

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ELETROFORESE DAS PROTEINAS SÉRICAS E URINÁRIAS  
DE CÃES COM ERLIQUIOSE NA FASE AGUDA**

**Catarina Micali Contin**

Médica Veterinária

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ELETOFORESE DAS PROTEINAS SÉRICAS E URINÁRIAS  
DE CÃES COM ERLIQUIOSE NA FASE AGUDA**

**Catarina Micali Contin**

**Orientador: Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, Área de Clínica Médica Veterinária.

**2015**

Contin, Catarina Micali  
C762e Eletroforese das proteínas séricas e urinárias de cães com  
erliquiose na fase aguda / Catarina Micali Contin. -- Jaboticabal,  
2015

x, 68 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015

Orientador: Áureo Evangelista Santana

Banca examinadora: Raimundo Souza Lopes, Daniela Gomes da  
Silva

Bibliografia

1. Glomerulopatia. 2. Proteinúria. 3. SDS-PAGE. 4. Tubulopatia. I.  
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-072:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –  
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CAMPUS DE JABOTICABAL  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** ELETROFORESE DAS PROTEÍNAS SÉRICAS E URINÁRIAS DE CÃES  
COM ERLIQUIOSE NA FASE AGUDA

**AUTORA:** CATARINA MICALI CONTIN

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. AUREO EVANGELISTA SANTANA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. AUREO EVANGELISTA SANTANA  
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

  
Prof. Dr. RAIMUNDO SOUZA LOPES  
Departamento de Clínica Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu

  
Profa. Dra. DANIELA GOMES DA SILVA  
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 02 de julho de 2015.

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**CATARINA MICALI CONTIN** – nascida em 26 de fevereiro de 1987 na cidade de Jaboticabal, SP, filha de Milton Ponchio Contin e Carmen Aparecida Micali Contin. Médica Veterinária formada pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Câmpus de Jaboticabal-SP, em dezembro de 2012. Durante a graduação foi bolsista como auxiliar de laboratório pelo CNPq (processo 371922/2009-7) e também bolsista de iniciação científica pelo CNPq (processo 114536/2011-2). Em março de 2013, ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Área de Clínica Médica Veterinária) da FCAV/UNESP, sob orientação do Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana. Neste período também foi contemplada com bolsa de estudos cedida pelo CNPq (processo 161889/2013-1).

**“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir”.**

**(Cora Coralina)**

*Aos meus pais, Milton e Carmen, pelo apoio constante, incentivo e compreensão durante essa etapa de minha vida.*

## ***Agradecimentos***

Agradeço a Deus, por me dar força, discernimento e paciência nos momentos de dificuldade, e por permitir mais esta conquista.

Ao Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana, pela oportunidade e orientação no mestrado, e pelo apoio e credibilidade durante esses dois anos de convívio.

Ao Dr. Leandro Crivellenti e Dra. Sofia Crivellenti, um agradecimento mais do que especial por terem me acompanhado em todas as etapas do projeto. Vocês foram essenciais para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pelo importante auxílio financeiro em forma de bolsa de estudo, propiciando a dedicação exclusiva à pós-graduação.

Aos meus pais, Milton e Camen, e meu irmão, Lucas, por serem aqueles em que sempre pude confiar, agradeço pelo apoio, incentivo e compreensão desprendidos durante essa etapa de minha vida.

Ao meu namorado e melhor amigo Bruno, por estar sempre ao meu lado, pelo apoio incondicional e por sempre me mostrar o lado bom das coisas.

À minha grande e melhor amiga Maíra, pela amizade que nem mesmo a distância conseguiu destruir. Você é uma verdadeira irmã.

À minha companheira de mestrado e nova amiga para toda a vida, Stefanie. Obrigada por dividir as angústias, medos e também as alegrias deste período comigo. Com certeza tudo ficou mais fácil com você ao meu lado.

À minha colega de pós-graduação Jéssica Rodrigues de Oliveira, por ceder as amostras dos cães doentes e por toda ajuda durante o experimento.



Aos meus amigos Giordano, Gabriela (Tipóia), Júlia (Siri), Cássia (Muleta), Mariana (Dôssim), Nathália (Gelada) que participaram direta ou indiretamente desse trabalho. Obrigada pela amizade em todos os momentos.

Aos queridos amigos do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, em especial aos funcionários Douglas Luduvério e Mateus Yamasaki, pela ajuda e disposição sempre que necessário.

Aos residentes, pós graduandos e todos os funcionários do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, pela colaboração na prestação disposta de seus serviços.

Às funcionárias da Biblioteca da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, Núbia Lopes Brichi e Renata Verardino Capalbo, pelo auxílio nas referências bibliográficas.

Ao Dr. Paulo César da Silva, funcionário do Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, pelo auxílio na realização dos ensaios de eletroforese.

Aos Prof. Dr. Gener Tadeu Pereira e Prof. Dr. João Ademir de Oliveira, pelo auxílio na elaboração e interpretação das inúmeras análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. José Jurandir Fagliari, pela atenção e auxílio na interpretação das análises eletroforéticas.

***Meus sinceros agradecimentos.***

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO –.....	iv
ABSTRACT – .....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Erliquiose canina.....	2
2.2 Gamopatia .....	5
2.3 Eletroforese das proteínas .....	8
3. OBJETIVOS.....	13
3.1 Objetivo geral.....	13
3.2 Objetivos específicos .....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	14
4.1 Animais .....	14
4.2 Obtenção das amostras de soro e de urina .....	15
4.3 Esfregaço de ponta de orelha .....	15
4.4 Avaliação do quadro hematológico, bioquímico e urinário .....	17
4.4.1 Hemograma .....	17
4.4.2 Bioquímica sérica e urinária.....	17
4.4.3 Aspectos físico-químicos e sedimentoscópicos da urina (urinálise) ....	18
4.4.4 Eletroforese de proteínas séricas e urinárias.....	19
4.5 Avaliação sorológica e reação em cadeia da polimerase (PCR) .....	20
4.5.1 “Dot-ELISA” para detecção de anticorpos anti- <i>Ehrlichia canis</i> .....	20
4.5.2 Técnica sorológica para detecção de anticorpos IgG e IgM anti-leptospira canina.....	21
4.5.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Babesia</i> spp. ....	21
4.6 Análise estatística .....	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	23
5.1 Dados epidemiológicos da população amostral.....	23

	Pagina
5.2 Hemograma .....	24
5.3 Bioquímica sérica.....	30
5.4 Eletroforese do soro.....	35
5.5 Função renal .....	42
5.6 Eletroforese da urina.....	45
6. CONCLUSÕES.....	51
7. REFERÊNCIAS .....	52
APÊNDICES.....	64



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Jaboticabal



## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 12544/14 do trabalho de pesquisa intitulado "**Eletroforese das proteínas sêricas e urinárias de cães com Eriquiose na fase aguda**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 07 de julho de 2014.

Jaboticabal, 07 de julho de 2014.

**Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes**  
Coordenadora – CEUA

## ELETROFORESE DAS PROTEÍNAS SÉRICAS E URINÁRIAS DE CÃES COM ERLIQUIOSE NA FASE AGUDA

**RESUMO** – A erliquiose canina é uma das hemoparasitoses mais frequentes entre os cães domésticos e apresenta alta prevalência nas regiões de clima tropical. Apesar das inúmeras investigações e avanços na compreensão da patogênese e diagnóstico da referida doença, pouco se sabe a respeito das alterações glomérulo-tubulares de cães acometidos por erliquiose. No presente estudo objetivou-se associar o perfil eletroforético das proteínas sanguíneas e urinárias com as possíveis alterações glomérulo-tubulares encontradas em cães com erliquiose na fase aguda. O Grupo Controle (GC) foi integrado por 18 cães saudáveis e o Grupo Doente (GD), por 24 animais. Ambos de qualquer gênero, raça e idade. O protocolo experimental incluiu avaliação das condições clínicas de cães sadios e daqueles acometidos pela doença, neste último caso com base nos sinais clínicos e presença de mórula em esfregaços sanguíneos de ponta de orelha. Dos animais controle e daqueles enfermos, foram obtidas amostras de sangue periférico e urina para análises eletroforéticas das proteínas pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Foram selecionadas 11 frações proteicas no traçado densitométrico dos soros sanguíneos, cujos pesos moleculares variaram entre 23 e 139 kDa (kilodáltons). Os resultados mostraram que algumas proteínas séricas de fase aguda se alteram nos cães com erliquiose na fase aguda. Observou-se diferença significativa entre os grupos estudados na concentração sérica de transferrina, haptoglobina, IgG (cadeia leve) e albumina, sendo que somente esta última apresentou níveis inferiores no Grupo Doente. A análise eletroforética da urina exibiu um número superior de frações proteicas excretadas pelos cães com erliquiose na fase aguda (295), quando comparados àqueles encontrados nos cães do GC (174). Foram encontradas proteínas de alto (>60 kDa) e baixo peso molecular (<60 kDa) na urina dos cães doentes, sugerindo que a doença em sua fase aguda, causa lesões tanto nos glomérulos quanto túbulos, respectivamente.

**Palavras-chave:** glomerulopatia, proteinúria, SDS-PAGE, tubulopatia

## ELECTROPHORESIS OF SERUM AND URINARY PROTEINS OF DOGS WITH ACUTE-PHASE ERLICHIOSIS

**ABSTRACT** – Canine ehrlichiosis is one of the most frequent haemoparasitosis between domestic dogs and has high prevalence in tropical regions. Despite the innumerable investigations and progresses in the pathogenesis comprehension and diagnosis of the disease, little is known on the glomerulo-tubular alterations of dogs stricken by ehrlichiosis. The aim of this study was to associate the electrophoretic profile of blood and urinary proteins with the possible glomerulo-tubular alterations found in dogs with acute-phase ehrlichiosis. The Control Group (CG) was formed by 18 healthy dogs and the Sick Group (SG), by 24 animals, both groups with unspecified genders, races and ages. The experimental protocol included assessment of the dogs' clinical conditions, and regarding the sick ones, based on the clinical signs and the presence of morula in the ear-tip blood smears. From the animals of both groups, peripheral blood and urine samples were obtained for protein electrophoretical analysis through the polyacrylamide gel with dodecyl sodium sulfate (SDS-PAGE) electrophoresis technique. Eleven protein fractions were selected in the blood sera densitometry trace, with molecular weights ranging from 23 to 123 kDa (kilodaltons). The results showed that some acute-phase proteins change in dogs with acute-phase ehrlichiosis. Significant difference between the studied groups was observed in serum concentrations of transferrin, haptoglobin, IgG (light chain) and albumin, the latter with lower levels in the Sick Group. The electrophoretical analysis of urine showed a larger number of protein fractions excreted by dogs with acute-phase ehrlichiosis (295), when in comparison with the ones in the CG (174). High (>60 kDa) and low (<60 kDa) molecular weight proteins were found in the sick dogs' urine, suggesting that the disease in its acute phase causes lesions in both glomeruli and tubules, respectively.

**Keywords:** glomerulopathy, proteinuria, SDS-PAGE, tubulopathy.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

µL: microlitro

AAG: α1 glicoproteína ácida

AAT: α1 antitripsina

atm: atmosfera

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

cm: centímetro

DNA: ácido desoxirribonucleico

DNNE: desvio nuclear de neutrófilos à esquerda

dL: decilitro

DRC: doença renal crônica

*E. canis: Ehrlichia canis*

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA: teste imunoenzimático de absorvância

EMC: erliquiose monocítica canina

GC: grupo controle

GD: grupo doente

IgA: imunoglobulina A

IgE: imunoglobulina E

IgG: imunoglobulina G

IgM: imunoglobulina M

kDa: kilodalton

mg: miligrama

MGG: May-Grunwald-Giemsa

mL: mililitros

nPCR: reação em cadeia da polimerase do tipo nested

°C: graus Celsius

PBS: tampão fosfato-salino

PCR: reação em cadeia da polimerase

PFA: proteínas de fase aguda

pH: potencial hidrogeniônico

RIFI: reação de imunofluorescência indireta

SDS-PAGE: sodium dodecil sulphate poliacrilamida gel electrophoresis  
(eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio)

TFG: taxa de filtração glomerular

Ucr: concentração de creatinina urinária

UP/C: razão proteína creatinina urinária

Upt: concentração de proteína urinária

x g: força gravitacional



## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1.</b> Estatística descritiva (média $\pm$ erro padrão da média) e valores de P do teste <i>t student</i> da contagem global de hemácias, hemoglobina, hematócrito, contagem global de leucócitos, valores absolutos de eosinófilos, neutrófilos bastonetes e segmentados, linfócitos, monócitos e contagem global de plaquetas dos animais do Grupo Controle (GC) e dos cães com erliquiose (GD) na fase aguda. Jaboticabal, 2015.....	25
<b>Tabela 2.</b> Estatística descritiva (média $\pm$ erro padrão da média) e valores de P do teste <i>t student</i> da concentração sérica de creatinina, ureia, fósforo e cálcio dos animais do Grupo Controle (GC) e dos cães com erliquiose (GD) na fase aguda. Jaboticabal, 2015.....	30
<b>Tabela 3.</b> Estatística descritiva (média $\pm$ erro padrão da média) e valores de P do teste <i>t student</i> da atividade sérica de ALT (alanina aminotransferase), FA (fosfatase alcalina) e concentração sérica de proteína total, albumina e globulinas dos animais do Grupo Controle (GC) e dos cães com erliquiose (GD) na fase aguda. Jaboticabal, 2015.....	31
<b>Tabela 4.</b> Estatística descritiva (média $\pm$ erro padrão da média) e valores de P do teste <i>t student</i> das concentrações séricas das frações proteicas (mg/dL) obtidas em gel de poliácridamida dos animais do Grupo Controle (GC) e dos cães com erliquiose (GD) na fase aguda. Jaboticabal, 2015.....	36
<b>Tabela 5.</b> Estatística descritiva (média $\pm$ erro padrão da média) e valores de P do teste <i>t student</i> da razão proteína e creatinina urinárias (UP/C) e densidade específica urinária (DEU) dos animais do Grupo Controle (GC) e dos cães com erliquiose (GD) na fase aguda. Jaboticabal, 2015.....	43
<b>Tabela 6.</b> Proteínas urinárias conforme seu peso molecular (kDa); <i>n</i> = número de proteínas observadas em cada intervalo conforme o peso molecular; Frequência = aparecimento das proteínas tanto no grupo controle (GC) como no grupo com erliquiose (GD) na fase aguda. Jaboticabal, 2015.....	47
<b>Tabela 7.</b> Frequência de aparecimento das proteínas urinárias de acordo com seu peso molecular (BPM - baixo peso molecular, MPM - médio peso molecular e APM - alto peso molecular; <i>n</i> = número de proteínas observadas no grupo controle (GC) e no grupo com erliquiose (GD) na fase aguda. Jaboticabal, 2015.....	48

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<p><b>Figura 1.</b> Ilustração do procedimento adotado para a realização da técnica de esfregaço de ponta de orelha. <b>(1A)</b> Tricotomia e antissepsia do pavilhão auricular externo com algodão embebido em álcool 70°. <b>(1B)</b> Punção do capilar auricular externo com uma agulha hipodérmica estéril (25x7mm). <b>(1C)</b> Sangue obtido da punção. <b>(1D)</b> Coleta da amostra de sangue com auxílio de um tubo microcapilar. <b>(1E)</b> Deposição da amostra de sangue em lâmina estéril. <b>(1F)</b> Posicionamento da lamínula para a confecção do esfregaço sanguíneo. <b>(1G)</b> Esfregaço sanguíneo pronto. Jaboticabal, 2015.....</p>	16
<p><b>Figura 2.</b> Principais sinais clínicos e alterações observados ao exame físico nos cães portadores de mórulas de <i>Ehrlichia</i> spp. (GD). Jaboticabal, 2015.....</p>	23
<p><b>Figura 3.</b> Contagens globais de hemácias, concentração de hemoglobina e valores de hematócrito dos animais do Grupo Controle (GC) e dos cães com erliquiose (GD) na fase aguda. Jaboticabal, 2015.....</p>	26
<p><b>Figura 4.</b> Contagens globais de leucócitos dos animais do Grupo Controle (GC) e dos cães com erliquiose (GD) na fase aguda. Jaboticabal, 2015.....</p>	27
<p><b>Figura 5.</b> Valores absolutos de eosinófilos dos animais do Grupo Controle (GC) e dos cães com erliquiose (GD) na fase aguda. Jaboticabal, 2015.....</p>	27
<p><b>Figura 6.</b> Valores absolutos de neutrófilos bastonetes e segmentados dos animais do Grupo Controle (GC) e dos cães com erliquiose (GD) na fase aguda. Jaboticabal, 2015.....</p>	28
<p><b>Figura 7.</b> Contagens globais de plaquetas dos animais do Grupo Controle (GC) e dos cães com erliquiose (GD) na fase aguda. Jaboticabal, 2015.....</p>	29
<p><b>Figura 8.</b> Concentrações séricas de creatinina dos animais do Grupo Controle (GC) e dos cães com erliquiose (GD) na fase aguda. Jaboticabal, 2015.....</p>	32

## LISTA DE FIGURAS

		Página
<b>Figura 9.</b>	Concentração sérica de globulina dos animais do Grupo Controle (GC) e dos cães com erliquiose (GD) na fase aguda. Jaboticabal, 2015.....	33
<b>Figura 10.</b>	Concentração sérica de transferrina, obtida em gel de poliacrilamida dos animais do Grupo Controle (GC) e dos cães com erliquiose (GD) na fase aguda. Jaboticabal,2015.....	38
<b>Figura 11.</b>	Concentração sérica de albumina, obtida em gel de poliacrilamida dos animais do Grupo Controle (GC) e dos cães com erliquiose (GD) na fase aguda. Jaboticabal, 2015.....	39
<b>Figura 12.</b>	Concentração sérica de haptoglobina, obtida em gel de poliacrilamida dos animais do Grupo Controle (GC) e dos cães com erliquiose (GD) na fase aguda. Jaboticabal, 2015.....	40
<b>Figura 13.</b>	Concentração sérica de IgG de cadeia leve, obtida em gel de poliacrilamida dos animais do Grupo Controle (GC) e dos cães com erliquiose (GD) na fase aguda. Jaboticabal, 2015.....	41
<b>Figura 14.</b>	Gráfico circular representativo da distribuição dos cães com erliquiose (GD) na fase aguda em não proteinúrico ( $UP/C < 0,2$ ), proteinúrico <i>borderline</i> /limítrofe ( $UP/C \geq 0,2$ ou $\leq 0,5$ ) e proteinúrico ( $UP/C > 0,5$ ), ilustrando o valor da razão proteína e creatinina urinárias e o sistema de subestadiamento da proteinúria da IRIS (2009).....	44
<b>Figura 15.</b>	Razão proteína e creatinina urinárias (UP/C) dos animais do Grupo Controle (GC) e dos cães com erliquiose (GD) na fase aguda. Jaboticabal, 2015.....	44
<b>Figura 16.</b>	Densidade específica urinária (DEU) dos animais do Grupo Controle (GC) e dos cães com erliquiose (GD) na fase aguda. Jaboticabal, 2015.....	45

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas bacterianas e virais, além das moléstias parasitárias, em geral, são responsáveis por grande parte da demanda de atendimento médico-veterinário, junto aos estabelecimentos de atenção à saúde de animais domésticos, especialmente os de companhia. A erliquiose canina encontra terreno fértil em muitas regiões do globo terrestre e apresenta grande frequência nas regiões de clima tropical, além de tratar-se de uma doença com evolução complexa e diagnóstico bastante complicado, devido a dificuldade de encontro das formas intracelulares do parasita.

