

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

GLOMERULOPATIAS SECUNDÁRIAS À EHRlichIOSE
MONOCÍTICA CANINA CRÔNICA.

ÉRICA SOLANGE CAETANO KIKUCHI

BOTUCATU/SP
NOVEMBRO 2015

GLOMERULOPATIAS SECUNDÁRIAS À EHRlichIOSE MONOCÍTICA CANINA CRÔNICA.

ÉRICA SOLANGE CAETANO KIKUCHI

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

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Paes

Co-orientador: Prof. Dr. Osimar de Carvalho Sanches

BOTUCATU/SP

NOVEMBRO 2015

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

Kikuchi, Érica Solange Caetano.

Glomerulopatias secundárias à ehrlichiose monocítica
canina crônica / Érica Solange Caetano Kikuchi. -
Botucatu, 2015

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

Orientador: Antonio Carlos Paes

Coorientador: Osimar de Carvalho Sanches

Capes: 50502034

1. Glomerulopatias. 2. Erliquiose. 3. Rins - Doenças.
4. Baço - Doenças. 4. Histopatologia veterinária.

Palavras-chave: Baço; Bioquímica sérica; Erliquiose
crônica; Histopatologia; Rim.

Nome do Autor: Érica Solange Caetano Kikuchi

Título: GLOMERULOPATIAS SECUNDÁRIAS À EHRLICHIOSE MONOCÍTICA
CANINA CRÔNICA.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Antonio Carlos Paes

Presidente e orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dra. Noeme Souza Rocha

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Rogério Giuffrida

Membro

Departamento

Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade do Oeste Paulista

UNOESTE

Presidente Prudente – SP

Data da Defesa: 13 de novembro 2015.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Tania e Edson, por toda dedicação, amor, incentivo, compreensão. Por me ensinarem a colocar acima de tudo a família, a realizar todas as tarefas com amor e dedicação, e a compreender que sempre precisaremos uns dos outros em todas as realizações feitas nesta vida.

Ao meu irmão Gustavo, por seu constante apoio e incentivo.

À minha querida e amada família, meu alicerce. Em especial, meu querido e amado tio Marcos Caetano (*in memoriam*), que sempre foi minha inspiração, e meu avô paterno Kimio Kikuchi (*in memoriam*).

Ao meu namorado, companheiro e amigo, Hugo, pelos infindáveis momentos de alegria.

Aos meus mais queridos amigos pela amizade incondicional, por compartilharem das minhas alegrias e tristezas e pela paciência nos momentos difíceis.

E aos animais, magníficas criaturas de Deus, principalmente áqueles que fizeram parte da minha vida e aos que fazem neste momento, Mufasa, Maia, Pink, Luan e Sushi, que fazem todo o trabalho valer a pena.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por tudo que passei, percebendo que até as coisas ruins possuem um grande, e por muitas vezes enigmático, lado bom.

Ao meu orientador, Antonio Carlos Paes, pelos ensinamentos e imensa contribuição em minha vida acadêmica.

Ao meu co-orientador, Osimar de Carvalho Sanches, pelo apoio e auxílio na leitura das lâminas, e pela confiança e amizade, principalmente pela disponibilidade no uso do laboratório (CDAPVET- Consultoria e Diagnóstico Anatomo-Patológico Veterinário) e nos ensinamentos valiosos do dia-a-dia tanto para minha carreira profissional quanto acadêmica.

À doutoranda, Carolina Sanches, pela ajuda nas necropsias, pelo incentivo, paciência e amizade em todas as horas.

Aos professores da pós graduação em medicina veterinária e zootecnia da UNESP/FMVZ por contribuírem no meu aprendizado durante o mestrado.

Ao Prof. Dr. Rogério Giuffrida pela assistência na análise estatística.

Aos funcionários do setor de Higiene Veterinária e Saúde Pública, pela boa convivência, principalmente Fernando, Dri, Parda, seu Robert, dona Rita, Cel.

Aos residentes e ex-residentes da MI, amigos queridos que tive o prazer de conhecer e de aprender muito Érika, Camila, Bigoleta, Chups, Uro, Gralha, André, Michael, Rodo, Mini.

Aos estagiários, que estavam sempre de prontidão para ajudar no que fosse preciso, Guilherme, Claudia, Priscila.

Aos mestrandos e doutorandos, que compartilharam das mesmas angústias e das mesmas alegrias que eu, Karen Caffaro, Laura Carolina, Rafaela Risseti, Ana Carolina, Amanda Bonalume, Noelle, Carol Lechinski, Carmen, Dani, Marília, Mariana Janini, Natalia, Fabiana.

A todos cães que involuntariamente contribuíram para a realização desse projeto.

Ao programa de pós-graduação da FMVZ pelo suporte.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da Bolsa de Mestrado.

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Porcentagem de machos e fêmeas entre os 16 cães com erliquiose crônica, Botucatu 2015.-----	24
Tabela 2. Média das idades dos 16 cães em anos. Botucatu, 2015-----	24
Tabela 3. Distribuição das raças nos 16 cães. Botucatu, 2015-----	24
Tabela 4. Total de amostras, valores máximo e mínimo, valores de referência mínimo e máximo para a espécie, média e desvio padrão (D.P.) de parâmetros bioquímicos séricos avaliados em cães com erliquiose na fase crônica, Botucatu, 2015. -----	25
Tabela 5. Distribuição das alterações glomerulares por histopatologia de cães com erliquiose crônica. Botucatu,2015-----	26
Tabela 6. Alterações tubulares e intersticiais por histopatologia dos rins de cães com erliquiose crônica. Botucatu 2015-----	31
Tabela 7. Caracterização do infiltrado inflamatório quanto a distribuição, localização e o tipo celular através da histopatologia dos rins de cães com erliquiose crônica. Botucatu 2015-----	32
Tabela 8. Coeficientes de correlação não paramétrica de Spearman (r) e valores de significância (p) entre parâmetros bioquímicos e histopatológicos do rim de cães com erliquiose crônica, Botucatu, 2015---	37
Tabela 9. Alterações histopatológicas ocorridas em baço de cães com erliquiose crônica. Botucatu 2015-----	38
Tabela 10. Coeficientes de correlação não paramétrica de Spearman (r) e valores de significância (p) entre parâmetros bioquímicos e histopatológicos do baço de cães com erliquiose crônica, Botucatu, 2015.	39

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Distribuição das alterações morfológicas glomerulares apresentadas nos cães com erliquiose crônica. Botucatu, 2015.. -----	27
Figura 2. Classificação das glomerulonefrites encontradas nos rins de cães com erliquiose crônica, Botucatu, 2015. -----	28
Figura 3. Fotomicrografia de rim canino com glomerulonefrite mesangial. Há proliferação de células mesangiais (seta). HxE, 20X. -----	29
Figura 4. Fotomicrografia de rim canino com glomerulonefrite mesangial. Há acúmulo de matriz mesangial difusa (setas). PAMS, 40X. -----	29
Figura 5. Fotomicrografia de rim canino com glomerulonefrite membranosa. Nota-se espessamento difuso da membrana basal dos capilares glomerulares (setas). PAMS, 40x. -----	30
Figura 6. Fotomicrografia de rim canino com glomerulonefrite crônica. Nota-se fibrose difusa dos glomérulos (setas) e tireoidização (cabeça de seta). Tricrômio de Masson, 20x. -----	30
Figura 7. Distribuição das alterações morfológicas tubulares e intersticiais dos rins de cães com erliquiose crônica. Botucatu, 2015. -----	31
Figura 8. Caracterização do infiltrado inflamatório quanto a distribuição, localização e o tipo celular através da histopatologia dos rins de cães com erliquiose crônica. Botucatu 2015. -----	33
Figura 9. Fotomicrografia de rim canino mostrando infiltração periglomerular de plasmócitos (setas). Verde Metil Pironina, 40X. -----	34
Figura 10. Fotomicrografia de baço canino mostrando folículo linfóide (*) e infiltrado de plasmócitos ao redor da trabécula (seta). HxE, 10X. -----	35

Figura 11. Fotomicrografia de baço canino mostrando folículo linfóide (*) e infiltrado de plasmócitos ao redor da trabécula (seta). VMP, 10X. --	35
Figura 12. Fotomicrografia de baço canino mostrando infiltrado de plasmócitos ao redor de artéria (setas). HxE, 40X. -----	36
Figura 13. Fotomicrografia de baço canino mostrando infiltrado de plasmócitos ao redor de artéria (setas). VMP, 40X. -----	36
Figura 14. Alterações histopatológicas encontradas em baço de cães com erliquiose crônica. Botucatu, 2015. -----	37

LISTA DE SIGLAS

- ALT – Alanina aminotransferase
- CME – Canine monocytic ehrlichiosis
- EMC – Erliquiose monocítica canina
- FA – Fosfatase alcalina
- GNC – Glomerulonefrite crônica
- GNM – Glomerulonefrite membranosa
- GNMP – Glomerulonefrite membranoproliferativa
- GNMS – Glomerulonefrite mesangioproliferativa
- HE – Hematoxilina e eosina
- IgG – Imunoglobulina
- IRA – Insuficiência renal aguda
- IRC – Insuficiência renal crônica
- ON – Óxido nítrico
- PAF – Fator ativador de plaqueta
- PAMS – Ácido periódico/prata-metanamina de Gomori
- PAS – Ácido periódico de Schiff
- TM – Tricrômio de Masson
- TX – Tromboxanos
- VMP – Verde metil pironina

SUMÁRIO

	Página
RESUMO -----	1
ABSTRACT -----	2
INTRODUÇÃO -----	3
2. REVISÃO DE LITERATURA -----	6
3. OBJETIVOS -----	16
3.1 Gerais -----	17
3.2 Específicos -----	17
4. MATERIAL E MÉTODOS -----	18
4.1 – Instituições envolvidas -----	19
4.2 – Animais -----	19
4.3 – Técnicas de biologia molecular -----	20
4.3.1 – Extração de DNA -----	20
4.3.2 – Reação de PCR -----	21
4.4 – Colheita de amostras -----	21
4.4.1 – Processamento das amostras -----	21
4.5 – Análise quantitativa e qualitativa dos rins e do baço -----	22
4.6 – Análise estatística -----	22
5. RESULTADOS -----	23
5.1 – Dados clínicos -----	24
5.2 -- Análise dos parâmetros bioquímicos -----	25
5.3 – Análise histopatológica do rim -----	25
5.3.1 – Alterações glomerulares -----	26
5.3.2 – Glomerulonefrites -----	27

5.3.3 – Alterações tubulares e intersticiais -----	28
5.3.4 – Infiltrado inflamatório -----	32
5.4 – Análise histopatológica do baço -----	33
5.5 – Análise estatística -----	38
6. DISCUSSÃO -----	40
6.1 – Bioquímica sérica -----	40
6.2 – Histopatologia renal -----	41
6.3 – Histopatologia do baço -----	43
7. CONCLUSÃO -----	44
8. ANEXOS -----	45
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	47
10. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO -----	59

KIKUCHI, E.S.C. **Glomerulopatias secundárias à ehrlichiose monocítica canina crônica**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2015.

RESUMO

A ehrlichiose monocítica canina (EMC), é doença infecciosa de alta incidência na clínica veterinária, causada por *Ehrlichia canis*, bactéria gram-negativa intracelular obrigatória e transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. O trabalho teve como objetivo avaliar as lesões histopatológicas em rins e baço causadas pela EMC, assim como os parâmetros da bioquímica sérica, ureia, creatinina, albumina e globulina. Para tanto, 16 cães apresentaram valores médios de ureia (90,18mg/dl) e creatinina (1,62mg/dl) acima dos valores de referência normal para cães; a albumina apresentou valores abaixo do normal com média de 2,01g/dl, enquanto a globulina permaneceu dentro da média com 3,58g/dl. A análise histopatológica constituiu na avaliação da região cortical e medular dos rins e do parênquima esplênico. As alterações morfológicas mais prevalentes foram o espessamento da membrana basal, formação de sinéquias, degeneração e necrose tubular. Quanto às glomerulonefrites a que apresentou maior ocorrência foi a do tipo mesangial em 62,5% (10/16) dos cães. Quanto às alterações esplênicas 43,7% (7/16) dos cães desenvolveram hipoplasia dos folículos linfóides, e 87,5% destes (14/16) apresentaram acúmulo de plasmócitos no parênquima. A análise estatística de correlação entre as variáveis, evidenciou correlação positiva entre a concentração de ureia e hiperplasia de células epiteliais glomerulares, e correlação positiva entre a creatinina e hiperplasia de células mesangiais e dilatação tubular; e entre a concentração de globulina e o infiltrado de plasmócitos. Correlação negativa foi observada para albumina e infiltrado plasmocitário. Em baço, hipertrofia de folículos linfóides e ureia tiveram correlação positiva, enquanto albumina e infiltrado plasmocitário apresentaram correlação negativa. Houve predomínio de glomerulonefrite mesangial, e o infiltrado plasmocitário parece ter papel crucial na imunopatologia das lesões.

Palavras-chave: cão, erliquiose crônica, rim, baço, histopatologia, bioquímica sérica.

KIKUCHI, E.S.C. **Glomerulopathies secondary to the chronic canine monocytic ehrlichiosis.** Thesis (MS). Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2015.

ABSTRACT

Canine monocytic ehrlichiosis (CME), is an infectious disease of high incidence in clinical routine, caused by *Ehrlichia canis*, an obligate intracellular gram-negative bacterium and transmitted by the tick *Rhipicephalus sanguineus*. This work aimed to evaluate the histopathological lesions in kidneys and spleen caused by CME, as well as the parameters of serum biochemistry urea, creatinine, albumin and globulin. To this end, 16 dogs showed mean values of urea (90,18mg / dl) and creatinine (1,62mg / dl) were above the normal reference values for dogs; albumin showed values below normal averaging 2.01g / dl, while globulin remained within the average with 3,58g / dl. The histopathological analysis consisted of the evaluation of cortical and medullary region of the kidney and splenic parenchyma. The most prevalent morphological changes were the thickening of the basement membrane, synechia formation, tubular degeneration and necrosis. As for glomerulonephritis the one that presented the highest occurrence was the mesangial type in 62.5% (10/16) of dogs. As for the splenic changes 43.7% (7/16) of the dogs developed hypoplasia of lymphoid follicles, and 87.5% of them (14/16) had plasma accumulation in the parenchyma. The statistical analysis of correlation between the variables, showed positive correlation between the urea concentration and hyperplasia of the glomerular epithelial cells, and also a positive correlation between creatinine and hyperplasia of mesangial cells and tubular dilation; and between the concentration of globulin and infiltrate of plasma cells. Negative correlation was observed for albumin and plasma cell infiltration. In spleen, enlarged lymphoid follicles and urea had positive correlation, whereas albumin and plasma cell infiltrates showed a negative correlation. There was a predominance of mesangial glomerulonephritis, and the plasma cell infiltrate probably plays an essential role in the immunopathology of injuries.

Keywords: dog, chronical ehrlichiosis, kidney, spleen, histopathology, serum biochemistry.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A erliquiose canina, mais comumente denominada erliquiose monocítica canina (EMC), doença infecciosa causada por bactéria gram-negativa intracelular obrigatória de monócitos, *Ehrlichia canis*. Pertence a família Anaplasmataceae, na qual o gênero *Ehrlichia* foi incluído a partir de 2001, havendo sido retirado da família Rickettsiaceae (GREENE, 2012).

É uma doença que possui distribuição mundial e necessita de vetores para ser transmitida, sendo o carrapato marrom, *Rhipicephalus sanguineus*, o mais comum (TAYLOR, 2007; GREENE, 2012). A infecção do cão sadio clinicamente, se dá no momento do repasto sanguíneo do carrapato infectado (DAVOUST, 1993).

Após a penetração no hospedeiro canino, a primeira replicação da *E. canis* ocorre nas células mononucleares e nos linfócitos. Os corpúsculos iniciais infectantes penetram na parede celular através de endocitose e, uma vez dentro da célula hospedeira, inibem a formação do fagolisossomo, e se multiplicam no interior do fagócito. A princípio, no interior de monócitos e neutrófilos são observados corpúsculos elementares iniciais com 0,5 a 1µm, que depois se multiplicam por divisão binária formando uma inclusão que recebe o nome de mórula, e que mede 1 a 2 micras de diâmetro. Quando maduras, as mórulas se dissociam em novos corpúsculos elementares infectantes, que deixam as células por exocitose ou por lise das mesmas, parasitando então novas células (MENDONÇA et al., 2005; PEREIRA, 2006; CHAVES; LEITE; NAVECA, 2007).

A doença é dividida em três fases: aguda, subclínica e crônica. Na fase aguda, que dura cerca de 2 a 4 semanas, o animal apresenta febre, anorexia, depressão, linfadenopatia e o hemograma mostra trombocitopenia (HUXSOLL, 1970; JAIN, 1993; NAKAGHI et al., 2008).

Durante a fase subclínica, não são observados sinais clínicos evidentes, podendo ocorrer apenas alterações laboratoriais hematológicas (NELSON E COUTO, 2010).

Por outro lado, na fase crônica ocorrem: monocitose, linfocitose, com linfócitos podendo conter grânulos azurofílicos, trombocitopenia, anemia não regenerativa, hiperglobulinemia, hipoplasia da medula óssea, hipoalbuminemia

(pela perda glomerular), proteinúria e azotemia. Ainda em muitos casos ocorre aumento da atividade da alanina aminotransferase (ALT) e da fosfatase alcalina (FA). Se houver supressão da medula óssea, ocorre pancitopenia. Outras alterações que podem ser encontradas são aumento no tempo de sangramento em razão da trombocitopenia ou má função plaquetária, hematúria e gamopatia monoclonal (ALMOSNY, 2002; THRALL, 2007; NELSON E COUTO, 2010; GREENE, 2012).

