myocardial cell injury in dogs with suspected cardiac contusion. *Journal of Veterinary Cardiology*, v.1, n.2, p.17-25, 1999.

SCHOBER, K.E.; CORNAND, C.; KIRBACH, B. Serum cardiac troponin I and cardiac troponin T concentrations in dogs with gastric dilatation-volvulus. *Journal of American Veterinary Medical Association*, n. 221, p. 381–388, 2002.

SERRES, F.; POUCHELON, J-L.; POUJOL, L.; LEFEBVRE, HP.; TRUMEL, C.; DASTE, T.; SAMPEDRANO, CC.; GOUNI, V.; TISSIER, R.; HAWA, G.; CHETBOUL, V. Plasma N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration helps to predict survival in dogs with symptomatic degenerative mitral valve disease regardless of and in combination with the initial clinical status at admission. *Journal of Veterinary Cardiology*, v. 11, p.103-121, 2009.

SHAW, S.P.; ROZANSKI, E.A.; RUSH JE. Cardiac troponins I and T in dogs with pericardial effusion. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, n.18: p. 322–324, 2004.

SHERBUK, J.E.; OKAMOTOY, E.E.; MARKSZY, M.A.; FORTUNYK, E.; CLARK, E.H.; GALDOS-CARDENASZ, K.; VASQUEZ-VILLAR, A.; FERNANDEZ, A.B.; CRAWFORDYY, T.C.; DOZZ, R.Q.; FLORES-FRANCOK, L.; COLANZIK, R.; GILMANZ, R.H.; BERNXX, C. Biomarkers and Mortality in Severe Chagas Cardiomyopathy. *Global Heart*, v.10, n.3, p.173-180, 2015.

SILVA, J. N.; ALMEIDA, A.B.P.F.; BOA SORTE, E.C,. FREITAS, A.G.; SANTOS, L.G.F.; AGUIAR, D.M.; SOUSA, V.R.F. Soroprevalência de anticorpos anti-Ehrlichia canis em cães de Cuiabá, Mato Grosso. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 19, n. 2, p. 108-111, 2010.

SILVA, R.M.F.L. Biomarcadores BNP e NT-proBNP na insuficiência cardíaca: Revisão de literatura, Disponível em: <http://dx.doi.org/10.13070/mm.pt.4.608>, 2014.

SIM, S.S.; LIEU, H.; ANDRE, P. Biomarkers and bioassays for cardiovascular diseases: Present and future. Biomarker Insights, n. 3, p. 293–302, 2008.

SINGLETERY, G.E.; MORRIS, N.A.; LYNNE O’SULLIVAN, M.; GORDON, S.G.; OYAMA, M.A. Prospective evaluation of NT-proBNP assay to detect occult dilated cardiomyopathy and predict survival in Doberman Pinschers. Journal of Veterinary Internal Medicine, v.26, n.6, p.1330-1336, 2012.

SINAGRA, G.; ANZINI, M.; PEREIRA, N.L.; BUSSANI, R.; FINOCCHIARO, G.; BARTUNKEK, J.; MERLO, M. Myocarditis in clinical practice. Mayo Clinic Proceedings, p.1-11, 2016.

SJÖSTRAND, K.; WESS, G.; LJUNGVALL, I.; HÄGGSTRÖM, J.; MERVEILLE, A.C.; WIBERG, M.; GOUNI, V.; LUNDGREN WILLESEN, J.; HANÅS, S.; LEQUARRÉ, A.S.; MEJER SØRENSEN, L.; WOLF, J.; TIRET, L.; KIERCZAK, M.; FORSBERG, S.; MCENTEE, K.; BATTAILLE, G.; SEPPÄLÄ, E.; LINDBLAD-TOH, K.; GEORGES, M.; LOHI, H.; CHETBOUL, V.; FREDHOLM, M.; HÖGLUND, K. Breed differences in natriuretic peptides in healthy dogs. Journal of Veterinary Internal Medicine, v.28, n.2, p.451-457, 2014.

SPINOSA, H.S. Antibióticos Bacteriostáticos que Interferem na Síntese Proteica: Macrolídios, Lincosamidas, Pleuromutilinas, Estreptograminas, Tetraciclina, Cloranfenicol e Derivados. Em: Spinosa, HS, Górnaiak, SL; Bernardi, MM. Farmacologia Aplicada a Medicina Veterinária 5 ed. Guanabara Koogan – Rio de Janeiro/SP, p. 470-471, 2011.

SPOTSWOOD, T. C.; KIRBERGER, R. M.; KOMA, L.M.P.K.; THOMPSON, P. N.; MILLER, D.B. Changes in echocardiographic variables of left ventricular size

and function in a model of canine normovolemic anemia. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, v. 47, p. 358–365.

STANOJEVIĆ, M.; STANKOV, S. Electrocardiographic changes in patients with chronic anemia. *Srpski Arhiv Za Celokupno Lekarstvo*, v. 126, n. 11-12, p. 461-466, 1997.

SUTO, Y.; SUTO, A.; INOKUMA, H.; OBAYASHI, H.; HAYASHI, T. First confirmed canine case of Ehrlichia canis infection in Japan. *Veterinary Recording*, v.148, p. 809811, 2001.

SYKES, J.E. Ehrlichia, Anaplasmosis, Rocky Mountain Spotted Fever, and Neorickettsial Infection. In: ETTINGER S.J.; FELDMAN, E.C. Textbook of Veterinary Internal Medicine – Diseases of the Dog and Cat - 7 ed. W.B. Saunders CO. p. 901904, 2010.

SZATMÁRI, V.; VAN LEEUWEN, M.W; TESKE, E. Innocent Cardiac Murmur in Puppies: Prevalence, Correlation with Hematocrit, and Auscultation Characteristics. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.29, p.1524–1528.

TALAROV, Z.Z.; TERZIYSKI, K.V.; KOSTIANEV, S.S. Heart Rate Variability as a Method for Assessment of the Autonomic Nervous System and the Adaptations to Different Physiological and Pathological Conditions. *Folia Medica*, v. 574, n.3-4, p.173-180, 2015.

TÁVORA, M.Z.P.; MEHTA, N.; SILVA, R.M.F.L.; GONDIM, F.A.A.; HARA, V.M.; DE PAOLA, A.A.V. Characteristics and Identification of Sites of Chagasic Ventricular Tachycardia by Endocardial Mapping. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*, v.72, n.4, p.463-474, 1999.

THOMASON, J.D.; FALLAW, T.L.; CALVERT, C.A. Indicações e técnica de registo electrocardiográfico contínuo ambulatório em cães. *Veterinary Medicine*, v.10, n.57, p.38-46, 2008.

THYGESEN, K.; ALPERT, J.S.; JAFFE, A.S.; SIMOONS, M.L.; CHAITMAN, B.R.; WHITE, H.D. Third universal definition of myocardial infarction. *European Heart Journal*, n. 33: p. 2551–2567, 2012.

TILLEY, L.P. *Essentials of canine and feline electrocardiography*. 3 ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 470 p.,1992

TONELLO, L.; RODRIGUES, F.B.; SOUZA, J.W.S.; CAMPBELL, C.S.G.; LEICHT, A.S.; BOULLOSA, D.A. The role of physical activity and heart rate variability for the control of work related stress. *Frontiers in physiology*, doi: 10.3389/fphys.2014.00067, 2014

TOOM, ML.; DOBAK, TP.; BROENS, EM.; VALTOLINA, C. Interstitial pneumonia and pulmonary hypertension associated with suspected ehrlichiosis in a dog. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 58, n. 1, p.0-1, 2015.

UENO, T.T.H.; AGUIAR, D.M.; PACHECO, R.C.; RICHTZENHAIN,L.J.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C.; MEGID, J.; LABRUNA, M.B. Ehrlichia canis em cães atendidos em hospital veterinário de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.18, n.3, p. 57-61, 2009.

ULLOA, H.M.; HOUSTON, B.J.; ALTROGGE, D.M. Arrhythmia prevalence during ambulatory electrocardiographic monitoring of Beagles. *American Journal of Veterinary Research*, v. 56 p.275-281, 1995.

UNVER, A.; OHASHI, N.; TAJIMA, T.; STICH, R.; GROVER, D.; RIKIHISA, Y. Transcriptional analysis of p30 major outer membrane multigene family of

Ehrlichia canis in dogs, ticks, and cell at different temperatures. Infectious Immunology, v. 69, p. 6172-6178, 2001.

VANDERLEY, L.C.M.; PASTRE, C.M.; HOSHI, R.A.; CARVALHO, T.D.; GODOY, M.F. Noções básicas de variabilidade da frequência cardíaca e sua aplicabilidade clínica. Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular, v. 24, n. 2, p. 205-217, 2009.

VIEIRA, R.F.C.; BIONDO, A.W.; GUIMARÃES, A.M.S.; SANTOS, A.P.; SANTOS, R.P.; DUTRA, L.H.; DINIZ, J.P.V.P; MORAIS, H.A.; MESSIK, J.B.; LABRUNA, M.B.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in Brazil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Jaboticabal, v.20, n.1, p. 1-12, 2011.

VITT, JP.; SAUNDERS, AB.; O'BRIEN, MT.; MANSELL, J.; AJITHDOSS, DK.; HAMER, SA. Diagnostic Features of Acute Chagas Myocarditis with Sudden Death in a Family of Boxer Dogs. Journal Of Veterinary Internal Medicine, v. 30, n. 4, p.1210-1215, 2016.

WANER T, Rosner M, Harrus S, Naveh A, Zass R, Keysar A. Detection of ehrlichial antigen in plasma of beagle dogs with experimental acute Ehrlichia canis infection. Veterinary Parasitology, v. 63, p. 331-335, 1996

WARE, W.A. Testes diagnósticos do sistema cardiovascular. In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. Medicina Interna de Pequenos Animais 4 ed. Elsevier Saunders, p.31-32, 2010.

WELLS, S.M.; SLEEPER, M. Cardiac troponins. Journal of Veterinary Emergency and Critical Care, n.18, p.235–245, 2008.

WEN B.; RIKIHISA, Y.; MOTT, J.M.; GREENE, R.; KIM, H.Y.; ZHI, N.; COUTO, G.C.; UNVER, A.; BARTSCH R. Comparison of nested PCR with immunofluorescent antibody assay for detection of Ehrlichia canis infection in

dogs treated with doxycycline, *Journal of Clinical Microbiology*, v.35 p.1852–1855, 1997.

WESS, G.; BUTZ, V.; MAHLING, M.; HARTMANN, K. Evaluation of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide as a diagnostic marker of various stages of cardiomyopathy in Doberman Pinschers. *American Journal of Veterinary Research*, v.72, n.5, p.642-649, 2011.

WILLIAMS, JD.; SNOW, RM.; ARCINIEGAS, JG. Myocardial involvement in a patient with human ehrlichiosis. *The American Journal Of Medicine*, v. 98, n. 4, p.414-415, 1995.

YAMADA, T.; MATSUMORI, A.; SASAYAMA, S. Therapeutic effect of anti-tumor necrosis factor-alpha antibody on the murine model of viral myocarditis induced by encephalomyocarditis virus. *Circulation*, v. 89, n. 2, p.846-851, 1994.

ZHANG, J.; HE, S.; QI, X.; LI, Y. Combined electrocardiography, coronary angiography and magnetic resonance imaging for the diagnosis of viral myocarditis: A case report. *Experimental and Therapeutic Medicine*, v.7, n.6, p. 1643-1646, 2014.