*Ehrlichia canis* (*E. canis*) é uma bactéria intracelular obrigatória que apresenta tropismo por células hematopoéticas. Esta hemoparasitose, conhecida como erliquiose monocítica canina (EMC) é potencialmente fatal, portanto, exige diagnóstico rápido e preciso para iniciar a terapia adequada, objetivando tornar o prognóstico favorável. A transmissão dá-se por meio da inoculação da bactéria pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* no cão. A doença é caracterizada por três fases: aguda, subclínica e crônica. Cães infectados com *E. canis* podem assim permanecer por toda a vida, mesmo após o tratamento. A prevalência da doença depende da distribuição do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, encontrado principalmente em áreas tropicais e subtropicais.

Dentre os diversos sinais clínicos e laboratoriais que caracterizam a erliquiose canina, as lesões renais e suas repercussões são aquelas das quais menos se conhecem. Teoricamente, a glomerulopatia está relacionada com a deposição de imunocomplexos, no entanto, não há dados a respeito do envolvimento túbulo-intersticial nesses pacientes suscitando a necessidade de mais estudos a respeito.

A eletroforese em gel de poliacrilamida é um dos melhores métodos para obtenção das frações proteicas presentes tanto no sangue quanto na urina, seja em seres humanos ou animais. Assim, neste ensaio objetivou-se avaliar cães acometidos por erliquiose na fase aguda, naturalmente adquirida, utilizando-se para tanto do eletroforetograma das proteínas séricas e urinárias, tentando identificar possíveis danos túbulo-glomerulares e sua conexão com a referida doença.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Erliquiose canina

A erliquiose foi descrita pela primeira vez em um cão de raça Pastor Alemão, na Argélia, por Donatien e Lestoquard, em 1935. No entanto, somente dez anos mais tarde passou a ser considerada como *Ehrlichia canis*, por Mashkovsky. No Brasil, o primeiro caso de erliquiose canina foi descrito em Belo Horizonte - MG, em 1973 (MACHADO, 2004). O segundo caso ocorreu em Jaboticabal - SP e foi relatado por Maregati, em 1978 (KAVINSKY et al., 1988).

Esta doença é a hemoparasitose mais comumente encontrada em cães (NELSON; COUTO, 2001; GREENE, 2006), sendo considerada uma infecção potencialmente fatal para a espécie (PYLE, 1980; WANER; HARRUS, 2000). Trata-se de uma doença com alta prevalência, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (MOREIRA et al., 2003). No Brasil, a região sudeste é considerada endêmica (BORIN; CRIVELENTI; FERREIRA, 2009).

A erliquiose monocítica canina (EMC) tem como agente etiológico a bactéria Gram-negativa intracelular obrigatória *Ehrlichia canis* (LAPPIN, 2006), que pertence à família *Rickettsiaceae* (DAGNONE et al., 2003). O parasita apresenta tropismo por monócitos, macrófagos e trombócitos, formando uma inclusão citoplasmática chamada mórula (NEER; HARRUS, 2006). Este microrganismo afeta animais de todas as idades, independentemente de raça ou sexo (ISOLA; CADIOLI; NAKAGE, 2012).

Apesar do carrapato *Amblyomma cajennense* ser considerado um potencial vetor em áreas rurais no Brasil (COSTA Jr. et al., 2007), o carrapato marrom do cão (*Rhipicephalus sanguineus*) é considerado o principal transmissor da doença (LEWIS Jr. et al., 1977). Sua erradicação é complexa (ISOLA; CADIOLI; NAKAGE, 2012) e a infecção acontece principalmente nas estações quentes do ano, quando o carrapato está mais ativo (HARRUS; WANER, 2011). A transmissão ocorre principalmente quando a bactéria é inoculada no hospedeiro por meio da secreção salivar infectada do carrapato (MOREIRA et al., 2003; BULLA et al., 2004; DAGNONE et al., 2009). A transfusão de sangue de cães doadores infectados cronicamente por até cinco anos

também é considerada um meio de transmissão entre cães susceptíveis (COUTO, 2003).

Durante o período de incubação da *E. canis*, que pode durar de 8 a 20 dias, os parasitas se multiplicam por divisão binária no interior dos macrófagos, formando as mórulas e posteriormente, disseminam-se pelo organismo (NEER; HARRUS, 2006). Caso o microrganismo não seja eliminado, a doença evolui para as fases subclínicas e crônica (HARRUS; WANER; BARK, 1997).

A fase aguda tem duração aproximada de duas a quatro semanas (NEER; HARRUS, 2006) e se caracteriza por alta parasitemia, sendo possível encontrar mórulas com mais facilidade (WOODY; ROSKINS, 1991) e, também, pelo surgimento dos primeiros e praticamente imperceptíveis sinais clínicos no paciente. Na medida em que a doença evolui, até a sua fase crônica, são somados outros sinais clínicos, dentre os quais os mais comumente encontrados incluem hipertermia (39,5°C – 41,5°C), perda de peso, anorexia, linfadenopatia, esplenomegalia, hepatomegalia, mucosas pálidas, depressão, dispneia, estertores pulmonares, cianose, secreção ocular e nasal mucopurulenta, vasculite, distúrbios cardiorrespiratórios, petéquias, equimoses, sinais neurológicos, musculares e poliartrite (WANER et al., 1999; NEER; HARRUS, 2006).

Em relação aos achados laboratoriais, trombocitopenia é o achado mais comum e se manifesta devido ao consumo, sequestro e destruição das plaquetas pelos macrófagos (ALMOSNY, 2002; ETTINGER; FELDMAN, 2004). Outras anormalidades hematológicas encontradas nesta fase da doença são leucopenia branda e diminuição progressiva da quantidade de eritrócitos, traduzindo um quadro de anemia normocítica e normocrômica, geralmente arregenerativa, devido à supressão da medula óssea e destruição exacerbada das células eritróides (FARIA, 2006; CASTRO et al., 2004; BORIN; CRIVELENTI; FERREIRA, 2009). Eventualmente, animais parasitados por *E. canis* também podem apresentar mórulas no interior de outros leucócitos ou plaquetas (MURPHY et al., 1998; NAKAGHI et al., 2008), proteinúria (WANER et al., 1999; NEER; HARRUS, 2006) e glomerulopatias decorrentes de lesões incipientes do parênquima renal (CODNER; MASLIN, 1992).

De acordo com Iqbal e Rikihisa (1994) e Harrus et al. (1998), os sinais clínicos da fase aguda podem se resolver com ou sem tratamento, já a eliminação do parasita

é mais difícil. Assim, os cães permanecem infectados e passam à fase subclínica da doença.

A fase subclínica da doença pode variar de meses a anos após a infecção do animal (LAPPIN, 2006). Neste estágio não há sinais clínicos, porém encontram-se trombocitopenia, leucopenia (HARRUS et al., 2004) e altos títulos de anticorpos contra *E. canis* no soro revelam-se de forma marcante (IQBAL; RIKIHISA, 1994), possivelmente, devido à permanência da bactéria no baço do paciente (HARRUS et al., 2004).

As alterações presentes na fase crônica são decorrentes das reações imunes contra a bactéria intracelular, resultando em prostração, palidez de mucosas, dor abdominal, epistaxe, hemorragias, hepato-esplenomegalia, infiltrado inflamatório pulmonar, hifema, dor articular, déficit de nervos cranianos, convulsões, poliúria e polidipsia (LAPPIN, 2006). Ademais, o quadro de trombocitopenia revela-se grave na fase crônica, em decorrência da hipoplasia ou aplasia da medula óssea (NELSON; COUTO, 2001; GREENE, 2006).

O diagnóstico presuntivo da erliquiose monocítica canina é baseado no conjunto de alterações clínicas e hematológicas (DAGNONE; MORAIS; VIDOTTO, 2001). Em áreas endêmicas, a contagem de plaquetas é considerada teste de triagem, devido à alta frequência com que a trombocitopenia aparece em cães com *E. canis* (HARRUS; WANER, 2011).

O diagnóstico parasitológico é estabelecido mediante o encontro de mórulas, formas de propagação caracteristicamente encontradas nos casos de *E. canis* e materializadas como inclusões citoplasmáticas nos leucócitos ou plaquetas, ao exame de esfregaços sanguíneos. A pesquisa de mórulas a partir dos referidos esfregaços sanguíneos é simples, apresenta baixo custo, além de possibilitar o arquivo das preparações positivas para *E. canis* (NAKAGHI et al., 2008; FRITZ, 2009; UENO et al., 2009). Cabe ressaltar que a presença de inclusões citoplasmáticas permite o estabelecimento de diagnóstico definitivo para a enfermidade (VARELA, 2003), contudo sua ausência não elimina a hipótese de infecção pelo parasita (HOSKINS, 1991). Isto se deve à dificuldade de se encontrar as formas de propagação em mórula já que a bactéria raramente ultrapassa 1% das células infectadas (DAGNONE; MORAIS; VIDOTTO, 2001; ALBERNAZ et al., 2007), além do fato de muitos

examinadores não terem a experiência necessária para detectar a inclusão citoplasmática. É recomendado o diagnóstico diferencial para leptospirose, uma vez que seus sinais clínicos e laboratoriais assemelham-se aos da erliquiose monocítica canina (NEER; HARRUS, 2006).

O teste diagnóstico definitivo dá-se quando o gênero *Ehrlichia* é detectado molecularmente por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). É feita a pesquisa do DNA do agente, usando amostras de sangue circulante ou do baço (DAGNONE et al., 2003; BULLA et al., 2004). Adicionalmente, para animais infectados e negativos à PCR, poderão ser utilizadas provas sorológicas com vistas ao diagnóstico (NAKAGHI et al., 2008, tais como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o Immunocomb® (kit dot-ELISA) (OLIVEIRA et al., 2000; LAPPIN, 2006). A desvantagem imposta pelos métodos sorológicos é a falta de distinção entre uma infecção atual e uma exposição prévia. Além disso, também é possível ocorrer reação cruzada com outras espécies de *Ehrlichia* (DAGNONE; MORAIS; VIDOTTO, 2001).

De outra parte, o objetivo do tratamento é dar suporte ao animal e controlar a multiplicação do parasita utilizando-se de fármacos tais como tetraciclina, cloranfenicol, dipropionato de imidocarb e amicarbalida. Neste particular, há autores que contestam o uso do dipropionato de imidocarb, alegando que sua administração antes ou depois da doxiciclina não altera a resposta terapêutica de cães com EMC (SAINZ et al., 2000; SOUSA et al., 2004). Em contraposição, a administração de tetraciclina, como a doxiciclina é unânime e faz parte do tratamento de erliquiose em todas suas fases (NEER; HARRUS, 2006).

Do ponto de vista da evolução do quadro de erliquiose, frente ao tratamento, Shipov et al. (2008) sugerem que a contagem total de leucócitos, taxa de hematócrito, concentração sérica de potássio e tempo de tromboplastina parcial ativada se revelam como indicadores prognósticos facilmente obtidos.

## 2.2 Gamopatia

Embora a EMC cause lesões renais que podem diminuir ou ocasionar a perda total da capacidade de funcionamento dos rins (NEER; HARRUS, 2006), são poucas



as pesquisas que relacionam a avaliação morfofuncional renal com a erliquiose canina na fase aguda, o que dificulta o entendimento da relação entre a fisiopatogênese da referida doença com as lesões glomérulo-tubulares.

Além dos sinais clínicos de erliquiose, já descritos, o desequilíbrio de natureza imunológica pode levar ao desenvolvimento de glomerulopatias, conseqüente à deposição de imunocomplexos em nível glomerular (CODNER; MASLIN, 1992). Nestes casos, a proteinúria se revela como um marco inicial do transtorno renal e de sua disseminação (VADEN, 2004; HEIENE et al., 2007). Destarte, quando se considera a cronologia do tempo, verifica-se que há uma resposta imune celular desencadeada pela presença do microrganismo. No entanto, tal estímulo do sistema imune, que tem como fito debelar o parasito, acaba por patentear uma reação inflamatória que destrói progressivamente os glomérulos e os túbulos renais, levando à formação de tecido cicatricial afuncional (BARROS et al., 2006). Com o passar do tempo, ocorrem hialinização e fibrose das alças glomerulares, uma vez que são obstruídas pela produção excessiva de elementos da matriz extracelular e, mesmo que o estímulo inicial cesse, o trauma será perpetuado. Portanto, a seqüência de eventos acima referida reúne os elementos fisiopatológicos responsáveis pelo estabelecimento da doença renal crônica (LEES, 2004), em caninos acometidos por erliquiose.

Do ponto de vista da investigação da morfofuncionalidade renal, se há aumento da carga filtrada, diz-se que a proteinúria tem origem glomerular. Por outro lado, quando ocorre falha na reabsorção, subentende-se que a origem é tubular. O grau de proteinúria é leve, sempre que os componentes túbulo-intersticiais estão acometidos, já as glomerulopatias levam a um grau de proteinúria acentuada. Diante de tais assertivas fica evidente que a quantificação das proteínas na urina auxilia na localização do tipo de lesão predominante (POLZIN; OSBORNE, 1995; LEES, 2004). De qualquer forma, independentemente da origem topográfica inicial da lesão renal, inevitavelmente todos os componentes serão acometidos na medida da evolução do tempo. Assim, o monitoramento da proteinúria é essencial no acompanhamento do paciente acometido por erliquiose, principalmente, com vistas à resposta terapêutica (POLZIN; OSBORNE, 1995).

A infecção por *E. canis* promove aumento na produção de imunoglobulinas, que podem ser do tipo gama ou beta (KATAOKA; SANTANA; SEKI, 2006). Na erliquiose canina a alteração bioquímica mais comumente encontrada em todas as etapas é a hiperglobulinemia devido ao aumento de gamaglobulinas, estimulado por antígenos (HARRUS et al., 1999; BUSH, 2004). Gamopatias, tanto mono quanto policlonais, podem levar à deposição de imunocomplexos e são facilmente identificadas pela análise eletroforética das proteínas séricas ou plasmáticas (KATAOKA; SANTANA; SEKI, 2006), sendo que, de acordo com Harrus et al. (1999), a hipergamaglobulinemia que ocorre nos pacientes acometidos por EMC é geralmente policlonal.

A gamopatia policlonal caracteriza-se pelo aumento das globulinas do tipo gama, sendo vista no eletroforetograma como uma zona ampla ou difusa. Tal achado resulta da heterogenicidade de clones de plasmócitos e linfócitos B, que produzem uma mistura heterogênea de imunoglobulinas. Mesmo que estejam presentes os isótipos IgM, IgG ou IgA, há predomínio de apenas um deles (ECKERSALL, 2008). De outra parte, apesar de ocorrer em menor frequência na EMC (HARRUS et al., 1999), a forma monoclonal é caracterizada por picos agudos de imunoglobulinas, que podem se localizar na região beta, mas geralmente se limitam a região gama (BRAUND; EVERETT; ALBERT, 1978).

Segundo Kataoka, Santana e Seki (2006), a hipoalbuminemia decorre da perda proteica devido à nefropatia ou da diminuição relativa de albumina associada à hiperglobulinemia. Outras hipóteses para essa alteração seriam o extravasamento da proteína para o espaço intersticial, devido a alteração da permeabilidade vascular (LAPPIN, 2006), redução da ingestão de proteínas (SANTARÉM, 2003) ou ainda alguns sinais clínicos presentes em pacientes com EMC como anorexia, hiporexia, vômitos e diarreia também podem ser responsáveis pela redução na síntese proteica e pela má absorção entérica (BUSH, 2004). Nesses casos, o eletroforetograma das frações globulínicas pode ser conduzido tanto no soro quanto na urina (GIRAUDEL; PAGÈS; GUELFY, 2002).

Apesar dos estudos das funções renais apresentarem inúmeros indicadores funcionais que se prestam como fatores diagnósticos e prognósticos, não há um único teste capaz de avaliar todas elas conjuntamente (FINCO, 1995).

### 2.3 Eletroforese das proteínas

A eletroforese é um método que separa os diferentes tipos de proteínas séricas ou plasmáticas por meio da instauração de um campo elétrico em pH alcalino, possibilitando a migração das frações proteicas em diferentes velocidades, rumo ao ânodo. Em seguida, após adequada coloração, as frações aparecem como bandas de intensidade de cor variável, que são escaneadas com auxílio de um densitômetro computadorizado e plotadas numa curva eletroforética (THOMAS, 2000; ECKERSALL, 2008).

No caso do fracionamento das proteínas de diferentes fluidos corporais, a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) é o método mais amplamente utilizado e altamente confiável (KANEKO, 1997). Dentre as vantagens do uso do gel de poliacrilamida, incluem-se a ausência de cargas elétricas, que faz com que o gel forneça bandas proteicas nítidas, facilitando a visualização. Ademais, apresenta baixo custo e relativa simplicidade em sua utilização, além de possibilitar a detecção de concentrações proteicas bem baixas, e propiciar a identificação e quantificação de 20 a 30 frações proteicas (GORDON, 1995). Em termos comparativos, a técnica com auxílio de fitas de acetato de celulose, ou filme de agarose, consegue reconhecer apenas 5 a 7 proteínas (EDINGER et al., 1992).

Quando a proteinúria glomerular está presente, as barreiras de filtração são lesionadas tanto pela carga quanto pelo tamanho das proteínas. Nesta condição, com o uso do *clearance* de globulinas, que permite avaliação das proteínas globulínicas sanguíneas e urinárias, é possível diferenciar a proteinúria seletiva (peso molecular de 60 a 80 kDa - kilodalton) da não seletiva (peso molecular acima de 80 kDa) (SCHAEFER et al., 2011). Neste caso, avalia-se a permeabilidade capilar glomerular às macromoléculas. Por outro lado, quando está patente a proteinúria tubular, verifica-se de fato a ausência de reabsorção proteica nos túbulos, o que torna possível o encontro de proteínas de baixo peso molecular (GRAUER, 2005; BARROS et al., 2006).

No que concerne à resposta inflamatória de fase aguda, ela apresenta três grandes características e é desencadeada logo que a injúria tecidual é instalada.

Primeiramente, trata-se de uma resposta extremamente rápida, que se desenvolve antes da estimulação da resposta imune específica e, muitas vezes, antes mesmo do aparecimento dos sinais clínicos. Em segundo lugar, trata-se de um fenômeno de defesa com elevada inespecificidade, já que se desenvolve secundariamente a numerosas e diferentes condições que levam à injúria tecidual. E, por último, a produção e reposta das proteínas de fase aguda (PFA) é espécie-específica. Deve ser ressaltado que a resposta de fase aguda traduz o esforço empreendido pelo organismo para recuperação da homeostasia e eliminação da causa do desequilíbrio (CERÓN; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005). Em decorrência de tal esforço, há o desencadeamento de efeitos sistêmicos tais como hipertermia, elevação do cortisol sanguíneo, leucocitose, redução nas concentrações de tiroxina, ferro e zinco, alterações metabólicas e, inclusive, nas concentrações de proteínas plasmáticas, ou, PFA (ECKERSALL, 2000).

Então, quando uma PFA tem sua concentração aumentada no soro ou no plasma, em face de um desequilíbrio da homeostase, ela é denominada proteína de fase aguda positiva ( $\alpha_1$ -antitripsina,  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida, ceruloplasmina e haptoglobina). Porém, quando a referida concentração está diminuída ela é denominada proteína de fase aguda negativa (pré-albumina, albumina e transferrina) (GRUYS; OBWOLO; TOUSAINT, 1994; KANEKO, 1997; ECKERSALL, 2008). Outra característica importante das PFA é o fato de se subfracionarem em cadeias alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) e gama ( $\gamma$ ), de acordo com seu peso molecular e densidade de cargas (MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004; PETERSEN; NIELSEN; HEEGAARD, 2004; CERÓN; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005).