A doença acomete entre 20 e 30% dos cães atendidos em hospitais e clínicas veterinárias no Brasil, podendo variar de 1,7% a 43%, dependendo da região de estudo (LABARTHE, 2003; BULLA, 2004; CARLOS, 2007).

A infecção por *E.canis* gera grande aumento da produção de imunoglobulinas, podendo ocorrer também a produção de anticorpos contra as plaquetas ou, então, a deposição de imunocomplexos em órgãos, como rins e articulações (GREENE, 2012; ISOLA 2012).

Para o diagnóstico preciso é necessário que se associe o histórico dos animais, os sinais clínicos e os exames hematológicos aos testes sorológicos ou moleculares (AGUIAR, 2006; NAKAGHI, 2008; ISOLA, 2012). Não é frequente encontrar mórulas intracitoplasmáticas em monócitos mas, na fase aguda da doença é quando estas estruturas podem ser visualizadas com facilidade, principalmente em esfregaço de sangue periférico. (ALMOSNY, 2002).

Em cães infectados por *E. canis* e que desenvolvem doença renal crônica é observado alta incidência de nefrite intersticial (CASTRO et al., 2004 e ALBERNAZ et al., 2007). O aumento sérico de globulina, principalmente da fração gama, induz hiperviscosidade sérica, trombocitopenia, além de causar danos ao endotélio vascular e veno-estase (GOULD et al. 2000).

Estudos relacionados as lesões histopatológicas dos órgãos de cães na fase crônica da EMC são escassos. Em razão disso, a pesquisa objetivou avaliar as lesões em rins e baço, para compreender essa enfermidade comum em razão da dispersão de carrapatos pelo Brasil, e alta letalidade em casos crônicos.

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

A EMC é uma doença infecciosa de distribuição mundial. Foi relatada pela primeira vez por Donatien e Lestorquard, no Instituto Pasteur na Argélia, em 1935. Ao observar esfregaços sanguíneos de cães febris e infestados por *Rhipicephalus sanguineus*, notaram a presença de pequenos organismos semelhantes à rickettsias no interior de monócitos, que foram chamados *Rickettsia canis*. No ano de 1945, em homenagem ao famoso bacteriologista alemão, Paul Ehrlich, Moshkovshi renomeou o organismo como *Ehrlichia canis*.

A EMC foi reconhecida nos EUA em 1962 (LITTLE, 2010) e alcançou importante significado durante a guerra do Vietnã (1968-1975), sendo responsável pela morte de centenas de cães do exército americano (RIKIHISA et al., 1992). No Brasil foi relatada pela primeira vez em Belo Horizonte-MG, por Costa et al., (em 1973), e o segundo relato em Jaboticabal-SP, por Maregati, em 1978 (KAVINSKI et al., 1988). Casos de erliquiose têm ocorrido em todo o mundo, nos meses mais quentes do ano favoráveis ao desenvolvimento do carrapato. Porém, nas zonas tropical e subtropical casos podem ser diagnosticados o ano inteiro (BIRCHARD E SHERDING, 2003).

O gênero *Ehrlichia* atualmente compreende cinco espécies válidas: *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* e *E. ruminantium*. Pertence à ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae, são bactérias Gram negativas pequenas, intracelulares obrigatórias, apresentam forma cocóide ou pleomórficas e podem infectar animais e humanos (HARRUS, 2002; DUMLER et al., 2001).

O vetor biológico da *E. canis* é o carrapato *R. sanguineus*, que se infecta ao ingerir sangue com leucócitos parasitados durante o repasto, no carrapato o agente multiplica-se nos hemócitos e na glândula salivar, ocorrendo somente transmissão transestadial. O carrapato adulto pode transmitir *E. canis* até por 155 dias após ter sido infectado. O ciclo biológico de *E. canis* no cão após penetrar nas células do sistema monócito macrofágico, ocorre o período de incubação que dura de 8 a 20 dias, onde a proliferação bacteriana no hospedeiro inicia-se com aderência dos corpúsculos elementares na membrana plasmática da célula e invaginação da mesma (RIKIHISA, 1991).

Alguns mecanismos de evasão do sistema imune pelas erliquias foram documentadas por McBride e Walker (2011) e Liu et al (2012) como a inibição da formação de fagolisossomo via fusão lisossomal, inibição da apoptose das células hospedeiras e recombinação de genes de proteína da membrana externa (resultando em variação antigênica).

A fusão fagolisossomal não ocorre em células infectadas, devido a ação de uma proteína (gp200) da *E. canis*, permitindo os corpúsculos elementares crescerem e se dividirem dentro dos limites do fagossomo, onde a multiplicação acontece por divisão binária, formando inclusões intracelulares denominadas mórulas (RIKIHISA, 1991; HARRUS et al., 1998, STITCH et al., 2008).

As mórulas são constituídas por vacúolos citoplasmáticos delimitados por uma membrana simples que contém em seu interior microcolônias de pequenos corpos elementares em números e tamanhos variados (YU et al., 2007). Muitas mórulas podem coexistir em um monócito e após três ou quatro dias são liberadas por exocitose e o ciclo infeccioso pelos corpúsculos é repetido (NYINDO et al., 1971; DAVOUST, 1993).

Diferenças nas estruturas genéticas das mórulas permitem sua diferenciação em genogrupos. As erliquias pertencentes ao genogrupo *E. canis* (*E. canis*, *E. chaffeensis* e *E. ruminantium*), possuem homologia de DNA de 98,2% (DUMLER et al., 2001).

SANCHEZ et al (2012) aponta em seu estudo duas opções para sobrevivência do agente infeccioso: uma seria o agente necrosar o tecido e obter mais rápido os nutrientes para sua propagação, enfrentando depois a reação do hospedeiro, e outra seria lesionar menos as células do hospedeiro, causando apoptose e não necrose, obtendo assim nutrientes mais lentamente, diminuindo as reações do hospedeiro e escapando da resposta inflamatória. Desse modo, se a inflamação for ativada adequadamente, eliminaria ou dificultaria a colonização por essa bactéria, confirmando que o agente etiológico mais bem sucedido é aquele que, apesar de patogênico, consegue o que necessita para sua sobrevivência num ambiente de tolerância, sem induzir uma reação no hospedeiro que prejudicaria sua persistência.

Em recente estudo por marcação citoquímica foi observado que as erlíquias são capazes de inibir a fusão lisossomal aos endossomos, como um mecanismo de evasão imunológica, mostrando que a evasão da fusão lisossomal por inclusões erlíquiais é fundamental para a sobrevivência e reprodução do patógeno, apesar de ser baseado em diferentes estratégias de acordo com as espécies de *Ehrlichia spp.* (ALVES et al, 2013). Porém, os mecanismos que levam ao estabelecimento e manutenção das mórulas erlíquiais dentro das células hospedeiras, e pelos os quais as erlíquias infectam diferentes tipos celulares, são diversos e ainda permanecem pouco conhecidos (TENG et al., 2003).

Após o período de incubação, a doença segue três fases: aguda, subclínica e crônica. A fase aguda pode durar de uma a quatro semanas e os sinais clínicos presentes são febre, anorexia, depressão, linfadenopatia, trombocitopenia (HUXSOLL, 1970; JAIN, 1993; NAKAGHI et al.,2008). É nessa fase que a identificação de mórulas do parasita em leucócitos é realizada com sucesso nos esfregaços sanguíneos (FELDMAN, 2000; ORIÁ, 2001; NAKAGHI et al., 2008). Se tratados adequadamente, os animais podem se recuperar, ou entrar na fase subclínica e carrear a bactéria por meses ou até anos. Na fase subclínica são observados altos títulos de anticorpos (HARRUS, 1998), podendo perdurar anos sem sintomatologia clínica (DAVOUST, 1993).

Alguns estudos com infecção experimental indicam que o baço é o órgão mais provável de abrigar *E. canis* durante a fase subclínica e também o último órgão que a bactéria se encontra antes de ser eliminada. Assim, cães esplenectomizados e infectados experimentalmente, mostraram sinais mais leves da doença se comparados com cães não esplenectomizados (HARRUS et al., 1997; GREENE, 2012).

A EMC causa diversos sinais sistêmicos, em qualquer fase da doença. Os sinais mais comuns incluem depressão, letargia, anorexia, perda de peso e hemorragias. Na pele, em geral aparecem petéquias ou equimoses (ou ambas), e epistaxe é frequentemente relatada. O exame físico revela linfadenomegalia e esplenomegalia em 20% e 25% dos cães, respectivamente. A trombocitopenia é o achado hematológico mais comum em cães infectados por *E. canis*, em todas as fases da doença (GREENE, 2012).

Na fase crônica o quadro é mais grave, com ocorrência de pancitopenia, glomerulonefrite, insuficiência renal, pneumonia intersticial, uveíte anterior e meningite associada com ataxia cerebelar, depressão, paresia, hiperestesia, além de anorexia, perda de peso, hemorragias e aumento da suscetibilidade às infecções secundárias devido ao comprometimento imunológico (COUTO, 1998; ANDEREG; PASSOS, 1999; BREITSCHWERDT, 2004; STITCH et al., 2008). Essa fase resulta em anemia aplásica, uma vez que assume características de doença imunomediada, sendo a principal consequência a ocorrência de hipoplasia da medula óssea (MENDONÇA et al., 2005).

Dentre a variedade de achados clínicos, a insuficiência renal aguda (IRA) se caracteriza pelo aparecimento súbito de insuficiência hemodinâmica, da filtração e da excreção pelos rins, com o subsequente acúmulo de toxinas metabólicas (urêmicas) e falta de regulação do equilíbrio hídrico, eletrolítico e ácido-básico (COWGILL e ELLIOT, 2004).

A uremia é caracterizada pelas manifestações clínicas decorrente do acúmulo de metabólitos urêmicos no sangue (ureia, creatinina e outras substâncias nitrogenadas não proteicas). Assim, na fisiopatologia da IRA, a "necrose tubular aguda" (ou nefrose), resultante da lesão isquêmica ou tóxica dos rins desencadeia a uremia aguda. Nesses pacientes o exame histopatológico revela focos degenerativos dos túbulos renais distribuídos por todo o rim, com infiltrado inflamatório intersticial mínimo. Com a insuficiência excretora instalada, ocorre um rápido e progressivo aumento no nitrogênio da ureia sanguínea e na creatinina sérica (POLZIN e OSBORNE, 2004).

Em contraste com a insuficiência renal crônica, a IRA é potencialmente reversível, se diagnosticada precocemente (COWGILL e ELLIOT, 2004). A insuficiência renal crônica (IRC) segundo Polzin e Osborne (2004), é definida como insuficiência renal primária que persistiu por um período prolongado, e que independente da causa da perda do néfron é caracterizada por lesões estruturais renais irreversíveis. Na maioria dos casos a uremia, síndrome clínica, que aparece quando há o acúmulo de substâncias normalmente removidas por rins saudáveis, é o estado clínico para o qual as doenças renais convergem.

Os achados mais frequentes em bioquímica sérica na fase crônica da enfermidade incluem hiperproteinemia, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, aumento da ALT e da FA. A hiperproteinemia resulta de níveis elevados de globulinas. Porém, não existe relação direta entre os níveis de globulina sérica e os níveis de anticorpos para *E. canis* (GREENE, 2012).

Hipergamaglobulinemia ocorre devido ao desenvolvimento de uma gamopatia policlonal, caracterizada por aumento da concentração de todas as imunoglobulinas, devido à atividade excessiva de diversos clones de plasmócitos, contudo pode ocorrer também gamopatia monoclonal (TIZARD, 2014). Cães que apresentam gamopatia monoclonal podem desenvolver hiperviscosidade associada a sinais clínicos e lesões patológicas (hemorragia subretinal e deslocamento de retina levando a cegueira aguda) (GREENE, 2012).

A hipoalbuminemia encontrada atribui-se a anorexia, perda periférica de albumina resultante do aumento da permeabilidade vascular, vasculites, perda sanguínea, glomerulopatias imunomediadas e ao decréscimo da síntese proteica devido a hepatopatias concomitantes (HARRUS et al., 1996; SOUSA et al, 2010).

Codner et al. (1992), relata que alguns animais infectados por *E. canis* podem desenvolver glomerulopatias relacionadas a deposição de imunocomplexos.

A presença de lesão por imunocomplexos nos glomérulos estimula células como os neutrófilos, células mesangiais, macrófagos e plaquetas a liberarem tromboxanos (TX), óxido nítrico (ON) e fator ativador de plaquetas (PAF). Tais substâncias aumentam a permeabilidade da membrana basal a macromoléculas; como resultado as proteínas plasmáticas, especialmente a albumina, são perdidas na urina e essa perda intensa excede a capacidade do organismo em sintetizar a proteína. Como resultado, a concentração de albumina diminui, conseqüentemente cai a pressão oncótica plasmática acarretando diminuição do volume sanguíneo e queda do fluxo renal. Ao passo que avança a doença renal, diminui a taxa da filtração glomerular ocasionando elevação da ureia e da creatinina sérica, uma vez que a creatinina não é

metabolizada e é excretada quase que inteiramente pela filtração glomerular (TIZARD, 2014).

Os imunocomplexos são formados pela combinação de anticorpos com os antígenos, que ativam o sistema complemento gerando peptídeos quimiotáticos que atraem os neutrófilos, estes podem então liberar substâncias oxidantes e enzimas, causando destruição tecidual e inflamação aguda. Quando os imunocomplexos são depositados nos glomérulos, causam espessamento da membrana basal e estimulam a proliferação das células glomerulares (células epiteliais, células endoteliais e células mesangiais (TIZARD, 2014).

Segundo Jones et al (2000) as glomerulonefrites são classificadas em: glomerulonefrite membranosa, glomerulonefrite membranoproliferativa (mesangiocapilar e mesangial/mesangioproliferativa) e glomerulonefrite crônica

A membranosa é caracterizada pelo espessamento, divisão e reduplicação da membrana basal dos capilares glomerulares associado à perda dos processos podálicos dos podócitos. Esse espessamento da membrana basal torna-se intenso a ponto de ser visualizado no microscópio óptico com auxílio de colorações especiais como o PAS (ácido periódico de Schiff) e por impregnação pela prata. Ainda podem ser observados na microscopia, depósitos densos de imunocomplexos no lado epitelial da membrana basal glomerular. Se a doença prolongar, notar-se-á um glomérulo aumentado e hiper celular, podendo distender a cápsula de Bowman, porém, raramente o espaço glomerular está obliterado. Não são comuns a formação de crescentes epiteliais e as sinéquias nesse tipo de glomerulonefrite (JONES et al, 2000; JUBB et al, 2006).

A Glomerulonefrite Membranoproliferativa é representada por uma combinação de lesões, como aumento significativo nas células mesangiais e na substância da membrana basal mesangial, membranas basais espessadas e frequentemente divisões das membranas basais. O distúrbio foi dividido em dois padrões de deposição de imunoglobulina, em um estão presentes depósitos de imunoglobulinas no lado subendotelial da membrana basal e no mesângio, e no outro padrão um depósito com pouca imunoglobulina, mas quantidades significativas de complemento no interior da membrana basal, se o componente proliferativo é principalmente mesangial, aplica-se a denominação

glomerulonefrite mesangial/mesangioproliferativa (JONES et al, 2000). Tizard (2014) relata que quando as três populações celulares proliferarem, esta é denominada de glomerulonefrite membranoproliferativa (GNMP); contudo se os imunocomplexos forem depositados somente no mesângio, a proliferação das células mesangiais ocorrerá e esta deve ser denominada de glomerulonefrite mesangial/mesangioproliferativa.

Glomerulonefrite crônica (glomeruloesclerose) é caracterizada por proliferação no número das células (endoteliais, mesangiais e epiteliais) no glomérulo, desorganização e oclusão dos lumens dos capilares glomerulares. As células epiteliais proliferativas podem acumular-se ao longo da camada parietal da cápsula de Bowman, formando as chamadas “crescentes epiteliais”. Podem ocorrer aderências do glomérulo à cápsula de Bowman, e o espaço de Bowman frequentemente está obliterado. O lúmen dos capilares está ocluído na maioria das vezes. Nos estágios avançados, todo glomérulo fica substituído por tecido conjuntivo hialino. A irrigação sanguínea diminui, levando ao quadro de isquemia, degeneração e necrose; que por sua vez resulta em grave fibrose do interstício, e muitos túbulos atrofiam. Essa lesão parece ser o estágio avançado de uma ou mais formas de glomerulonefrite, é denominado o estágio final da doença glomerular (JONES et al, 2000; JUBB, 2006).

A vasculite é um achado consistente nos órgãos e tecidos de todos os animais infectados experimentalmente, devido à inflamação generalizada nos vasos, e pode ter papel central na patogênese da EMC, sendo desencadeada por mecanismo imunomediado (VAN DIJK, 1971; SIMPSON, 1974; CASTRO et al 2004).

Como consequência dessa intensa vasculite ocorre ativação da cascata de coagulação desencadeando trombocitopenia de consumo, além de nefrite intersticial, inflamação perivascular no fígado, com presença de degeneração hidrópica, meningoencefalite não supurativa, esplenomegalia e hiperplasia dos cordões medulares (CASTRO et al, 2004).

A trombocitopenia é o achado hematológico mais comum na EMC, aparece em todas as fases da enfermidade, com ocorrência em mais de 90% dos cães infectados. É proposto ainda que a infecção por *E. canis* resulta em produção exacerbada de anticorpos antiplaquetas, que por sua vez seria

uma das maiores causas de trombocitopenia vista na EMC (HARRUS et al, 1996; HARRUS et al, 2004).

Também contribui para a ocorrência de trombocitopenia a presença do fator de inibição da migração plaquetária produzido por linfócitos ativados que são estimulados pela exposição a monócitos infectados, comprometendo a formação de pseudópodes das plaquetas, induzindo-as ao arredondamento, aglutinação e vazamento (HARRUS et al, 1997; KATARZYNA et al, 2011). A concentração do fator inibidor da migração plaquetária é inversamente proporcional a contagem de plaquetas (ABARCA et al, 2007). Níveis mais altos desse fator foram associados a cepas mais virulentas de *E. canis* (HARRUS et al, 1999).