ANEXOS

Tabela 1: Valores de referência dos parâmetros clínicos, hematológicos, bioquímicos e eletrocardiográficos utilizados no estudo em questão

Parâmetro	Referência
Pressão Arterial Sistólica (mmHg)	90 - 150
Albumina (g/dL)	2,6 - 3,3
Globulina (g/dL)	2,7 - 4,4
ALT (UI/L)	21 - 73
AST (UI/L)	20 - 156
GGT (UI/L)	1,2 - 6,4
Uréia (mg/dL)	21,4 - 59,9
Creatinina (mg/dL)	0,5 - 1,5
CKMB (UI/L)	47 - 184
NT-proBNP (pmol/L)	403 - 980
Troponina Cardíaca I (ng/dL)	≤ 0,11
Hemácias ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	5,5 - 8,5
Hemoglobina (g/dL)	12,0 - 18,0
VG (%)	37,0 - 55,0
VCM (fl)	60,0 - 77,0
CHCM (g/dL)	32,0 - 36,0
Proteína total (g/dL)	6,0 - 8,0
RDW (%)	12,0 - 15,0
Contagem plaquetária ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	160,0 - 430,0
Leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	6,0 - 17,0
Neutrófilos segmentados ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0 - 0,3
Linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1,0 - 4,8
Eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0,1 - 1,25
Monócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0,15 - 1,35
Frequência cardíaca ECG convencional (bpm)	70 - 160
Eixo elétrico médio - complexo QRS (°)	40 - 100
Duração onda P (ms)	30 - 50
Intervalo PR (ms)	60 - 130
Duração complexo QRS	Até 50
Intervalo QT (ms)	150 - 250
Amplitude onda P (mV)	<0,4
Amplitude onda Q (mV)	0 - 0,5
Amplitude onda R (mV)	0,5 - 2,5

Amplitude onda S (mV)	0 - 0,3
Infradesnivelamento segmento ST	Até 0,15
Amplitude onda T	<25% onda R
Frequência cardíaca média - Holter (bpm)	81 - 105
Frequência cardíaca mínima - Holter (bpm)	30 - 58
Frequência cardíaca máxima - Holter (bpm)	235 - 250
NN médio (ms)	482 - 845
SDNN (ms)	322,3 ± 137,4
SDANN (ms)	148 - 202
SDNN INDX (ms)	161 - 359
NNs (x 10 ³)	79 - 130
RMSSD	90 - 155
TINN	-
pNN50 (%)	48 - 69

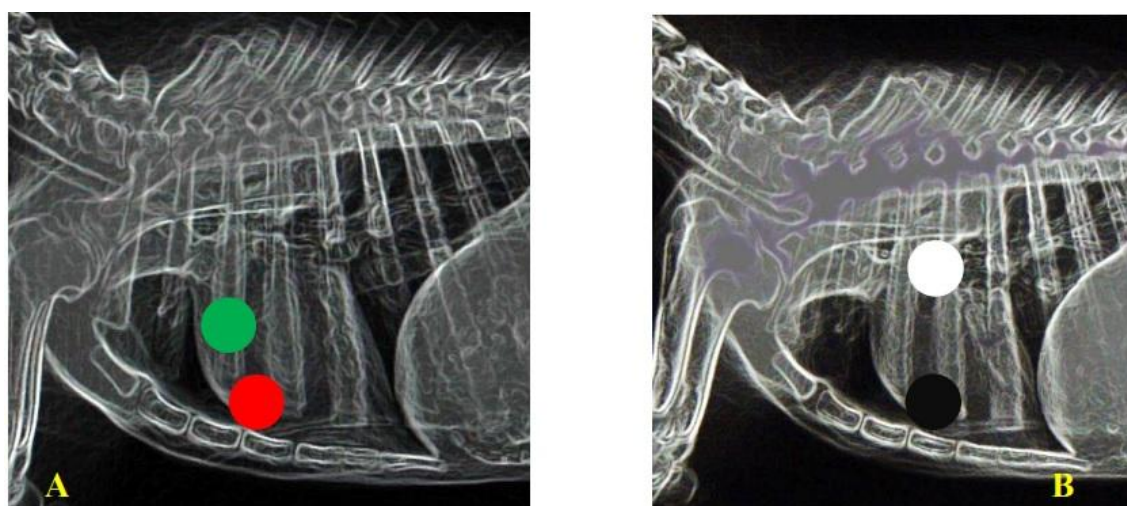


Figura 1. Posicionamento dos eletrodos de acordo com as cores: A: Hemitórax direito: B Hemitórax esquerdo

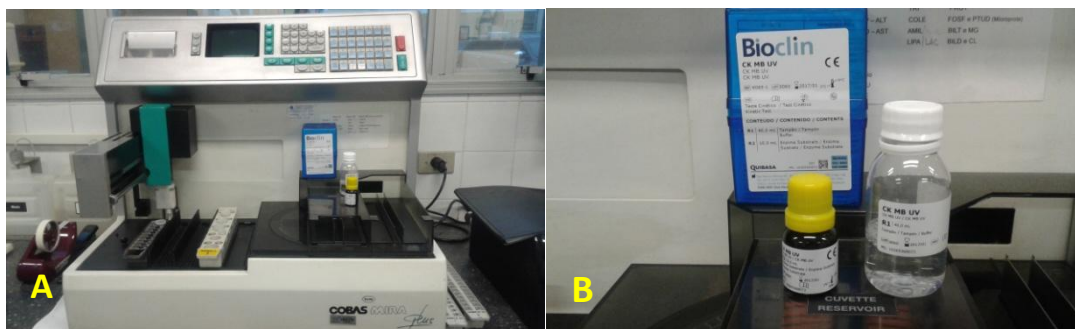


Figura 2. Métodos utilizados para dosagem de CKMB. A: Analisador bioquímico automático Cobas Mira plus®; B: Kit utilizado para análise de CKMB Bioclin®.

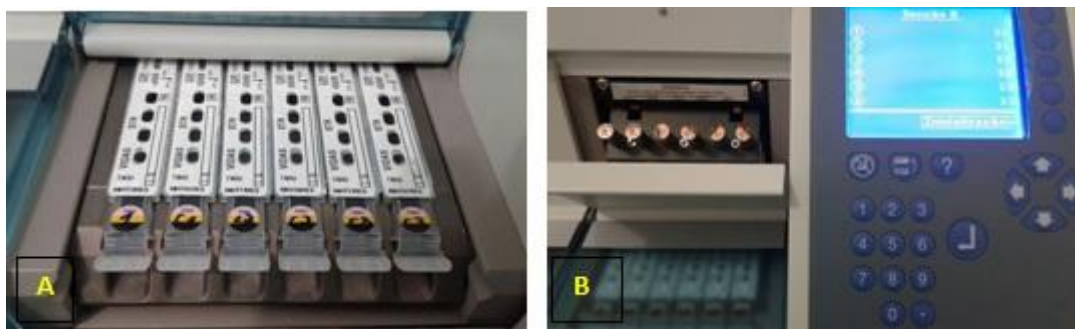


Figura 3. Métodos utilizados para dosagem de cTnI. A) Kit utilizado para a dosagem B) VIDAS® High sensitive Troponin I testAnalísador automático Mini-Vidas®



Figura 4: Kit ELISA N-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide (NTProBNP)® da empresa Cloud Clone Corp utilizado para dosagem sérica de NT-proBNP.



Figura 5: Cão com Ehrliquiose Monocítica Crônica. A) Estado geral alerta; B) Presença de petéquias em região medial de membro pélvico direito.

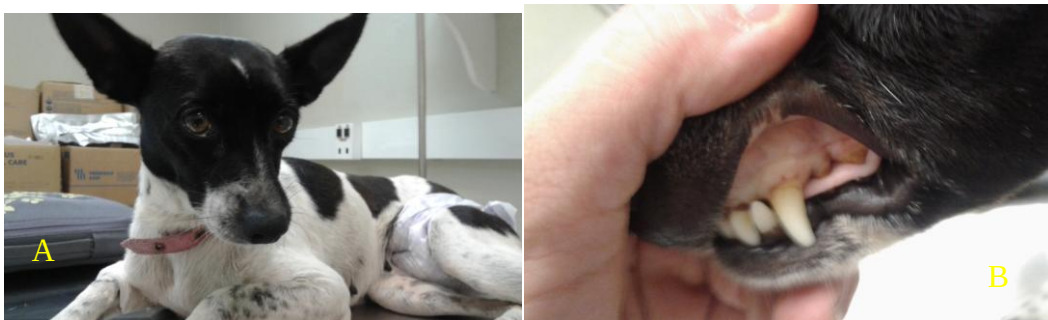


Figura 6: Cão com Ehrliquiose Monocítica Crônica. A) Apatia; B) Palidez de mucosa oral.

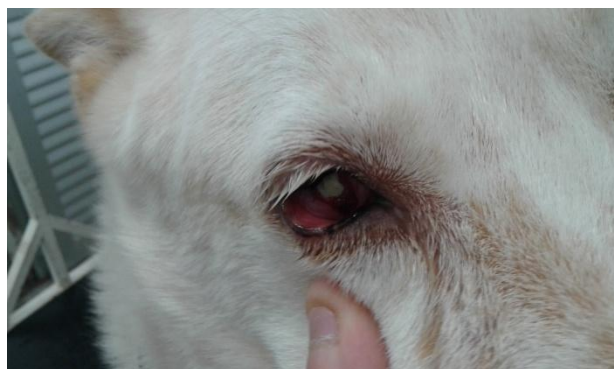


Figura 7: Uveíte em cão com Ehrliquiose Monocítica Crônica

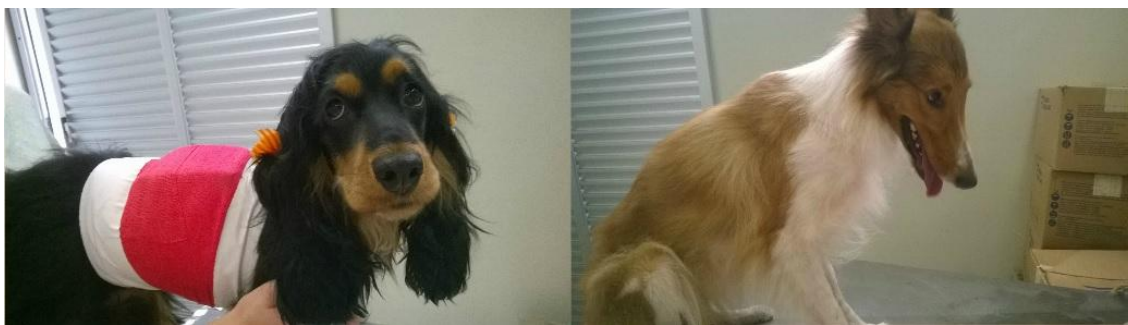


Figura 8: Animais saudáveis pertencentes do grupo controle



Figura 9: Traçado eletrocardiográfico de um cão do grupo doente com taquicardia sinusal (FC = 186 bpm) e presença de extrassístole ventricular esquerda ao centro (seta). (Derivação II; velocidade: 25 mm/ms; sensibilidade: 1 mV= 1cm).



Figura 10: Traçado eletrocardiográfico de um cão do grupo doente com bloqueio atrioventricular de primeiro grau. No detalhe: intervalo PR medindo 135 ms. (Derivação II; velocidade: 25 mm/ms; sensibilidade: 1 mV= 1cm).

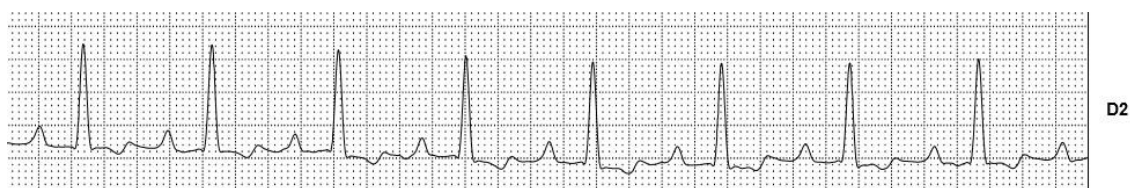


Figura 11: Traçado eletrocardiográfico de um cão do grupo doente com taquicardia sinusal, (FC = 180 bpm). (Derivação II; velocidade: 25 mm/ms; sensibilidade: 1 mV= 1cm).



Figura 12: Traçado eletrocardiográfico de um cão do grupo doente com presença de pausa sinusal (Derivação II; velocidade: 25 mm/ms; sensibilidade: 1 mV= 1cm).

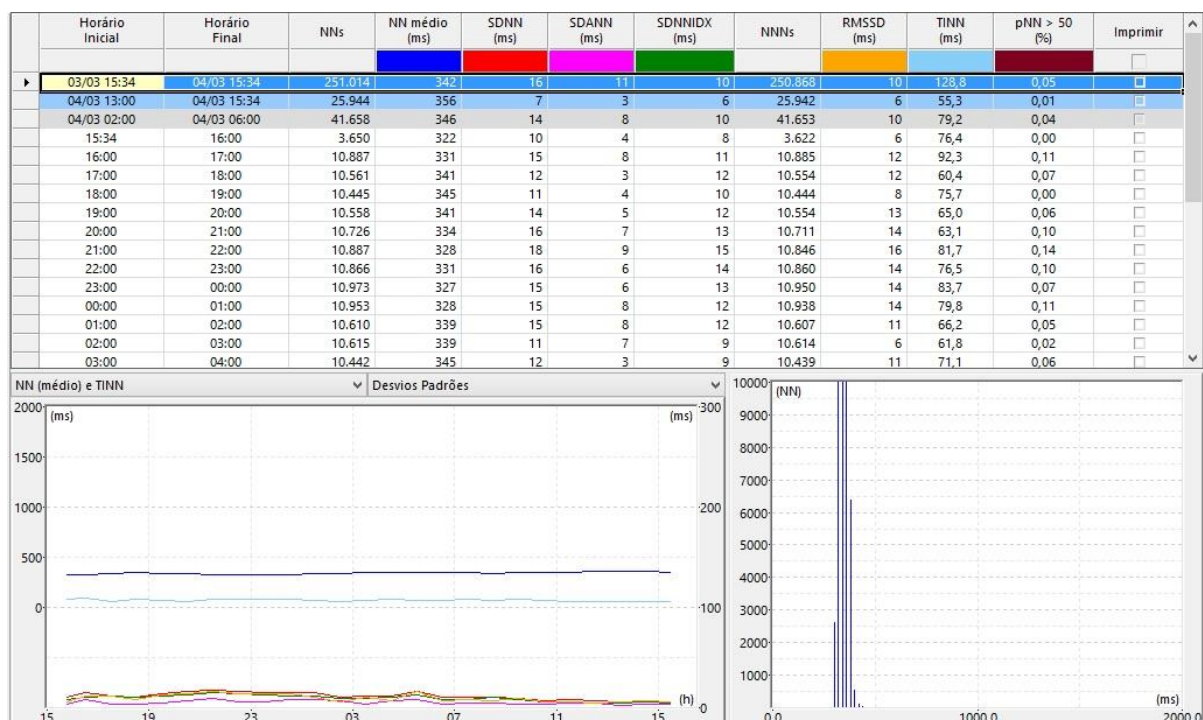


Figura 13: Dados de variabilidade de frequência cardíaca de um cão do grupo controle, e histograma dos intervalos NN durante 24 horas.