A  $\alpha_1$ -antitripsina e a  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida representam as proteínas da cadeia  $\alpha_1$ . Elas elevam-se rapidamente logo após a infecção ou injúria tecidual, no entanto, sua concentração é rapidamente normalizada após cessação do estímulo. Já as proteínas de cadeia  $\alpha_2$  (ceruloplasmina, haptoglobina,  $\alpha_2$ -macroglobulina e amiloide A sérica) têm como característica o aumento de sua concentração mais tardiamente, porém seus níveis permanecem elevados por várias semanas (KANEKO, 1997; MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004; CERÓN; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005).

As proteínas que integram a fração  $\beta$  (hemopexina, ferritina, fibrinogênio, proteína C reativa e amiloide A sérica) apresentam um perfil de elevação entre sete a dez dias, após o início do estímulo inflamatório, e suas concentrações podem continuar elevadas por várias semanas (KANEKO, 1997; MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004).

A fração  $\gamma$  do traçado eletroforético compreende as imunoglobulinas (IgA, IgM, IgG e IgE). Essas proteínas são sintetizadas por células do sistema imunológico quando há um estímulo antigênico, principalmente viral (KANEKO, 1997; MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004).

Tais proteínas são consideradas indicadoras de prognóstico, já que são de fundamental importância para revelar precocemente doenças subclínicas ou alterações fisiológicas do organismo, além de atuarem como instrumento no manejo do paciente e acompanhamento do tratamento (CERÓN; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005).

A imunoglobulina A (IgA), é uma proteína com peso molecular 139 kDa encontrada em altas concentrações em doenças infecciosas (KANEKO, 1997). Atua como anticorpo originário de células secretórias do trato intestinal e dos pulmões, e caracteriza-se por apresentar capacidade de neutralizar vírus e prevenir aderências de bactérias aos tecidos alvo (GERSHWIN, 2008). De acordo com Jain (1993), a lágrima, saliva, secreções respiratórias, gastrintestinais e genitourinárias de muitas espécies animais contém IgA. Desta forma, atribui-se-lhe a função de defesa localizada e proteção de várias superfícies do corpo contra invasão bacteriana e viral a essa proteína.

A ceruloplasmina (125 kDa) apresenta concentrações elevadas nos processos inflamatórios, infecciosos, virais e parasitários. Já, sua diminuição ocorre após o parto, desnutrição, deficiência na absorção de nutrientes, nefrose e moléstias infecciosas associadas à intoxicação por cobre (JAIN, 1993). Desempenha importante função no transporte de cobre necessário para manter e cicatrizar feridas, além de favorecer a produção de colágeno. Também protege células e tecidos contra compostos oxidantes gerados por fagócitos durante a batalha contra microrganismos, além de diminuir o compartimento de neutrófilos marginais (CERÓN; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005).

A transferrina é uma glicoproteína de peso molecular 79 kDa, considerada uma PFA negativa, assim como a albumina, e suas concentrações séricas tendem a diminuir diante de um processo inflamatório (KANEKO, 1997). Trata-se de glicoproteína de síntese hepática, que tem como função o transporte de ferro plasmático, e que cujo aumento da concentração plasmática está relacionado à deficiência de ferro (NAOUM; CERON; DOMINGOS, 1999). Naquelas situações, nas quais o organismo é invadido por microrganismos, a absorção de ferro intestinal é interrompida e a interleucina-1 estimula a secreção de transferrina e haptoglobina pelos hepatócitos, aumentando a incorporação de ferro no fígado. Desta forma, há redução na disponibilidade de ferro e, portanto, a invasão bacteriana é retardada (TIZARD, 2008). Isso explica sua atividade antibacteriana e antiviral (JAIN, 1993).

A albumina (69 kDa) é a primeira proteína a migrar em direção ao ânodo, na consecução da eletroforese, em cães hígidos. Em condições de higidez, é a proteína que apresenta maior concentração plasmática, correspondendo a 60% da concentração total de proteínas. Dentre suas funções destacam-se a manutenção da pressão coloidosmótica e o transporte de substâncias como ácidos graxos, colesterol, bilirrubina, óxido nítrico e outros íons (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008). Devido ao fato de ser uma PFA negativa, a diminuição de sua concentração é de difícil interpretação, pois também é afetada pelo estado nutricional, mecanismos de perdas proteicas e diminuição de sua síntese (ECKERSALL, 2008).

A imunoglobulina G (IgG) apresenta as subunidades de cadeia leve (35 kDa) e cadeia pesada (58 kDa). As cadeias pesadas de IgG são conhecidas como cadeias gama e são únicas para IgG (GERSHWIN, 2008). Trata-se da classe de anticorpos com maior concentração no soro. São responsáveis pela imunidade humoral do organismo e desempenham atividades como opsonização, aglutinação e fixação do complemento (JAIN, 1993).

A  $\alpha_1$ -antitripsina (AAT) (60 kDa) apresenta como sua principal função a neutralização das atividades de enzimas proteolíticas, no decorrer do processo inflamatório agudo. Devido a esta característica, sua síntese é estimulada durante a resposta inflamatória aguda (NAOUM; CERON; DOMINGOS, 1999).

A haptoglobina é uma glicoproteína de peso molecular 45 kDa (KANEKO, 1997). A referida proteína se liga a hemoglobina livre (tóxica e pró-inflamatória) no

plasma. Este complexo é fagocitado por células do sistema mononuclear fagocitário diminuindo o dano oxidativo associado com a hemólise (MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004). De acordo com Kogika et al. (2003), sua concentração aumenta em processos inflamatórios agudos, estresse, após o tratamento com glicocorticoesteróides, e, algumas vezes, em processos neoplásicos recentes. Por outro lado, diminui em síndromes hemolíticas podendo ser utilizada como um índice sensível nos estados hemolíticos (NAOUM; CERON; DOMINGOS, 1999; YANG et al., 2003).

A  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida (AAG) tem peso molecular por volta de 40 kDa (ECKERSALL, 2008). O fato desta proteína elevar-se lentamente, no soro, e manter sua concentração elevada por tempo prolongado é uma característica vantajosa na investigação de AAG, no estudo da fase aguda da inflamação, podendo fornecer informações de como ela reage na transição da fase aguda para crônica (HORADAGODA et al., 1999). A concentração sérica da AAG é alterada significativamente após um processo inflamatório (CONNER et al., 1989) ou infeccioso, sendo utilizada como parâmetro de eleição para avaliação do processo agudo (KOGIKA et al., 2003). De outra parte, trata-se de uma fração proteica que se liga a grande parte das drogas bloqueadoras e antiarrítmicas (DELLO et al., 1988). Este fato favorece o acompanhamento e manutenção da prescrição de tais fármacos durante a resposta de fase aguda, mesmo quando a principal proteína carreadora (albumina sérica) diminui sua concentração (MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004). Porém, a desvantagem reside na alteração da farmacocinética dos referidos bloqueadores e antiarrítmicos, já que a concentração plasmática de tais fármacos livres, pode diminuir se houver um aumento na concentração de AAG durante a resposta de fase aguda (IKENOUE et al., 2000).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Neste ensaio, objetivou-se avaliar, por meio do eletroforetograma sérico e urinário, as possíveis alterações precoces glomérulo-tubulares encontradas em cães com erliquiose na fase aguda, atendidos junto ao Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia - UFU e Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" da FCAV/UNESP, Câmpus Jaboticabal.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Análise epidemiológica da população amostral,
- Análises hematológicas,
- Análises bioquímico-séricas,
- Análises bioquímico-urinárias,
- Urinálise,
- Avaliação eletroforética das proteínas de fase aguda no soro,
- Avaliação eletroforética das proteínas de fase aguda na urina.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido nas dependências dos Hospitais Veterinários da Universidade Federal de Uberlândia – UFU e do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

### 4.1 Animais

Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal (protocolo 12544/14).

Ao final do estudo foram avaliados 63 cães, e dentre esses, foram selecionados 42 segundo os critérios de inclusão, atendidos junto ao Setor de Clínica Médica de Pequenos Animais dos Hospitais Veterinários da Universidade Federal de Uberlândia – UFU e do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, distribuídos em dois grupos experimentais, como a seguir:

- **Grupo Controle (GC):** o grupo controle constituiu-se de 18 cães saudáveis, de quaisquer gêneros, raças e idade, cujo bom estado de saúde foi avaliado com base em exames clínicos gerais e laboratoriais de rotina, de acordo com as normas de atendimento médico veterinário adotadas pelo Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV/UNESP, Jaboticabal – SP.
- **Grupo Doente (GD):** o grupo doente constituiu-se de 24 cães com erliquiose na fase aguda, de quaisquer gêneros, raças e idade. Estes animais apresentaram obrigatoriamente mórula de *E. canis* ao esfregaço sanguíneo, além de ser observado DNA de *Ehrlichia canis* por meio da técnica da nPCR e exibirem resultados positivos na pesquisa de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* da classe IgG. Por outro lado, foi condição obrigatória que todos os cães deste grupo fossem negativos para detecção de DNA de *Babesia* spp. pela técnica da nPCR, além de exibirem sorologia negativa na pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira* spp. das classes IgG e IgM. O diagnóstico para a enfermidade foi firmado no âmbito dos serviços competentes e por profissionais experientes e

qualificados. Os animais do referido grupo foram alocados junto ao Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia - UFU, Uberlândia - MG.

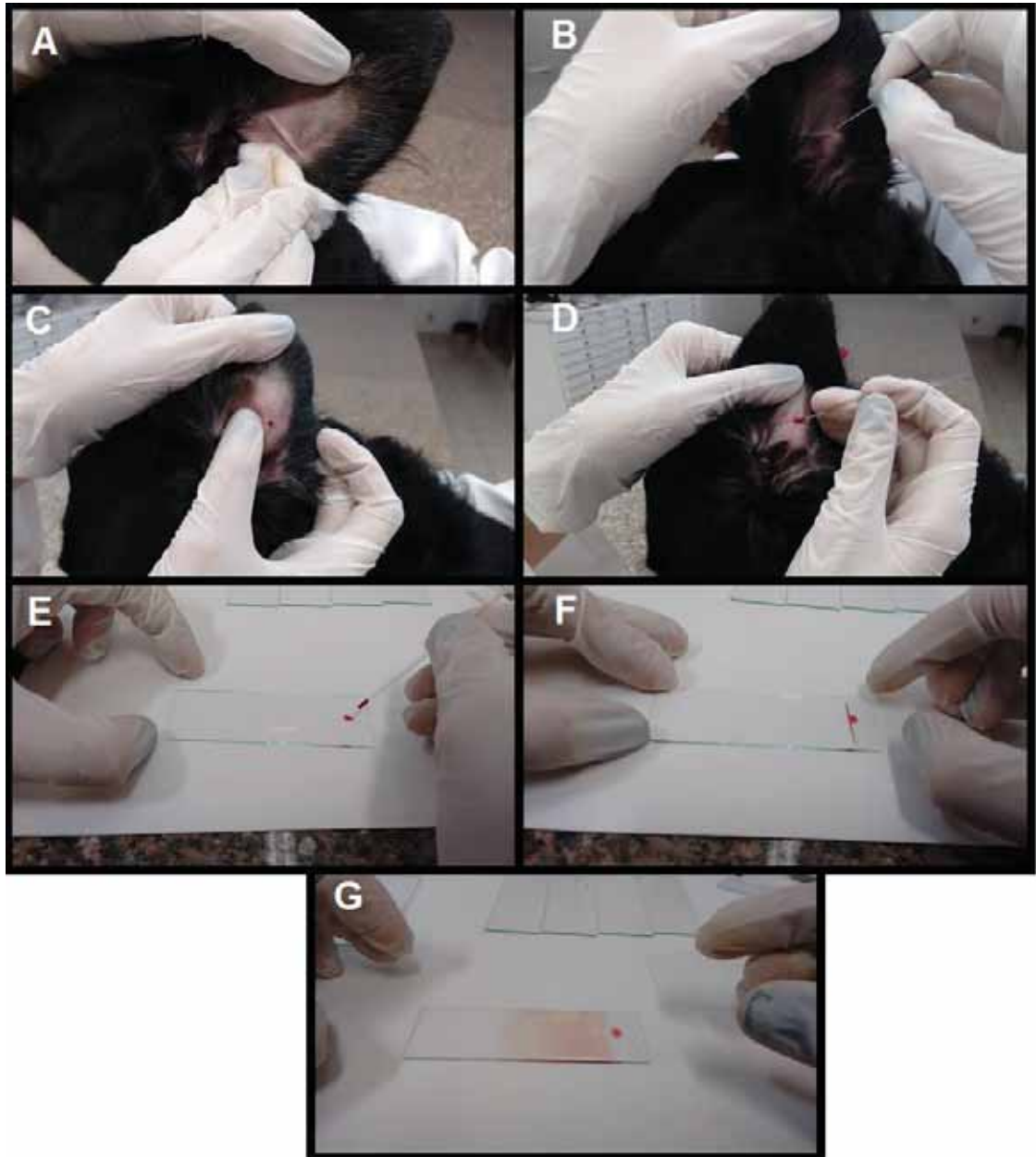
#### **4.2 Obtenção das amostras de soro e de urina**

Colheram-se 10 mL de sangue, de cada unidade experimental, por venopunção jugular externa, utilizando-se o sistema Vacutainer® em frascos com EDTA e sem o referido anticoagulante, cujos tubos foram previamente identificados, sendo 2 a 3 mL de sangue para a obtenção do hemograma e 7 a 8 mL destinados à obtenção das variáveis bioquímico-séricas. As alíquotas de soro foram obtidas após centrifugação do sangue, a 800 x g durante 5 minutos, transferidas para microtubos do tipo Eppendorf em subalíquotas de cerca de 2 mL e mantidas a -20°C até o momento das análises laboratoriais.

As amostras de urina foram obtidas por micção espontânea ou cateterização vesical, com auxílio de sondas uretrais de tamanhos apropriados para cada animal. Após a centrifugação, alíquotas do sobrenadante foram acondicionadas e mantidas a -20°C até o momento das análises eletroforéticas.

#### **4.3 Esfregaço de ponta de orelha**

Para realização do esfregaço de ponta de orelha foram conduzidas, primeiramente, tricotomia e antissepsia da região do pavilhão auricular externo a ser puncionado. Posteriormente, foi efetuada punção de um capilar auricular com auxílio de agulha hipodérmica estéril (25x7mm). A amostra de sangue foi obtida com auxílio de um tubo microcapilar. Foram confeccionados esfregaços sanguíneos sobre lâminas limpas e desengorduradas, a seguir corados com Rosenfeld modificado (Figura 1). Ato contínuo, após secagem dos esfregaços corados, pesquisaram-se mórulas de *Ehrlichia canis* e outros possíveis parasitas em toda a extensão da lâmina, utilizando-se de objetiva de imersão (100X) (FERREIRA NETO; VIANA; MAGALHÃES, 1982).



**Figura 1.** Ilustração do procedimento adotado para a realização da técnica de esfregaço de ponta de orelha. **(1A)** Tricotomia e antissepsia do pavilhão auricular externo com algodão embebido em álcool 70°. **(1B)** Punção do capilar auricular externo com uma agulha hipodérmica estéril (25x7mm). **(1C)** Sangue obtido da punção. **(1D)** Coleta da amostra de sangue com auxílio de um tubo microcapilar. **(1E)** Deposição da amostra de sangue em lâmina estéril. **(1F)** Posicionamento da lamínula para a confecção do esfregaço sanguíneo. **(1G)** Esfregaço sanguíneo pronto. Jaboticabal, 2015.

#### **4.4 Avaliação do quadro hematológico, bioquímico e urinário**

As análises laboratoriais hematológicas, bioquímicas e urinárias foram realizadas no laboratório de Patologia Clínica Veterinária “Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto” do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP e no Laboratório Clínico do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

##### **4.4.1 Hemograma**

As contagens globais de hemácias, leucócitos e plaquetas, taxa de hemoglobina e hematócrito, foram obtidos com o auxílio de um contador automático de células<sup>1</sup>. As fórmulas leucocitárias relativa e absoluta, bem como a avaliação morfológica das células do sangue, especialmente dos eritrócitos, foram conduzidas a partir de esfregaços sanguíneos corados com uma mistura de May-Grunwald-Giemsa (MGG).

##### **4.4.2 Bioquímica sérica e urinária**

As amostras de soro foram processadas para determinação de concentrações de creatinina (método de Jaffé modificado), ureia (método enzimático), alanino aminotransferase (método Reitman e Frankel), proteína total (método biureto), albumina (método verde de bromocresol), cálcio (reação cromogênica com cresolftaleína complexona), fósforo (método de Daly e Ertingshausen modificado), fosfatase alcalina (método da hidrólise da timolftaleína em meio alcalino) e globulina (subtração do teor sérico de albumina daquele de proteína total). Tais variáveis bioquímicas foram estudadas segundo preceitos do sistema Labtest<sup>®</sup> para análises laboratoriais em bioquímica-clínica, e leituras em espectrofotômetro semiautomático<sup>2</sup>.

Com relação às variáveis bioquímicas ensaiadas a partir de amostras de urina, foram determinadas as concentrações de creatinina (método de Jaffé modificado) e

---

<sup>1</sup> ABC Vet – HORIBA ABX – São Paulo-Brasil

<sup>2</sup> Labquest – Labtest Diagnóstica – Lagoa Santa – MG – Brasil

proteína (método vermelho de pirogalol – kit Sensiprot<sup>3</sup>). Da mesma maneira que para as provas bioquímico-sélicas, utilizou-se do sistema Labtest<sup>®</sup>, com leituras realizadas em espectrofotômetro semiautomático.

Para os cálculos da razão proteína/creatinina - UP/C urinária utilizou-se a fórmula:

$$\text{UP/C} = \frac{\text{UPt (mg/dL)}}{\text{Ucr (mg/dL)}}$$

\*Sendo: UP/C a razão proteínas creatinina urinária, UPt a concentração urinária das proteínas e UCr a concentração urinária de creatinina.

Neste estudo, os cães foram classificados de acordo com o sistema de subestadiamento de proteinúria da IRIS (2009) como: não proteinúrico (UPC <0,2), proteinúrico *borderline*/limítrofe (UPC ≥0,2 ou ≤0,5) ou proteinúrico (UPC >0,5).

#### 4.4.3 Aspectos físico-químicos e sedimentoscópicos da urina (urinálise)

O exame físico da urina foi realizado por meio da observação macroscópica. A densidade urinária foi mensurada em refratômetro digital<sup>4</sup> e os aspectos químicos foram mensurados por meio de tiras reativas de urina<sup>5</sup>. A quantidade de proteínas foi verificada por meio de kit de fitas reativas. Trata-se de um método amplamente utilizado na rotina clínica, devido ao seu baixo custo e simples utilização. Para a sedimentoscopia, as amostras foram centrifugadas<sup>6</sup> a 800 x g durante cinco minutos, sendo o sobrenadante reservado para determinação da UP/C e o sedimento para confecção da lâmina.

<sup>3</sup> Labtest Diagnóstica - Lagoa Santa - MG - Brasil

<sup>4</sup> Refratômetro de Mesa - UGI (1,000 - 1,050) - Atago - Tóquio - Japão

<sup>5</sup> Combur 10 Test UX<sup>®</sup> - Boehringer Mannheim S.A. - Buenos Aires - Argentina

<sup>6</sup> Centrífuga Excelsa Baby II, Modelo 206 – R FANEM<sup>®</sup> - São Paulo - Brasil

A preparação em lâmina foi analisada a fresco, à microscopia óptica<sup>7</sup>, empregando-se objetiva seca (40X) para realização das contagens de cada tipo de elemento figurado, por campo.