Parmar et al (2013) baseado nos trabalhos de Smith et al (1975), Waner et al (1999) e Waner et al (2008), descreve três hipóteses que explicariam o desenvolvimento da trombocitopenia. A primeira delas sugere que a trombocitopenia por *E. canis* é principalmente devido a destruição plaquetária em grande escala pelo baço que começa poucos dias após a infecção; a segunda hipótese estaria relacionada à hipoplasia da linhagem megacariocítica da medula óssea, e a terceira hipótese seria a formação de altos níveis de imunoglobulinas (IgG) antiplaquetas 17 dias pós infecção. Relata ainda, que a produção excessiva de anticorpos antiplaquetas, em cães infectados por *E. canis* é uma das principais causas da trombocitopenia.

Altos títulos de anticorpos contra *E.canis* não fornecem proteção aos animais expostos pois o papel desses anticorpos na eliminação da bactéria é mínimo (BARNWELL et al, 1999; RISTIC et al, 1993). Além disso, eles ainda podem ter efeito prejudicial na progressão da doença devido as suas consequências imunopatológicas (RISTIC et al, 1993). Entre os mecanismos hiperimunes que podem estar envolvidos na patogênese da EMC, incluem extensa infiltração plasmocitária nos órgãos parenquimatosos e medula óssea; hipergamaglobulinemia policlonal que não corresponde aos altos títulos específicos de anticorpos contra *E.canis*; a indução da produção de anticorpos antiplaquetários após a infecção natural e experimental; e a presença de imunocomplexos circulantes em cães naturalmente e experimentalmente

infectados com *E.canis* (GRINDEM et al, 1999; HARRUS et al, 2001; HARRUS et al, 1999).

Estudo realizado com cães submetidos à esplenectomia demonstrou importante papel desenvolvido pelo baço na patogênese da enfermidade. Houve pequena diminuição no número de plaquetas do grupo esplenectomizado quando comparado com o grupo controle, que desenvolveu severa trombocitopenia. É possível que o baço secrete fatores que induzam a supressão da medula óssea, na fase crônica da doença. Portanto, a ausência desses fatores nos cães esplenectomizados explicaria a doença de forma leve (HARRUS et al, 1998). A remoção do órgão dominante em produção de anticorpos e o seu papel na eliminação de células velhas, infectadas e ou sinalizados pelo sistema imunológico são os principais objetivos alcançados pela esplenectomia (HARRUS et al, 1999).

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Gerais

Avaliar os achados histopatológicos e histoquímicos de rins e de baço de cães com erliquiose crônica, assim como avaliar a correlação com os parâmetros de bioquímica sérica.

3.2 Específicos

- a) Quantificar e descrever as alterações histopatológicas em rins e baço de cães com EMC na fase crônica da enfermidade;
- b) Investigar a correlação entre a concentração de ureia, creatinina, globulina e albumina, com as alterações histopatológicas encontradas;
- c) Investigar as alterações esplênicas que ocorrem na fase crônica da EMC.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Instituições envolvidas

Foram utilizadas as instalações da Disciplina de Enfermidade Infecciosas dos Animais Domésticos, no setor de necropsia para a realização das necropsias e para a retirada dos órgãos.

Para o armazenamento e a realização do PCR foi utilizado o Laboratório de Diagnóstico Molecular no Instituto de Biociências da UNESP-Botucatu do Departamento de Microbiologia e Imunologia.

O processamento do material e a confecção das lâminas histopatológicas foram realizadas no Centro de Diagnóstico Veterinário – CDAPVET- Presidente Prudente – SP.

4.2 Animais

Foram utilizados 16 cães da rotina clínica do Setor de Enfermidades Infecciosas dos Animais Domésticos FMVZ-UNESP/ Botucatu,SP. No estudo foram colhidos fragmentos de rim e de baço para o exame histopatológico, e os exames de bioquímica foram ureia, creatinina, albumina e globulina. Sendo 8 machos e 8 fêmeas. Desses animais, 10 eram sem raça definida, 2 Poodles e 4 de outras raças diferentes; que vieram a óbito por EMC crônica. Os animais apresentaram os sinais clínicos, exames hematológicos e bioquímica sérica compatíveis com a EMC, juntamente com PCR positivo para o diagnóstico, sem predileção por idade, sexo ou raça.

4.3 Técnica de Biologia Molecular

As técnicas de Biologia Molecular foram realizadas no Instituto de Biociências da UNESP-Botucatu do Departamento de Microbiologia e Imunologia.

4.3.1 Extração de DNA

Foi utilizado o Invisorb Spin Tissue Mini Kit.

Foram esmagadas as amostras de tecido em pequenos fragmentos nitrogênio líquido (5 a 40mg de tecido). Diluiu-se com pequena quantidade de H₂O se necessário. Foi transferido para tubo de 1,5 mL. Ajustado o termobloco a 52°C. Identificou-se a quantidade necessária de tubos. Foi pipetado para o tubo 400µL de *Lysis Buffer* e 40 µL de Proteinase K. Passou pelo vortex por 5 a 10 segundos. Incubado no termobloco com agitação até lise completa (aprox.. 20 min) à 52°C.

Foi centrifugado por 2 minutos à 11.000 rpm, transferido o sobrenadante para novo tubo de 1,5 mL e acrescentaou-se 200 µL de *Binding Buffer T* à amostra e passou pelo vortex. Transferida a solução lisada para Spin Filter em tubo de 2,0 mL e incubou-se por 1 min à temperatura ambiente, centrifugou-se por 2 min a 11.000 rpm. Neste meio tempo, foi aquecido o volume necessário de *Elution Buffer* (50 µL/amostra + 50 µL para erros de pipetagem).

Descartou-se o filtrado e foi pipetado sobre o filtro 550 µL de *Wash Buffer* e centrifugado por 1 minuto a 11.000 rpm. Descartou-se o filtrado e repetiu a lavagem anterior. Centrifugou-se por 1min a 11.000 rpm e descartou-se o filtrado, centrifugando por mais 4 minutos em velocidade máxima. Foi transferido o filtro para o tubo de 1,5 mL do kit e adicionado 50µL de *Elution Buffer D* (à 52°C). Incubou-se em temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugado por 1 minuto a 11.000 rpm. Descartou-se o filtro.

4.3.2 Reação de PCR

A reação final de 25 µL contendo, 2,5 µL de amostra, 15,87 µL de água MilliQ estéril, 0,5 µL de dNTP 10mM, 2,5 µL de *Buffer* 10X, 1,5 µL de MgCl₂ 50 mM, 1 µL de primer DSB330 10 mM, 1 µM de primer DSB729 10 µM, 0,13 µL de *Taq Platinum* 5U/ µL. Os reagentes foram descongelados (exceto a *Taq Platinum*) e passou-se rapidamente pelo vortex spin. Não vortexar os primers. Identificados os microtubos de 2002,5 µL de amostra, aliquotou-se 22,5 µL de amostra em cada microtubo previamente identificado e foi mantido em gelo. Foi levado para a sala de aplicação e adicionou-se 2,5 µL de amostra da amostra. Levado ao termociclador, programa EHRLICHI (95°C por 2 minutos; 50 ciclos de: 95°C por 15 segundos, 58°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, 72°C por 5 minutos).

4.4 Colheita das amostras

Após a morte dos animais foi realizada necropsia e foram colhidos fragmentos dos rins e do baço dos cães com erliquiose crônica, acondicionados e armazenados em frascos contendo formalina 10% tamponada, pH 7,0 por 24 a 48 horas, e depois lavados em água corrente por 1 hora. Após isso, os fragmentos dos rins e do baço foram transferidos para uma solução de álcool 70%.

4.4.1 Processamento das amostras

Os fragmentos dos rins e do baço foram processados conforme técnica de rotina histológica para microscopia óptica e inclusão em parafina. Com o auxílio do micrótomo rotativo secções de 2 a 3 µm de espessura foram cortados e posteriormente corados pelos métodos de Hematoxilina e Eosina, Tricrômio de Masson, Verde Metil Pironina e P.A.M.S. (método de ácido periódico/prata-metenamina de Gomori). Todas as colorações seguiram o protocolo de TOLOSA et al. (2003).

4.5 Análise quantitativa e qualitativa dos rins e do baço

A análise histopatológica dos rins foi baseada na observação das alterações glomerulares, tubulares e intersticiais e na caracterização do infiltrado inflamatório, conforme protocolo utilizado por Laufer (1997) e Sanches (2005).

As alterações glomerulares analisadas foram: espessamento difuso da parede glomerular, aumento de matriz mesangial, espessamento de membrana basal, hiperplasia de células endoteliais, hiperplasia de células epiteliais, hiperplasia de células mesangiais, formação de crescentes, sinéquias, esclerose glomerular. As alterações tubulares e intersticiais analisadas incluíram a regeneração do epitélio tubular, degeneração tubular, necrose tubular, fibrose intersticial, atrofia tubular, tireoidização e dilatação tubular.

A análise morfológica do infiltrado inflamatório foi realizada com base na distribuição (focal, multifocal e difuso), quanto à localização (intersticial, periglomerular e peritubular) e quanto ao tipo celular (linfocitário, plasmocitário, linfoplasmocitário e neutrofílico). A análise histopatológica do baço se baseou na observação dos folículos linfóides, se houve atrofia, hipertrofia ou hipoplasia, e no acúmulo de plasmócitos. Todas as alterações renais e esplênicas foram classificadas em escores: leve (+), moderada (++) e acentuada (+++).

4.6 Análise estatística

As estatísticas descritivas relativas aos valores de bioquímica sérica e os resultados dos exames histopatológicos de baço e rim foram sumarizados em tabelas. Para estudar a relação entre parâmetros bioquímicos e resultados das análises histopatológicas do baço e dos rins dos cães estudados recorreu-se a análise de correlação não paramétrica de Spearman, considerada adequada para avaliação de escores. Todas as análises foram conduzidas no software SPSS v.16.0 e com nível de significância de 5%(FIELD, 2012).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Dados clínicos

Dos 16 cães avaliados, 8 eram machos e 8 fêmeas, com idade entre 4 e 145 meses (3 meses e 12 anos), a maioria sem raça definida (tabelas 1, 2 e 3).

Tabela 1. Porcentagem de machos e fêmeas entre os 16 cães com erliquiose crônica, Botucatu 2015.

Sexo	Animais	%
Macho	8	50%
Fêmea	8	50%
Total	16	100%

Tabela 2. Média das idades dos 16 cães em anos. Botucatu, 2015.

Idade	Animais	%
Até 1 ano	7	43,75%
1 à 5 anos	5	31,25%
5 à 10 anos	2	12,5%
10 anos ou mais	2	12,5%
Total	16	100%

Tabela 3. Distribuição das raças nos 16 cães. Botucatu, 2015.

Raça	Animais	%
SRD	10	62,5%
Poodle	2	12,5%
Outros	4	25%
Total	16	100%

5.2 Análise dos parâmetros bioquímicos

Desses 16 cães, 3 não possuíam exames de ureia e creatinina e 5 não possuíam exames de albumina e globulina. Assim as análises histopatológicas de rim e baço foram realizadas nos 16 cães, porém, as análises estatísticas de correlação com a bioquímica sérica só foram possíveis com 11 animais para albumina e globulina, e 13 animais para ureia e creatinina.

A concentração de uréia nos animais variou de 31 a 329 mg/dL, resultando na média de 90,18mg/dL, e a creatinina variou de 0,2 a 12,1 mg/dL, resultando na média de 1,62mg/dL. A azotemia ocorreu em 76,9% (10/13) dos animais, onde 60% destes eram machos. Por outro lado, a concentração de albumina variou de 1,1 a 2,7 g/dl com média de 2,01g/dl e a concentração de globulina variou de 1,1 a 8,9g/dl com média de 3,58g/dl. Valores de bioquímica sérica dos animais demonstradas na tabela 4 e figura 1.

Tabela 4. Total de amostras, valores máximo e mínimo, valores de referência mínimo e máximo para a espécie, média e desvio padrão (D.P.) de parâmetros bioquímicos séricos avaliados em cães com erliquiose na fase crônica, Botucatu, 2015.

Parâmetro	N	Val. Mínimo	Val. Máximo	Val.Ref. Mín.	Val.Ref. Máx.	Média	D.P.
Ureia	13	31	329	21,4	59,92	90,18	76,61
Creatinina	13	0,2	12,1	0,5	1,5	1,62	3,16
Albumina	11	1,1	2,7	2,6	3,3	2,01	0,48
Globulina	11	1,1	8,9	2,7	4,4	3,58	2,10

Fonte: Valores de referência Kaneko (1997), Meyer ; Harvey (2004)

5.3 Análise histopatológica do rim

Quanto à caracterização do processo patológico nos animais com EMC crônica, houve predomínio do espessamento da membrana basal (100%), sinéquias (100%), e degeneração tubular (100%). Quanto ao infiltrado, houve predomínio de infiltrado multifocal (50,0%), sendo ele na maioria das vezes periglomerular (56,2%) e intersticial (56,2%) e do tipo plasmocitário (56,2%).

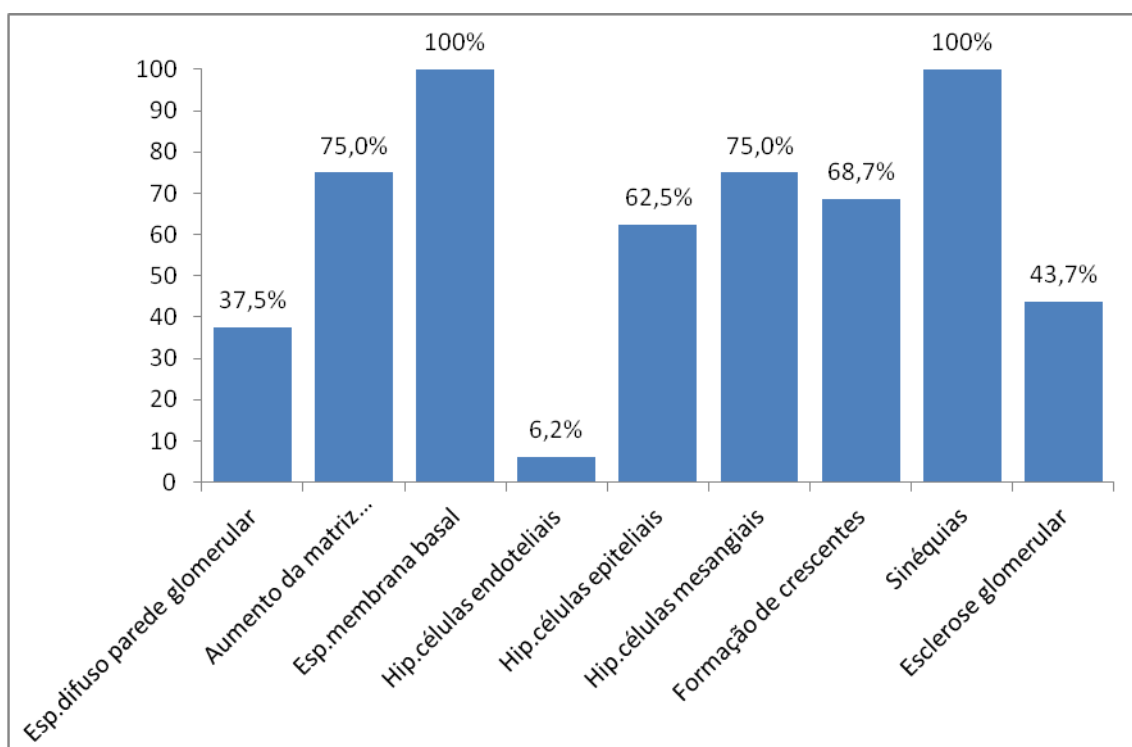
5.3.1 Alterações glomerulares

As alterações glomerulares variaram de leve a acentuada, representando 56,2 e 50,0%, respectivamente. A hiperplasia de células epiteliais e a formação de crescentes e sinéquias foi encontrado em 50% dos animais. Entre as alterações de caráter moderado, o aumento da matriz mesangial e o espessamento da membrana basal ocorreu em 50% e 43,7% dos animais respectivamente. Em 18,8% dos animais foi observado espessamento da membrana basal de caráter acentuado. Os dados das distribuições das alterações glomerulares seguem demonstradas na Tabela 5.

Tabela 5. Distribuição de frequências das alterações glomerulares por histopatologia de cães com erliquiose crônica. Botucatu, 2015.

	LEVE	MODERADA	ACENTUADA
	(+)	(++)	(+++)
Alterações			
Glomerulares			
	(%)	(%)	(%)
Esp. Dif. parede Glom.	0	31,2	6,3
Esp. da membrana basal	37,5	43,7	18,8
Hiperplasia cél. Endot.	6,2	0	0
Hiperplasia cél. Epitel.	56,2	0	6,3
Hiperplasia cél. Mesang.	31,3	31,3	12,4
Formação de crescentes	50,0	6,3	12,4
Sinéquias	50,0	37,5	12,5
Esclerose glomerular	31,1	6,3	6,3

Figura 1- Distribuição das alterações morfológicas glomerulares apresentadas nos cães com erliquiose crônica. Botucatu, 2015.