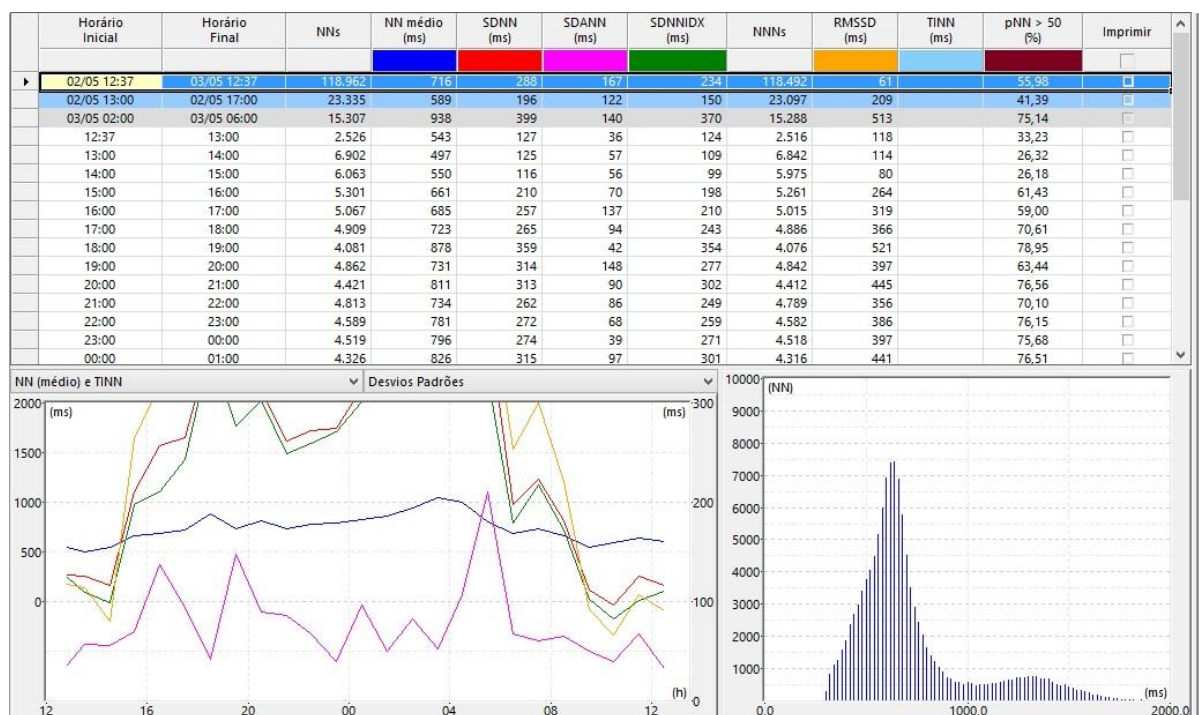


Figura 14: Dados de variabilidade da frequência cardíaca de um cão do grupo doente, e histograma dos intervalos NN durante 24 horas.

Tabela 1: Dados descritivos dos animais selecionados para compor o grupo doente (G1).

Animal	Idade	Sexo	Raça	Peso(kg)
1	3 meses	M	SRD	10
2	4 meses	F	SRD	2,6
3	4 meses	F	PitBull	7,8
4	5 meses	F	Border Collie	10,4
5	8 meses	M	SRD	24,8
6	10 meses	M	Labrador Retriever	19,6
7	1 ano	M	SRD	8,4
8	1 ano	M	Lhasa Apso	6,8
9	1 ano	F	SRD	6
10	2 anos	M	SRD	8,9
11	2 anos	M	SRD	16,2
12	3 anos	M	YorkShire Terrier	4,7
13	3 anos	M	Mest. Fox	7,15
14	5 anos	F	Schnauzer	7
15	5 anos 7 meses	F	Bull Terrier	15
16	5 anos 8 meses	F	Pug	10,9
17	5 anos 8 meses	M	SRD	20,7
18	6 anos	M	SRD	6,6
19	6 anos	F	SRD	11,6
20	6 anos	F	SRD	18,3

Tabela 2: Dados descritivos dos animais selecionados para compor o grupo controle(G2).

Animal	Idade	Sexo	Raça	Peso (kg)
1	9 meses	M	Pastor Alemão	35
2	10 meses	F	Cocker Americano	8,3
3	10 meses	M	Labrador Retriever	31,2
4	1 ano	F	Border Collie	20
5	1 ano 4 meses	M	SRD	26
6	1 ano 4 meses	F	Pastor Collie	18
7	2 anos	M	SRD	24,3
8	3 anos	F	PitBull	25,8
9	3 anos	M	SRD	37
10	5 anos	F	YorkShire Terrier	4,5

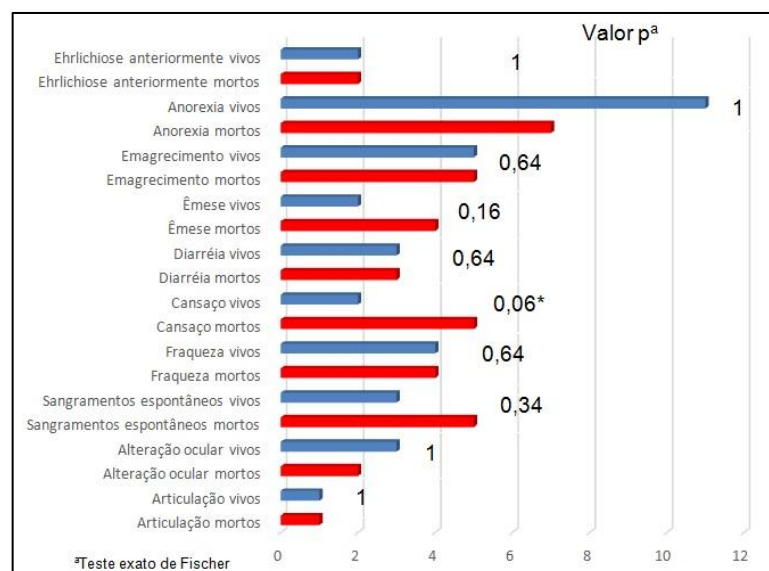


Gráfico 1. Análise da Frequência absoluta de dados de anamnese. Comparação entre grupo de animais e não sobreviventes aos 28 dias de tratamento (p < 0,05).

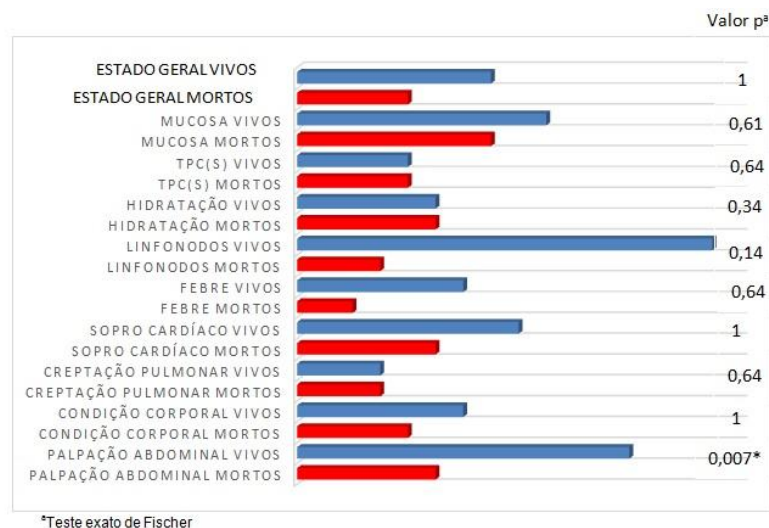


Gráfico 2: Análise da frequência relativa (%) geral de dados de exame físico. Comparação entre o subgrupo de animais vivos e o subgrupo de animais mortos durante os 28 dias de observação.

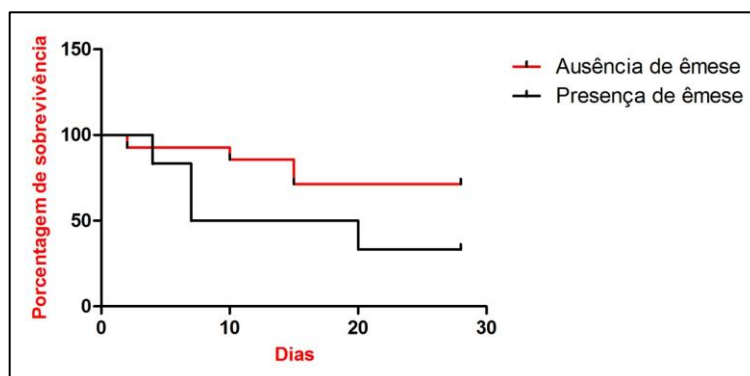


Gráfico 3: Curva de sobrevivência em função da presença ou não de êmese. (Teste de Log-rank ($p = 0,0972$; $p < 0,05$)).

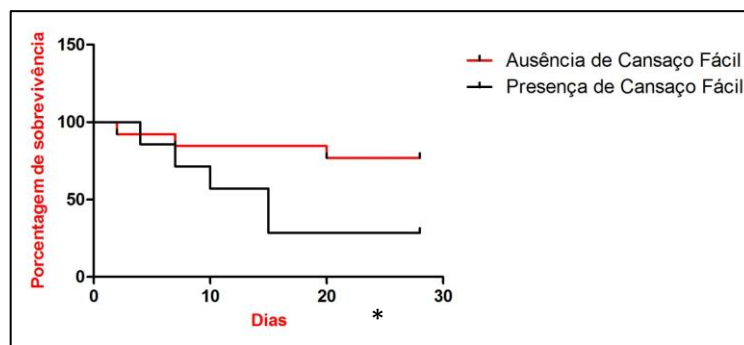


Gráfico 4: Curva de sobrevivência em função da presença ou ausência de cansaço fácil à anamnese. (Teste de Log-rank; $p = 0,0379$; $p < 0,05$)

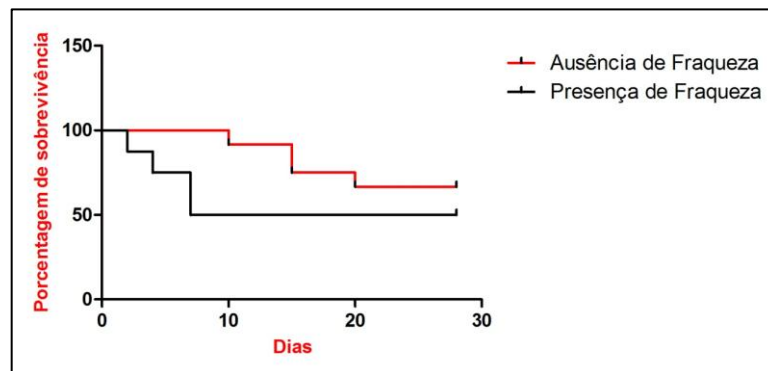


Gráfico 5: Curva de sobrevivência em função da presença ou ausência de fraqueza. (Teste de Log-rank. $p = 0,1446$; $p < 0,05$)