#### 4.4.4 Eletroforese de proteínas séricas e urinárias

A eletroforese das proteínas séricas e urinárias foi realizada a partir das amostras do Grupo Doente e do Grupo Controle. Tal técnica foi efetuada segundo a rotina do Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP. O fracionamento eletroforético foi realizado segundo a técnica descrita por LAEMMLI (1970) modificada, utilizando-se o sistema vertical de eletroforese<sup>8</sup>.

A polimerização do gel foi possível pela adição de tetrametiletilenodiamina (TEMED)<sup>9</sup> e persulfato de amônia a 10%.

A placa contendo o gel foi colocada em suporte apropriado<sup>10</sup> em contato com uma cuba superior contendo solução tampão constituída de tris-base, glicina, dodecil sulfato de sódio (SDS) e água destilada estéril suficiente para completar um litro de solução (Apêndice C). As placas foram preenchidas com o gel de separação a 10% e gel de empilhamento a 4%. As amostras para o fracionamento das proteínas foram preparadas utilizando-se 10 µL de soro sanguíneo diluídos em 30 µL de tampão-fosfato (PBS) e 20 µL de gel mix. Posteriormente, foram aquecidas sobre água em ebulição por 10 minutos. Uma alíquota de 5 µL das referidas amostras foi depositada no fosso do gel.

A placa foi colocada em suporte apropriado, em contato com solução tampão e submetida à corrente elétrica de 20 mA, em fonte adequada. Terminada a separação, o gel foi corado durante duas horas em solução de azul de comassie 0,2%, no agitador horizontal, para uma coloração uniforme e, em seguida, retirado o excesso de corante com solução descorante (Apêndice C), até que as frações se apresentassem nítidas.

---

<sup>7</sup> Microscópio Nikon Eclipse – E 200, Nikon Corporation , Tóquio, Japão

<sup>8</sup> PROTEAN II XI, VERTICAL ELETOPHORESIS CELLS®, BIO-RAD

<sup>9</sup> Sigma, ST. Louis-MO, Estados Unidos da América

<sup>10</sup> Fotodyne, Fotodyne Inc, Houston, TX, EUA

Os pesos moleculares e as concentrações das frações proteicas foram determinados por densitometria computadorizada<sup>11</sup> por meio do escaneamento dos géis das amostras. Para a identificação das proteínas foram utilizados marcadores<sup>12</sup> de pesos moleculares de 200, 116, 97, 66, 55, 45, 36, 29 e 20 kDa, além das proteínas purificadas albumina,  $\alpha_1$ -antitripsina, haptoglobina, ceruloplasmina, transferrina e IgG. Para a avaliação densitométrica das bandas proteicas confeccionaram-se curvas de referência a partir da leitura do marcador padrão.

A metodologia para realização da eletroforese das proteínas urinárias foi a mesma, porém, antes de serem utilizadas, as amostras passaram pelo processo de liofilização no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, do Departamento de Tecnologia da FCAV/UNESP. Alíquotas de 1000  $\mu$ L de cada amostra de urina foram transferidas para tubos Falcon de 15 mL e congeladas a temperatura de  $-18^\circ\text{C}$ . As amostras foram assim inseridas no liofilizador<sup>13</sup>. O processo de liofilização ocorreu durante 48 horas, à  $-40^\circ\text{C}$  e 4 atm de pressão. O produto final foi ressuscitado com 100  $\mu$ L de PBS e centrifugado durante 10 minutos ao final do processo. Foram utilizados 50  $\mu$ L do sobrenadante de cada amostra e 20  $\mu$ L de gel mix (corante). Foram levadas para o aquecimento, como descrito anteriormente e, a partir daí, o processo foi semelhante aquele aplicado ao soro dos animais.

#### **4.5 Avaliação sorológica e reação em cadeia da polimerase (PCR)**

As análises sorológicas e as de PCR foram realizadas nas amostras de soro dos animais, e seguiu-se os critérios de avaliação explicitados no item 4.1, para incluir cães no Grupo Controle ou Grupo Doente.

##### **4.5.1 “Dot-ELISA” para detecção de anticorpos anti-*Ehrlichia canis***

Os testes utilizados para detecção de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* da classe IgG foi realizado no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária “Prof. Dr. Joaquim

---

<sup>11</sup> Shimadzu CS-9301, Shimadzu Corp., Kyoto-Japão

<sup>12</sup> SIGMAMARKER™, wide range, 6,5 a 200 kDa, Sigma, Aldrich Biotechnology LP

<sup>13</sup> Savant, Super Modulyo, EUA

Martins Ferreira Neto” da FCAV/UNESP empregando-se kit<sup>14</sup> comercial. Utilizou-se a metodologia empregada e descrita pelo fabricante, a qual considera títulos positivos (reagentes) acima de 1:80.

#### **4.5.2 Técnica sorológica para detecção de anticorpos IgG e IgM anti-leptospira canina**

Os testes utilizados para detecção da presença de anticorpos anti-*Leptospira* spp. nos soros caninos foram também realizados nas dependências do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária “Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto” da FCAV/UNESP por meio de kits comerciais específicos para detecção de IgM<sup>15</sup> e IgG<sup>16</sup> seguindo as informações do fabricante.

#### **4.5.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para *Ehrlichia canis* e *Babesia* spp.**

As técnicas de PCR foram realizadas conforme as orientações e rotina do Laboratório de Imunoparasitologia Veterinária do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ/UNESP, Câmpus de Botucatu, SP, nas quais a extração do DNA de amostras do sangue total foi realizada empregando-se a nested PCR para detecção de *Ehrlichia canis* e *Babesia* spp.

### **4.6 Análise estatística**

Os resultados foram submetidos ao teste *t student* para amostras independentes com o intuito de verificar possíveis diferenças entre os animais do Grupo Controle e aqueles acometidos por erliquiose na fase aguda (GD). No caso em que a homogeneidade não foi satisfeita, aplicou-se a correção de *Welch para o teste t student* (PETRIE; WATSON, 2007). As variáveis que tiveram distribuição não paramétrica ou não Gaussiana foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney. Para

---

<sup>14</sup> Immunocomb<sup>®</sup>, Biogal, Israel

<sup>15</sup> Test-IT<sup>™</sup> *Leptospira canina* IgM, JMR Trading LTDA, Paraná, Brasil

<sup>16</sup> Immuno Comb *Leptospira canina* IgG, JMR Trading LTDA, Paraná, Brasil



cada variável observada no experimento foram apresentadas as estatísticas descritivas referentes à média e erro padrão de média. Para todos os efeitos considerou-se o nível de significância de  $p < 0,05$ .

Os resultados deste trabalho foram obtidos por meio do programa GraphPad Prism<sup>17</sup>, com exceção da análise urinária, a qual foi processada pelo programa R<sup>18</sup>, por meio do teste Qui-Quadrado.

---

<sup>17</sup> versão 4.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA

<sup>18</sup> R version 3.1.2 Copyright © 2014. The Foundation for Statistical Computing Platform, Pennsylvania, USA.

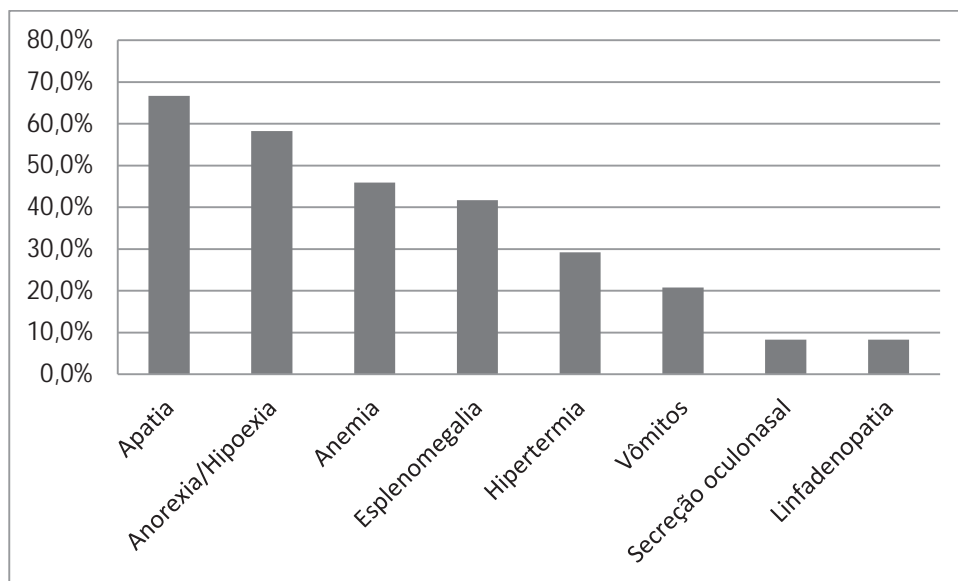
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Dados epidemiológicos da população amostral

O Grupo Controle (GC) compôs-se por sete fêmeas (38,9%) e onze machos (61,1%). Dezesesseis animais (88,9%) não possuíam raça definida, um pertencia à raça Pastor Alemão (5,6%) e um era da raça Fila Brasileiro (5,6%). As parcelas experimentais apresentaram idades que variaram entre 4 meses a 10 anos, sendo que 55,6% encontraram-se na faixa etária de 7 meses a 2 anos.

O Grupo Doente (GD) constituiu-se por quinze fêmeas (62,5%) e nove machos (37,5%). Os resultados mostram ocorrência significativamente mais alta em fêmeas com EMC, e, embora não seja o objetivo do estudo, esses dados corroboram com a literatura nacional descrita por Moreira et al. (2003) e Borin, Crivelenti e Ferreira (2009), em que 61,5% e 61,1% dos cães acometidos pela doença pertencem ao sexo feminino, respectivamente.

Os principais sinais clínicos e alterações observados ao exame físico nos cães portadores de mórulas de *Ehrlichia* spp. estão ilustrados na Figura 2 e foram semelhantes aos descritos na literatura (WANER et al., 1999; MOREIRA et al., 2003; FARIA, 2006; BORIN; CRIVELENTI; FERREIRA, 2009; MUNHOZ, 2009).



**Figura 2.** Principais sinais clínicos e alterações observados ao exame físico nos cães portadores de mórulas de *Ehrlichia* spp (GD). Jaboticabal, 2015.

Outros sinais que apareceram em menor frequência foram oligodipsia, dificuldade locomotora dos membros posteriores, tosse, dispnéia, úlcera de córnea e epistaxe. Cada uma destas variáveis apresentou um caso (4,2%). Um dado importante, e surpreendente, é que 62,5% dos proprietários informaram que os cães não tiveram contato com carrapatos, o que também foi observado no estudo de Borin, Crivelenti e Ferreira (2009).

Os critérios adotados para inclusão dos cães no Grupo Doente foram o encontro de mórulas por meio da técnica do esfregaço sanguíneo e a detecção do DNA de *E. canis* pela técnica da nPCR. No entanto, estudos mostram que nem sempre a inclusão intracitoplasmática é encontrada com facilidade. Segundo Nakaghi et al. (2008), apenas 3,3% dos animais pesquisados foram positivos ao exame do esfregaço sanguíneo, número inferior ao encontrado no estudo de Borin, Crivelenti e Ferreira (2009), no qual 5,7% dos cães apresentaram mórula de *Ehrlichia* spp.

É importante salientar que nem todos os animais positivos ao esfregaço sanguíneo apresentam o mesmo resultado por meio da nPCR, como mostrou o estudo de Albernaz et al. (2007). O contrário também é válido, já que no ensaio de Nakaghi et al. (2008), dos 30 animais analisados, apenas um foi positivo para a técnica de esfregaço sanguíneo, enquanto dezesseis positivaram ao teste de PCR. Para Mylonakis et al. (2003), uma possível explicação seria a dificuldade imposta ao encontro de mórulas e inclusões citoplasmáticas em leucócitos. É sabido que a técnica de pesquisa de mórula em esfregaço sanguíneo pode apresentar resultados inferiores àqueles obtidos por meio de outras técnicas de diagnóstico. Também é importante levar em consideração a fase da doença, já que as infecções subclínicas e crônicas apresentam baixa parasitemia (CASTRO et al., 2004).

## 5.2 Hemograma

Após a obtenção e análise das variáveis eritroleucométricas, verificou-se haver diferença significativa entre os grupos estudados no que concerne à contagem global de hemácias, hemoglobina, hematócrito, contagem global de leucócitos, valores absolutos de eosinófilos, neutrófilos bastonetes, segmentados e contagem global de

plaquetas. Valores absolutos de linfócitos ( $p=0,68$ ) e monócitos ( $p=0,12$ ) não variaram entre os grupos (Tabela 1).

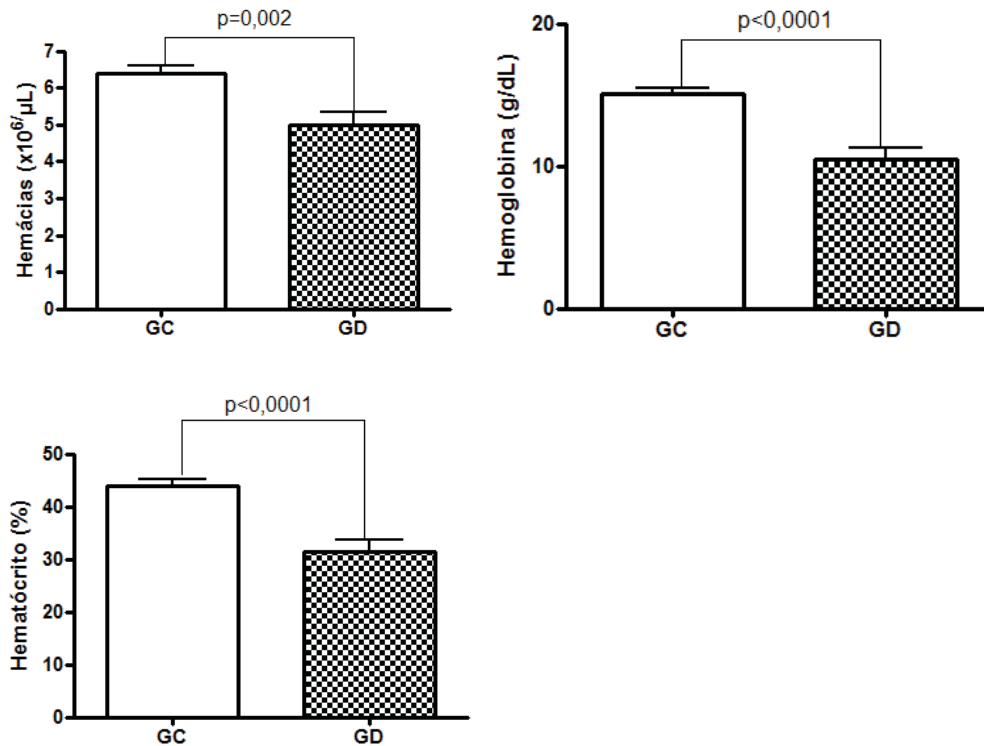
**Tabela 1.** Estatística descritiva (média  $\pm$  erro padrão da média) e valores de P do teste *t student* para contagem global de hemácias, hemoglobina, hematócrito, contagem global de leucócitos, valores absolutos de eosinófilos, neutrófilos bastonetes e segmentados, linfócitos, monócitos e contagem global de plaquetas dos animais do Grupo Controle (GC) e dos cães com erliquiose (GD) na fase aguda. Jaboticabal, 2015.

Parâmetros	GC	GD	Valores de P
<b>Hemácias</b> <sup>2</sup> ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	6,39 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>	5,00 $\pm$ 0,35 <sup>b</sup>	0,002
<b>Hemoglobina</b> <sup>2</sup> (g/dL)	15,04 $\pm$ 0,46 <sup>a</sup>	10,47 $\pm$ 0,76 <sup>b</sup>	<0,0001
<b>Hematócrito</b> <sup>2</sup> (%)	43,91 $\pm$ 1,19 <sup>a</sup>	31,43 $\pm$ 2,12 <sup>b</sup>	<0,0001
<b>Leucócitos totais</b> <sup>2</sup> ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	9,41 $\pm$ 0,48 <sup>a</sup>	6,95 $\pm$ 0,64 <sup>b</sup>	0,004
<b>Eosinófilos</b> <sup>2</sup> ( $/\mu\text{L}$ )	836,6 $\pm$ 180,5 <sup>a</sup>	152,7 $\pm$ 46,0 <sup>b</sup>	0,002
<b>Neutrófilos bastonetes</b> <sup>1</sup> ( $/\mu\text{L}$ )	4,22 $\pm$ 4,22 <sup>a</sup>	425,6 $\pm$ 138,1 <sup>b</sup>	<0,0001
<b>Neutrófilos segmentados</b> ( $/\mu\text{L}$ )	5.871 $\pm$ 394,6 <sup>a</sup>	3.740 $\pm$ 447,1 <sup>b</sup>	0,001
<b>Linfócitos</b> ( $/\mu\text{L}$ )	2.033 $\pm$ 230,6 <sup>a</sup>	2.173 $\pm$ 238,5 <sup>a</sup>	0,68
<b>Monócitos</b> <sup>1</sup> ( $/\mu\text{L}$ )	442,2 $\pm$ 50,43 <sup>a</sup>	462,5 $\pm$ 129,1 <sup>a</sup>	0,12
<b>Plaquetas</b> ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	276,3 $\pm$ 12,78 <sup>a</sup>	90,13 $\pm$ 12,43 <sup>b</sup>	<0,0001

\* Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os grupos ( $p<0,05$ ).<sup>1</sup> Valores submetidos ao teste de Mann-Whitney para atender aos padrões de homogeneidade das amostras. <sup>2</sup> Valores não paramétricos submetidos à correção de *Welch*.

De acordo com Woody e Hoskins (1991), Moreira et al. (2003), Waldemarin et al. (2003) e Greene (2006), a erliquiose canina leva a alterações hematológicas, como foi observado por meio da avaliação das médias obtidas para hemácias, hematócrito e hemoglobina (Tabela 1 e Figura 3), permitindo constatar a anemia em 79,1% dos cães do GD. Este resultado assemelha-se com aquele encontrado por Borin, Crivelenti e Ferreira (2009), em que 82,3% dos animais com EMC também apresentaram quadro de anemia. De acordo com Moreira et al. (2003), a atuação do sistema monocítico-

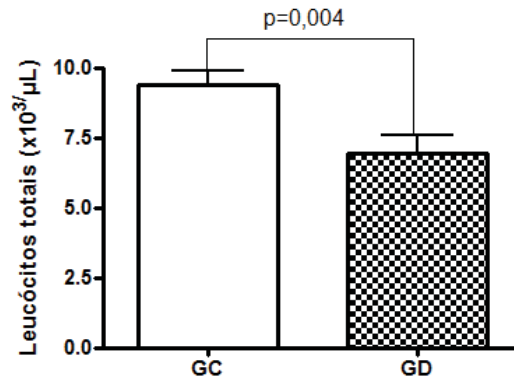
fagocitário, a lise celular pela ação do sistema complemento e a supressão da eritropoese na medula óssea são algumas das possíveis causas para quadros anêmicos.



**Figura 3.** Contagem global de hemácias, concentração de hemoglobina e valores de hematócrito dos animais do Grupo Controle (GC) e dos cães com erliquiose (GD) na fase aguda. Jaboticabal, 2015.