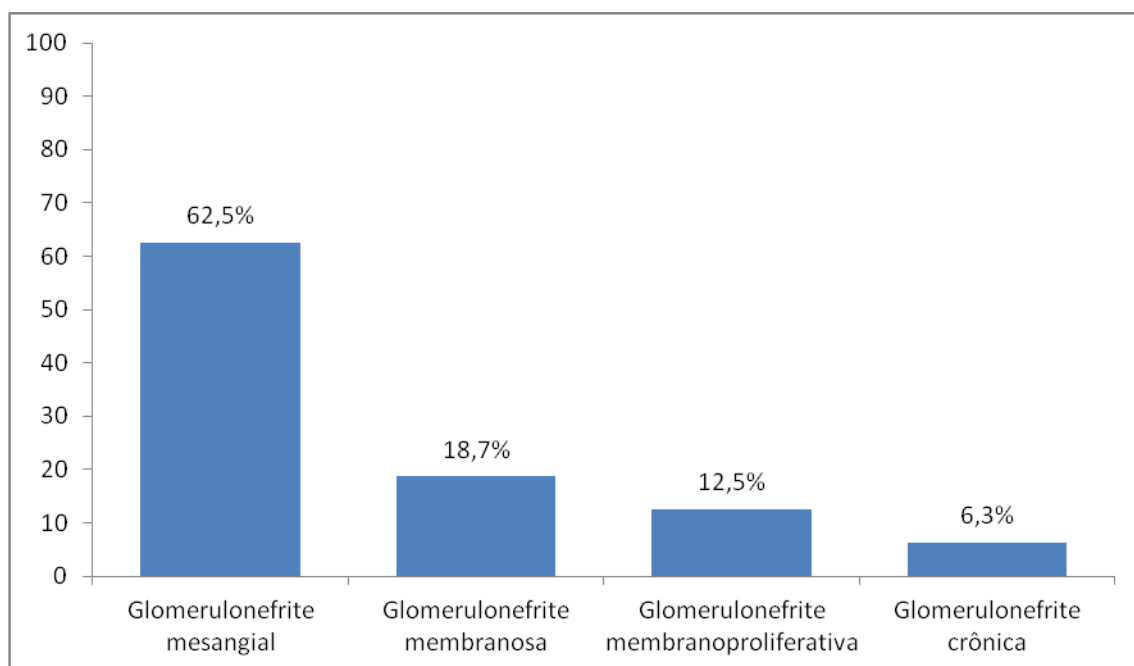


Fonte: elaborado pela autora

5.3.2 Glomerulonefrites

As glomerulonefrites foram caracterizadas em: mesangial, membranosa, membranoproliferativa e crônica. Todos os cães (100%) apresentaram algum tipo de glomerulonefrite, sendo que 62,5% (10/16) foram do tipo mesangial. A distribuição das glomerulonefrites estão listadas figura 3 a 7.

Figura 2- Classificação das glomerulonefrites encontradas nos rins de cães com erliquiose crônica, Botucatu, 2015.



Fonte: elaborado pela autora

5.3.3 Alterações tubulares e intersticiais

A análise das alterações tubulares e intersticiais demonstram que 100% dos animais apresentaram degeneração tubular, independente da gravidade da lesão. Contudo, houve predomínio das alterações de caráter acentuado, com necrose tubular (25%), dilatação tubular (6,2%), tireoidização (6,2%), atrofia tubular (6,2%) e fibrose intersticial (6,2%) representadas na Tabela 6 e figura 8.

Figura 3. Fotomicrografia de rim canino com glomerulonefrite mesangial. Setas indicam proliferação de células mesangiais (seta). HxE, 20X

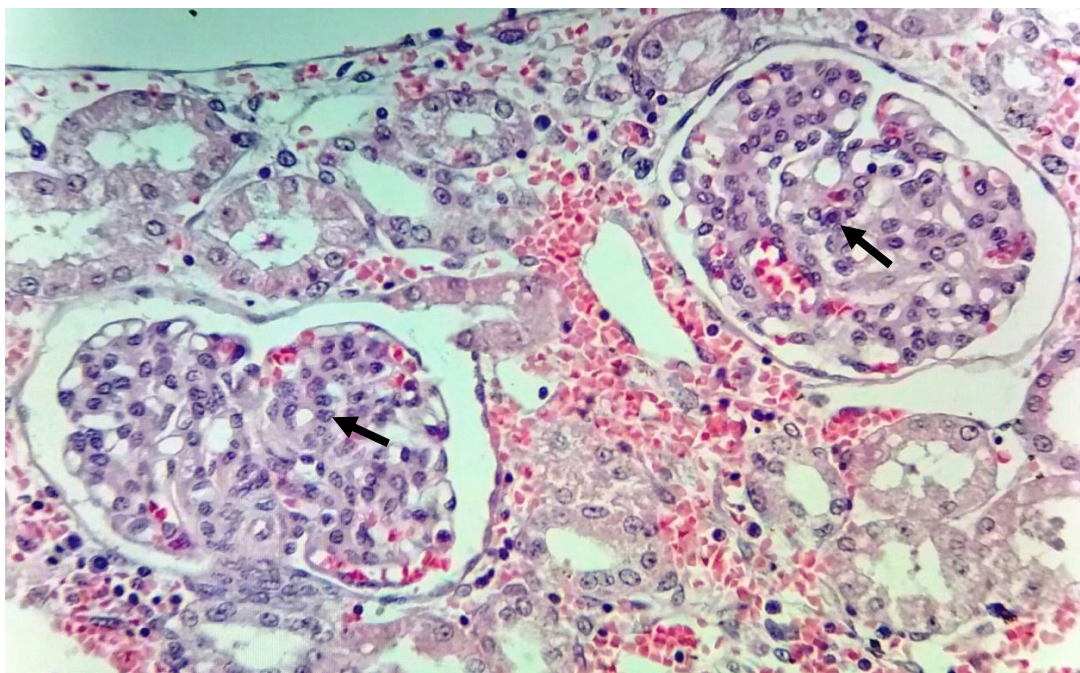


Figura 4. Fotomicrografia de rim canino com glomerulonefrite mesangial. As setas indicam acúmulo de matriz mesangial difusa (setas). PAMS, 40X.

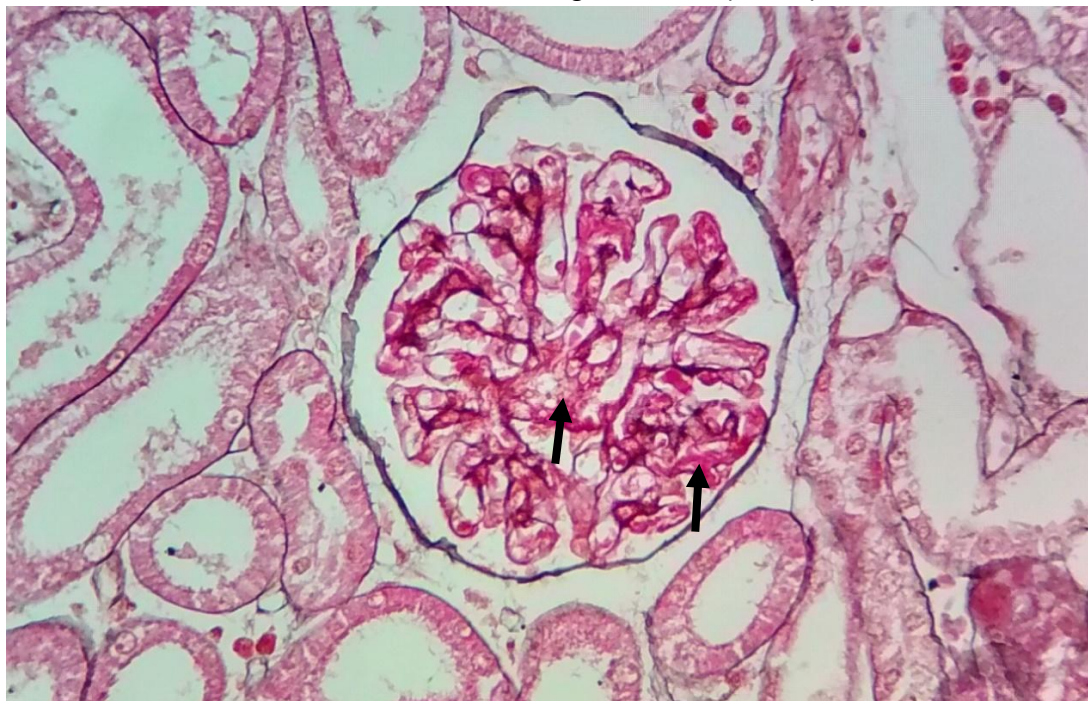


Figura 5. Fotomicrografia de rim canino com glomerulonefrite membranosa. Nota-se espessamento difuso da membrana basal dos capilares glomerulares (setas). PAMS, 40x.

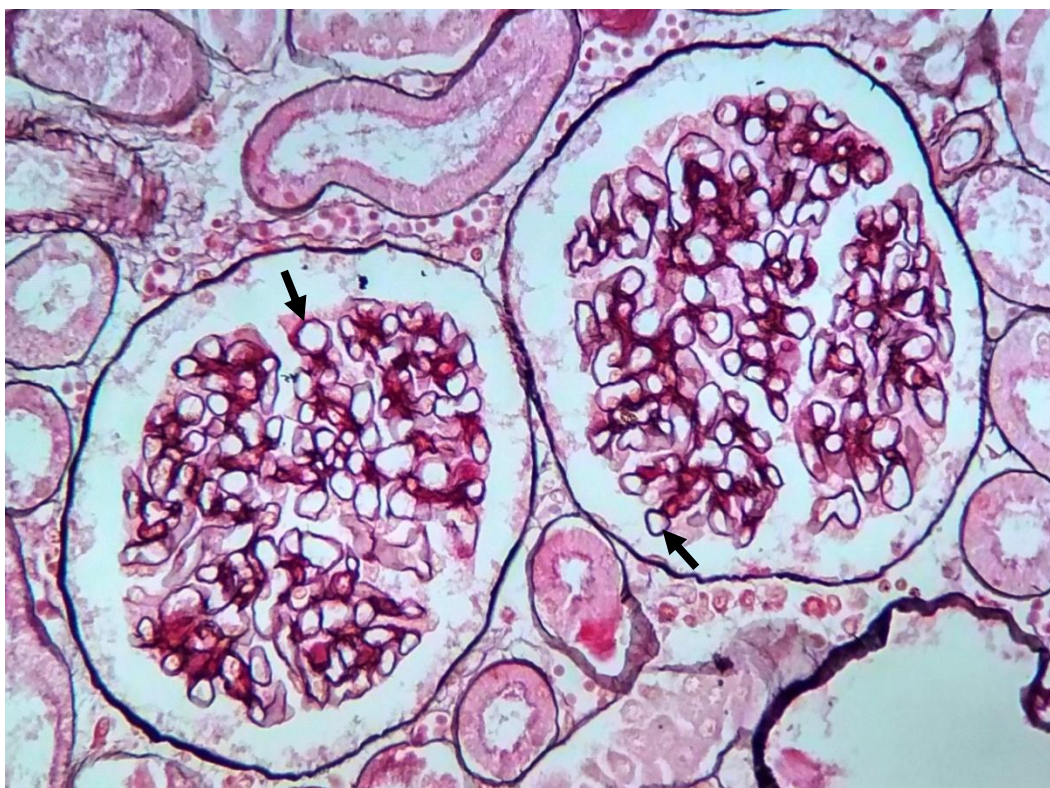


Figura 6. Fotomicrografia de rim canino com glomerulonefrite crônica. Nota-se fibrose difusa dos glomérulos (setas) e tireoidização (cabeça de seta). Tricrômio de Masson, 20x.

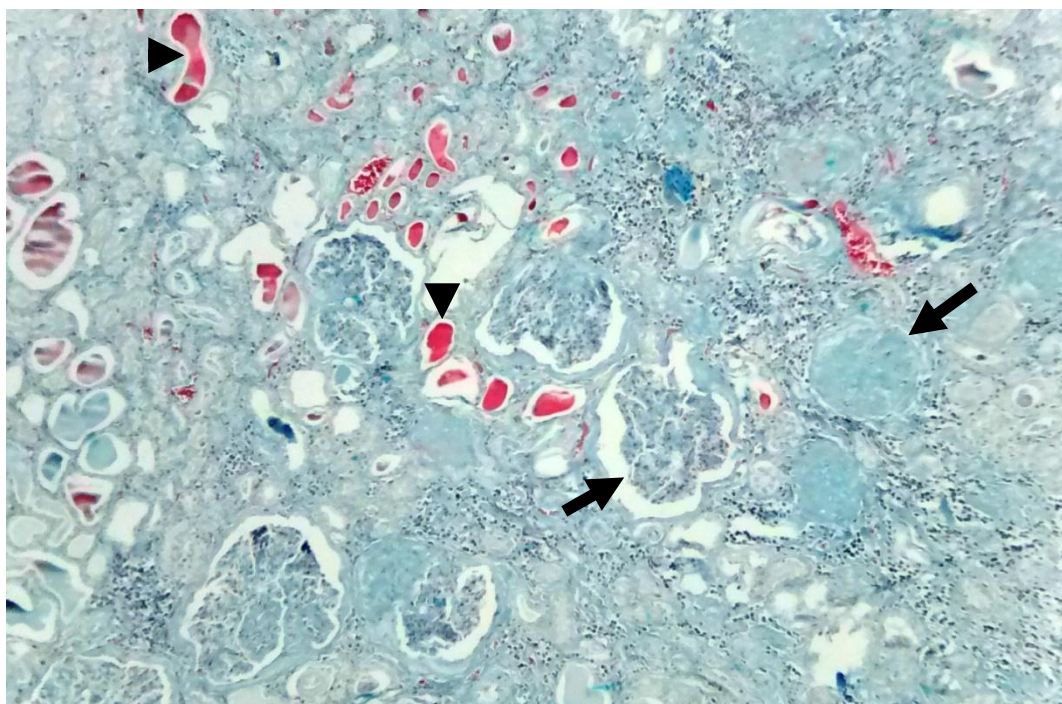
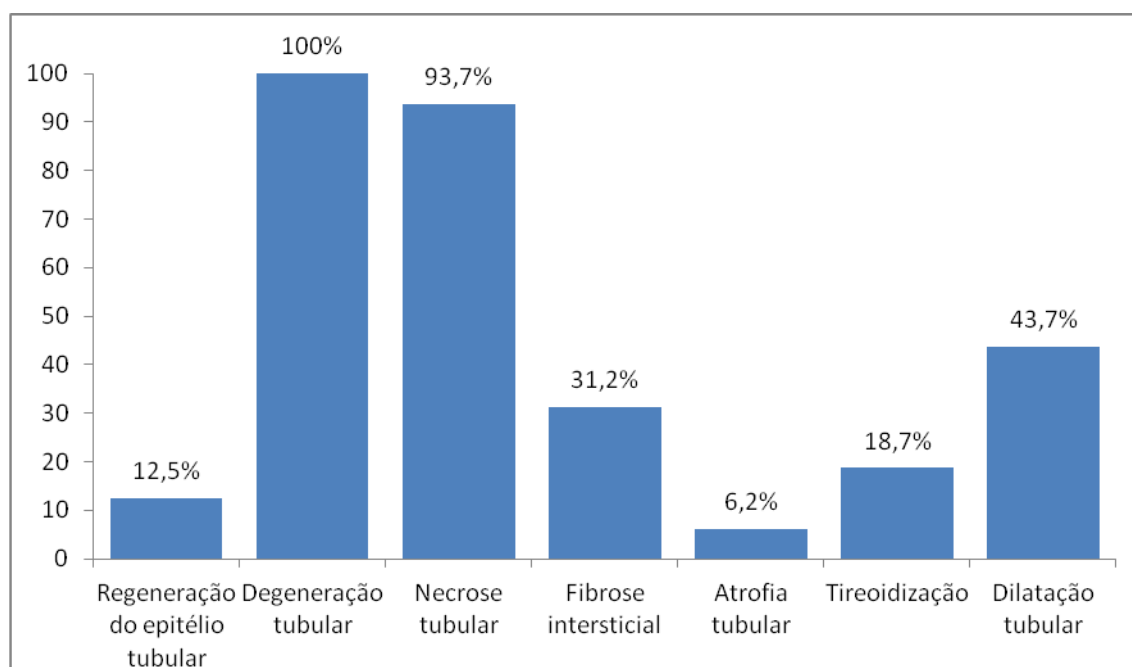


Tabela 6. Distribuição de frequências das alterações tubulares e intersticiais por histopatologia dos rins de cães com erliquiose crônica. Botucatu 2015.

	Leve	Moderada	Acentuada
	(+)	(++)	(+++)
Alterações tubulares e intersticiais			
	%	%	%
Regeneração do epitélio tubular	12,5	0	0
Degeneração tubular	31,3	43,7	25,0
Necrose tubular	43,7	25,0	25,0
Fibrose intersticial	25,0	0	6,2
Atrofia tubular	0	0	6,2
Tireoidização	6,3	6,2	6,2
Dilatação tubular	18,8	18,7	6,2

Figura 7. Distribuição das alterações morfológicas tubulares e intersticiais dos rins de cães com erliquiose crônica. Botucatu, 2015.