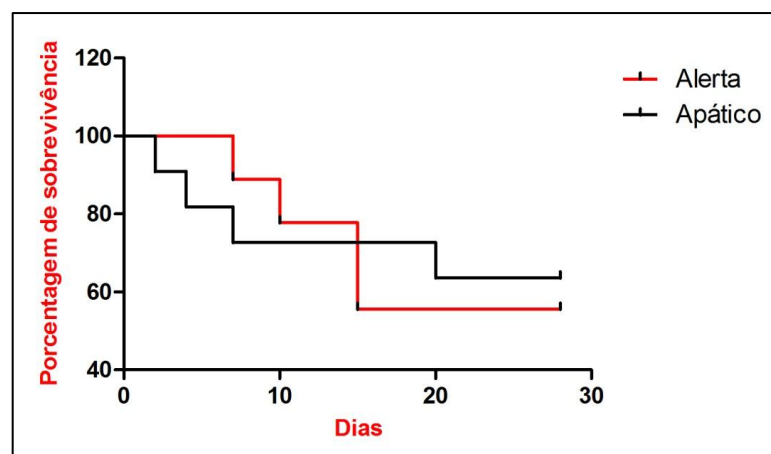


Gráfico 6: Curva de Sobrevivência em função da atitude do animal (alerta ou apático) (Teste de Log-rank; $p = 0,851$; $p < 0,05$)

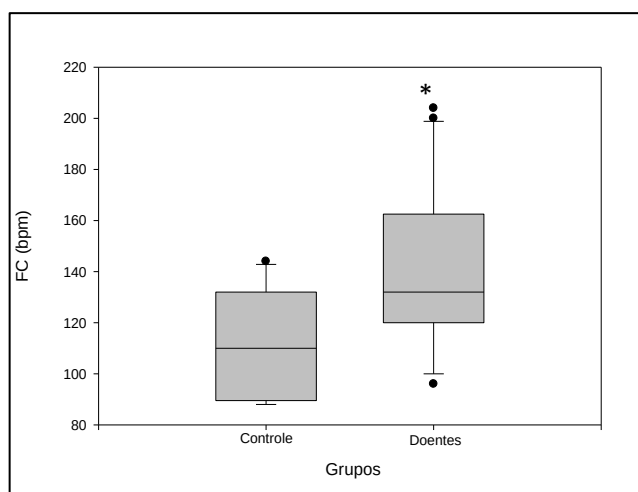


Gráfico 7: Distribuição amostral dos valores de frequência cardíaca (bpm) entre os grupos donde e controle

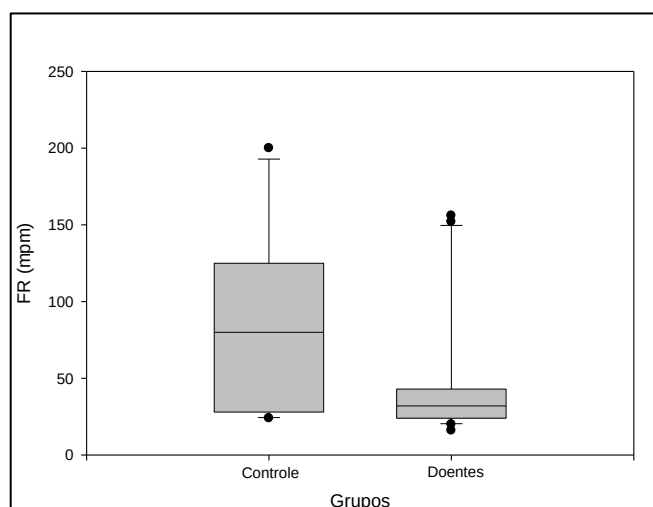


Gráfico 8: Distribuição amostral dos valores de frequência respiratória (mpm) entre os grupos donde e controle

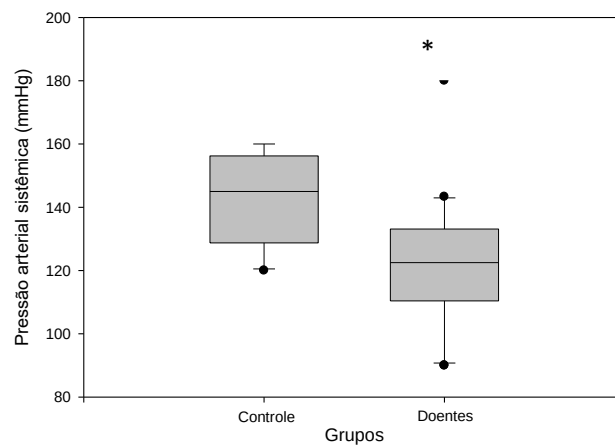


Gráfico 9: Distribuição amostral dos valores de pressão arterial sistêmica (mmHg) entre os grupos doente e controle

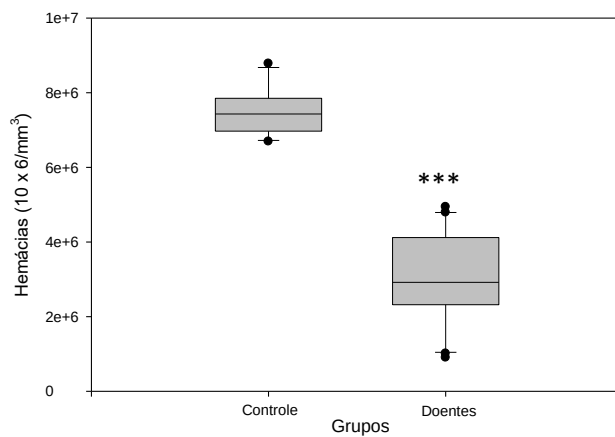


Gráfico 10: Distribuição amostral do número de hemácias ($10^6/\mu\text{l}$) entre os grupos doente e controle.

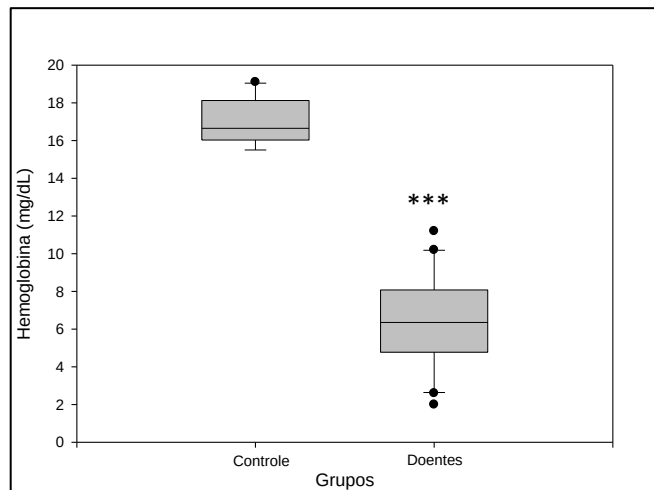


Gráfico 11: Distribuição amostral da concentração de hemoglobina (g/dL) entre os grupos doente e controle.

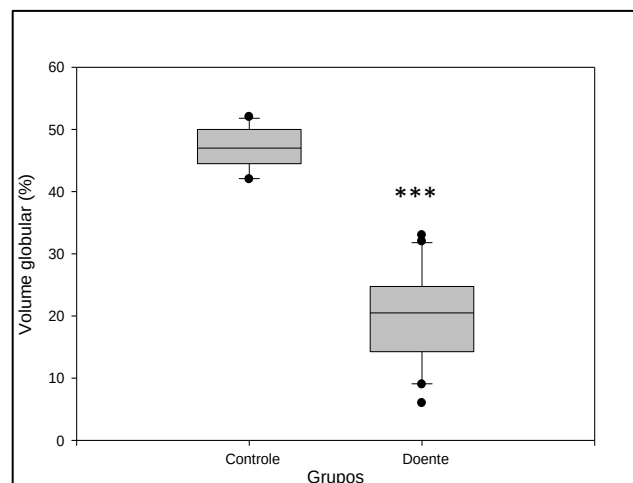


Gráfico 12: Distribuição amostral do volume globular (%) entre os grupos doente e controle

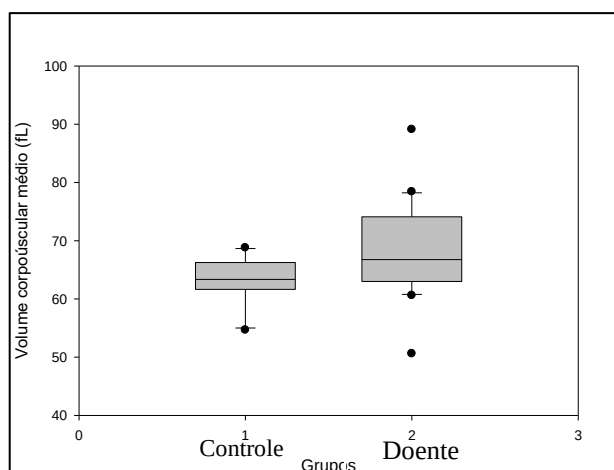


Gráfico 13: Distribuição amostral do volume corpuscular médio (fL) entre os grupos doente e controle

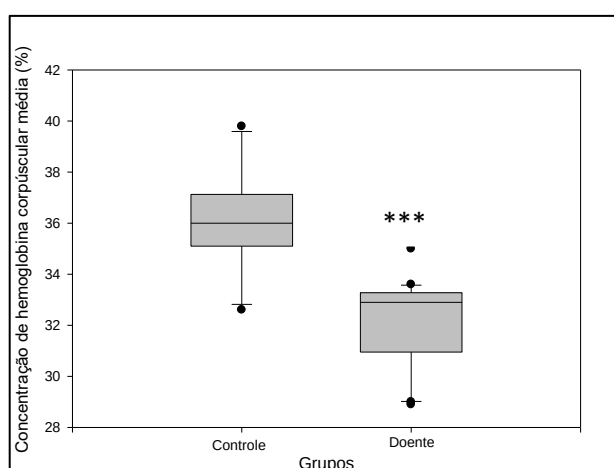


Gráfico 14: Distribuição amostral da concentração de hemoglobina corpuscular média (g/dL) entre os grupos doente e controle

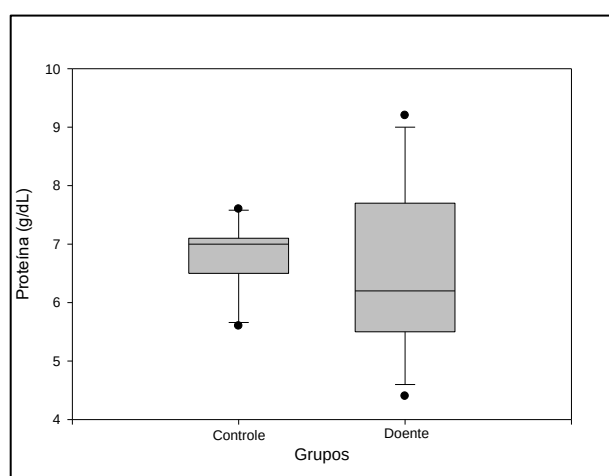


Gráfico 15: Distribuição amostral da concentração de proteína plasmática (g/dL) total entre os grupos doente e controle

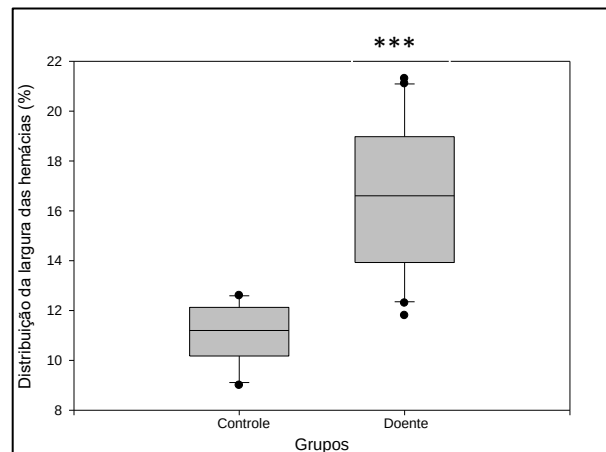


Gráfico 16: Distribuição amostral da largura das hemácias (RDW) (%) entre os grupos doente e controle

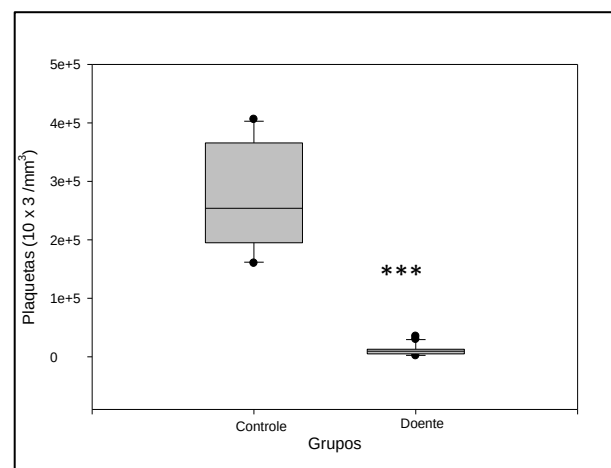


Gráfico 17: Distribuição amostral de plaquetas (x 10³/mm³) entre os grupos doente e controle.