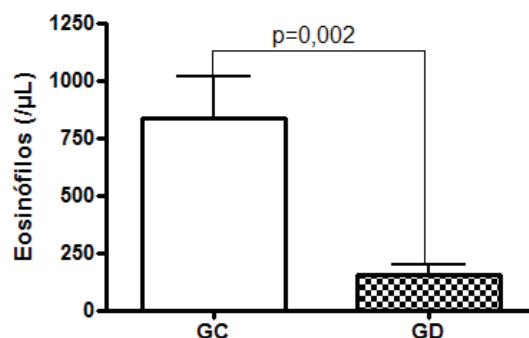
Os resultados obtidos para as variáveis leucocitárias do Grupo Doente apresentaram média (Tabela 1 e Figura 4) dentro dos padrões de normalidade (Apêndice A), no entanto 41,7% dos cães com erliquiose na fase aguda apresentaram leucopenia. Este resultado é superior aqueles descritos por Moreira et al. (2003), Waldemarin et al. (2003), Mendonça et al. (2005) e Borin, Crivelenti e Ferreira (2009). De acordo com Harrus et al. (1999), Meneses et al. (2008), Harrus e Wanner (2011) e Rondelli (2012), a leucopenia é um achado marcante no hemograma de animais infectados por *E. canis* nas fases aguda e crônica, e normalmente vem acompanhado de trombocitopenia moderada a severa. Segundo Santarém (2003), tal achado decorre do sequestro e destruição dos leucócitos como uma resposta inflamatória à infecção pela *Ehrlichia* spp., que tende a desaparecer com o tempo. A contagem

global dos leucócitos encontrou-se dentro dos padrões de normalidade para a espécie canina em 58,3% dos animais do GD. Estes resultados condizem com os achados de Waldemarin et al. (2003) e Borin, Crivelenti e Ferreira (2009).



**Figura 4.** Contagem global de leucócitos dos animais do Grupo Controle (GC) e dos cães com erliquiose (GD) na fase aguda. Jaboticabal, 2015.

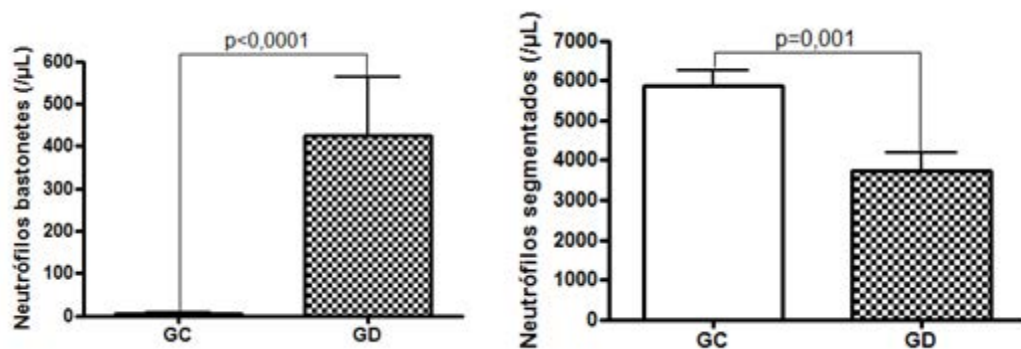
Do total de animais positivos para *E. canis*, 66,7% apresentaram eosinopenia (Figura 5), tal qual relatado nos trabalhos de Sousa (2006), Albernaz et al. (2007) e Borin, Crivelenti e Ferreira (2009), porém em outras proporções. Esta alteração leucocitária é um achado importante para a doença na fase aguda, porém seu mecanismo não está bem esclarecido. Existe a possibilidade dos eosinófilos sofrerem lise intravascular, sequestro reversível por órgãos do sistema monocítico fagocitário e migração para os tecidos (MENDONÇA et al., 2005; ALBERNAZ et al., 2007).



**Figura 5.** Valores absolutos obtidos para eosinófilos em animais do Grupo Controle (GC) e cães com erliquiose (GD) na fase aguda. Jaboticabal, 2015.

Foi observado desvio nuclear de neutrófilos à esquerda (DNNE) em 25% dos cães deste estudo (Figura 6). Este achado corrobora com os de Waddle e Littman

(1988), que encontraram aumento do número de bastonetes em 26% dos animais, e diferem dos de Mendonça et al. (2005) e Borin, Crivelenti e Ferreira (2009), que encontraram esta alteração em 50,46% e 67% dos animais verificados, respectivamente. Possivelmente, o DNNE ocorre devido à migração, sequestro e destruição de leucócitos nos órgãos e tecidos onde acontece a multiplicação do agente, vasculite e focos de inflamação (MENDONÇA et al., 2005).



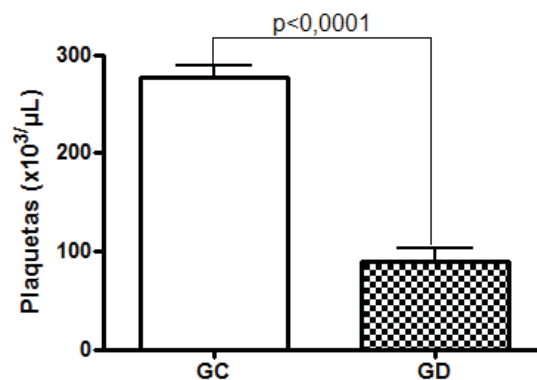
**Figura 6.** Valores absolutos obtidos para neutrófilos bastonetes e segmentados em animais do Grupo Controle (GC) e em cães com erliquiose (GD) na fase aguda. Jaboticabal, 2015.

Dos 24 cães doentes, somente dois (8,3%) apresentaram linfopenia. Estes resultados são inferiores aqueles encontrados por Mendonça et al. (2005), Sousa (2006) e Albernaz et al. (2007). De acordo com Mendonça et al. (2005), a lise ou sequestro dos linfócitos pelos tecidos, principalmente o tecido linfóide, leva à diminuição na contagem de linfócitos.

A monocitopenia foi encontrada em 16,7% dos animais do GD. Esta contagem baixa de monócitos também foi encontrada nos trabalhos de Sousa (2006) e Borin, Crivelenti e Ferreira (2009), com 15,38% e 12,81%, respectivamente. A baixa frequência dos cães com esta alteração confirma que a monocitopenia é um achado insignificante no leucograma (WEISER, 2007).

A trombocitopenia é considerada a alteração hematológica mais comum em cães infectados por *E. canis* (ALMOSNY, 2002; MOREIRA et al., 2003; ETTINGER; FELDMAN, 2004). Neste trabalho, observou-se trombocitopenia em 95,8% dos cães pertencentes ao Grupo Doente (Figura 7), corroborando os trabalhos de Wadlle e

Littman (1988), Mendonça et al., (2005), Borin, Crivelenti e Ferreira (2009), Munhoz (2009), Rondelli (2012) e Alves (2013). A diminuição na concentração de plaquetas no sangue de cães com erliquiose aparece em todas as fases da doença, diferindo, apenas, com relação ao mecanismo ensejador. Na fase aguda, a trombocitopenia se deve ao aumento do consumo ou sequestro esplênico das plaquetas; já na fase crônica, ocorre aplasia medular. Fatores inflamatórios e imunológicos também podem ser responsáveis pelo consumo e destruição das plaquetas (SOUSA, 2006; BAKER, 2007).



**Figura 7.** Valores médios obtidos para contagem global de plaquetas em animais do Grupo Controle (GC) e em cães com erliquiose (GD) na fase aguda. Jaboticabal, 2015.

No entanto, esta alteração hematológica não deve ter um peso decisivo no diagnóstico. De acordo com Santos et al. (2009), 53,3% dos animais que compuseram seu estudo foram positivos para *E. canis*, com auxílio da técnica nPCR, mas, 46,7% dos cães trombocitopênicos não apresentaram o parasita. Tais dados comprovam que animais não trombocitopênicos podem ser positivos na PCR para erliquiose (BULLA et al., 2004) e que é impossível confirmar diagnóstico para EMC baseando-se apenas na diminuição numérica das plaquetas.

Neste ensaio, apenas um (4,2%), dos vinte e quatro cães positivos para erliquiose na fase aguda, apresentou trombocitose. Sousa (2006) encontrou resultado semelhante em seu experimento, em que um dos treze animais positivos na PCR para *E. canis* apresentou trombocitose. Achado que não fornece subsídios a qualquer juízo de conclusão.



### 5.3 Bioquímica sérica

Os valores de estatística descritiva das variáveis bioquímico-séricas encontram-se nas Tabelas 2 e 3.

**Tabela 2.** Estatística descritiva (média  $\pm$  erro padrão da média) e valores de P do teste *t student* da concentração sérica de creatinina, ureia, fósforo e cálcio dos animais do Grupo Controle (GC) e dos cães com erliquiose (GD) na fase aguda. Jaboticabal, 2015.

Parâmetros	GC	GD	Valores de P
<b>Creatinina</b> (mg/dL)	1,11 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	0,81 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	0,0004
<b>Ureia</b> (mg/dL)	31,8 $\pm$ 2,8 <sup>a</sup>	33,25 $\pm$ 3,18 <sup>a</sup>	0,75
<b>Fósforo</b> <sup>2</sup> (mg/dL)	4,32 $\pm$ 0,28 <sup>a</sup>	5,08 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup>	0,10
<b>Cálcio</b> (mg/dL)	9,98 $\pm$ 0,36 <sup>a</sup>	9,59 $\pm$ 0,27 <sup>a</sup>	0,38

\* Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).<sup>1</sup> Valores submetidos ao teste de Mann-Whitney para atender aos padrões de homogeneidade das amostras. <sup>2</sup> Valores não paramétricos submetidos à correção de *Welch*.

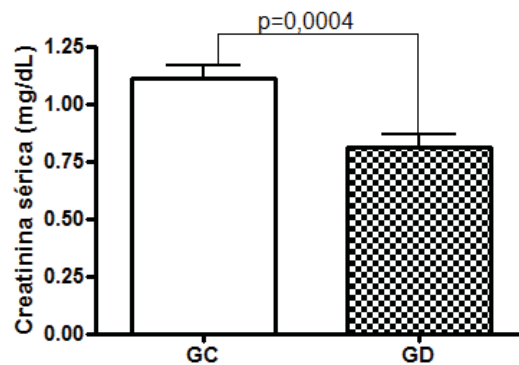
**Tabela 3.** Estatística descritiva (média  $\pm$  erro padrão da média) e valores de P do teste *t student* da atividade sérica de ALT (alanina aminotransferase), FA (fosfatase alcalina) e concentração sérica de proteína total, albumina e globulinas dos animais do Grupo Controle (GC) e dos cães com erliquiose (GD) na fase aguda. Jaboticabal, 2015.

Parâmetros	GC	GD	Valores de P
ALT <sup>1</sup> (U/L)	34,11 $\pm$ 4,16 <sup>a</sup>	46,33 $\pm$ 11,79 <sup>a</sup>	0,71
FA <sup>2</sup> (U/L)	120,4 $\pm$ 13,35 <sup>a</sup>	176,6 $\pm$ 43,34 <sup>a</sup>	0,23
Proteína total <sup>2</sup> (g/dL)	5,53 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	6,15 $\pm$ 0,29 <sup>a</sup>	0,06
Albumina <sup>2</sup> (g/dL)	3,06 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	2,78 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	0,11
Globulina <sup>2</sup> (g/dL)	2,42 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	3,38 $\pm$ 0,31 <sup>b</sup>	0,01

\* Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).<sup>1</sup> Valores submetidos ao teste de Mann-Whitney para atender aos padrões de homogeneidade das amostras. <sup>2</sup> Valores não paramétricos submetidos à correção de *Welch*.

A obtenção e cotejamento das variáveis bioquímico-séricas permitiram verificar diferenças significativas entre os grupos estudados no que diz respeito à concentração sérica de creatinina e globulina (Figura 8 e Figura 9).

A análise bioquímica permitiu constatar diminuição na concentração sérica de creatinina no GD em comparação ao GC (Figura 8). Apenas 12,5% dos cães do grupo infectado por *E. canis* apresentaram níveis de creatinina sérica abaixo dos valores de referência para a espécie, o restante dos animais encontraram-se dentro dos valores de normalidade (Apêndice B), indicando pouco envolvimento do agente etiológico aos órgãos aos quais está relacionado. Meneses et al. (2008) também não encontraram resultados fora dos padrões em cães infectados naturalmente por *E. canis*, em Salvador e região metropolitana da Bahia. Entretanto, Fernandes et al. (2008) obtiveram valores médios de creatinina aumentados em 34% dos cães em seus estudos. Apesar de existir uma significativa diminuição na concentração de creatinina sérica no presente estudo, essa provavelmente não tenha significância clínica em decorrência dos valores estarem dentro dos padrões de normalidade para a espécie e, além do mais, a concentração de ureia não apresentou diferença entre os grupos estudados. Outra explicação, ainda que menos provável, possa ser em decorrência da diminuição da massa muscular em decorrência da doença.

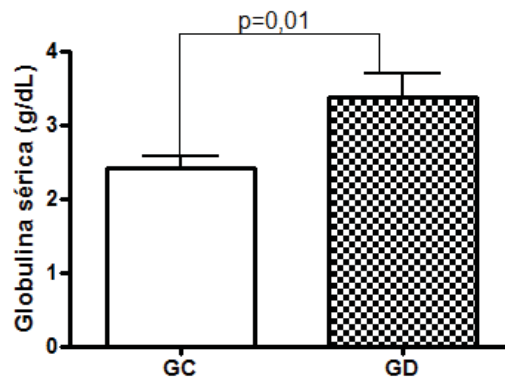


**Figura 8.** Concentrações séricas de creatinina em animais do Grupo Controle (GC) e em cães com erliquiose (GD) na fase aguda. Jaboticabal, 2015.

Em relação à concentração sérica de ureia, apenas 1 cão (4,2%) do GD mostrou valor acima do padrão para a espécie, o restante situou-se dentro dos limites para a espécie canina (Apêndice B). Os resultados encontrados por Harrus, Waner e Bark (1997) e Sousa et al. (2010) em trabalhos com cães acometidos por infecção natural de *E. canis*, foram superiores àqueles encontrados no presente estudo, com 8,3% e 35%, respectivamente. Os dados obtidos por Alves (2013) assemelham-se aos do presente estudo, já que foram encontradas médias aumentadas no grupo dos cães com erliquiose na fase subclínica em relação ao seu grupo controle, no entanto os valores encontraram-se dentro da faixa de normalidade para a espécie. Já Fernandes et al. (2008), trabalhando com cães acometidos por erliquiose, observaram, no que concerne à taxa de ureia sérica, que 74% da sua população amostral apresentava-se dentro dos limites da normalidade. Tanto o valor encontrado acima da faixa de normalidade, quanto os valores mais elevados dentro da mesma podem ser justificados pelo mecanismo de elevação nas taxas do metabolismo proteico ou pela diminuição da taxa de filtração glomerular dos cães enfermos. É provável que esta última assertiva seja válida desde que os níveis de ureia estejam associados à proteinúria, que sugerem a existência de uma lesão glomerular (ALVES, 2013).

De acordo com a análise bioquímico-sérica referente à concentração de globulina, foi possível verificar que houve aumento em seu nível no GD (Figura 9). A hiperglobulinemia foi verificada em 16,7% dos animais deste grupo, número inferior àquele encontrado por Sousa et al. (2010), com 41,6% dos cães infectados por *E. canis*, no estado do Mato Grosso, apresentando aumento da concentração sérica de

globulinas. Kataoka, Santana e Seki (2006) também observaram quadro de hiperglobulinemia em cães infectados naturalmente por *E. canis*. Uma possível explicação para essa alteração é a elevação das frações gama, induzidas pela resposta imune do hospedeiro em relação ao parasita (HARRUS et al., 1999; BUSH, 2004). As consequências podem ser aumento de viscosidade sérica e hemorragia causada pela intervenção física com as plaquetas, associado a alterações nos fatores de coagulação e danos ao endotélio vascular e estase venosa (GOULD et al., 2000). Em contrapartida, 37,5% dos pacientes no presente estudo apresentaram quadro de hipoglobulinemia, enquanto que no estudo realizado no estado de Mato Grosso, Sousa et al. (2010) encontraram 47,9% do total de animais com essa mesma alteração. Essa diminuição na concentração sérica de globulinas pode se justificar pelo fato de distúrbios entéricos ou hepáticos graves ocasionarem perda de globulina intestinal (SOUSA et al., 2010).



**Figura 9.** Concentração sérica de globulina em animais do Grupo Controle (GC) e dos cães com erliquiose (GD) na fase aguda. Jaboticabal, 2015.

Os resultados do GD, representados pelas médias das concentrações séricas de cálcio e fósforo (Tabela 2), mostram que as variáveis encontraram-se dentro dos limites de normalidade para a espécie canina (Apêndice B), além de não apresentarem diferença significativa entre os grupos estudados. Analisando os animais individualmente, verificou-se que 33,3% dos cães com erliquiose na fase aguda apresentaram hipocalcemia, enquanto 33,3% exibiram hiperfosfatemia. De acordo com Fettman (2007), a excreção urinária de fósforo depende da filtração glomerular e da reabsorção tubular, que, no presente estudo possivelmente estão comprometidas, já que foram encontradas, por meio da eletroforese de urina,

proteínas de alto e baixo peso molecular nos cães do GD. Diante destas lesões, pode haver redução do fluxo sanguíneo renal e da TFG, que resultaria em hiperfosfatemia e, por mecanismos compensatórios, a hipocalcemia secundária (FETTMAN, 2007).

Apesar dos níveis de albumina sérica do Grupo Doente, ilustrados por suas médias (Tabela 3), estarem dentro dos padrões de referência para normalidade (Apêndice B), 41,7% dos cães apresentaram hipoalbuminemia. Esta alteração também foi encontrada por Fernandes et al. (2008) e Rondelli (2012). Uma possível explicação para o quadro de hipoalbuminemia em cães com erliquiose na fase aguda é o extravasamento dessa proteína para o espaço intersticial, devido a alteração da permeabilidade vascular (LAPPIN, 2006). Outra hipótese é a redução da ingestão de proteínas (SANTARÉM, 2003) ou ainda um mecanismo compensatório para o estado de hiperglobulinemia observado em cães acometidos pela enfermidade (HARRUS et al., 1996), e verificado em 16,7% dos animais doentes. Além disso, alguns sinais clínicos presentes no GD como anorexia, hiporexia, vômitos e diarreia também são responsáveis pela redução na síntese proteica e pela má absorção entérica em casos de diminuição na concentração de albumina (BUSH, 2004).

A hiperproteinemia na fase aguda da EMC está associada ao aumento de gamaglobulinas em resposta à circulação e imunogenicidade da bactéria (HARRUS et al., 1996) e foi encontrada em 8,3% dos animais analisados neste estudo. No entanto, também houve considerável número de animais com hipoproteinemia (37,5%), resultado semelhante também foi encontrado por Santarém (2003). Uma possível explicação é o quadro de anemia levar a diminuição na concentração sérica das proteínas totais, ou como sugere Woody e Hoskins (1991), a albumina ser eliminada pela urina como forma de compensação para diminuir a concentração das proteínas plasmáticas com o objetivo de evitar o aumento da viscosidade do sangue. No entanto, é importante lembrar que os níveis de proteína total podem estar dentro da faixa de normalidade para a espécie canina, como foi constatado em 50% dos animais deste estudo. Isso, provavelmente se deve ao estado de equilíbrio entre os estados de hipoalbuminemia e hiperglobulinemia, encontrados neste estudo.