Fonte: elaborado pela autora

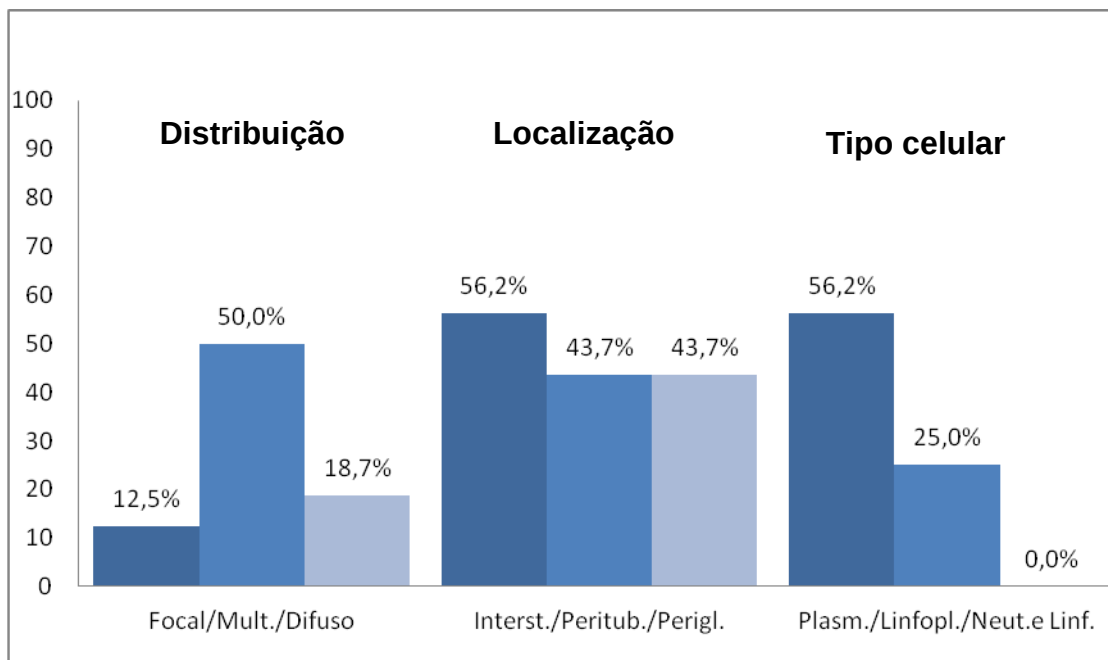
5.3.4 Infiltrado inflamatório

Quanto à distribuição do infiltrado inflamatório 12,5%, 50% e 6,3% foram focal, multifocal e difusa respectivamente. Com relação à localização 56,2% dos animais apresentaram infiltrado periglomerular e intersticial e 43,7% tinham localização peritubular. Quanto ao tipo celular 56,2% dos animais apresentaram infiltrado inflamatório plasmocitário (sendo que 25% foi de caráter leve, 18,7% caráter moderado e 12,5% de caráter acentuado). Já o infiltrado inflamatório linfoplasmocitário foi visto em 25% dos animais (18,7% de caráter leve e 6,3% de caráter moderado). Nenhum dos animais apresentou infiltrado inflamatório neutrofílico ou linfocitário. A caracterização do infiltrado inflamatório quanto a distribuição, localização e tipo celular estão representados na Tabela 7 e figura 9.

Tabela 7. Distribuição de frequências do infiltrado inflamatório quanto à distribuição, localização e o tipo celular através da histopatologia dos rins de cães com erliquiose crônica. Botucatu 2015.

	Leve	Moderada	Acentuada
	(+)	(++)	(+++)
Infiltrado Inflamatório			
	%	%	%
Distribuição			
focal	12,5	0	0
multifocal	50,0	0	0
difuso	6,3	6,2	6,2
Localização			
intersticial	56,2	0	0
peritubular	43,7	0	0
periglomerular	56,2	0	0
Tipo celular			
linfocitário	0	0	0
plasmocitário	25,0	18,7	12,5
linfoplasmocitário	18,7	6,3	0
neutrofílico	0	0	0

Figura 8. Caracterização do infiltrado inflamatório quanto a distribuição, localização e o tipo celular através da histopatologia dos rins de cães com erliquiose crônica. Botucatu 2015.



Fonte: elaborado pela autora

5.4 Análise histopatológica do baço

Quanto às alterações histopatológicas no baço 12,5 % dos cães apresentaram atrofia dos folículos linfóides, 43,7% hipoplasia de folículos e 37,5% desenvolveram hipertrofia dos folículos. O acúmulo de plasmócitos (figura 10 e 11) ocorreu 87,5% (43,7% de caráter acentuado, 25% de caráter moderado e 18,8% de caráter leve) como mostra a tabela 9 e a figura 12.

Figura 9. Fotomicrografia de rim canino mostrando infiltração periglomerular de plasmócitos (setas). Verde Metil Pironina, 40X.

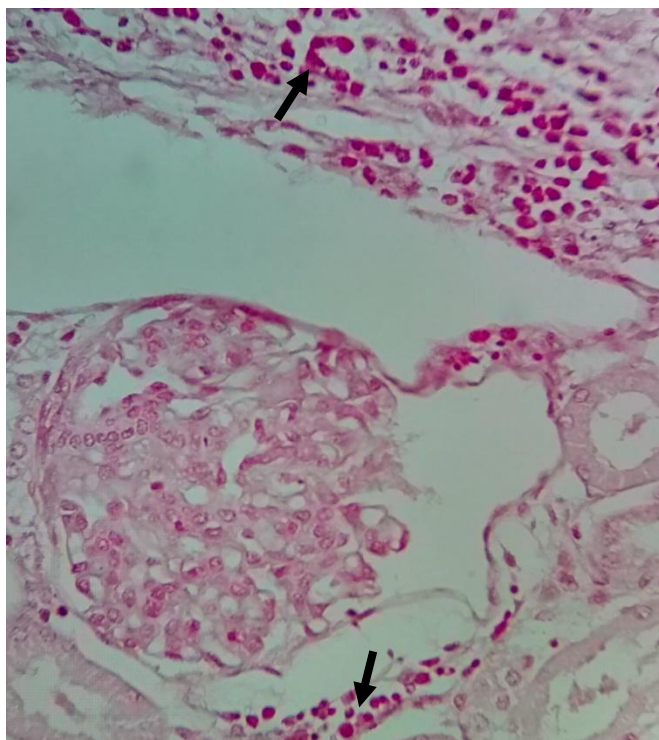


Figura 10. Fotomicrografia de baço canino mostrando folículo linfóide (*) e infiltrado de plasmócitos ao redor da trabécula (seta). HxE, 10X.

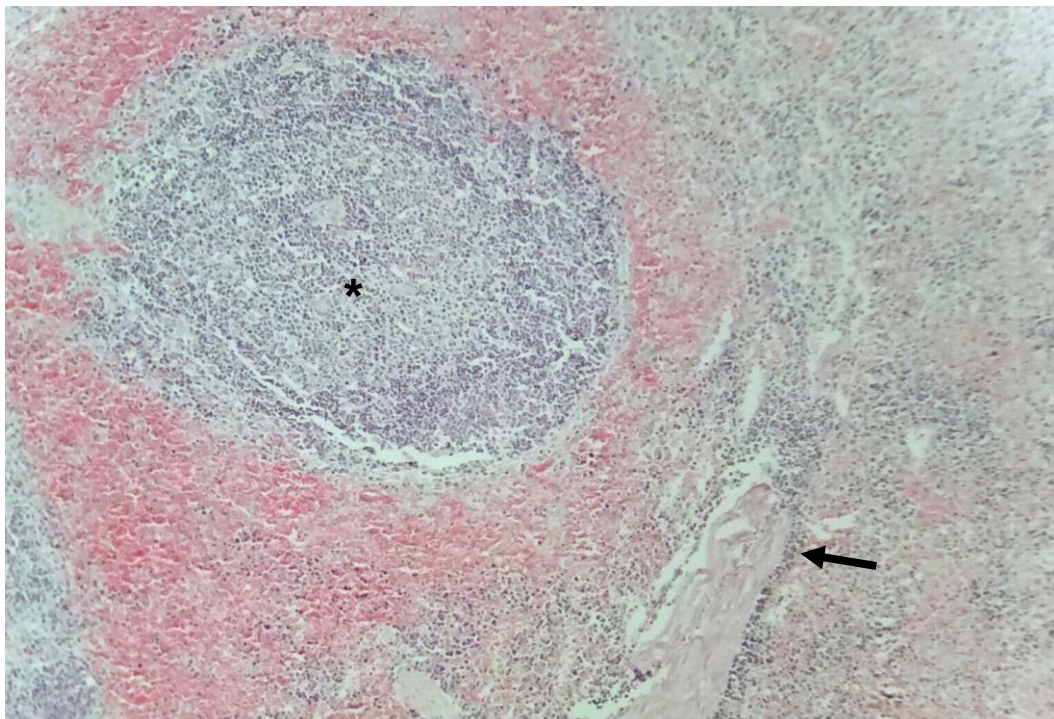


Figura 11. Fotomicrografia de baço canino mostrando folículo linfóide (*) e infiltrado de plasmócitos ao redor da trabécula (seta). VMP, 10X.

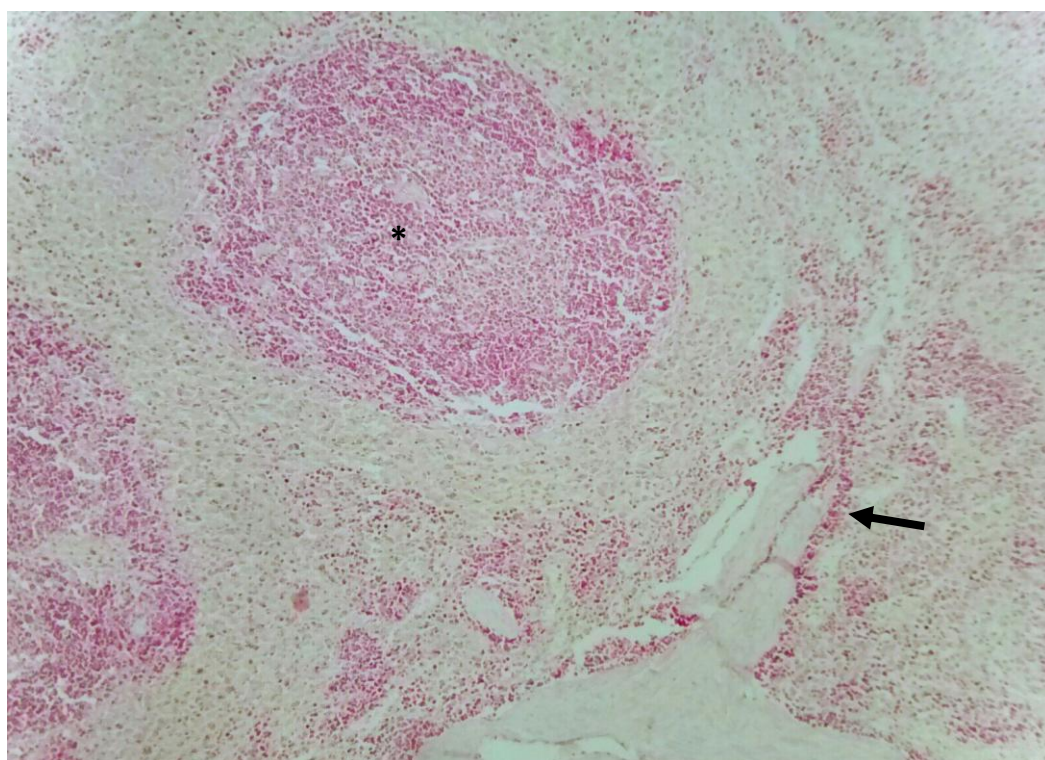


Figura 12. Fotomicrografia de baço canino mostrando infiltrado de plasmócitos ao redor de artéria (setas). HxE, 40X.

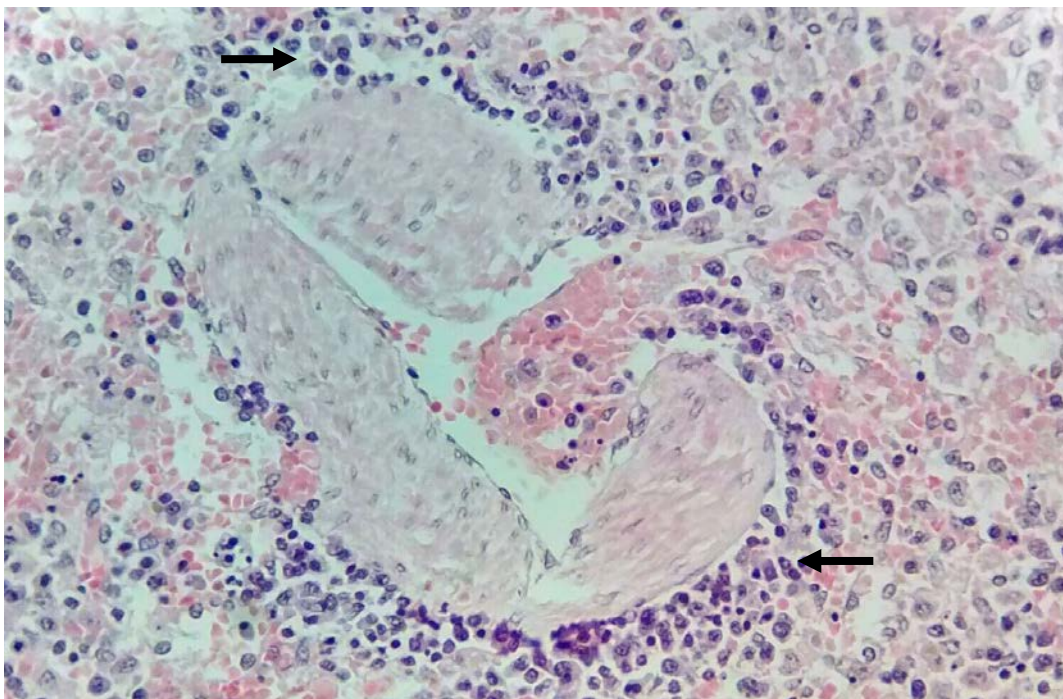
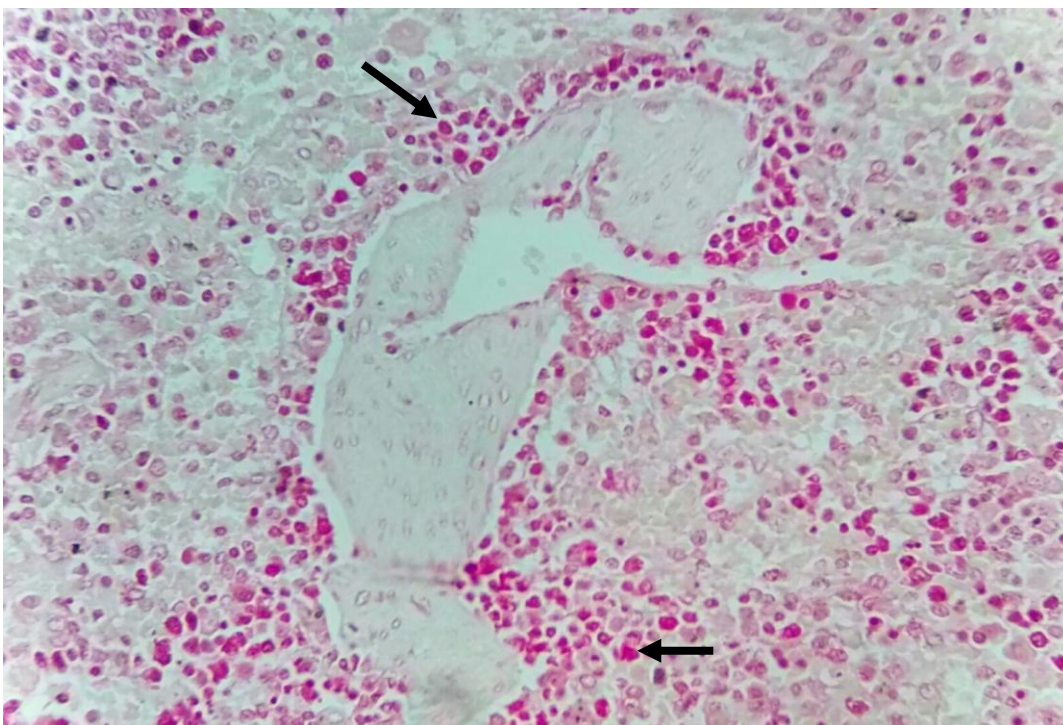


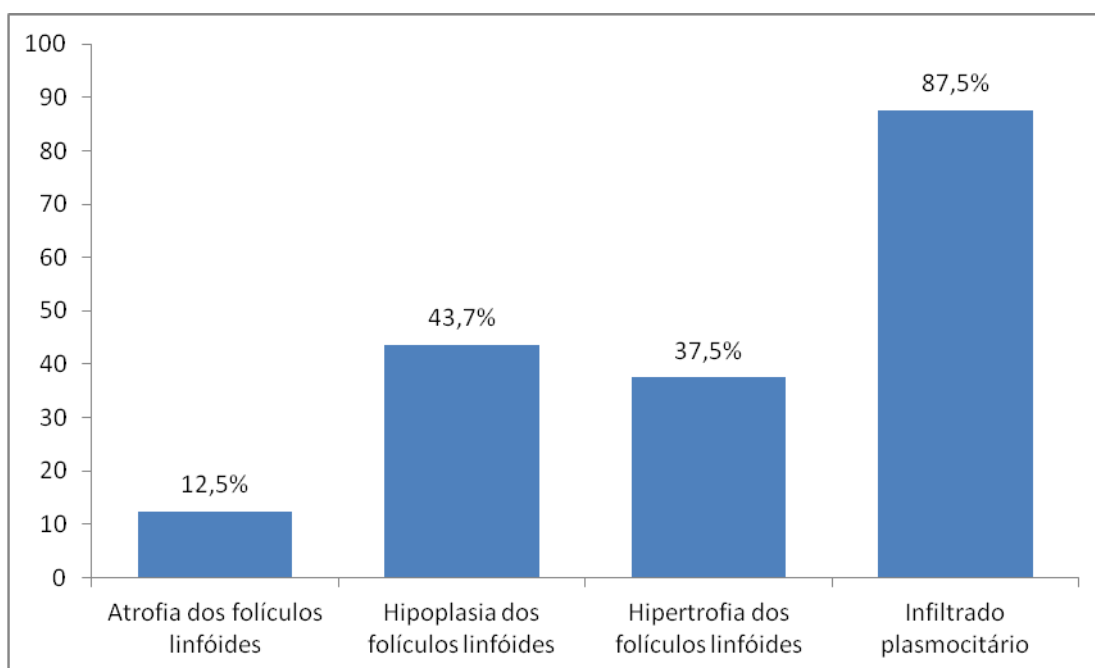
Figura 13. Fotomicrografia de baço canino mostrando infiltrado de plasmócitos ao redor de artéria (setas). VMP, 40X.