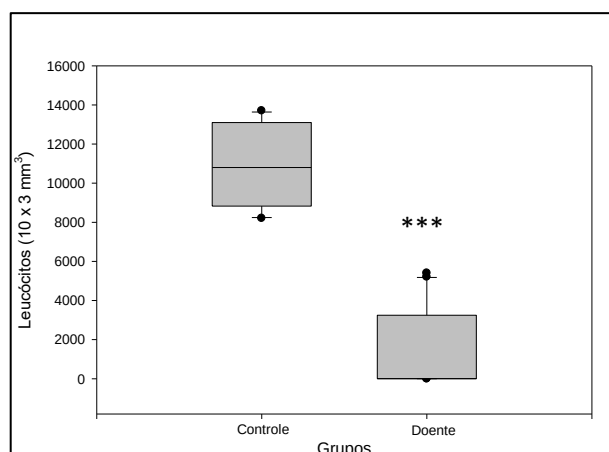


Gráfico 18: Distribuição amostral do número total de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) entre os grupos doente e controle.

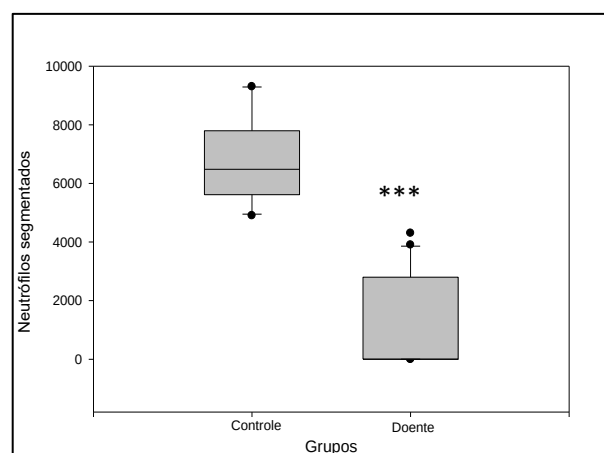


Gráfico 19: Distribuição amostral de número absoluto de neutrófilos segmentados ($/\mu\text{L}$) entre os grupos doente e controle.

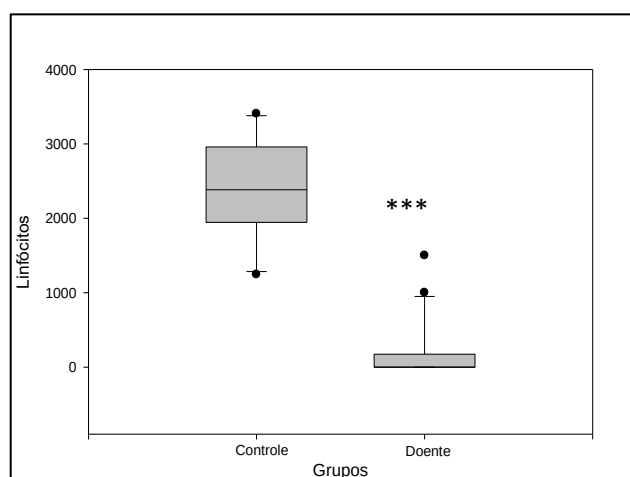


Gráfico 20: Distribuição amostral do número absoluto de linfócitos ($/\mu\text{l}$) entre os grupos doente e controle.

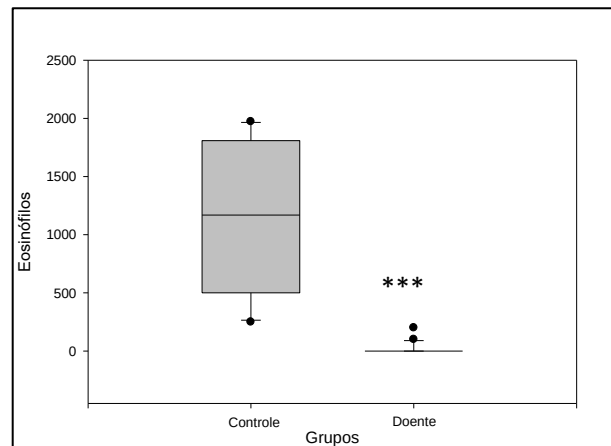


Gráfico 21: Distribuição amostral do número absoluto de eosinófilos ($/\mu\text{l}$) entre os grupos doente e controle.

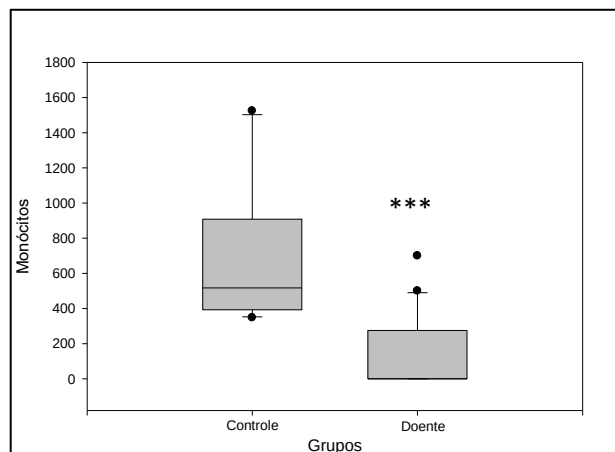


Gráfico 22: Distribuição amostral do número absoluto de monócitos ($/\mu\text{l}$) entre os grupos.

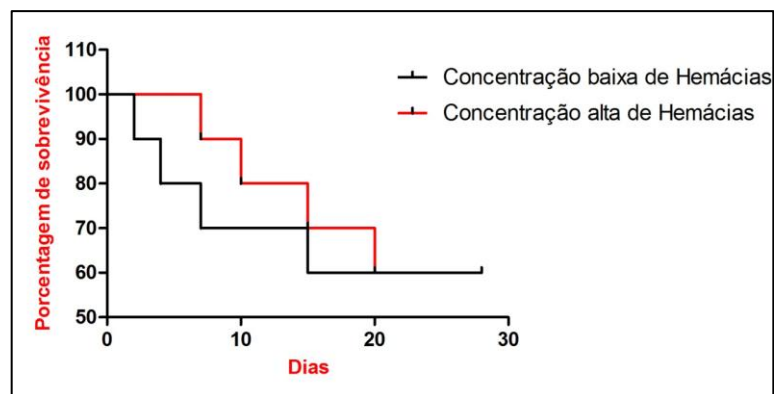


Gráfico 23: Curva sobrevida dos animais do grupo doente em função do número de hemácias. (Teste de Long-rank; $p = 0,825$; $p < 0,05$).

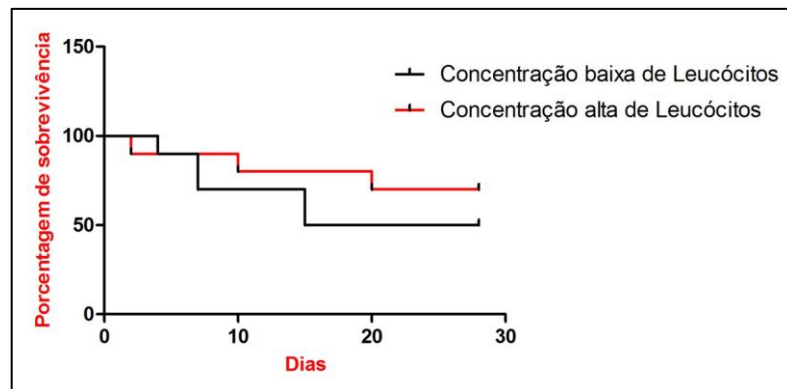


Gráfico 24: Curva sobrevida dos animais do grupo doente em função da contagem total de leucócitos. (Teste de Long-rank; $p = 0,37$; $p < 0,05$).

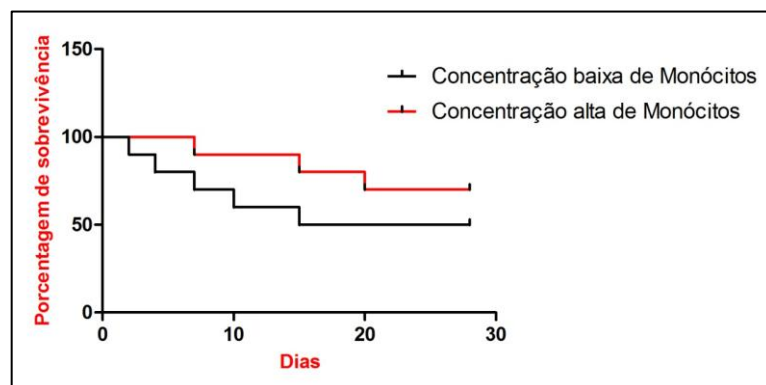


Gráfico 25: Curva sobrevida dos animais do grupo doente em função da concentração de monócitos. Ao teste de log-rank comparando as duas curvas, o valor p encontrado foi de 0,27 ($p < 0,05$).

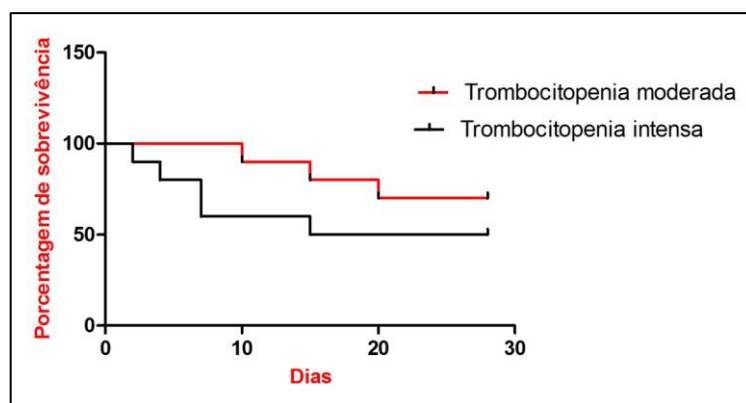


Gráfico 26: Curva sobrevida dos animais do grupo controle em função da intensidade da trombocitopenia. (Teste de Long-rank; $p = 0,16$; $p < 0,05$).

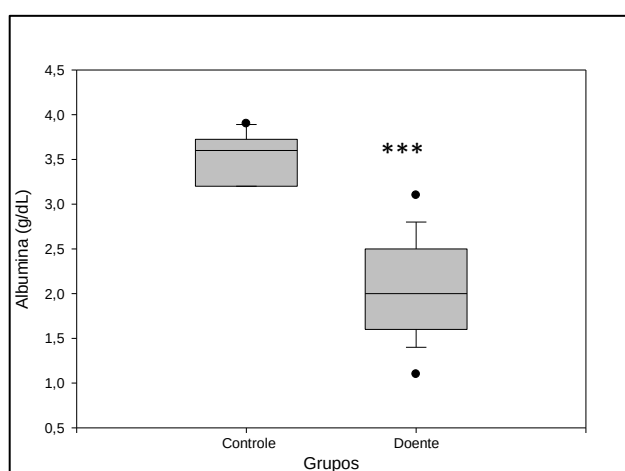


Gráfico 27: Gráfico da distribuição amostral da concentração de albumina (g/dL) entre os grupos doente e controle

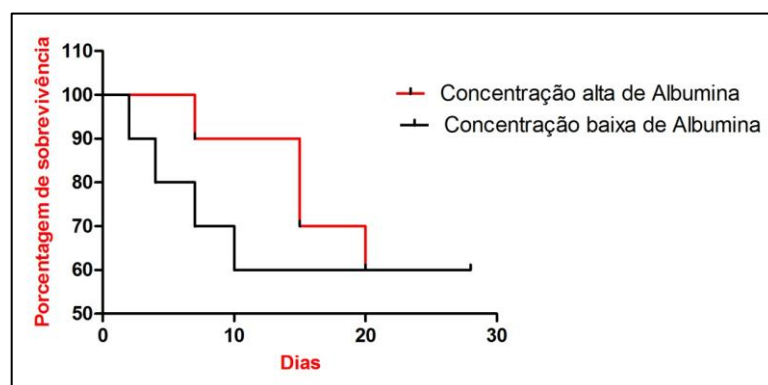


Gráfico 28: Curva sobrevida dos animais do grupo doente em função da concentração de albumina. (Teste de Long-rank; $p = 0,57$; $p < 0,05$)

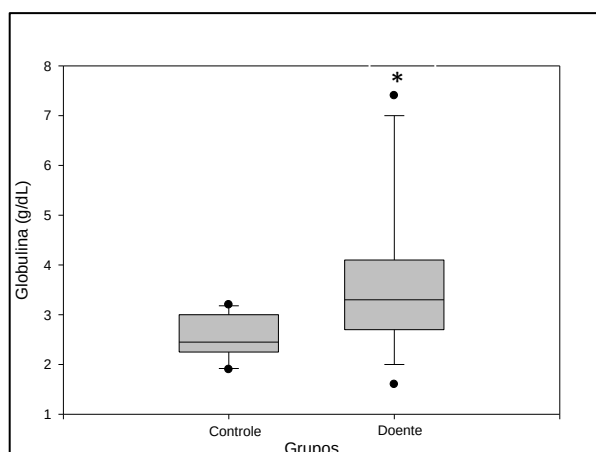


Gráfico 29: Distribuição da concentração de globulina (g/dL) entre os grupos doente e controle.