Os níveis de atividade sérica da ALT mostraram-se elevados apenas em 12,5% dos animais do GD. Este resultado corrobora o achado de Sousa et al. (2010), com 12,8% dos animais acometidos por *E. canis*. No entanto, é bem inferior aos resultados

encontrados por Fernandes et al. (2008), com 26% dos animais com elevação na atividade sérica da ALT. Em contrapartida, o número de cães com aumento na atividade sérica de FA no GD foi de 33,3% neste estudo. Já Sousa et al. (2010) observou 12,8% e, Fernandes et al. (2008), em 74% dos cães com EMC. Tais alterações podem ter ocorrido devido ao dano hepático ou estresse sistêmico causado por diversas doenças, inclusive pela EMC (ALMOSNY, 2002).

#### **5.4 Eletroforese do soro**

A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) identificou proteínas no soro, cujos pesos moleculares variaram entre 23 e 139 kDa. Para os cães saudáveis e com erliquiose na fase aguda estudados neste ensaio, foram selecionadas, por meio do eletroforetograma 11 frações proteicas no traçado densitométrico dos soros sanguíneos. Somente nove foram identificadas nominalmente: imunoglobulina A (IgA) (139 kDa), ceruloplasmina (125 kDa), transferrina (79 kDa), albumina (69 kDa),  $\alpha$ 1-antitripsina (60 kDa), IgG de cadeia pesada (58 kDa), haptoglobina (45 kDa),  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida (40 kDa) e IgG de cadeia leve (35 kDa). As proteínas nominalmente não identificadas foram intituladas de acordo com seus pesos moleculares: proteína de peso molecular 23 kDa e proteína de peso molecular 44 kDa.

As proteínas de fase aguda foram classificadas de acordo com a resposta que apresentam. A proteína C reativa e amiloide A sérica são consideradas como resposta principal, já a  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida, ceruloplasmina e haptoglobina são classificadas como resposta moderada, e, por último na classe de resposta negativa, encontram-se a albumina e a transferrina (KANEKO, 1997; CERÓN, ECKERSALL, MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005; ECKERSALL, 2008). No presente estudo não houve nenhuma PFA com resposta principal. No grupo de resposta moderada, encontraram-se  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida, ceruloplasmina e haptoglobina, e com resposta negativa a albumina.

Neste ensaio, as proteínas de fase aguda ceruloplasmina,  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida, transferrina e haptoglobina, apresentaram-se como positivas, sendo que somente nas duas últimas foram observadas diferenças significativas entre os grupos

estudados. Já a albumina e  $\alpha$ 1-antitripsina, comportaram-se como PFA negativas, já que suas concentrações mostraram-se estatisticamente menores no GD.

Os valores de estatística descritiva das concentrações séricas das frações proteicas obtidas em gel de poliacrilamida encontram-se na Tabela 4.

**Tabela 4.** Estatística descritiva (média  $\pm$  erro padrão da média) e valores de P do teste *t student* das concentrações séricas das frações proteicas (mg/dL) obtidas em gel de poliacrilamida em animais do Grupo Controle (GC) e em cães com erliquiose (GD) na fase aguda. Jaboticabal, 2015.

Parâmetros	GC	GD	Valores de P
<b>IgA<sup>2</sup></b> (mg/dL)	15,26 $\pm$ 2,29 <sup>a</sup>	22,3 $\pm$ 3,91 <sup>a</sup>	0,13
<b>Ceruloplasmina<sup>2</sup></b> (mg/dL)	30,41 $\pm$ 4,56 <sup>a</sup>	64,30 $\pm$ 17,06 <sup>a</sup>	0,07
<b>Transferrina</b> (mg/dL)	181,4 $\pm$ 20,14 <sup>a</sup>	311,6 $\pm$ 25,94 <sup>b</sup>	0,0007
<b>Albumina<sup>2</sup></b> (mg/dL)	3480 $\pm$ 89,16 <sup>a</sup>	2905 $\pm$ 160,1 <sup>b</sup>	0,004
<b><math>\alpha</math>1-antitripsina</b> (mg/dL)	193,1 $\pm$ 9,15 <sup>a</sup>	174,9 $\pm$ 11,53 <sup>a</sup>	0,26
<b>IgG Pesada</b> (mg/dL)	801,4 $\pm$ 200,1 <sup>a</sup>	1103 $\pm$ 137,1 <sup>a</sup>	0,21
<b>44 kDa</b> (mg/dL)	13,21 $\pm$ 3,73 <sup>a</sup>	24,04 $\pm$ 4,97 <sup>a</sup>	0,12
<b>Haptoglobina<sup>2</sup></b> (mg/dL)	40,03 $\pm$ 8,23 <sup>a</sup>	241,5 $\pm$ 31,31 <sup>b</sup>	<0,0001
<b><math>\alpha</math>1-glicoproteína ácida<sup>2</sup></b> (mg/dL)	19,99 $\pm$ 5,41 <sup>a</sup>	53,37 $\pm$ 14,13 <sup>a</sup>	0,36
<b>IgG Leve<sup>2</sup></b> (mg/dL)	224,7 $\pm$ 34,49 <sup>a</sup>	740,8 $\pm$ 154,9 <sup>b</sup>	0,004
<b>23 kDa<sup>2</sup></b> (mg/dL)	419,8 $\pm$ 14,98 <sup>a</sup>	378,8 $\pm$ 28,52 <sup>a</sup>	0,21

\* Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).<sup>1</sup> Valores submetidos ao teste de Mann-Whitney para atender aos padrões de homogeneidade das amostras. <sup>2</sup> Valores não paramétricos submetidos à correção de *Welch*.

Posteriormente a verificação dos resultados obtidos em relação à concentração sérica das proteínas em gel de poliacrilamida, observou-se haver diferenças significativas entre os grupos estudados relativamente à transferrina, albumina, haptoglobina e IgG de cadeia leve (Figuras 10 a 13).

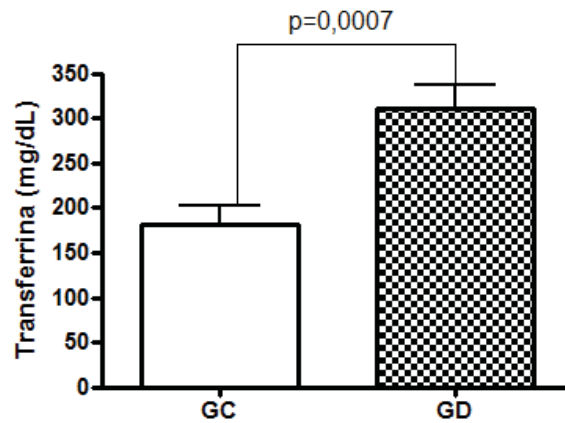
As concentrações de IgA e IgG de cadeia pesada não diferiram significativamente entre os grupos estudados, assim como também foi observado no

estudo de Hess et al. (2006) com cães infectados experimentalmente durante 4 meses.

Os valores médios obtidos neste ensaio para ceruloplasmina sérica, em cães do grupo GD, apresentaram-se superiores ( $64,30 \pm 17,06$ ) àqueles encontrados por Munhoz (2009) ( $44,88 \pm 11,92$ ), cujos animais experimentalmente infectados atingiram concentrações séricas, máximas, no 6º dia após a infecção. Kogika et al. (2003) também observou aumento na concentração desta proteína em cães com gastroenterite hemorrágica e Faria Junior (2004) em cadelas com piometra. Segundo Kogika et al. (2003), a quantificação sérica de ceruloplasmina funciona como indicador precoce do processo inflamatório.

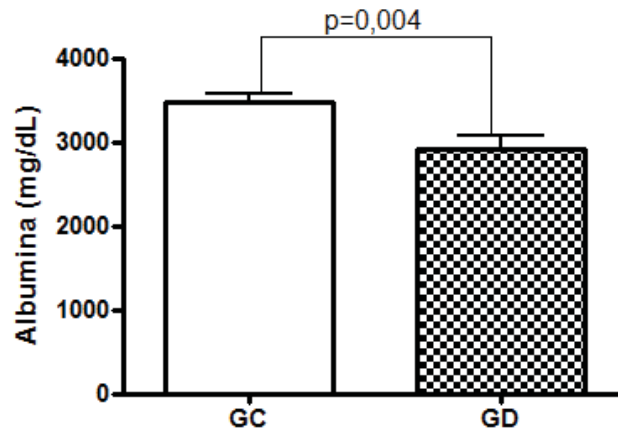
De outra parte, contrariando a literatura compulsada, a concentração sérica de transferrina em cães naturalmente acometidos por erliquiose, neste estudo, mostrou-se superior àquela encontrada em animais do Grupo Controle (Figura 10). De acordo com KANEKO (1997), a transferrina é considerada uma PFA negativa, portanto esperava-se que seu nível diminuisse em situações inflamatórias. Os grupos estudados apresentaram diferença significativa entre si ( $p < 0,05$ ) (Figura 10). Em consonância com os achados deste ensaio, Rodrigues (2006) e Munhoz (2009) também observaram que a transferrina comportou-se como PFA positiva frente aos processos inflamatórios aos quais suas parcelas experimentais haviam sido submetidas. Provavelmente, houve algum estímulo para o aumento na produção desta proteína, de forma similar, nos estudos acima referidos. É importante salientar que a elevação nos níveis séricos de transferrina pode contribuir com o mecanismo de defesa contra agentes infecciosos em animais enfermos (MURATA, SHIMADA, YOSHIOKA, 2004). Esse argumento justificaria a alta concentração de transferrina em casos de erliquiose na fase aguda, como foi observado neste ensaio.





**Figura 10.** Concentração sérica de transferrina, obtida em gel de poliacrilamida em cães do Grupo Controle (GC) e naqueles acometidos com erliquiose (GD) na fase aguda. Jaboticabal, 2015.

A albumina comportou-se como esperado, ou seja, como uma proteína de fase aguda negativa. Através da Figura 11 é possível observar que a concentração de albumina no GD foi inferior àquela encontrada no GC. Quadros de hipoalbuminemia em infecções naturais por *E. canis* foram descritos por Nelson e Couto (2001). Essa alteração pode ocorrer por consequência da diminuição na ingestão de proteínas (comum em cães enfermos que apresentam anorexia ou hiporexia), diminuição na síntese de proteínas (ocasionada por lesões hepáticas), perda na urina devido a lesões renais (proteinúria) ou então por um mecanismo compensatório para o aumento de globulinas que acontece em cães com EMC (HARRUS et al., 1999). Acredita-se que esta última seja a causa da alteração, já que os grupos estudados diferiram significativamente entre si ( $p < 0,05$ ) para a variável em questão e 16,7% dos cães do GD apresentaram quadro de hiperglobulinemia.

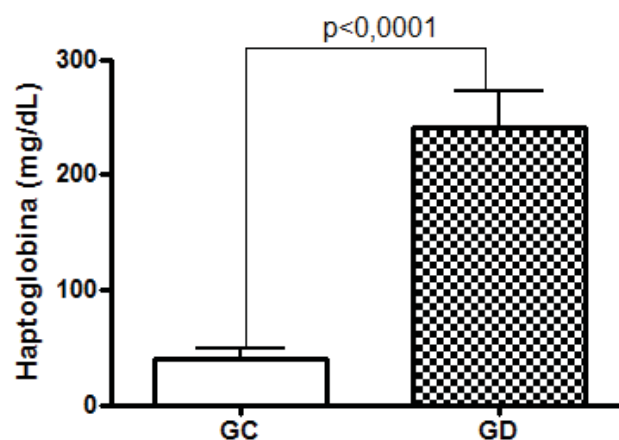


**Figura 11.** Concentração sérica de albumina, obtida em gel de poliacrilamida em animais do Grupo Controle (GC) e naqueles acometidos por erliquiose (GD) na fase aguda. Jaboticabal, 2015.

Apesar da  $\alpha$ 1-antitripsina ser considerada uma PFA positiva no cão, no presente ensaio suas concentrações séricas apresentaram-se menores nos animais do GD, comportando-se como uma PFA negativa. Não foram encontrados dados na literatura referentes a esta proteína na erliquiose, embora já tenha sido detectada em alguns traçados eletroforéticos (THOMAS, 2000). De acordo com Murata, Shimada e Yoshioka (2004), a  $\alpha$ 1-antitripsina e  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida pertencem a classe das  $\alpha$ 1-globulinas. Essas proteínas aumentam sua concentração quando são estimuladas pela interleucina 1 (IL-1). No entanto a elevação ocorre logo após a infecção e retorna aos valores de normalidade assim que o estímulo cessa.

A concentração de haptoglobina apresentou-se mais elevada no GD em relação ao GC (Figura 12). Essa elevação na quantidade da proteína também foi descrita por Munhoz (2009) em seus pacientes experimentalmente infectados por *E. canis*. De acordo com Eckersall (2008), os valores de referência para a concentração de haptoglobina para a espécie canina encontram-se entre 0,1 a 0,2 g/dL, contudo quando o animal é acometido por doenças inflamatórias e infecciosas esse valor pode chegar a 0,5 g/dL ou mais. No presente estudo, as concentrações séricas médias de haptoglobina observadas em cães do GC e GD foram de  $0,04 \pm 0,08$  g/dL e  $0,24 \pm 0,31$  g/dL, respectivamente. Portanto é possível observar que o GD apresentou o valor esperado para cães com processo infeccioso. A haptoglobina é uma  $\alpha$ 2-globulina que é induzida pela IL-6 e tem seus níveis séricos aumentados mais tardiamente,

permanecendo assim por várias semanas (MURATA, SHIMADA, YOSHIOKA, 2004; CÉRON, ECKERSALL, MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005). O traçado eletroforético da haptoglobina já foi descrito em doenças infecciosas, inflamatórias e neoplásicas (KOGIKA et al., 2003; MISCHKE; WATERSTON; ECKERSALL, 2007; DABROWNSKI; WAWRON; KOSTRO, 2007) e, de acordo com tais pesquisadores, os níveis da referida proteína mostrou-se sempre superior quando comparados àqueles de cães saudáveis. Assim sendo, tal PFA revela-se como um indicador eficaz no monitoramento terapêutico e no prognóstico da erliquiose em cães, já que se trata de um importante marcador de condições inflamatórias e infecciosas (BAYRAMLI; ULUTAS, 2008).



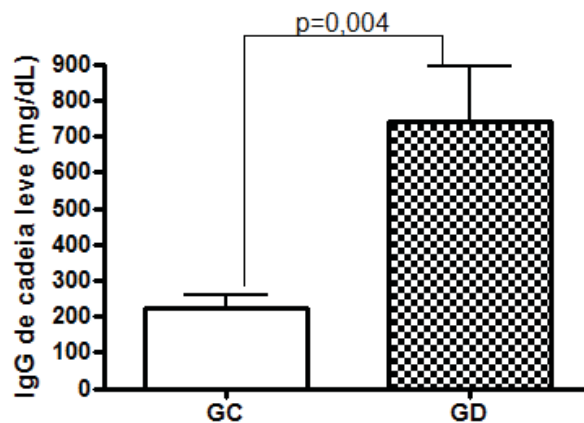
**Figura 12.** Concentração sérica de haptoglobina, obtida em gel de poliacrilamida em animais do Grupo Controle (GC) e naqueles acometidos por erliquiose (GD) na fase aguda. Jaboticabal, 2015.

Não houve diferença significativa entre os grupos estudados em relação aos níveis da proteína de peso molecular 44 kDa, porém eles se mostraram mais elevados em cães com erliquiose na fase aguda. Não foram encontrados dados na literatura sobre esta proteína na referida doença.

Os valores médios encontrados para  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida em cães acometidos por erliquiose (GD) foram superiores àqueles do GC. No entanto, não houve diferença significativa entre os grupos estudados. Já Munhoz (2009) obteve nível de significância de  $p < 0,05$  entre os grupos no 6° e 12° dia após a infecção, além da PFA apresentar seu pico de concentração ( $195,5 \pm 40,37$  mg/dL) no 12° dia após a infecção e seus níveis decaírem até valores próximos daqueles obtidos no início da infecção experimental ( $75,64 \pm 36,15$  mg/dL). No ensaio em tela, encontrou-se concentração média de  $53,37 \pm 14,13$  mg/dL nos cães acometidos por erliquiose na

fase aguda. De acordo com Munhoz (2009), a  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida é um importante marcador das lesões inflamatórias em cães com erliquiose.

O resultado referente à concentração de IgG de cadeia leve encontrado no GD foi superior àquele do GC e apresentou diferença significativa entre os grupos estudados (Figura 13). A concentração média obtida para IgG de cadeia leve ( $740,8 \pm 154,9$  mg/dL) foi inferior àquela obtida por Munhoz (2009), no 30º dia de infecção experimental por *E. canis* ( $877,98 \pm 381,83$  mg/dL). De acordo com este último estudo, o aumento nos níveis da imunoglobulina sugerem o desenvolvimento de imunidade humoral. No ensaio de Hess et al. (2006), não foi observada diferença significativa entre as imunoglobulinas A, M e G na doença experimentalmente induzida ao longo de 4 meses de estudo e os anticorpos específicos para *E. canis* não protegeram os animais de nova infecção. Os pesquisadores concluíram que não houve desenvolvimento eficiente da resposta imune nestes pacientes.



**Figura 13.** Concentração sérica de IgG de cadeia leve, obtida em gel de poliacrilamida em animais do Grupo Controle (GC) e em cães com erliquiose (GD) na fase aguda. Jaboticabal, 2015.

Não houve diferença significativa entre os GC e GD, no que se refere à concentração da proteína de peso molecular 23 kDa. Assim como foi observado por Munhoz (2009), a referida fração proteica comportou-se como uma PFA negativa.

## 5.5 Função renal

A sedimentoscopia urinária apresentou apenas pequena quantidade de células epiteliais de transição. Além disso, foi observada diferença significativa entre os grupos estudados em relação à presença de hemácias e leucócitos na urina (Figura 14). Por outro lado, os valores de pH ( $p=0,08$ ), turbidez ( $p=0,14$ ) e a quantidade de proteína ( $p=0,06$ ) na urina não divergiram entre os grupos.

Para uma análise mais segura da função renal é indicado associar os resultados de pH, densidade urinária específica (CHEW; DiBARTOLA; SCHENCK, 2011) e sedimento urinário (GRAUER, 2011). No caso do pH, os resultados deste ensaio mostraram que 62,5% dos animais do GD situaram-se na faixa de pH ácido ( $<6,5$ ), 20,8% no intervalo neutro ( $6,5 - 7,5$ ) e 16,6% com urina alcalina ( $>7,5$ ).

Neste ensaio, 37,5% dos animais com erliquiose na fase aguda não apresentaram nem mesmo traços de proteínas, enquanto que 62,5% dos animais apresentaram mais de 2+. No estudo de Marinho (2012), verificou-se que 47,6% dos cães com doença renal subclínica não apresentaram proteinúria e 52,4% foram positivos na procura de proteínas por meio de kit comercial de fitas reativas.

À sedimentoscopia urinária procederam-se contagens de hemácias e leucócitos. Na pesquisa de hemácias, encontrou-se 12,5% de cães do GD negativos; 41,6% dos cães com traços a 2+ e 45,8% iguais ou superiores a 3+. Em relação aos leucócitos, 4,16% foram negativos, 33,3% apresentam 1+ e, em 62,5% foram verificados valores iguais ou superiores a 2+. No estudo de Alves (2013) não encontrou-se sedimentoscopia ativa, contrariando os resultados encontrados no presente ensaio.