***Tabela 8.** Distribuição das frequências das alterações histopatológicas ocorridas em baço de cães com erliquiose crônica. Botucatu 2015.

Alterações em baço	Leve (+)	Moderada (++)	Acentuada (+++)
	%	%	%
Atrofia de folículos linfóides	0	6,2	6,3
Hipoplasia de folículos linfóides	6,2	31,2	6,3
Hipertrofia de folículos linfóides	12,5	18,7	6,3
Acúmulo de plasmócitos	18,8	25	43,7

Figura 14. Alterações histopatológicas encontradas em baço de cães com erliquiose crônica. Botucatu, 2015.



Fonte: elaborado pela autora

5.5 Análise de correlação

A análise de correlação e valores de significância entre parâmetros bioquímicos e histopatológicos dos rins demonstraram correlação positiva entre a hipertrofia de células epiteliais ($p=0,033$) e infiltrado inflamatório intersticial ($p=0,024$) com a concentração de uréia. Quanto à concentração de creatinina houve correlação positiva entre a hiperplasia de células mesangiais ($p=0,032$) e dilatação tubular ($p=0,022$). Em relação à concentração de albumina e o infiltrado inflamatório, a correlação foi negativa quando era de padrão difuso ($p=0,004$), quando acentuado ($p=0,020$) e quando era do tipo plasmocitário ($p=0,026$). Já em relação a concentração de globulina houve correlação positiva quando o infiltrado inflamatório era de padrão difuso ($p=0,019$), quando acentuado ($p=0,026$) e quando era do tipo plasmocitário ($p=0,027$), como mostra a tabela 8.

Tabela 9. Coeficientes de correlação não paramétrica de Spearman (r) e valores de significância (p) entre parâmetros bioquímicos e histopatológicos do rim de cães com erliquiose crônica, Botucatu, 2015.

Histopatologia	Parâmetros séricos							
	Ureia		Creatinina		Albumina		Globulina	
	r	p	r	P	r	p	r	P
Hip.cél. epiteliais	0,593	0,033*	0,427	0,145	-0,016	0,964	-0,204	0,547
Hiper.cél.mesangiais	0,440	0,132	0,596	0,032*	-0,574	0,065	0,315	0,346
Dilatação tubular	0,202	0,509	0,628	0,022*	-0,127	0,710	-0,063	0,854
Infiltrado difuso	0,078	0,800	0,095	0,758	-0,785	0,004*	0,690	0,019*
Infiltrado acentuado	0,131	0,670	0,469	0,106	-0,684	0,020*	0,662	0,026*
Infiltrado intersticial	0,619	0,024*	0,227	0,455	-0,205	0,546	-0,058	0,866
Infil. plasmocitário	0,172	0,574	0,127	0,679	-0,662	0,026*	0,660	0,027*

* $p < 0,05$

A análise de correlação e valores de significância entre parâmetros bioquímicos e histopatológicos do baço, demonstraram correlação positiva entre hipertrofia de folículos linfóides ($p=0,028$) com a concentração de ureia. E houve correlação negativa entre hipoplasia de folículos linfóides ($p=0,030$) com ureia;

e entre infiltrado plasmocitário ($p < 0,001$) com albumina, demonstrados na tabela 10.

Tabela 10. Coeficientes de correlação não paramétrica de Spearman (r) e valores de significância (p) entre parâmetros bioquímicos e histopatológicos do baço de cães com erliquiose crônica, Botucatu, 2015.

Histopatologia	Parâmetros séricos							
	Ureia		Creatinina		Albumina		Globulina	
	r	P	r	P	r	p	r	P
Hipop.fol.linfóides	-0,599	0,030*	0,062	0,838	0,468	0,145	-0,301	0,3
Hipert.fol. linfóides	0,603	0,028*	0,277	0,358	-0,455	0,159	0,179	0,5
Infilt. Plasmocitário	0,334	0,264	0,113	0,712	-0,854	<0,001*	0,503	0,1

* $p < 0,05$

6. DISCUSSÃO

6.1 Bioquímica sérica

O presente estudo revelou resultados de exames de ureia e creatinina dos cães com erliquiose crônica acima da média dos valores de referência normais, corroborando com trabalhos nos quais os pacientes apresentaram aumento das concentrações séricas de ureia (35%) e creatinina (29%). (HARRUS et al., 1997; SOUSA et al., 2010). Em dois estudos com cães naturalmente infectados por *E. canis*, foi observada elevação sérica de ureia em (35%) e (21%) dos animais amostrados, respectivamente (HARRUS et al., 1997; FRANK et al., 1999).

O fato pode ter associação a um quadro de glomerulopatia, podendo explicar assim a correlação positiva (quando aplicado o teste de correlação de Spearman), encontrada nesse estudo entre ureia e hiperplasia de células epiteliais glomerulares e infiltrado intersticial. Ainda reforçando a associação ao quadro de glomerulopatia, observou-se correlação positiva da creatinina com a hiperplasia de células mesangiais glomerulares e a dilatação tubular nos rins dos cães com erliquiose crônica. Desse modo fica evidente que a ocorrência de glomerulonefrite mesangial/mesangioproliferativa observada na maioria dos animais desse estudo esteja diretamente correlacionada com os valores acima da média de ureia e creatinina.

Observou-se ainda correlação positiva entre o aumento de ureia à hipertrofia dos folículos linfóides em baço. Pode ocorrer hipoalbuminemia associada à proteinúria (CODNER; MASLIN, 1992; KATAOKA; SANTANA; SEKI, 2006).

A hipoalbuminemia pode ser resultante da anorexia, que leva a diminuição da ingestão de proteínas, e também pode ser um mecanismo compensatório devido ao aumento das globulinas, prevenindo assim o aumento da viscosidade no sangue (HARRUS et al., 1996). Outra explicação para a hipoalbuminemia encontrado no presente estudo está relacionado as perdas desta devido as lesões glomerulares e tubulares corroboradas por Polzin et al (2004).

Waner et al (1997) observaram hipergamaglobulinemia em estudo experimental com cães da raça beagle em fase subclínica da erliquiose, porém, os cães desse estudo apresentaram valores de globulina abaixo ou dentro dos padrões do normal, isso pode ser explicado pelo fato de que nos quadros de pancitopenia, achado característico da erliquiose em fase crônica, a concentração de gamaglobulinas é menor, provavelmente em consequência da leucopenia pronunciada (HARRUS et al., 1996), assim como pela proteinúria marcante observada nos pacientes com insuficiência renal crônica (POLZIN, 2004).

6.2 HISTOPATOLOGIA RENAL

Segundo Polzin et al (2004), as alterações histopatológicas encontradas nos rins com falência renal em estágio terminal incluem: a esclerose glomerular, fibrose intersticial, infiltrado inflamatório mononuclear túbulo-intersticial, dilatação tubular e atrofia do epitélio tubular. No presente estudo todos os animais apresentaram alterações de degeneração e necrose túbulo-intersticiais. Os cães machos tiveram maior prevalência que as fêmeas quanto ao aumento da matriz mesangial, hiperplasia de células mesangiais e a formação de crescentes com 43,7%, 43,7%, 50% respectivamente. Codner et al. (1992), relata que alguns animais infectados pela *E. canis* podem desenvolver glomerulopatia relacionada à deposição de imunocomplexos. A evolução do quadro pode predispor os animais acometidos a insuficiência renal crônica e proteinúria (FRANCK et al., 1999).

O fato da maioria dos animais do presente estudo não apresentarem elevação dos níveis de globulina sérica, pode ser explicado devido à gravidade das lesões glomerulares e túbulo-intersticiais, fato este que culminaria com a marcante perda de globulinas pela urina (POLZIN, 2004).

Em cães experimentalmente infectados, por dentre outras alterações que foram atribuídas à patogenia da EMC, Castro et al. (2004) constataram glomerulonefrite caracterizada por infiltrado de células inflamatórias evidente nos rins, esses dados evidenciam que a EMC está associada com alteração

funcional glomerular, corroborando com os achados histopatológicos e correlações observadas no presente estudo, quando aplicado o teste de correlação de Spearman, onde todos os cães apresentaram algum tipo de lesão morfofuncional em rins. Portanto, o espessamento da parede glomerular, leva a diminuição da taxa de filtração glomerular, que por sua vez diminui a perfusão renal e desencadeia o processo de esclerose glomerular e, com isso, os rins perdem a capacidade de excreção dos metabólitos urêmicos (SANCHES, 2005).

O mecanismo de instalação da lesão glomerular crônica envolve vários fatores de crescimento e citocinas que tem ação quimiotática sob as células inflamatórias mononucleares, atraindo-as para o local da injúria tecidual, daí a importância de caracterizar o infiltrado inflamatório presente nas lesões renais dos cães (D'AMICO, 1998). Macedo (2007) observou na análise histológica do rim, infiltrado plasmocitário cortical de intensidade moderada, especialmente periglomerular, e difuso no interstício medular, muitas vezes acentuado, corroborando com os achados desse estudo onde o infiltrado inflamatório do tipo plasmocitário foi predominante, e a localização foi na maioria das vezes intersticial com distribuição multifocal, e com predomínio nos machos.

A concentração de plasmócitos periglomerular e intersticial em cães com EMC teria como causa a produção local de imunoglobulinas, o que vem de encontro com a hipótese de que a patogênese das glomerulonefrites são associadas na sua grande maioria com a deposição de imunocomplexos circulantes nos glomérulos, o que sustenta o quadro de hipersensibilidade do tipo III (TIZARD, 2014).

Newman et al (2007) relatam que a glomerulonefrite do tipo mesangioproliferativa é a forma mais comum em cães que possuem deposição de imunocomplexos, o que vem corroborar com os achados do presente estudo, no qual também foi o tipo morfológico mais frequente, sendo observada em 10 cães e não havendo predisposição desta em relação ao sexo dos animais.

6.3 HISTOPATOLOGIA DO BAÇO

No exame microscópico a alteração histopatológica mais evidente é o infiltrado celular plasmocitário em numerosos órgãos, especialmente rins, tecidos linfopoiéticos e meninges (DAVOUST, 1993). Segundo Hildebrandt et al. (1973), as alterações de baço podem ser caracterizadas, em cães naturalmente infectados, pela infiltração extensa de plasmócitos no parênquima deste e diversos outros órgãos.

Macedo (2007) encontrou na análise histopatológica do baço aparente hiperplasia de folículos e cordões esplênicos, o presente trabalho observou hipoplasia de folículos linfoides com predomínio em cães machos (31,2%), grande quantia de plasmócitos e relativamente poucos linfócitos e macrófagos. O grau de infiltrado plasmocitário parece aumentar em cães cronicamente infectados (GREENE, 2012). Em razão disso, infiltrado plasmocitário pelo parênquima esplênico também foi observado nesse estudo.

Nos cães que apresentaram concentração sérica de globulinas acima de 2,4 mg/dL, quanto maior o acúmulo difuso de plasmócitos no parênquima esplênico, maior foi a hiperplasia de células mesangiais e o espessamento da membrana basal dos capilares glomerulares.

Considerando que 87,5% dos cães do presente estudo apresentaram infiltração de plasmócitos no parênquima esplênico, (machos e fêmeas tiveram frequência de 43,7%), o que vem de encontro com os achados de Harrus et al (1998), que relatam que cães esplenectomizados desenvolvem EMC mais branda. Isso indica que o baço de cães com EMC tem papel importante na patogênese das alterações renais e hematológicas.

7. CONCLUSÕES

- Apesar da enorme complexidade da etiopatogênese da *E. canis* existem dois mecanismos para levar à glomerulopatias secundárias:
 - Imunitário pela deposição de imunocomplexos nos glomérulos;
 - Autoanticorpos pela imunidade celular.
- Glomerulonefrite é um achado evidente em cães com EMC crônica, com predomínio do tipo mesangioproliferativa.
- As alterações morfológicas túbulo-intersticiais nos cães com EMC são frequentes.
- Os cães com erliquiose crônica apresentam acúmulo de plasmócitos no parênquima esplênico e renal.
- O aumento na concentração de plasmócitos no parênquima renal está diretamente relacionado com o aumento das alterações morfológicas glomerulares e túbulo-intersticiais.
- O infiltrado de plasmócitos no parênquima esplênico parece ter papel crucial na patogênese das lesões imunomediadas em cães com EMC.

8. Anexo: Distribuição das alterações histopatológicas encontradas em rins dos 16 animais com erliquiose crônica. Botucatu, 2015

	1P	2P	3P	4P	5P	6P	7P	8P
Espessamento difuso da parede glomerular				+++				
Aumento da matriz mesangial	++	++	++	+++	++		+	++
Espessamento da membrana basal	+	++	+	+++	++	++	++	+
Hiperplasia de células endoteliais							+	
Hiperplasia de células epiteliais	+	+		+++	+	+	+	+
Hiperplasia de células mesangiais	+	++	+	+++	+		+	+
Formação de crescentes	+	+	+	+++	+	+	+	
Sinéquias	+	+	+	+++	+	+	+	++
Esclerose glomerular	+			+++			+	+
Regeneração do epitélio tubular							+	
Degeneração tubular	+++	++	+	+++	+	+	++	++
Necrose tubular	+	++	+	+++	+	+	++	+
Fibrose intersticial				+++			+	
Atrofia tubular				+++				
Tireoidização				+++			++	
Dilatação tubular				+++			++	+
Infiltrado focal			+					
Infiltrado multifocal		+			+	+	+	+
Infiltrado difuso				+				
Infiltrado discreto			+				+	+
Infiltrado moderado		+			+	+		
Infiltrado acentuado				+				
Infiltrado intersticial		+		+	+	+	+	
Infiltrado peritubular		+	+	+	+		+	+
Infiltrado periglomerular		+	+	+	+	+	+	+
Infiltrado linfocitário								
Infiltrado plasmocitário		+	+	+++			++	++
Infiltrado linfoplasmocitário					++	+		
Infiltrado neutrofílico								

Legenda: (+) alteração leve; (++) alteração moderada; (+++) alteração acentuada.

	9P	10P	11P	12P	13P	14P	15P	16P
Espessamento difuso da parede								
glomerular		++		++		++	++	++
Aumento da matriz mesangial	++				+	++	++	+
Espessamento da membrana basal	+++	+++	++	++	+	++	+	+
Hiperplasia de células endoteliais								
Hiperplasia de células epiteliais					+		+	+
Hiperplasia de células mesangiais	+++				++	++	++	++
Formação de crescentes	+				+	++		+++
Sinéquias	+	++	+	++	++	+++	++	++
Esclerose glomerular		++		+		+		
Regeneração do epitélio tubular					+			
Degeneração tubular	++	+++	+	++	++	+++	+	++
Necrose tubular	+	+++	+	+++	++	+++		++
Fibrose intersticial	+	+		+				
Atrofia tubular								
Tireoidização								+
Dilatação tubular		+				+	++	++
Infiltrado focal			+					
Infiltrado multifocal						+	+	+
Infiltrado difuso	+++			++				
Infiltrado discreto			+		+	+		
Infiltrado moderado				++			+	+
Infiltrado acentuado	+++							
Infiltrado intersticial			+			+	+	+
Infiltrado peritubular								+
Infiltrado periglomerular							+	+
Infiltrado linfocitário								
Infiltrado plasmocitário	+++		+	+				++
Infiltrado linfoplasmocitário						+	+	
Infiltrado neutrofílico								

Legenda: (+) alteração leve; (++) alteração moderada; (+++) alteração acentuada

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA, K.; LOPEZ, J.; PERRET, C.; GUERRERO, J.; GODOY, P.; VELOZ, A.; VALIENTE-ECHEVERRÍA, F.; LEÓN, U.; GUTJAHR, C.; AZÓCAR, T. *Anaplasma platys* in dogs, Chile. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 13, n. 9, p. 1392-1395, 2007.

AGUIAR, D. M. *Aspectos epidemiológicos da erliquiose canina no Brasil*. 2006. 95 f. Tese (Doutorado - Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

ALBERNAZ, A. P.; MIRANDA, F. J. B.; MELO JR., O. A.; MACHADO, J. A.; FAJARDO, H. V. Erliquiose canina em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. *Cienc. Anim. Bras.*, v. 8, p. 799-806, 2007.

ALMOSNY, N. R. P. *Erliquiose em pequenos animais domésticos e como zoonose*. Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses. Rio de Janeiro: Livros de Veterinária, 2002. cap. 1, p. 13-49.

ALVES, M. A. M. K. *Erliquiose monocítica canina subclínica, naturalmente adquirida*: diagnóstico, aspectos clínico-laboratoriais, envolvimento renal e evolução com o tratamento. 2013. 57 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.

ALVES, R. N.; LEVENHAGEN, M. A.; RIECK, S. E.; LABRUNA, M. B.; BELETTI, M. E. A manutenção de *Ehrlichia canis* em macrófagos é dependente da evasão lisossomal. *Ars Vet.*, v. 29, n. 4, p. 5, 2013.

ANDEREG, P.; PASSOS, L. Erliquiose canina: revisão. *Rev. Clín. Vet.*, n. 19, p. 31-38, 1999.

BARNWELL, R. E.; OHASHI, N.; RIKIHISA, Y. *Ehrlichia chaffeensis* and *E. sennetsu*, but not the human granulocytic ehrlichiosis agent, colocalize with

transferrin receptor and up-regulate transferrin receptor mRNA by activating iron-responsive protein 1. *Infect. Immun.*, v. 67, p. 2258-2265, 1999.

BIRCHARD, J. S.; SHERDING, G. R. *Clínica de pequenos animais*. 2. ed. São Paulo: Roca, 2003.

BREITSCHWERDT, E. B. Riquetsioses. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. *Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 422-429.

BULLA, C.; KIOMI TAKAHIRA, R.; PESSOA ARAÚJO JR., J.; APARECIDA TRINCA, L.; SOUZA LOPES, R.; WIEDMEYER, C. E. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with Ehrlichia canis in an endemic area. *Vet. Res.*, v. 35, p. 141-146, 2004.