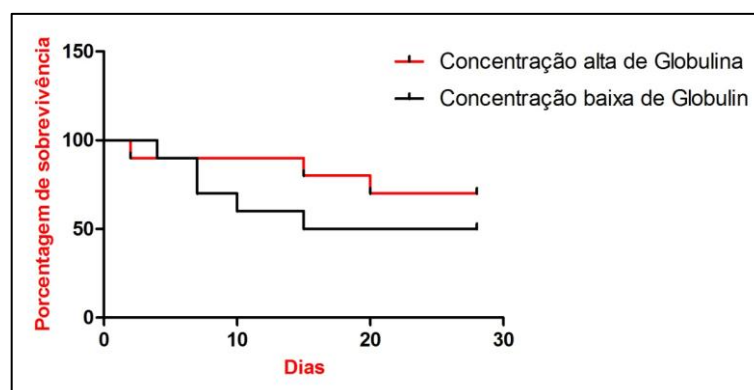


Gráfico 30: Curva de sobrevivência dos animais do grupo controle em função da concentração de globulina. (Teste de Long-rank; $p = 0,3$; $p < 0,05$).

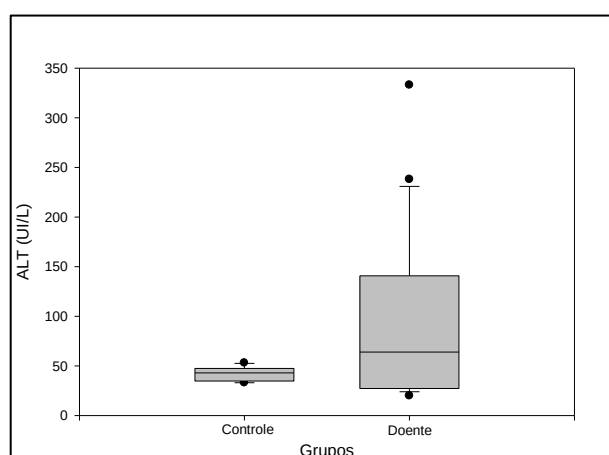


Gráfico 31: Distribuição amostral da concentração de alanina aminotransferase (ALT) (UI/L) entre os grupos doente e controle.

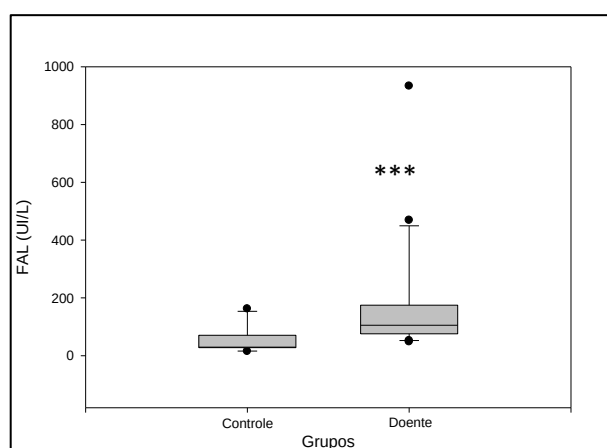


Gráfico 32: Distribuição amostral da concentração de fosfatase alcalina (FA) (UI/L) entre os grupos doente e controle.

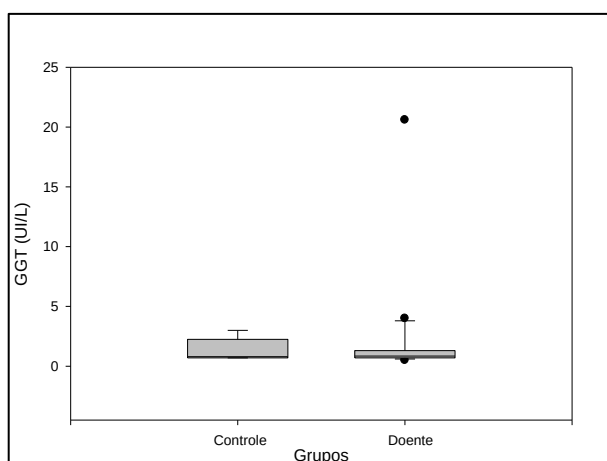


Gráfico 33: Gráfico da distribuição amostral da concentração de gama glutamil transferase (GGT) (UI/L) entre os grupos doente e controle.

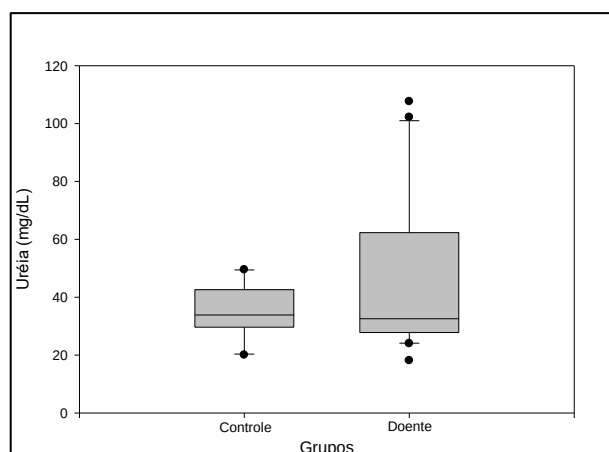


Gráfico 34: Distribuição amostral da concentração de uréia (mg/dL) entre os grupos doente e controle.

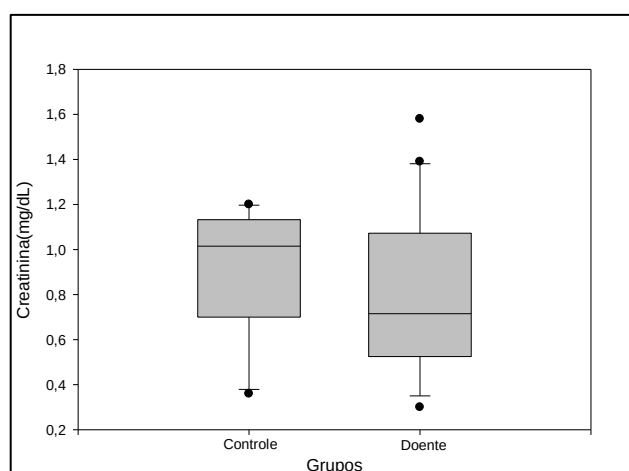


Gráfico 35: Distribuição amostral da concentração de creatinina (mg/dL) entre os grupos doente e controle.

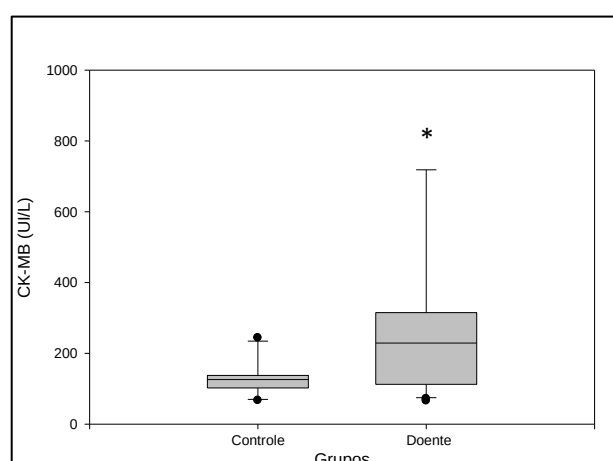


Gráfico 36: Distribuição amostral da concentração de CK-MB (UI/L) entre os grupos doente e controle.

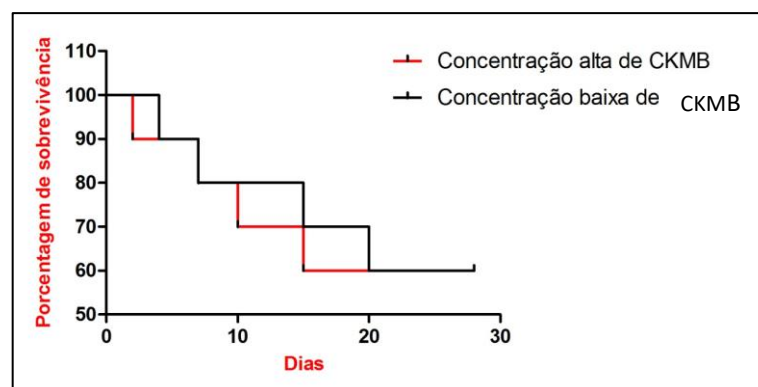


Gráfico 37: Curva de sobrevivência dos animais do grupo doente em função da concentração de CKMB. (Teste de Long-rank; $p = 0,86$; $p < 0,05$).

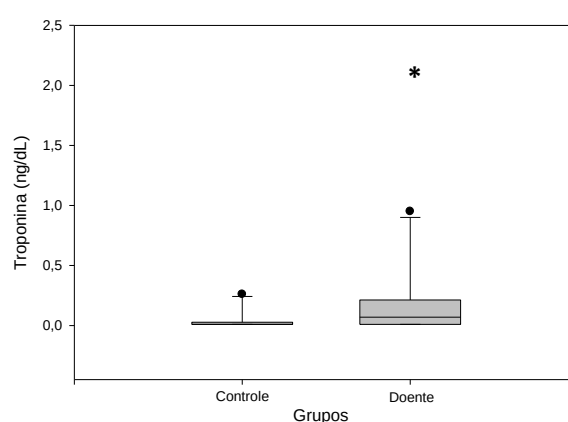


Gráfico 38: Gráfico da distribuição amostral da concentração de troponina cardíaca I entre os grupos doente e controle.

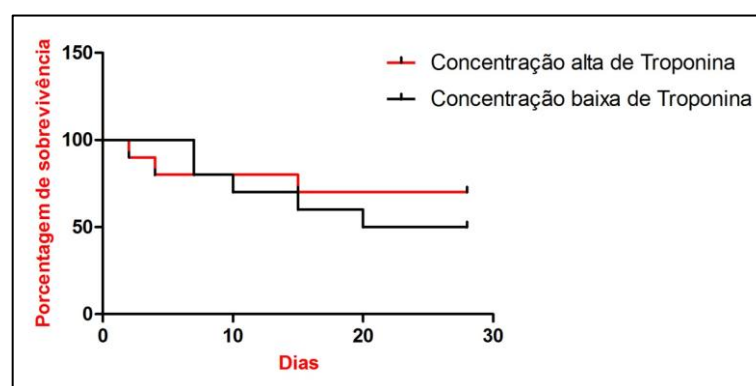


Gráfico 39: Curva de sobrevivência dos animais do grupo doente em função da concentração de troponina cardíaca I. (Teste de Long-rank; $p = 0,60$; $p < 0,05$).

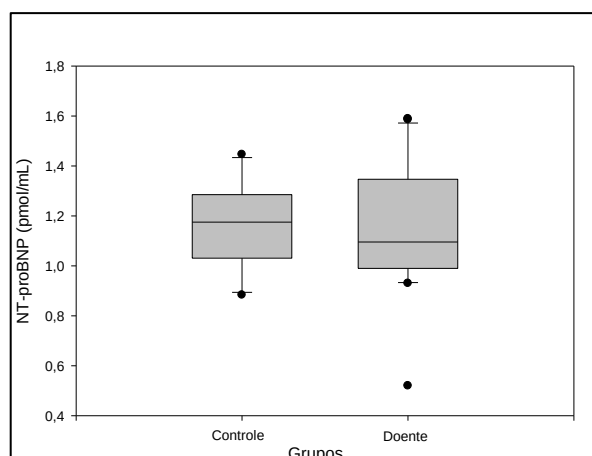


Gráfico 40: Distribuição amostral da concentração de NT-proBNP entre os grupos doente e controle.