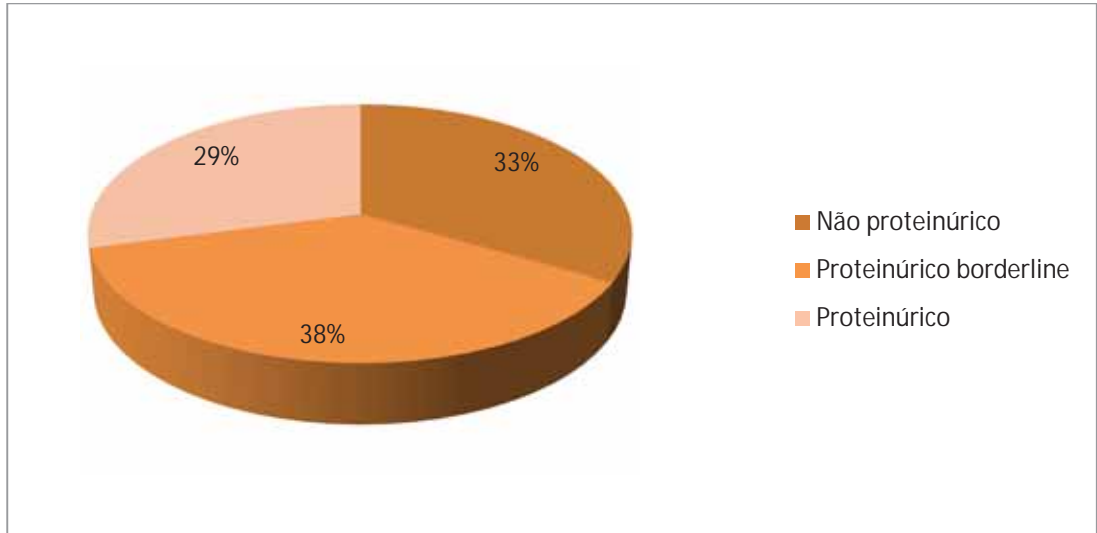
Em contrapartida, observou-se haver diferença significativa entre os grupos estudados no que concerne à razão proteína e creatinina urinárias (UP/C) e densidade específica urinária (DEU), conforme Tabela 5.

**Tabela 5.** Estatística descritiva (média  $\pm$  erro padrão da média) e valores de P do teste *t student* da razão proteína e creatinina urinárias (UP/C) e densidade específica urinária (DEU) em animais do Grupo Controle (GC) e naqueles acometidos por erliquiose (GD) na fase aguda. Jaboticabal, 2015.

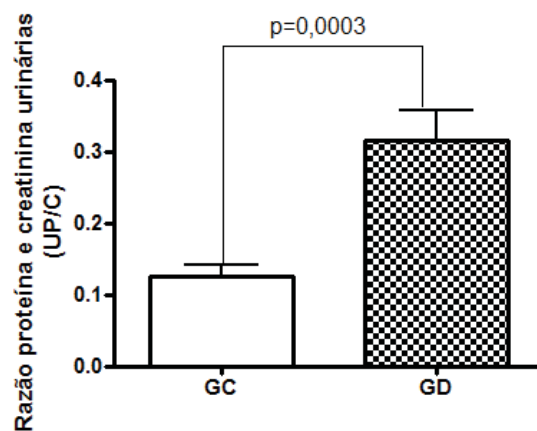
Parâmetros	GC	GD	Valores de P
UP/C <sup>2</sup>	0,13 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,31 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	0,0003
DEU	1,04 $\pm$ 0,003 <sup>a</sup>	1,05 $\pm$ 0,003 <sup>b</sup>	0,0009

\* Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).<sup>1</sup> Valores submetidos ao teste de Mann-Whitney para atender aos padrões de homogeneidade das amostras. <sup>2</sup> Valores não paramétricos submetidos à correção de *Welch*.

Pela Figura 15 é possível verificar que a razão proteína e creatinina urinárias de cães com erliquiose na fase aguda é superior àquela encontrada nos cães do GC. De acordo com os valores de UP/C preconizados pela IRIS (2009), os animais doentes do presente estudo encontravam-se proteinúricos *borderline*/limítrofe, já que os resultados obtidos para esse grupo (Tabela 5) são de 0,31 $\pm$ 0,04. Segundo os dados explicitados (Figura 14), 66,7% dos cães enfermos apresentam proteinúria, valor superior àquele encontrado por Alves (2013), que reportou 53% de proteinúria em cães com erliquiose na fase subclínica. De acordo com Polzin e Osborne (1995) e Lees (2004), o grau de proteinúria é geralmente leve, sempre que os componentes túbulo-intersticiais estão acometidos. Já no caso das glomerulopatias, observam-se graus de proteinúria acentuados. Desta forma fica claro que a quantificação de proteínas na urina é de extrema importância, pois auxilia na localização das lesões renais (POLZIN; OSBORNE, 1995; LEES, 2004). Diante do fato da proteinúria ser um importante marcador de lesão renal (LEFEBVRE; TOUTAIN, 2004), é possível considerar que cães com erliquiose na fase aguda apresentem potencial risco ao desenvolvimento de doença renal.



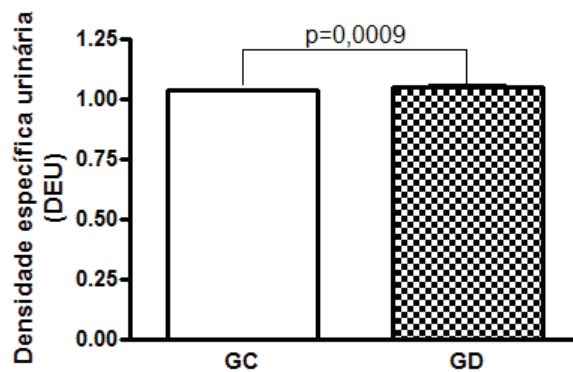
**Figura 14.** Gráfico circular representativo da distribuição dos cães com erliquiose (GD) na fase aguda em não proteinúrico ( $UP/C < 0,2$ ), proteinúrico *borderline*/limitrofe ( $UP/C \geq 0,2$  ou  $\leq 0,5$ ) e proteinúrico ( $UP/C > 0,5$ ), ilustrando o valor da razão proteína e creatinina urinárias e o sistema de subestadiamento da proteinúria da IRIS (2009).



**Figura 15.** Razão proteína e creatinina urinárias (UP/C) de animais do Grupo Controle (GC) e de cães com erliquiose (GD) na fase aguda. Jaboticabal, 2015.

A média da densidade urinária específica (DEU) (Tabela 5 e Figura 16) encontrada no grupo de cães com erliquiose na fase aguda ( $1,05 \pm 0,003$ ) foi superior à normalidade para a espécie canina (1,020 – 1,045), enquanto os animais do GC encontraram-se dentro dos padrões de normalidade ( $1,04 \pm 0,003$ ) (Apêndice B). Do

total de cães do GD, 66,6% apresentaram DEU acima dos valores de referência. Talvez esse quadro se deva ao possível efeito da desidratação, comum em cães com os sinais clínicos apresentados pelos cães doentes, como anorexia/hiporexia e vômito. O trabalho de Borin (2011) constatou que a baixa DEU em cães com DRC serve como fator diagnóstico da doença, mas não é suficiente para a caracterização dos diferentes estádios evolutivos da referida doença. No ensaio de Alves (2013) foi concluído que a avaliação da DEU não permite identificar o comprometimento renal em cães com erliquiose na fase subclínica. Diante destes dados é possível acreditar que os resultados acima dos valores de referência no presente estudo serve como suspeita para o diagnóstico de EMC e que os animais na fase aguda ainda não apresentam diminuição da densidade urinária.



**Figura 16.** Densidade específica urinária (DEU) dos animais do Grupo Controle (GC) e dos cães com erliquiose (GD) na fase aguda. Jaboticabal, 2015.

## 5.6 Eletroforese da urina

Em comparação com outros fluídos biológicos, a urina possui algumas vantagens como facilidade de coleta, grande quantidade de metabólitos e capacidade de refletir desequilíbrios internos. Dessa forma, ela foi escolhida para avaliar a existência ou não de proteínas. Após a análise dos dados referentes à sua eletroforese, foi possível verificar um número superior de frações proteicas excretadas pela urina nos cães com erliquiose na fase aguda (295), quando comparado àquele encontrado nos cães do GC (174). Notou-se diferença significativa entre os grupos estudados ( $p < 0,05$ ) nos intervalos de 10 a 20 kDa, 31 a 40 kDa e 41 a 50 kDa, sendo



observada grande frequência no aparecimento de proteínas com peso molecular entre 21 a 30 kDa, 31 a 40 kDa, 41 a 50 kDa, 51 a 60 kDa, com 91,6% cada e 61 a 70 kDa, com 95,8% (Tabela 6). Dentre as proteínas encontradas, apenas aquela cuja densidade encontrava-se entre 121 e 130 kDa, mostrou-se ausente no GD. No que se refere à quantidade de proteínas excretadas pela urina, aquelas com peso molecular entre 31 e 40 kDa apareceram em maior número (77 proteínas).

**Tabela 6.** Distribuição de proteínas urinárias conforme seu peso molecular (kDa); *N*= número de proteínas observadas em cada intervalo conforme o peso molecular; Frequência = aparecimento das proteínas tanto no grupo controle (GC) como no grupo com erliquiose (GD) na fase aguda. Jaboticabal, 2015.

Frações proteicas	<i>N</i>	Frequência (%)		Valores de <i>P</i>
		GC	GD	
<b>10 a 20 kDa*</b>	12	5,5 (1)	41,6 (11)	<b>0,012</b>
<b>21 a 30 kDa</b>	67	72,2 (22)	91,6 (45)	<b>0,118</b>
<b>31 a 40 kDa*</b>	77	61,1 (17)	91,6 (60)	<b>0,025</b>
<b>41 a 50 kDa*</b>	48	61,1 (19)	91,6 (29)	<b>0,025</b>
<b>51 a 60 kDa</b>	69	72,2 (25)	91,6 (44)	<b>0,118</b>
<b>61 a 70 kDa</b>	51	83,3 (26)	95,8 (25)	<b>0,297</b>
<b>71 a 80 kDa</b>	30	83,3 (15)	62,5 (15)	<b>0,18</b>
<b>81 a 90 kDa</b>	7	22,2 (4)	12,5 (3)	<b>0,438</b>
<b>91 a 100 kDa</b>	9	22,2 (5)	16,6 (4)	<b>0,706</b>
<b>101 a 110 kDa</b>	28	61,1 (11)	70,8 (17)	<b>0,508</b>
<b>111 a 120 kDa</b>	13	33,3 (6)	29,1 (7)	<b>0,773</b>
<b>121 a 130 kDa</b>	1	5,5 (1)	-	<b>0,429</b>
<b>131 a 140 kDa</b>	4	11,1 (2)	8,33 (2)	<b>1,00</b>
<b>141 a 150 kDa</b>	4	11,1 (2)	8,33 (2)	<b>1,00</b>
<b>151 a 160 kDa</b>	6	5,5 (1)	20,8 (5)	<b>0,214</b>
<b>161 a 170 kDa</b>	4	11,1 (2)	8,3 (2)	<b>1,00</b>
<b>171 a 180 kDa</b>	10	22,2 (4)	25 (6)	<b>1,00</b>
<b>&gt;180 kDa</b>	29	61,1 (11)	75 (18)	<b>0,338</b>

\* indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o Grupo Controle (GC) e o grupo de cães com erliquiose (GD) na fase aguda. Valores submetidos ao teste do Qui-quadrado tabelado ( $GL=2$ ,  $\alpha = 0,05$ ) = 5,99

**Tabela 7.** Frequência de aparecimento das proteínas urinárias de acordo com seu peso molecular (BPM - baixo peso molecular, MPM - médio peso molecular e APM - alto peso molecular); *N* = número de proteínas observadas no Grupo Controle (GC) e no grupo com erliquiose (GD) na fase aguda. Jaboticabal, 2015.

Grupo	N	Frequência (%)		
		BPM (<60 kDa)	MPM (60 a 80 kDa)	APM (>80 kDa)
GC	174	44,8 (80)	27 (45)	28,1 (49)
GD	295	63,3 (187)	14,2 (42)	22,3 (66)

Foram encontrados dezoito intervalos de proteínas na urina dos animais do GC e dezessete nos cães com erliquiose na fase aguda, o que difere dos resultados encontrados por Zaragoza et al. (2003a), Zaragoza et al. (2003b) e Schaefer et al. (2011), em que o número de bandas observadas no GC foi menor do que no GD. O intervalo das proteínas com peso molecular entre 71 e 80 kDa, no qual a albumina se encontra (SCHULTZE, JENSEN, 1989), apresentou maior frequência no Grupo Controle em relação ao Doente, com 83,3% e 62,5%, respectivamente (Tabela 6). De acordo com Zini, Bonfanti e Zatelli (2004) cães com funcionamento renal saudável normalmente exibem albumina na urina. Este fato é considerado fisiológico quando associado ao valor de UP/C abaixo de 0,5. Baseado nestes dados é possível crer que essa seja a causa da maior quantidade da proteína excretada pelo GC, já que o valor do UP/C nos cães saudáveis neste estudo foi de  $0,13 \pm 0,02$ .

As proteínas de origem plasmática encontradas na urina refletem o tipo de doença que pode estar acometendo os rins. De acordo com Rego et al. (2001), a excreção de proteínas por meio da urina devido ao comprometimento tubular, caracteriza-se pelo achado de proteínas com peso molecular inferior a 60kDa, em contrapartida as lesões glomerulares ocorrem quando proteínas de densidade superior a 60 kDa ultrapassam as barreiras glomerulares. Diante destes dados, o proteinograma urinário em SDS-PAGE deste estudo sugere lesões tubulares, já que todas as bandas proteicas com peso molecular inferior a 60 kDa, apresentaram maior frequência no GD, quando comparadas ao GC. No entanto, as proteínas com médio e alto peso molecular figuraram com maior frequência em 61,5% dos animais do GC, com raras exceções como as frações de 61 a 70 kDa, 100 a 101 kDa, 151 a 160 kDa e valores superiores a 171 kDa, que se apareceram mais frequentemente no GD. De

acordo com Finco (1995), o aparecimento de proteínas com diferentes pesos moleculares na urina de cães saudáveis é considerado normal.

Foram encontradas proteínas de média e alta densidade (>60 kDa) na urina dos cães com erliquiose na fase aguda (36,5%) (Tabela 7), sugerindo uma lesão renal de origem glomerular. No estudo de Zaragoza et al. (2003a), foram encontrados 42,1% dos cães com leishmaniose, apresentando proteínas com médio e alto peso molecular. O intervalo de 100 a 110 kDa corresponde a transferrina (SCHULTZE; JENSEN, 1989). No presente estudo, encontrou-se 61,1% desta proteína no GC e 70,8% no GD, já Zaragoza et al. (2003b) verificou em 100% das cadelas saudáveis e 80% daquelas com piometra.

As lesões glomerulares podem ser justificadas devido à deposição de imunocomplexos em nível glomerular ou lesões no parênquima renal (CODNER; MASLIN, 1992), que alteram sua permeabilidade, permitindo a excreção de proteínas com alto peso molecular. Nestes casos, a proteinúria se revela como um marco inicial do transtorno renal e de sua disseminação (VADEN, 2004; HEIENE et al., 2007). De acordo com Schaefer et al. (2011), a proteinúria glomerular lesiona as barreiras de filtração tanto pela carga quanto pelo tamanho das proteínas. Nesta condição, com o uso do *clearance* de globulinas, é possível avaliar as proteínas globulínicas sanguíneas e urinárias, diferenciando-as em proteinúria seletiva (peso molecular de 60 a 80 kDa) e não seletiva (peso molecular acima de 80 kDa). Diante destes dados, o presente estudo encontrou proteinúria seletiva (20 proteínas entre 60 e 80 kDa) e proteinúria não seletiva (60 proteínas com mais de 80 kDa) no GD, confirmando mais uma vez a suspeita de proteinúria glomerular nos animais com erliquiose na fase aguda deste experimento.

É importante salientar a grande frequência e quantidade de proteínas com peso inferior a 60 kDa presentes na urina dos animais com erliquiose na fase aguda (63%) e no GC (44,8%) (Tabela 6). Outros estudos também apresentaram resultados semelhantes, como o de Zaragoza et al. (2003a), com 57,9% de proteínas com BPM em cães com leishmaniose e 33,5% no GC; Zaragoza et al. (2003b), que relataram proteínas no intervalo de 30 a 60 kDa que só apareciam nas cadelas com piometra e Schaefer et al. (2011) que observaram grande quantidade de proteínas com densidade menor que 60 kDa na urina de cães com síndrome de resposta inflamatória

grave (58%) contra 45% no GC. Provavelmente, este fato se deve a ausência de reabsorção proteica nos túbulos, tornando possível o encontro destas proteínas na urina (GRAUER, 2005; BARROS et al., 2006). Os resultados encontrados no presente estudo sugerem tubulopatia associada à proteinúria, ambas relacionadas ao processo inflamatório decorrente da infecção por *E. canis*. Esta alteração também foi encontrada no ensaio realizado por Zaragoza et al. (2003c), que avaliaram a proteinúria em cães com leptospirose e observaram elevação nas concentrações de proteínas de baixo peso molecular, confirmando o comprometimento do segmento tubular do néfron.

Embora as análises estatísticas tenham mostrado diferença significativa entre os grupos estudados com relação aos valores de UP/C, os resultados, apresentados pela média ( $0,31 \pm 0,04$ ), mostraram que o GD encontrava-se apenas na faixa de proteinúrico limítrofe para a espécie canina. Sendo assim, a proteinúria não apresenta importância clínica em pacientes sem azotemia, segundo a classificação da IRIS (2009). Diante do fato do valor de UP/C no grupo de cães com erliquiose na fase aguda estar dentro dos valores limítrofes, enquanto a eletroforese urinária indicou e quantificou grande número de proteínas de alto e baixo peso molecular no GD, fica claro que esta técnica serve como diagnóstico precoce para lesões glomérulo-tubulares em cães acometidos pela referida doença.

## 6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste experimento, conclui-se que:

- Devido à frequência de 95,8% de trombocitopenia encontrada em cães com erliquiose na fase aguda, sugere-se que a contagem de plaquetas possa funcionar como um teste de triagem para a referida doença.
- Apesar do perfil eletroforético do soro encontrado não ser exclusivo para erliquiose canina na fase aguda, a eletroforese em gel de poliacrilamida pode dar suporte ao diagnóstico precoce, prognóstico e monitoramento da doença.
- O valor de UP/C nos cães do Grupo Doente mostraram-se dentro dos valores limítrofes, enquanto a eletroforese urinária indicou e quantificou grande número de proteínas de alto e baixo peso molecular neste grupo, indicando que esta técnica pode servir como diagnóstico precoce para lesões glomérulo-tubulares em cães acometidos pela referida doença.
- A eletroforese em gel de poliacrilamida em conjunto com a UP/C, revelaram que pode existir lesão tanto tubular quanto glomerular na fase aguda da erliquiose, embora ainda sejam necessários mais estudos para elucidar as lesões supracitas.

## 7. REFERÊNCIAS

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. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 8, n. 4, p. 799-806, 2007.

ALMOSNY, N. R. P. **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses**. Rio de Janeiro: L. F. Livros de Veterinária, 2002. 135 p.

ALVES, M. A. M. K. **Erliquiose monocítica canina subclínica, naturalmente adquirida – diagnóstico, aspectos clínico-laboratoriais, envolvimento renal e evolução com o tratamento**. 2013. 76 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2013.