CARLOS, R. S. A.; MUNIZ NETA, E. S.; SPAGNOL, F. H.; OLIVEIRA, L. L. S.; BRITO, R. L. L.; ALBUQUERQUE, G. R.; ALMOSNY, N. R. P. Frequência de anticorpos anti-Ehrlichia canis, Borrelia burgdorferi e antígenos de Dirofilaria immitis em cães na microrregião Ilhéus Itabuna, Bahia, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 16, n. 3, p. 117-120, 2007.

CASTRO, M. B.; MACHADO, R. Z.; AQUINO, L. P. C. T.; ALESSI, A. C.; COSTA, M. T. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. *Vet. Parasitol.*, v. 119, p. 73-86, 2004.

CHAVES, L. A.; LEITE, R. A. C.; NAVECA, S. A. *Erlíquiose canina*. 2007. ____ f. Monografia (Especialização em Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais) - Qualittas Instituto de Pós-Graduação, Manaus, 2007.

CODNER, E. C.; CACECI, T.; SAUNDERS, G. K.; SMITH, C. A.; ROBERTSON, J. L.; MARTIN, R. A.; TROY, C. G. Investigation of glomerular lesions in dogs

with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. *Am. J. Vet. Res.*, v. 53, n. 12, p. 2286-2291, 1992a.

CODNER, E. C.; MASLIN, W. R. Investigation of renal protein loss in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. *Am. J. Vet. Res.*, v. 53, n. 3, p. 294-299, 1992b.

COSTA, J. O.; SILVA, M.; BATISTA JUNIOR, J. A.; GUIMARÃES, M. P. *Ehrlichia canis* infection in dog in Belo Horizonte - Brazil. *Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. Minas Gerais*, v. 25, n. 2, p. 199-200, 1973.

COUTO, C. G. Doenças Ricktsiais In: BIRCHAD, S. J.; SHERDING, R. G. *Manual Saunders: clínica de pequenos animais*. São Paulo: Roca, 1998. p. 139-142.

COWGILL, L. D.; ELLIOT, D. A. Insuficiência renal aguda. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. *Tratado de medicina interna veterinária*. 5. ed. São Paulo: Koogan, 2004. v. 2, p. 1701-1720.

DAVOUST, B. Canine ehrlichiosis. *PointVét*, v. 25, n. 151, p. 43-51, 1993.

D' AMICO, G. Tubulo-interstitial damage in glomerular disesses: Its role in the progression of the renal damage. *Nephrol. Dial. Transplant.*, v. 13, suppl., p. 80-85, 1998.

DiBARTOLA, S. P. Abordagem clínica e avaliação laboratorial da doença renal. In: ETTINGER, S. J. ; FELDMAN, E. C. *Tratado de medicina interna veterinária*. 5. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004. v. 2, p. 1685-1700.

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 Ricktsiaceae and Anaplasmataceae in the order Ricktsiales: 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 HE agent as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 51, p. 2145-2165, 2001.

FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. *Schalm's veterinary hematology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

FIELD, A. *Discovering statistics using IBM SPSS Statistics*. 4. ed. Thousand Oaks: Sage Publications Limited Textbooks, 2012.

FRANCK, R. J.; BREITSCHWERDT, E. B. A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from north California and Virginia. *J. Vet. Intern. Med.*, v.13, n.3,p. 194-201, 1999.

GOULD, D. J.; MURPHY, K.; RUDORF, H.; CRISPIN, S. M. Canine monocytic ehrlichiosis presenting as acute blindness 36 months after importation into the UK. *J. Small Anim. Pract.*, v. 41, n. 6, p. 263-265, 2000.

GREENE, C. E. Ehrlichia and Anaplasma Infections. In: ____ (Ed.). *Infectious diseases of the dog and cat*. 4. ed. Saint Louis: Elsevier, 2012. cap. 26, p. 227-260.

GRINDEM, C. B.; BREITSCHWERDT, E. B.; PERKINS, P. C.; CULLINS, L. D.; THOMAS, T. J.; HEGARTY, B. C. Platelet-associated immunoglobulin (antiplatelet antibody) in canine Rocky Mountain spotted fever and ehrlichiosis. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, v. 35, p. 56-61, 1999.

HARRUS, S.; WANER, T.; WEISS, D. J.; KEYSARY, A.; BARK, H. Kinetics of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 51, p. 13-20, 1996.

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. *Vet. Rec.*, v. 141, p. 360-363, 1997.

HARRUS, S.; WANER, T.; AIZENBERG, I.; FOLEY, J. E.; POLAND, A. M.; BARK, H. Amplification of Ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. *J. Clin. Microbiol.*, v. 36, p. 73-76, 1998.

HARRUS, S.; WANER, T.; KEYSARY, A.; AROCH, I.; VOET, H.; BARK, H. Investigation of splenic functions in canine monocytic ehrlichiosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 62, p. 15-27, 1998.

HARRUS, S.; WANER, T.; BARK, H.; JONGEJAN, F.; CORNELISSEN, A. W. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.*, v. 37, n. 9, p. 2745-2749, 1999.

HARRUS, S.; DAY, M. J.; WANER, T.; BARK, H. Presence of immune-complexes, and absence of antinuclear antibodies, in sera of dogs naturally and experimentally infected with *Ehrlichia canis*. *Vet. Microbiol.*, v. 83, p. 343-349, 2001.

HARRUS, S.; ALLEMAN, A. R.; BARK, H.; MAHAN, S. M.; WANER, T. Comparison of three enzyme-linked immunosorbent assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. *Vet. Microbiol.*, v. 86, p. 361-368, 2002.

HARRUS, S.; KENNY, M.; MIARA, L.; AIZENBERG, I.; WANER, T.; SHAW, S. Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment of experimental *Ehrlichia canis* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 48, p. 4488-4490, 2004.

HARRUS, S.; WANER, T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. *Vet. J.*, v. 187, p. 292-296, 2011.

HILDEBRANDT, P. K.; CONROY, J. D.; MCKEE, A. E.; NYINDO, M. B. A.; HUXSOLL, D. L. Ultrastructure of *Ehrlichia canis*. *Infect. Immun.*, v. 7, n. 2, p. 265-271, 1973.

HUXSOLL, D. L.; HILDEBRANDT, P.K.; NIMS, R. M.; WALKER, J. S. Tropical canine pancytopenia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 157, p. 1627-1632, 1970.

ISOLA, J. G. M. P.; CADIOLI, F. A.; NAKAGE, A. P. Erliquiose Canina – revisão de literatura. *Rev. Cient. Eletrôn. Med. Vet.*, v. 9, n. 18, p. 1-11, 2012.

JAIN, N. C. The plates. In: _____. *Essentials of veterinary hematology*. Philadelphia: Lea & Febinger, 1993. cap. 6, p. 105-132.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. Sistema urinário. In: _____. *Patologia veterinária*. 6. ed. Sao Paulo: Manole, 2000. cap. 24, p. 1131-1168.

JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. Pathology of domestic animals. MAXIE, M. G.; NEWMAN, S. J. *The urinary system*. 5. ed. San Diego: Academic Press, 2006. v. 2, p. 426-521.

KATAOKA, A.; SANTANA, A. E.; SEKI M. C. Alterações do proteinograma sérico em cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis*. *Ars Vet.*, v. 22, n. 2, p. 98-102, 2006.

KAVINSKI, L. C.; FLORIANO, B.; CARON, P. E.; BRONZE, S. J. M. Ocorrência de um caso de erliquiose canina em Curitiba-PR. *Rev. Set. Ciênc. Agrár.*, v. 10, n. 1-2, p. 217-219, 1988.

LABARTHE, N.; DE CAMPOS PEREIRA, M.; BARBARINI, O.; MCKEE, W.; COIMBRA, C. A.; HOSKINS, J. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis* and *Borrelia burgdorferi* infections in Brazil. *Vet. Ther.*, v. 4, n. 1, p. 67-75, 2003.

LAUFER, R. *Estudo da correlação diagnóstica entre citologia, biópsia "de janela" e exame "post-mortem" em rins de cães*. 1997. ____ f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1997.

LITTLE, S. E. Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. *Vet. Clin. North Am. Small Pract.*, v. 40, p. 1121-1140, 2010.

LIU, H.; BAO, W.; LIN, M.; NIU, H.; RIKIHISA, Y. Ehrlichia type IV secretion effector ECH 0825 is translocated to mitochondria and curbs ROS and apoptosis by upregulating host MnSOD. *Cell. Microbiol.*, v. 14, p. 1037-1050, 2012.

MACEDO, E. A. *Ultraestrutura de células parasitadas por Ehrlichia canis., métodos diagnósticos e histopatologia em órgãos de cães com erliquiose da micro-região de Uberlândia, MG*. 2007. ____ f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

MAXIE, M. G.; PRESCOTT, J. F. The urinary system. In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. *Pathology of domestic animals*. 4. ed. San Diego: Academic Press, 1993. v. 2, p. 475-487.

MCBRIDE, J. W.; WALKER, D. H. Molecular and cellular pathobiology of Ehrlichia infection: targets for new therapeutics and immunomodulation strategies. *Expert Rev. Mol. Med.*, v. 13, p. E3, 2011.

MENDONÇA, C. S.; MUNDIM, A. V.; COSTA, A. S.; MORO, T. V. Erliquiose canina: alterações hematológicas em cães domésticos naturalmente infectados. *Biosci. J.*, v. 21, n. 1, p. 167-174, 2005.

NAKAGHI, A. C. H.; MACHADO, R. Z.; COSTA, M. T.; ANDRÉ, M. R.; BALDINI, C. D. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. *Cienc. Rural*, v. 38, n. 3, p. 766-770, 2008.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Doenças riquetsiais polissêmicas. In: _____. *Medicina interna de pequenos animais*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. cap. 96, p. 1322-1335.

NEWMAN, S. J.; CONFER, A. W.; PANCIEIRA, R. J. Urinary system. In: _____. *Pathologic basis of veterinary disease*. St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier, 2007. cap. 11, p. 613-691.

NYINDO, M. B.; RISTIC, M.; HUXSOLL, D. L. A.; SMITH, A. R. Tropical canine pancytopenia: In vitro cultivation of the causative agent Ehrlichia canis. *Am. J. Vet. Res.*, v. 32, n. 11, p. 1651-1658, 1971.

ORIÁ, A. P. *Correlação entre uveítes, achados de patologia clínica, sorológicos (Reação de Imunofluorescência Indireta e Dot-blot ELISA) e de anatomopatologia do bulbo do olho, em animais da espécie canina, natural e experimentalmente infectados pela Ehrlichia canis*. 2001. 89 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

PARMAR, C.; PEDNEKAR, R.; JAYRAW, A.; GATNE, M. Comparative diagnostic methods for canine ehrlichiosis. *Turkish J. Vet. Anim. Sci.*, v. 37, p. 282-290. 2013.

PEREIRA, J. C. *Erlichiose canina*. 2006. 20 f. Monografia (Especialização em Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais) - Universidade Castelo Branco, São José do Rio Preto, 2006.

POLZIN, D. J.; OSBORNE, C. A.; JACOB, J. F.; ROSS, S. Insuficiência renal crônica. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. *Tratado de medicina interna veterinária*. 5. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004. v. 2, p. 1721-1750.

PLONECZKA-JANECZKO, K.; RYPULA, K. Application with a flow cytometry in differentiation of antibodies accompanying platelets in *Ehrlichia canis* and *Borrelia burgdorferi* infections in dogs. *J. Immunol.*, v. 36, n. 3, p. 174-179, 2011.

POPOV, V. L.; HAN, V. C.; CHEN, S. M.; DUMLER, J. S.; FENG, H. M.; ANDREADIS, T. G.; TESH, R. B.; WALKER, D. H. Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. *J. Med. Microbiol.*, v. 47, n. 3, p. 235-251, 1998.

RIKIHISA, Y. The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 4, p. 286-308, 1991.

RISTIC, M.; HOLLAND, C. J. Canine ehrlichiosis. In: WOLDEHIWET, Z.; RISTIC, M. (Ed.). *Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals*. Oxford: Pergamon Press, 1993. p. 169-186.

SANCHES, O. C. *Histopatologia da série eritróide da medula óssea e do tecido renal de cães com insuficiência renal crônica*. 2005. ____f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

SANCHEZ, I. X. B.; SOCARRAS, T. J. O.; SILVA, M. L.; PEREIRA, N. B.; MACHADO, R. Z.; VASCONCELOS, A. C. Apoptose na infecção experimental de cães domésticos com *Ehrlichia canis*. *Ciênc. Rural*, v. 42, n. 8, p. 1457-1463, 2012.

SIMPSON, C. F. Relationship of *Ehrlichia canis* infected mononuclear cells to blood vessels of the lung. *Infect. Immun.*, v. 10, p. 590-596, 1974.

SMITH, R. D.; RISTIC, M.; HUXSOLL, D. L.; BAYLOR, R. A. Platelet kinetics in canine ehrlichiosis: evidence for increased platelet destruction as the cause of thrombocytopenia. *Infect. Immun.*, v. 11, p. 1216-1221, 1975.

SOUSA, V. R. F.; ALMEIDA, A. B. P. F.; BARROS, L. A.; SALES, K. G.; JUSTINO, C. H. S.; DALCIN, L.; BOMFIM, T. C. B. Avaliação clínica e molecular de cães com erliquiose. *Ciênc. Rural*, v. 40, n. 6, p. 1309-1313, 2010.

STEVENS, A.; LOWE, J. Doenças do sistema urinário. In: _____. *Patologia*. 2. ed. São Paulo: Manole, 1998. p. 317-349.

STITCH, R. W.; SCHAEFER, J. J.; BREMER, W. G.; NEEDHAM, G. R.; JITTAPALAPONG, S. Host surveys, ixodid tick biology and transmission scenarios as related to the tick-borne pathogen, *Ehrlichia canis*. *Vet. Parasitol.*, v. 158, p. 256-273, 2008.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. *Parasitologia veterinária*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

TENG, C. H.; PALANIAPPAN, R. U.; CHANG, Y. F. Cloning and characterization of an *Ehrlichia canis* gene encoding a protein located to the morula membrane. *Infect. Immun.*, v. 71, n. 4, p. 2218-2225, 2003.

THRALL, M. A. Interpretação da resposta leucocitária nas doenças. In: _____. *Hematologia e bioquímica veterinária*. São Paulo: Roca, 2007. cap. 12, p. 127.

TIZARD, I. R. *Imunologia veterinária*. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. cap. 15, p.162.

TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A.; NETO, A. G. F. *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. 2. ed. Barueri: Manole, 2003. 331p.

VAN DIJK, J. E. Estudios on Ehrlichia canis. *Zentralbl. Veterinarmed. B*, v. 18, p. 787-803, 1971.

WANER, T.; ROSNER, M.; HARRUS, S.; NAVEH, A.; ZASS, R.; KEYSARY, A. Demonstration of serum platelet antibodies an experimental acute ehrlichiosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 48, n. 1, p. 177-182, 1997.

WANER, T.; KEYSARY, A.; BARK, H.; SHARABANI, E.; HARRUS, S. Canine monocytic ehrlichiosis – an overview. *Israel J. Vet. Med.*, v. 54, p. 103-107, 1999.

WANER, T. Hematopathological changes in dogs infected with *Ehrlichia canis*. *Israel Vet. Med. J.*, v. 63, p. 1-8, 2008.

YU, X.; McBRIDE, J. W.; WALKER, D. H. Restriction and expansion of Ehrlichia strain diversity. *Vet. Parasitol.*, v. 143, n. 3-4, p. 337-346, 2007.

ZAFAR, I.; RIKIHISA, Y. Reisolation of Ehrlichia canis from blood and tissues of dogs after doxycycline treatment. *J. Clin. Microbiol.*, v. 32, n. 7, p. 1644-1649, 1994.

10. Trabalho a ser enviado para : Pesquisa Veterinária Brasileira.

GLOMERULOPATIAS SECUNDÁRIAS À EHRlichIOSE MONOCÍTICA CANINA CRÔNICA.

Erica S. C. Kikuchi, Antonio Carlos Paes, Osimar C. Sanches, Rogério Giuffrida.

ABSTRACT: Kikuchi, E.S.C.; Paes, A.C.; Sanches, O.C.; Giuffrida, R. 2015. (**Glomerulopathies secondary to the chronic canine monocytic ehrlichiosis**). GLOMERULOPATIAS SECUNDÁRIAS À EHRlichIOSE MONOCÍTICA CANINA CRÔNICA. Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Junior, s/n CEP 18.618-970, Botucatu, Brasil. E-mail: erica.cdapvet@yahoo.com.br.

Canine monocytic ehrlichiosis (CME), is an infectious disease of high incidence in clinical routine, caused by *Ehrlichia canis*, an obligate intracellular gram-negative bacterium and transmitted by the tick *Rhipicephalus sanguineus*. This work aimed to evaluate the histopathological lesions in kidneys and spleen caused by CME, as well as the parameters of serum biochemistry urea, creatinine, albumin and globulin. To this end, 16 dogs showed mean values of urea (90,18mg / dl) and creatinine (1,62mg / dl) were above the normal reference values for dogs; albumin showed values below normal averaging 2.01g / dl, while globulin remained within the average with 3,58g / dl. The histopathological analysis consisted of the evaluation of cortical and medullary region of the kidney and splenic parenchyma. The most prevalent morphological changes were the thickening of the basement membrane, synechia formation, tubular degeneration and necrosis. As for glomerulonephritis the one that presented the highest occurrence was the mesangial type in 62.5% (10/16) of dogs. As for the splenic changes 43.7% (7/16) of the dogs developed hypoplasia of lymphoid follicles, and 87.5% of them (14/16) had plasma accumulation in the parenchyma. The statistical analysis of correlation between the variables, showed positive correlation between the urea concentration and hyperplasia of the glomerular epithelial cells, and also a positive correlation between creatinine and hyperplasia of mesangial cells and tubular dilation; and between the concentration of globulin and infiltrate of plasma cells. Negative correlation was observed for albumin and plasma cell infiltration. In spleen, enlarged lymphoid follicles and urea had positive correlation, whereas albumin and plasma cell infiltrates showed a negative correlation. There was a predominance of mesangial glomerulonephritis, and the plasma cell infiltrate probably plays an essential role in the immunopathology of injuries.