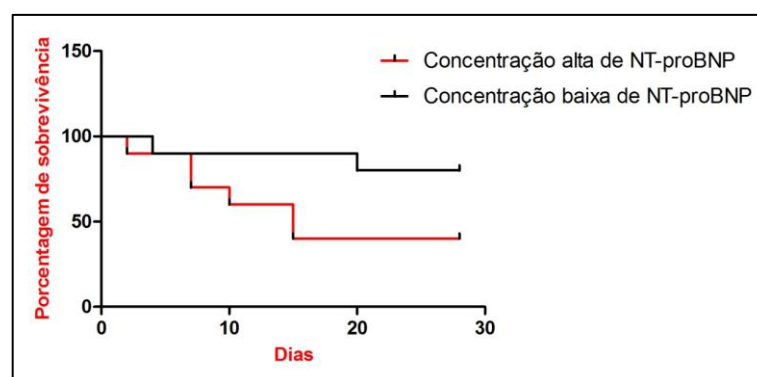


Gráfico 41: Curva de sobrevivência em dos animais do grupo doente em função da concentração de NT-proBNP. (Teste de Long-rank; $p = 0,07$; $p < 0,05$)



Gráfico 42: Distribuição de frequências do ritmo cardíaco de base apresentado no eletrocardiograma nos animais do grupo doente.

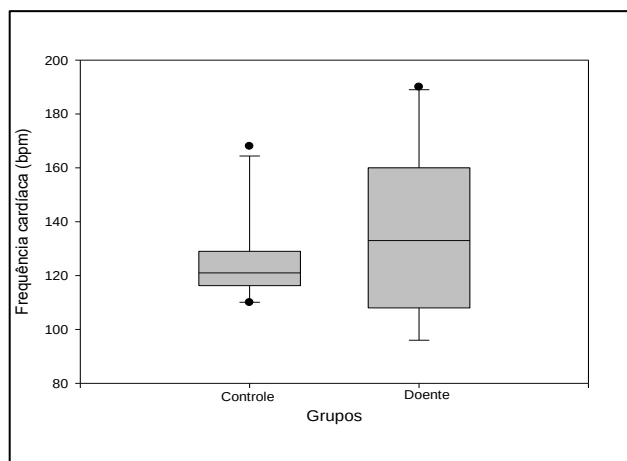


Gráfico 43: Distribuição amostral da frequência cardíaca (bpm) ao eletrocardiograma entre os grupos doente e controle.

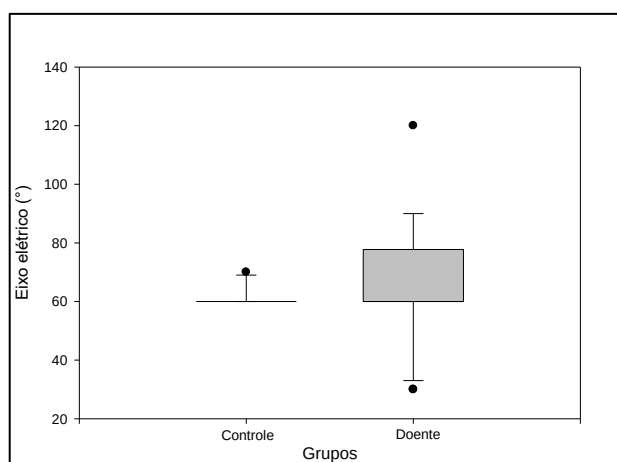


Gráfico 44: Distribuição amostral do eixo elétrico médio do complexo QRS (graus) ao eletrocardiograma entre os grupos doente e controle.

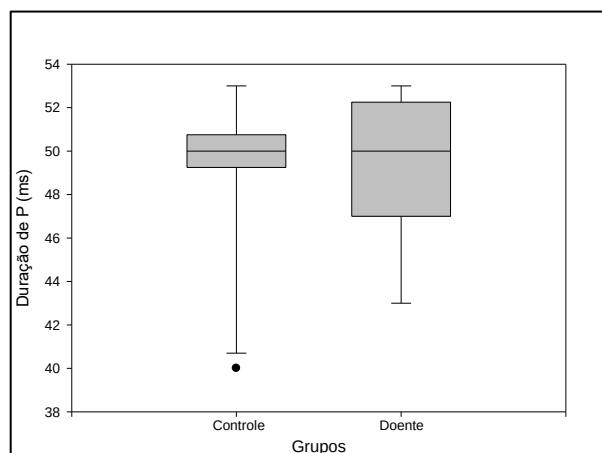


Gráfico 45: Distribuição amostral da duração da onda P (ms) ao eletrocardiograma entre os grupos doente e controle.

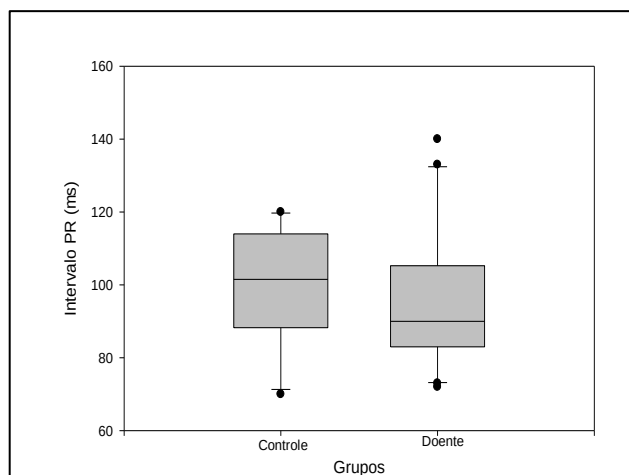


Gráfico 46: Distribuição amostral da duração do intervalo PR (ms) ao eletrocardiograma entre os grupos doente e controle.

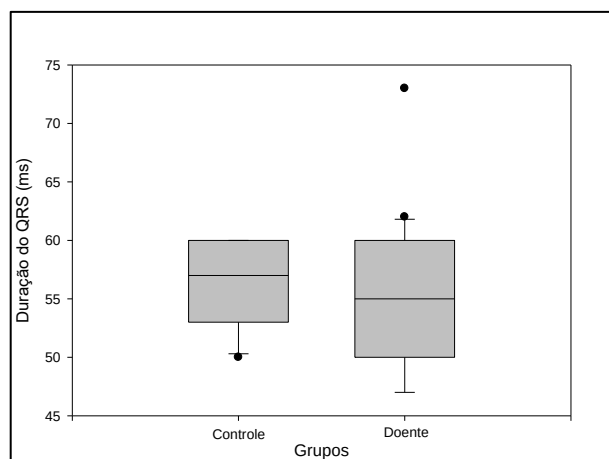


Gráfico 47: Distribuição amostral da duração do complexo QRS (ms) ao eletrocardiograma entre os grupos doente e controle.

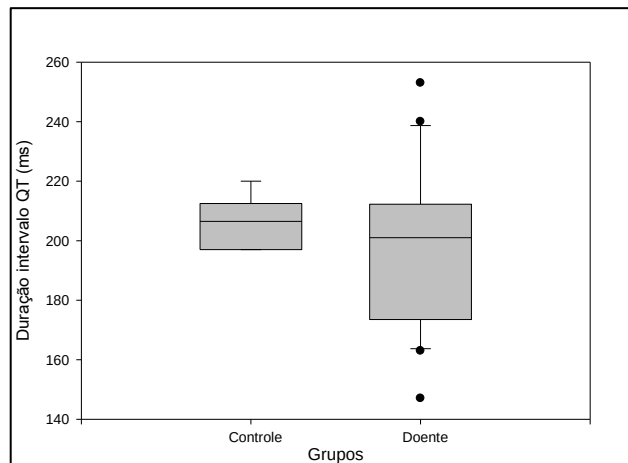


Gráfico 48: Distribuição da duração do intervalo QT (ms) ao eletrocardiograma entre os grupos doente e controle.

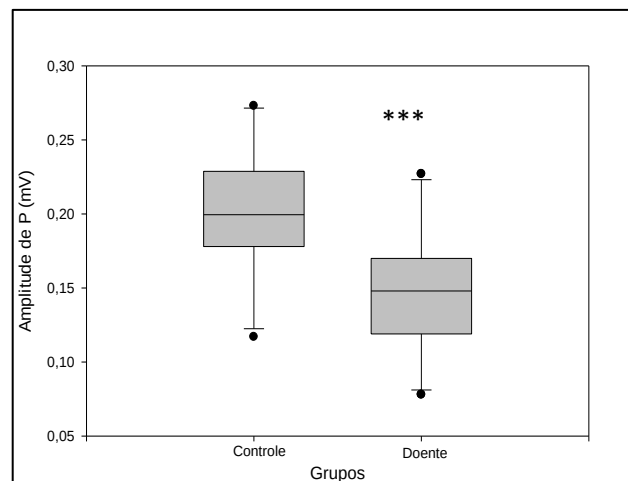


Gráfico 49: Distribuição amostral da amplitude da onda P (mV) ao eletrocardiograma entre os grupos doente e controle.

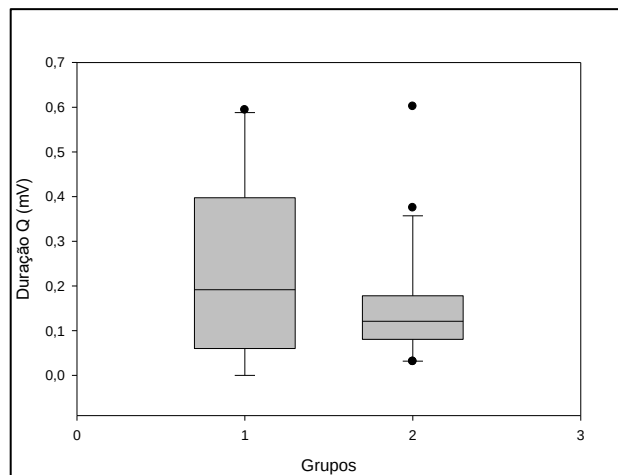


Gráfico 50: Distribuição amostral do valor de amplitude da onda Q (mV) ao eletrocardiograma entre os grupos doente e controle.

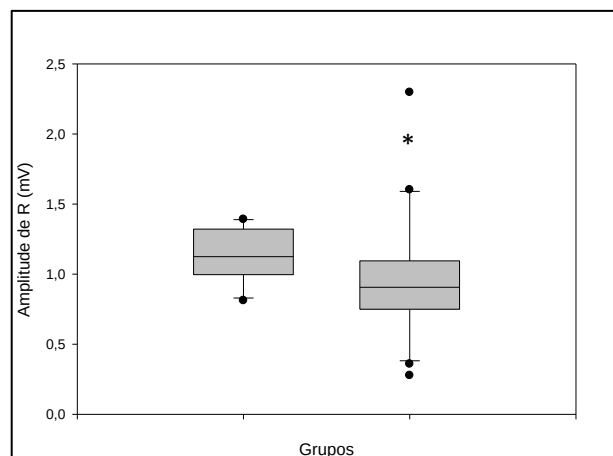


Gráfico 51: Distribuição do valor de amplitude da onda R (mV) ao eletrocardiograma entre os grupos doente e controle.

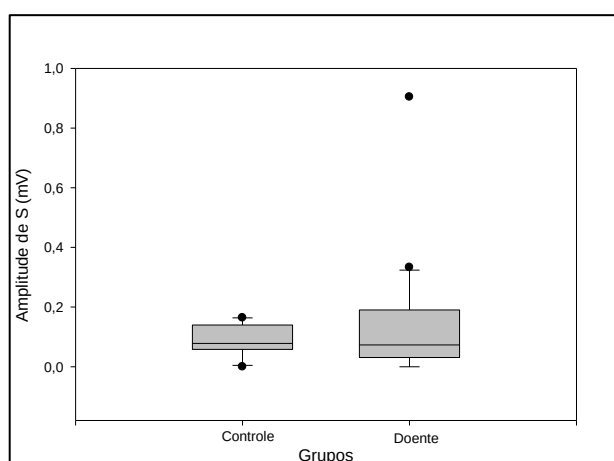


Gráfico 52: Distribuição do valor de amplitude da onda S (mV) ao eletrocardiograma entre os grupos doente e controle.

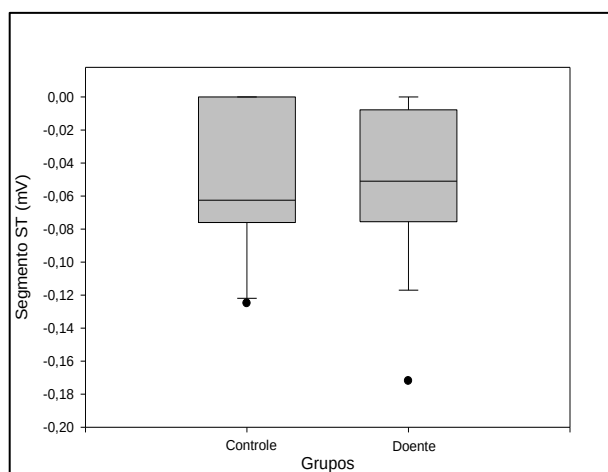


Gráfico 53: Distribuição do valor da amplitude do infradesnívelamento do segmento ST (mV) ao eletrocardiograma entre os grupos doente e controle.