INDEX TERMS: dog, chronical ehrlichiosis, kidney, spleen, histopathology, serum biochemistry.

RESUMO: A erliquiose monocítica canina (EMC), é doença infecciosa de alta incidência na clínica veterinária, causada por *Ehrlichia canis*, bactéria gram-negativa intracelular obrigatória e transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. O trabalho teve como objetivo avaliar as lesões histopatológicas em rins e baço causadas pela EMC, assim como os parâmetros da bioquímica sérica, ureia, creatinina, albumina e globulina. Para tanto, 16 cães apresentaram valores médios de ureia (90,18mg/dl) e creatinina (1,62mg/dl) acima dos valores de referência normal para cães; a albumina apresentou valores abaixo do normal com média de 2,01g/dl, enquanto a globulina permaneceu dentro da média com 3,58g/dl. A análise histopatológica constituiu na avaliação da região cortical e medular dos rins e do parênquima esplênico. As alterações morfológicas mais prevalentes foram o espessamento da membrana basal, formação de sinéquias, degeneração e necrose tubular. Quanto às

glomerulonefrites a que apresentou maior ocorrência foi a do tipo mesangial em 62,5% (10/16) dos cães. Quanto às alterações esplênicas 43,7% (7/16) dos cães desenvolveram hipoplasia dos folículos linfóides, e 87,5% destes (14/16) apresentaram acúmulo de plasmócitos no parênquima. A análise estatística de correlação entre as variáveis, evidenciou correlação positiva entre a concentração de ureia e hiperplasia de células epiteliais glomerulares, e correlação positiva entre a creatinina e hiperplasia de células mesangiais e dilatação tubular; e entre a concentração de globulina e o infiltrado de plasmócitos. Correlação negativa foi observada para albumina e infiltrado plasmocitário. Em baço, hipertrofia de folículos linfóides e ureia tiveram correlação positiva, enquanto albumina e infiltrado plasmocitário apresentaram correlação negativa. Houve predomínio de glomerulonefrite mesangial, e o infiltrado plasmocitário parece ter papel crucial na imunopatologia das lesões.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: cão, erliquiose crônica, rim, baço, histopatologia, bioquímica sérica.

INTRODUÇÃO

A erliquiose canina, mais comumente denominada erliquiose monocítica canina (EMC), é uma doença infecciosa causada por uma bactéria gram-negativa intracelular obrigatória de monócitos, *Ehrlichia canis*. Pertence a família Anaplasmataceae, na qual o gênero *Ehrlichia* foi incluído a partir de 2001, havendo sido retirado da família Rickettsiaceae (GREENE, 2012).

A doença possui distribuição mundial e necessita de vetores para ser transmitida, sendo o carrapato marrom, *Rhipicephalus sanguineus*, o mais comum (TAYLOR, 2007; GREENE, 2012). A infecção do cão sadio se dá no momento do repasto sanguíneo do carrapato infectado (DAVOUST, 1993). A doença é dividida em três fases: aguda, subclínica e crônica. Na fase aguda, que dura cerca de 2 a 4 semanas, o animal apresenta febre, anorexia, depressão, linfadenopatia e o hemograma mostra trombocitopenia (HUXSOLL, 1970; JAIN, 1993; NAKAGHI et al., 2008).

Durante a fase subclínica, não são observados sinais clínicos evidentes, podendo ocorrer apenas alterações laboratoriais hematológicas (NELSON E COUTO, 2010).

Na fase crônica ocorrem: monocitose, linfocitose, com linfócitos podendo conter grânulos azurofílicos, trombocitopenia, anemia não regenerativa, hiperglobulinemia, hipoplasia da medula óssea, hipoalbuminemia (pela perda glomerular), proteinúria e azotemia. Em muitos casos ocorre aumento da atividade da alanina aminotransferase (ALT) e da fosfatase alcalina (FA).

Se houver supressão da medula óssea, é observada pancitopenia. Outras alterações que podem ser encontradas são aumento no tempo de sangramento em razão da trombocitopenia ou má função plaquetária, hematúria e gamopatia monoclonal (ALMOSNY, 2002; THRALL, 2007; NELSON E COUTO, 2010; GREENE, 2012).

Em cães infectados por *E. canis* e que desenvolvem doença renal crônica é observado alta incidência de nefrite intersticial (CASTRO et al., 2004 e ALBERNAZ et al., 2007). O aumento sérico de globulina principalmente da fração gama induz hiperviscosidade sérica, trombocitopenia além de causar danos ao endotélio vascular e veno-estase (GOULD et al. 2000).

Para tanto, os objetivos desse estudos foram quantificar e descrever as alterações histopatológicas em rins e baço de cães com EMC na fase crônica da enfermidade, e investigar a correlação entre a concentração de ureia, creatinina, globulina e albumina, com as alterações histopatológicas encontradas.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras: Foram utilizados 16 cães oriundos da rotina clínica do setor de Enfermidades Infecciosas dos Animais Domésticos. Após a morte dos animais, baseado nos sinais clínicos, exames hematológicos e bioquímica sérica, e PCR positivo para a doença, foi realizada necrópsia e foram colhidos fragmentos dos rins e do baço dos cães com erliquiose crônica. Foram processados conforme técnica de rotina histológica para microscopia óptica e inclusão em parafina e corados pelos métodos de Hematoxilina e

Eosina, Tricrômio de Masson, Verde Metil Pironina e P.A.M.S. (método de ácido periódico/prata-metenamina de Gomori). Todas as colorações seguiram o protocolo de TOLOSA et al. (2003).

Análise histopatológica: Em rins, observação das alterações glomerulares, tubulares e intersticiais e na caracterização do infiltrado inflamatório, conforme protocolo utilizado por Laufer (1997) e Sanches (2005). A análise histopatológica do baço se baseou na observação dos folículos linfoides, se houve atrofia, hipertrofia ou hipoplasia, e no acúmulo de plasmócitos. Através das análises estatísticas, foi investigada a correlação entre a concentração de ureia, creatinina, globulina e albumina, com as alterações histopatológicas encontradas em rim e baço

Análise estatística: As estatísticas descritivas relativas aos valores de bioquímica sérica e os resultados dos exames histopatológicos de baço e rim foram sumarizados em tabelas. Para estudar a relação entre parâmetros bioquímicos e resultados das análises histopatológicas do baço e dos rins dos cães estudados recorreu-se a análise de correlação não paramétrica de Spearman, considerada adequada para avaliação de escores. Todas as análises foram conduzidas no software SPSS v.16.0 e com nível de significância de 5%(FIELD, 2012).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise dos parâmetros bioquímicos

A concentração de uréia nos animais variou de 31 a 329 mg/dL, resultando na média de 90,18mg/dL, e a creatinina variou de 0,2 a 12,1 mg/dL, resultando na média de 1,62mg/dL. Corroborando com trabalhos onde os pacientes apresentaram aumento das concentrações séricas de ureia e creatinina (HARRUS et al., 1997; SOUSA et al., 2010).

O fato pode ter associação a um quadro de glomerulopatia, podendo explicar assim a correlação positiva (quando aplicado o teste de correlação de Spearman), encontrada nesse estudo entre ureia e hiperplasia de células epiteliais glomerulares e infiltrado intersticial.

Ainda reforçando a associação ao quadro de glomerulopatia, observou-se correlação positiva da creatinina com a hiperplasia de células mesangiais glomerulares e a dilatação tubular nos rins dos cães com erliquiose crônica. Desse modo fica evidente que a ocorrência de glomerulonefrite mesangioproliferativa observada na maioria dos animais desse estudo esteja diretamente correlacionada com os valores acima da média de ureia e creatinina.

Em contraste a concentração de albumina variou de 1,1 a 2,7 g/dl com média de 2,01g/dl e a concentração de globulina variou de 1,1 a 8,9g/dl e a média foi 3,58g/dl. A hipoalbuminemia pode ser resultante da anorexia, que leva a diminuição da ingestão de proteínas, e também pode ser um mecanismo compensatório devido ao aumento das globulinas, prevenindo assim o aumento da viscosidade no sangue (HARRUS et al., 1996) que foi o encontrado no presente estudo, valores de albumina abaixo dos valores normais. Wanner et al (1999) observou hipergamaglobulinemia em estudo experimental com cães da raça beagle em fase subclínica, porém, os cães desse estudo apresentaram valores de globulina dentro dos normais, isso pode ser explicado pelo fato de que nos quadros de pancitopenia, sinal característico da erliquiose em fase crônica, a concentração de gamaglobulinas é menor, provavelmente em consequência da leucopenia pronunciada (HARRUS et al., 1996).

Análise histopatológica do rim

Quanto à caracterização do processo patológico nos animais com EMC crônica, houve predomínio do espessamento da membrana basal (100%), sinéquias (100%), e degeneração tubular (100%). Quanto ao infiltrado, houve predomínio de infiltrado multifocal (50,0%), sendo ele na maioria das vezes periglomerular (56,2%) e intersticial (56,2%) e do tipo plasmocitário (56,2%).

Alterações glomerulares

Os animais na fase crônica da EMC tiveram alterações glomerulares que variaram de leve a acentuada, com predomínio de caráter leve, as quais mostraram maior frequência hiperplasia de células epiteliais (56,2%), formação de crescentes e sinéquias (50%). Nas alterações de caráter moderado acentuaram-se o aumento da matriz mesangial (50%) e espessamento da membrana basal (43,7%). Espessamento da membrana basal ainda demonstrou caráter acentuado em 18,8%. Castro et al. (2004) constataram glomerulonefrite caracterizada por infiltrado de células inflamatórias evidente nos

rins, esses dados evidenciam que a EMC está associada com alteração funcional glomerular, afirmando os achados histopatológicos e correlações observadas no presente estudo, quando aplicado o teste de correlação de Spearman, onde todos os cães apresentaram algum tipo de lesão morfofuncional em rins.

Glomerulonefrites

As glomerulonefrites foram caracterizadas em: mesangial, membranosa, membranoproliferativa e crônica. Todos os cães (100%) apresentaram algum tipo de glomerulonefrite, sendo que 62,5% (10/16) foram do tipo mesangial.

Alterações tubulares e intersticiais

A análise das alterações tubulares e intersticiais mostram que 100% dos animais demonstraram degeneração tubular, independente da gravidade da lesão. Contudo, houve predomínio das alterações de caráter acentuado, com necrose tubular (25%), dilatação tubular (6,2%), tireoidização (6,2%), atrofia tubular (6,2%) e fibrose intersticial (6,2%) Segundo Polzin e Osborne (2004), as alterações histopatológicas encontradas nos rins com falência renal em estágio terminal incluem: a esclerose glomerular, fibrose intersticial, infiltrado inflamatório mononuclear túbulo-intersticial, dilatação tubular e atrofia do epitélio tubular. No presente estudo todos os animais apresentaram alterações de degeneração e necrose túbulo-intersticiais.

Infiltrado inflamatório

Quanto a distribuição do infiltrado inflamatório 50% dos animais apresentaram alterações multifocais de caráter leve; 12,5% exibiam alterações focais de caráter leve. Com relação a localização, houve predomínio de infiltrado periglomerular e intersticial de caráter leve (56,2%). Quanto ao tipo celular 25% dos animais apresentaram infiltrado inflamatório plasmocitário (sendo que 25% foi de caráter leve, 18,7% caráter moderado e 12,5% de caráter acentuado. Já o infiltrado inflamatório linfoplasmocitário apareceu com 18,7% de caráter leve e 6,3% de caráter moderado. Nenhum dos animais apresentou infiltrado inflamatório neutrofílico ou linfocitário.). Macedo (2007) observou na análise histológica do rim, infiltrado plasmocitário cortical de intensidade moderada, especialmente periglomerular, e difuso no interstício medular, muitas vezes acentuado, corroborando com os achados desse estudo onde o infiltrado inflamatório do tipo plasmocitário foi predominante, e a localização foi na maioria das vezes intersticial com distribuição multifocal.

Análise histopatológica do baço

As observações de alterações histopatológicas ocorridas em baço de cães com EMC crônica, constituíram de caráter moderado em 31,2% de hipoplasia de folículos linfoides. Hipertrofia de folículos linfoides apareceu em 18,7% de caráter moderado. O acúmulo de plasmócitos ocorreu 87,5% (43,7% de caráter acentuado, 25% de caráter moderado e 18,8% de caráter leve. Macedo (2007) encontrou na análise histopatológica do baço aparente hiperplasia de folículos e cordões esplênicos, corroborando com os achados desse trabalho, e apresentou nessa região grande quantia de plasmócitos e relativamente poucos linfócitos e macrófagos. Do mesmo modo infiltrado plasmocitário pelo parênquima esplênico também foi observado nesse estudo.

CONCLUSÕES

Apesar da enorme complexidade da etiopatogênese da E. canis existem dois mecanismos para levar à glomerulopatias secundárias:

- Imunitário pela deposição de imunocomplexos nos glomérulos;
- Autoanticorpos pela imunidade celular.

Glomerulonefrite é um achado evidente em cães com EMC crônica, com predomínio do tipo mesangioproliferativa.

As alterações morfológicas túbulo-intersticiais nos cães com EMC são frequentes.

Os cães com erliquiose crônica apresentam acúmulo de plasmócitos no parênquima esplênico e renal.

O aumento na concentração de plasmócitos no parênquima renal está diretamente relacionado com o aumento das alterações morfológicas glomerulares e túbulo-intersticiais.

O infiltrado de plasmócitos no parênquima esplênico parece ter papel crucial na patogênese das lesões imunomediadas em cães com EMC.

REFERÊNCIAS

- Albernaz A.P., Miranda F.J.B., Melo Jr O.A., Machado J.A. & Fajardo H.V. 2007. Erliquiose canina em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. *Cienc. Anim. Bras.* 8:799-806.
- Almosny N.R.P. 2002. *Erliquiose em pequenos animais domésticos e como zoonose*. Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses. Livros de Veterinária, Rio de Janeiro. cap. 1, p. 13-49.
- Castro M.B., Machado R.Z., de Aquino L.P.C.T., Alessi A.C. & Costa M.T. 2004. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. *Vet. Parasitol.* 119:73-86.
- Davoust B. 1993. Canine ehrlichiosis. *PointVét.* 25:43-51.
- Field A. 2012. *Discovering Statistics using IBM SPSS Statistics*. 4. ed. Sage Publications Limited Textbooks, Thousand Oaks.
- Gould D.J., Murphy K., Rudolf H. & Crispin S.M. 2000. Canine monocytic ehrlichiosis presenting as acute blindness 36 months after importation into the UK. *J. Small Anim. Pract.* 41:263-265.
- Greene C.E. 2012. Ehrlichia and Anaplasma Infections. In: ____ (Ed.). *Infectious diseases of the dog and cat*. 4. ed. Elsevier, Saint Louis. cap. 26, p. 227-260.
- Harrus S., Waner T., Weiss D.J., Keysary A. & Bark H. 1996. Kinetics of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 51:13-20.
- Harrus S., Kass P.H., Klement E. & Waner T. 1997. Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. *Vet. Rec.* 141:360-363.
- Huxsoll D.L., Hildebrandt P.K., Nims R.M. & Walker J.S. 1970. Tropical canine pancytopenia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 157:1627-1632.
- Jain N.C. 1993. The plates. In: _____. *Essentials of veterinary hematology*. Lea & Febinger, Philadelphia. cap. 6, p. 105-132.
- Laufer R. 1997. Estudo da correlação diagnóstica entre citologia, biópsia “de janela” e exame “post-mortem” em rins de cães. Dissertação (Mestrado)—Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- Macedo E.A. 2007. Ultraestrutura de células parasitadas por *Ehrlichia canis*., métodos diagnósticos e histopatologia em órgãos de cães com erliquiose da micro-região de Uberlândia, MG. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
- Nakaghi A.C.H., Machado R.Z., Costa M.T., André M.R. & Baldini C.D. 2008. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. *Cienc. Rural* 38:766-770.
- Nelson R.W. & Couto C.G. 2010. Doenças riquetsiais polissêmicas. In: _____. *Medicina interna de pequenos animais*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. cap. 96, p. 1322-1335.
- Polzin D.J., Osborne C.A., Jacob J.F. & Ross S. 2004. Insuficiência renal crônica. In: Ettinger S.J. & Feldman E.C. *Tratado de medicina interna veterinária*. 5. ed. Guanabara Koogan, São Paulo. v. 2, p. 1721-1750.

- Sanches O.C. 2005. Histopatologia da série eritróide da medula óssea e do tecido renal de cães com insuficiência renal crônica. Dissertação (Mestrado)—Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- Sousa V.R.F., Almeida A.B.P.F., Barros L.A., Sales K.G., Justino C.H.S., Dalcin L. & Bomfim T.C.B. Avaliação clínica e molecular de cães com erliquiose. *Ciênc. Rural* 40:1309-1313.
- Taylor M.A., Coop R.L. & Wall R.L. 2007. Parasitologia veterinária. 3. ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Thrall M.A. 2007. Interpretação da resposta leucocitária nas doenças. In: _____. Hematologia e bioquímica veterinária. Roca, São Paulo. cap. 12, p. 127.
- Tolosa E.M.C., Rodrigues C.J., Behmer O.A. & Neto A.G.F. 2003. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. 2. ed. Manole, Barueri.
- Waner T., Keysary A., Bark H., Sharabani E. & Harrus S. Canine monocytic ehrlichiosis – an overview. *Israel J. Vet. Med.* 54:103-107.