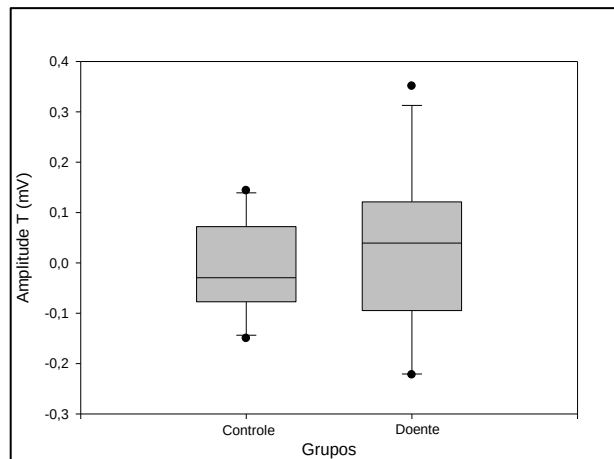


Gráfico 54: Distribuição do valor da amplitude da onda T (mV) ao eletrocardiograma entre os grupos doente e controle.

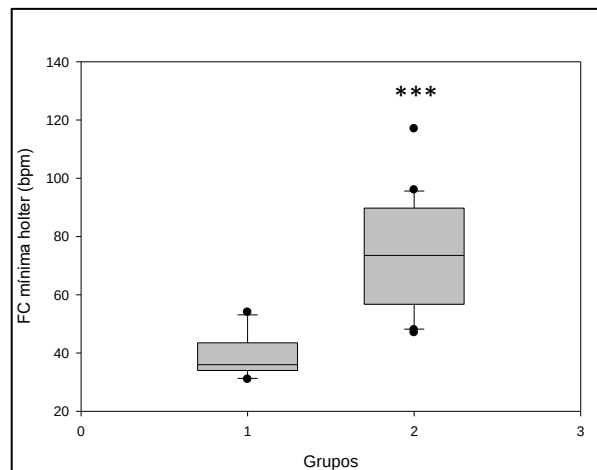


Gráfico 55: Distribuição amostral do valor de frequência cardíaca mínima (bpm) ao Holter entre os grupos doente e controle .

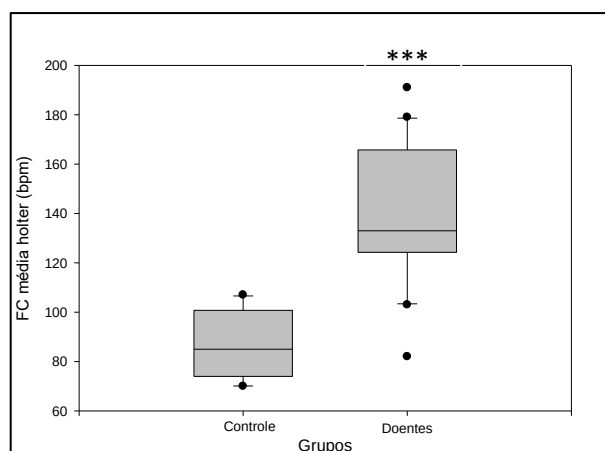


Gráfico 56: Distribuição amostral do valor de frequência cardíaca média (bpm) ao Holter entre os grupos doente e controle.

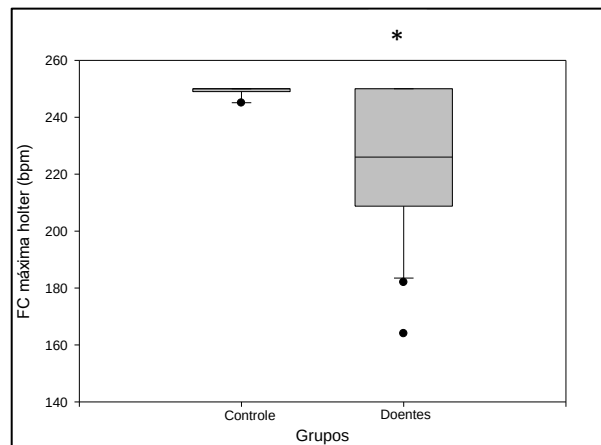


Gráfico 57: Distribuição amostral do valor de frequência cardíaca máxima (bpm) ao Holter entre os grupos doente e controle.

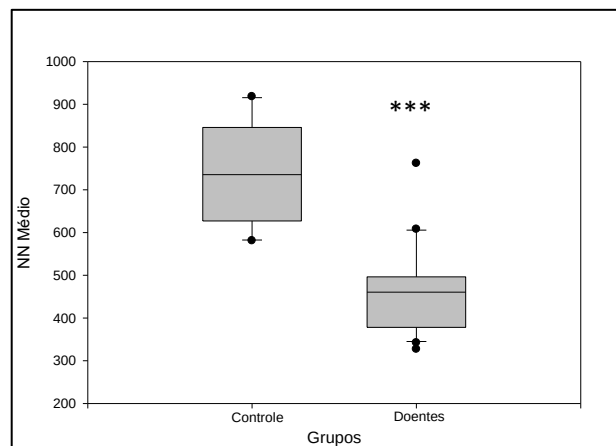


Gráfico 58: Distribuição amostral do valor de NN médio ao Holter entre os grupos doente e controle.

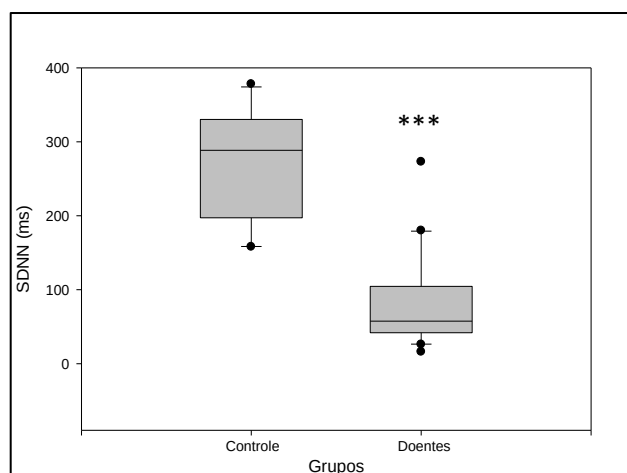


Gráfico 59: Distribuição amostral do valor de SDNN (ms) ao Holter entre os grupos doente e controle.

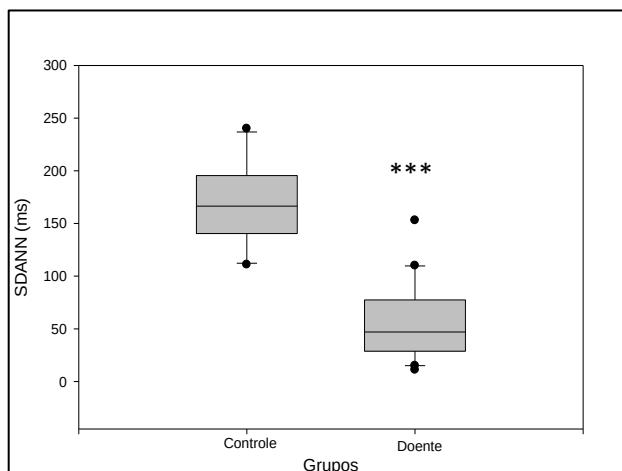


Gráfico 60: Distribuição amostral do valor de SDANN (ms) ao Holter entre os grupos doente e controle.

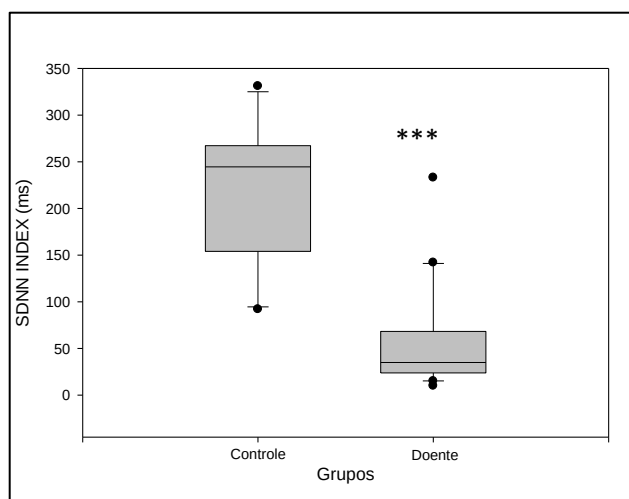


Gráfico 61: Distribuição amostral do valor de SDNNINDEX ao Holter entre os grupos.

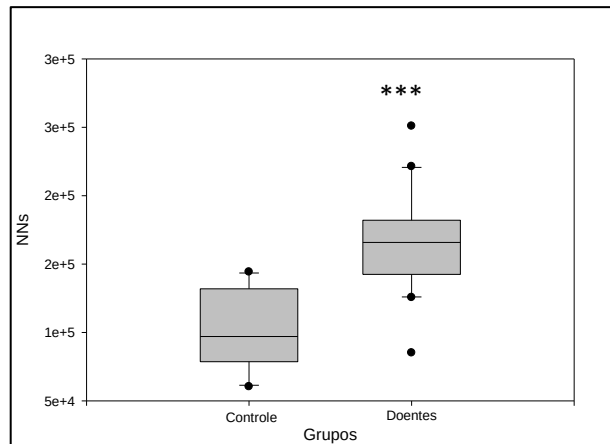


Gráfico 62: Distribuição amostral do número de distâncias NN ao Holter entre os grupos doente e controle.

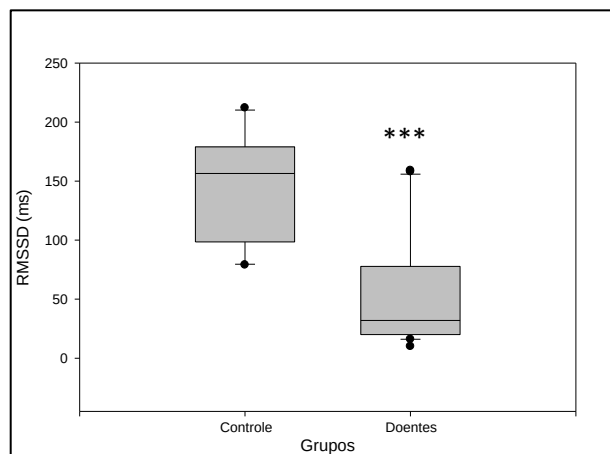


Gráfico 63: Distribuição amostral dos valores de RMSSD (ms) ao Holter entre os grupos doente e controle.

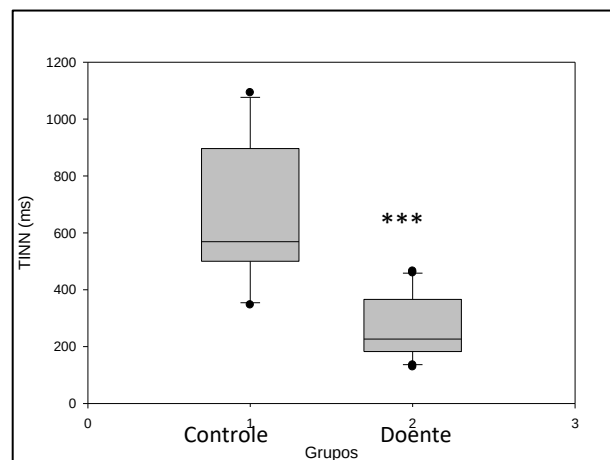


Gráfico 64: Distribuição amostral dos valores de TNN (ms) ao Holter entre os grupos doente e controle.

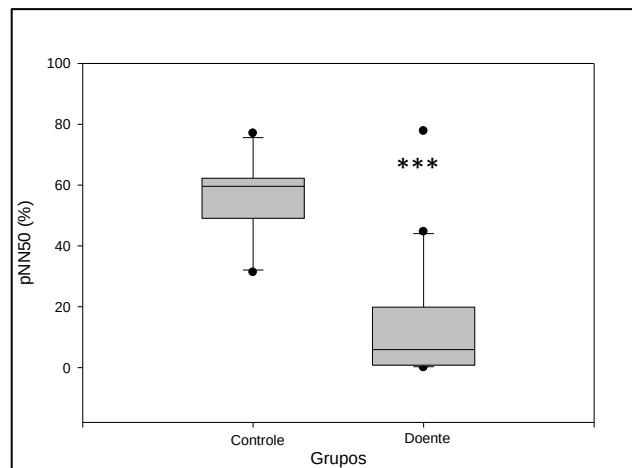


Gráfico 65: Distribuição amostral dos valores de pnn50 (%) ao Holter entre os grupos doente e controle.