BAKER, D. C. Diagnóstico dos distúrbios hemostáticos. In: THRALL, M. A. **Hematologia e bioquímica veterinária**. São Paulo: Editora Roca, 2007. cap.12, p.170 - 187.

BARROS, R. T.; ALVES, M. A. R.; DANTAS, M.; KIRSZTAJN, G. M.; SENS, Y. A. S. **Glomerulopatias: patogenia, clínica e tratamento**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 457 p.

BAYRAMLI, G.; ULUTAS, B. Acute phase protein response in dogs with experimentally induced gastric mucosal injury. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v. 37, n. 3, p. 312-316, 2008.

BORIN, S. **Estudo da hipoplasia sanguínea e quantificação imunofenotípica de células CD45+ no sangue e na medula óssea de cães com doença renal crônica**. 2011. 89 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2011.

BORIN, S.; CRIVELENTI, L. Z.; FERREIRA, F. A. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de *Ehrlichia* spp. naturalmente infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 3, p. 566-571, 2009.

BRAUND, K. G.; EVERETT, R. M.; ALBERT, R. A. Neurologic manifestations of monoclonal IgM gammopathy associated with lymphocytic-leukemia in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 172, n. 2, p. 1407-1410, 1978.

BULLA, C.; TAKAHIRA, R. K.; ARAÚJO JUNIOR, J. P.; TRINCA, L. A.; LOPES, R. S.; WEIDMEYER, C. E. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Veterinary Research**, London, v. 35, n. 1, p. 141-146, 2004.

BUSH, B. M. Bioquímica plasmática. In:\_\_\_\_\_. **Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2004. cap. 5, p. 169-223.

CASTRO, M. B.; MACHADO, R. Z.; AQUINO, L. P.; ALESSI, A. C.; COSTA, M. T. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinico pathological and immunopathological findings. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 119, n. 1, p. 73-86, 2004.

CERÓN, L. L.; ECKERSALL, P. D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v. 34, n. 2, p. 85-99, 2005.

CHEW, D. J; DiBartola S. P.; SCHENCK, P. "**Urinalysis**". **Canine and feline nephrology and urology**. 2<sup>nd</sup> ed. St. Louis: Elsevier Saunders, 2011. p.1 - 31.

CODNER, E. C.; MASLIN, W. R. Investigation of glomerular lesions in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 53, n. 12, p. 2286-2291, 1992.

CONNER, J. G.; ECKERSALL, P. D.; WISEMAN, A.; BAIN, R. K.; DOUGLAS, T. A. The acute phase response in calves following infection with *Pasteurella haemolytica* and *Ostertagia ostertagii* and endotoxin administration. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 47, n. 3, p. 203-207, 1989.

COSTA Jr., L. M.; REMBECK, K.; RIBEIRO, M. F.; BEELITZ, P.; PFISTER, K.; PASSOS, L. M. Sero-prevalence and risk indicators for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil. **The Veterinary Journal**, London, v.174, n. 3, p. 673-676, 2007.

COUTO, C. G. Doença riquetsiais. In: BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders Clínica de Pequenos Animais**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2003. p.138 – 143.



DABROWSKI, R.; WAWRON, W.; KOSTRO, K. Changes in CRP, SAA and haptoglobin produced in response to ovariohysterectomy in healthy bitches and those with pyometra. **Theriogenology**, Oxford, v. 67, n. 2, p. 321-327, 2007.

DAGNONE, A. S.; MORAIS, H. S. A.; VIDOTTO, O. Eriiquiose nos animais e no homem. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 22, n. 2, p. 191 – 201, 2001.

DAGNONE, A. S.; MORAIS, H. S. A.; VIDOTTO, M. C.; JOJIMA, F. S.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tickinfested dogs from a hospital population in south Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 117, n. 4, p. 285-290, 2003.

DAGNONE, A. S.; SOUZA, A. I.; ANDRÉ, M. R.; MACHADO, R. Z. Molecular diagnosis of Anaplasmataceae organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 18, n. 4, p. 20 – 25, 2009.

DELLO, C. P.; BELPAIRE, F. M.; RICK, A.; FRAYEMAN, N. H. Influence of inflammation on serum concentration, molecular heterogeneity and drug binding properties of canine alpha-1-acid glycoprotein. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 71-76, 1988.

ECKERSALL, P. D. Acute phase proteins as markers of infection and inflammation: monitoring animal health, animal welfare and food safety. **Irish Veterinary Journal**, Dublin, v. 53, n. 6, p. 307-311, 2000.

ECKERSALL, P. D. Proteins, proteomics and the dysproteinemias. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6<sup>th</sup> ed. Burlington: Academic Press, 2008. p. 117-155.

EDINGER, H.; MILLER, I.; STANEK, C.; GEMEINER, M. Electrophoretic serum protein patterns in laminitic horses. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, Alfeld, v. 99, n. 10, p. 426-30, 1992.

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. v. 1.

FARIA JUNIOR, D. **Caracterização citológica e bioquímica do sangue e do lavado peritoneal em cadelas com piometra**. 2004. 58 f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2004.

FARIA, J. L. **Estudo comparativo de detecção de DNA de *Ehrlichia canis* em sangue total de e em aspirado de baço pelo “nested” PCR em cães naturalmente infectados.** 2006. 65 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2006.

FERNANDES, P. V. B.; JERICÓ, M. M.; LOPES, P. A.; MOREIRA, M. A. B.; SULTANUM, C. A. R.; ZORZI, V. B.; MACHADO, F. A. L.; CANTAGALLO, K. L. Alterações hematológicas e bioquímicas em cães soropositivos pra *Ehrlichia canis* no período de 2002 a 2008. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 35., 2008, Gramado. **Anais eletrônicos...** Brasília, DF:SBMV, 2008. 1 CD-ROM.

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

FETTMAN, M. J. Metabolismo de fluidos e eletrólitos. In: THRALL, M. A. **Hematologia e bioquímica veterinária.** São Paulo: Editora Roca, 2007. cap.12, p.311 - 334.

FINCO, D. R. Evaluation of renal function. In: OSBORNE, C. A.; FINCO, D. R. **Canine and feline nephrology and urology.** Baltimore: Williams & Wilkins, 1995. p. 216-229.

FRITZ, C. L. Emerging tick-borne diseases. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice,** Philadelphia, v. 39, n. 2, p. 265-278, 2009.

GERSHWIN, L. J. Clinical veterinary immunology. In: KANEKO J. J., HARVEY J. W.; BRUSS M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals.** 6<sup>th</sup> ed. Burlington: Academic Press, 2008. p. 157-172.

GIRAUDEL, J.; PAGÈS, J. P.; GUELFY, J. F. Monoclonal gammopathies in the dog: A retrospective study of 18 cases (1986-1999) and literature review. **Journal of the American Animal Hospital Association,** Lakewood, v. 38, n. 2, p.135–147, 2002.

GORDON, A. H. **Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels.** New York: Elsevier Science Publishers, 1995. 213 p.

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

GRAUER, G. F. Canine glomerulonephritis: new thoughts on proteinuria and treatment. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 46, n. 10, p. 469-478, 2005.

GRAUER, G. F. Proteinuria: measurement and interpretation. **Topics in Companion Animal Medicine**, New York, v. 26, n. 3, p. 121-127, 2011.

GREENE, C. Ehrlichiosis, Neorickettsiosis, Anaplasmosis and Wolbachia Infection. In:\_\_\_\_\_. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3<sup>rd</sup> ed. St. Louis: Saunders, 2006. p. 203 -231.

GRUYS, E.; OBWOLO, M. J.; TOUSAINT, M. J. M. Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. **Veterinary Bulletin**, Farnham Royal, v. 64, n. 11, p. 1009-1018, 1994.

HARRUS, S.; WANER, T.; AVIDAR, Y.; BOGIN, E. PEH, H., BARK, H. Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 66, n. 3-4, p. 241–249, 1996.

HARRUS, S.; WANER, T.; BARK, H. Canine monocytic ehrlichiosis: an update. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, Yardley, v. 19, n. 4, p. 431-444, 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*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 1, p. 73-6, 1998.

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

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. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 48, n. 11, p. 4488-4490, 2004.

HARRUS, S.; WANER, T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. **The Veterinary Journal**, London, v. 187, n. 1, p. 292-296, 2011.

HEIENE, R.; KRISTIANSEN, V.; TEIGE, J.; JANSEN, J. H. Renal histomorphology in dogs with pyometra and control dogs, and long term clinical outcome with respect to signs of kidney disease. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Vanloese, v. 49, n. 13, p. 1-9, 2007.

HESS, P. R.; ENGLISH, R. V.; HEGARTY, B. C.; BROWN, G. D.; BREITSCHWERDT, E. B. Experimental *Ehrlichia canis* infection in the dog does not cause immunosuppression. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 109, n. 1-2, p. 117-125, 2006.

HORADAGODA, N. U.; KNOX, K. M. G.; GIBBS, H. A.; REID, S. W. J.; HORADAGODA, A.; EDWARDS, S. E. R.; ECKERSALL, P. D. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. **Veterinary Record**, London, v. 144, p. 434-441, 1999.

HOSKINS, J. D. Ehrlichial diseases of dogs: diagnosis and treatment. **Canine Practice**, Santa Barbara, v. 16, n. 3, p. 13-21, 1991.

IKENOUE, N.; SAITSU, Y.; SHIMODA, H.; KOKUE, E. Disease-induced alterations in plasma drug-binding proteins and their influence on drug binding percentages in dogs. **Veterinary Quarterly**, Dondrechet, v. 22, n. 1, p. 43-49, 2000.

IQBAL, Z.; RIKIHISA, Y. Application of the polymerase chain reaction for the detection of *Ehrlichia canis* in tissues of dogs. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 42, n. 4, p. 281-287, 1994.

IRIS - Internacional Renal Interest Society. **Staging chronic Kidney disease (CKD)**. 2009. Disponível em: <[http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS2009\\_Staging\\_CKD.pdf](http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS2009_Staging_CKD.pdf)>. Acesso em: 24 abr. 2015.

ISOLA, J. G. M. P.; CADIOLI, F. A.; NAKAGE, A. P. Erliquiose canina - revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, São Paulo, v. 9, n. 18, p. 1-11, 2012.

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

KANEKO, J. J. Serum proteins and dysproteinemias. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5<sup>th</sup> ed. San Diego: Academic Press, 1997. 932 p.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6<sup>th</sup> ed. Burlington: Academic Press, 2008. p. 117-155, 157-172.

KATAOKA, A.; SANTANA, A. E.; SEKI M. C. Alterações do proteinograma sérico em cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis*. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, 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. **Revista do Setor de Ciências Agrárias**, Curitiba, v. 10, n. 1-2, p. 217-219, 1988.

KOGIKA, M. M.; PEREIRA, D. A.; ELIAS, F.; NOTOMI, M. K.; DELAYTE, E. H.; KAWAHARA, R.; HAGIWARA, M. K. Determinação sérica de haptoglobina, ceruloplasmina e  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida em cães com gastroenterite hemorrágica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 3, p. 513-517, 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAPPIN, M. R. Erliquiose Canina. In:\_\_\_\_\_. NELSON, R.; COUTO, G. **Medicina interna de pequenos animais**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p. 1229 – 1232.

LEES, G. E. Early diagnosis of renal disease and renal failure. **Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 34, n. 4, p. 867, 2004.

LEFEBVRE, H. P.; TOUTAIN, P. L. Angiotensin-converting enzyme inhibitors in the therapy of renal diseases. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 27 ,n. 5, p. 265–281, 2004.

LEWIS Jr., G. E.; RISTIC, M.; SMITH, R. D.; LINCOLN, T.; STEPHENSON, E. H. The brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* and the dog as experimental hosts of *Ehrlichia canis*. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 32, n. 12, p. 1953-1955, 1977.

MACHADO, R. Z. Erliquiose Canina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 23., SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTOSIOSES, 1., 2004, Ouro Preto. **Anais...** Ouro Preto: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2004. 1 CD-ROM.

MARINHO, T. R. **Avaliação da proteinúria como marcador da lesão/doença renal subclínica em cães.** 2012. 65 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 2012.

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

MENESES, I.; SOUZA, B.; TEIXEIRA, C.; GUIMARÃES, J. Perfil clínico-laboratorial da erliquiose monocítica canina em cães de Salvador e região metropolitana, Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 9, n. 4, p. 770 - 776, 2008.

MISCHKE, R.; WATERSTON, M.; ECKERSALL, P. D. Changes in C-reactive protein and haptoglobin in dogs with lymphatic neoplasia. **The Veterinary Journal**, London, v. 174, n. 1, p. 188-192, 2007.

MOREIRA, S. M.; BASTOS, C. V.; ARAUJO, R. B.; SANTOS, M.; PASSOS, L. M. F. Retrospective study (1998-2001) on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, MG, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 2, p. 141-147, 2003.

MUNHOZ, T. D. **Concentrações séricas de proteínas de fase aguda e IgG na infecção experimental por *Ehrlichia canis*.** 2009. 55 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2009.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **The Veterinary Journal**, London, v. 168, n. 1, p. 28-40, 2004.

MURPHY, G. E.; EWING, S. A.; WHITWORTH, L. C.; FOX, J. C.; KOCAN, A. A. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffensis* and *E. ewingii* in dogs from Oklahoma. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 79, n. 4, p. 325-339, 1998.

MYLONAKIS, M. E.; KOUTINAS, A. F.; BILLINIS, C.; LEONTIDES, L. S.; KONTOS, V.; PAPADOPOULOS, O.; RALLIS, T.; FYTIANOU, A. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 91, n. 2-3, p. 197 - 204, 2003.

NAKAGHI, A. C. H.; MACHADO, R. Z.; TINUCCI-COSTA, M.; ANDRÉ, M. R.; BALDANI, C. V. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 766-770, 2008.

NAOUM, P. C.; CERON, C. R.; DOMINGOS, C. R. B. Conhecimentos Básicos de Eletroforese. In: NAOUM, P. C. **Eletroforese – técnicas e diagnósticos**. 2. ed. São Paulo: Santos Livraria e Editora, 1999. p. 1-38.

NEER, T. M.; HARRUS, S. Canine monocytotropic ehrlichiosis and neorickettsiosis (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ruminantium*, *N. sennetsu*, and *N. risticii* infections). In: GREENE, C. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2006. p. 203-216.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 324 p.

OLIVEIRA, D.; NISHIMORI, C. T.; COSTA, M. T., MACHADO, R. Z.; CASTRO, M. B.. Detecção de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* em cães naturalmente infectados, através do "DOT-ELISA". **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, São Paulo, v. 1, n. 9, p. 1-6, 2000.

PETERSEN, H. H.; NIELSEN, J. P.; HEEGAARD, P. M. H. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary Research**, Paris, v. 35, n. 2, p. 163-187, 2004.

PETRIE, A.; WATSON, P. Hypothesis Tests 1 - The t-Test: Comparing One of Two Means. In:\_\_\_\_\_. **Statistics for veterinary and animal science**, 2<sup>nd</sup> ed. Ames: Blackwell Publishing, 2007, p. 83-94.

POLZIN, D. J.; OSBORNE, C. A. Pathophysiology of renal failure and uremia. In: OSBORNE, C. A.; FINCO, D. R. **Canine and feline nephrology and urology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995. p. 335-367.

PYLE, R. L. Canine ehrlichiosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 177, n. 12, p. 1197-1199, 1980.

REGO, A. B.; KOGIKA, M. M.; SANTORO, M. L.; HAGIWARA, M. K. & MIRANDOLA, R. M. Eletroforese das proteínas urinárias de cães normais e de cães com doença renal em gel de sódio-dodecil-sulfato poliacrilamida (SDS-PAGE). **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v. 7, n. 2, p. 65–72, 2001.

RODRIGUES, V. **Hemograma, teores séricos de proteínas e de cortisol de fêmeas caninas (*Canis familiaris* – LINNAEUS, 1758) submetidas à operação cesariana.** 2006. 69 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2006.

RONDELLI, M. C. H. **Avaliação hormonal adrenocortical em cães com infecção natural por *Ehrlichia canis*.** 2012. 73 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal. 2012.

SAINZ, A.; TESOURO, M. A.; AMUSATEGUI, I.; RODRIGUEZ, F.; MAZZUCHELLI, F.; RODRIGUEZ, M. Prospective comparative study of 3 treatment protocols using doxycycline or imidocarb dipropionate in dogs with naturally occurring ehrlichiosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v. 14, n. 2, p. 134-139, 2000.

SANTARÉM, V. A. **Achados epidemiológicos, clínicos, hematológicos e comparação de técnicas para diagnóstico de *Ehrlichia canis*.** 2003. 130f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2003.

SANTOS, F.; COPPEDE, J. S.; PEREIRA, A. L. A.; OLIVEIRA, L. P.; ROBERTO, P. G.; BENEDETTI, R. B. R.; ZUCOLOTO, L. B.; LUCAS, F.; SOBREIRA, L.; MARINS, L. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia spp.* in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **The Veterinary Journal**, London, v. 179, n. 1, p. 145 - 148, 2009.

SCHAEFER, H.; KOHN, B.; SCHWEIGERT, F. J.; RAILA, J. Quantitative and qualitative urine excretion in dogs with severe inflammatory response syndrome. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v. 25, n. 6, p. 1292 – 1297, 2011.

SCHULTZE, A. E.; JENSEN, R. K. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis of canine urinary proteins for the analysis and differentiation of tubular and glomerular diseases. **Veterinary Clinical Pathology**, Madison, v.18, n. 4, p. 93 - 97, 1989.

SHIPOV, A.; KLEMENT, E.; REUVENI-TAGER, L.; WANER, T.; HARRUS, S. Prognostic indicators for canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 153, n. 1-2, p. 131-138, 2008.



SOUSA, M. G.; HIGA, A. C.; GERARDI, D. G.; TINUCCI-COSTA, M.; MACHADO, R. Z. Tratamento da erliquiose canina de ocorrência natural com doxiciclina, precedida ou não pelo Dipropionato de Imidocarb. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Belém, v. 3, n. 2, p. 126-130, 2004.

SOUSA, V. R. F. **Avaliação clínica, morfológica, hematológica, bioquímica e biomolecular de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys***. 2006. 58f. Tese (Doutorado Parasitologia Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

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. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 6, p. 1309-1313, 2010.

THOMAS, J. S. Overview of plasma proteins. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL J. G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 5<sup>th</sup> ed. Lippincott: Williams & Wilkins, 2000. p.891-898.

TIZARD, I. R. **Veterinary immunology: an introduction**. 8<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier, 2008. p. 147.

UENO, T. E. H.; AGUIAR, D. M.; PACHECO, R. C.; RICHTZENHAIN, L. J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C.; MEGID, J.; LABRUNA, M. B. *Ehrlichia canis* em cães atendidos no hospital veterinário de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia e Veterinária**, São Paulo, v. 18, n. 3, p. 57-61, 2009.

VADEN, S. L. Renal biopsy: methods and interpretation. **Veterinary Clinics North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 34, n. 4, p. 887-908, 2004.

VARELA, A. S. Tick-borne *Ehrlichiae* and *Rickettsia* of dogs. In: BOWMAN, D. D. **Companion and exotic animal parasitology**. Ithaca: International Veterinary Information Service, 2003. Disponível em: <<http://www.ivis.org>>. Acesso em: 9 abr. 2014.

ZARAGOZA, C.; BARRERA, R.; CENTENO, F.; TAPIA, J. A.; MAÑÉ, M.C. Canine pyometra: a study of the urinary proteins by SDS – PAGE and Western blot. **The-riogenology**, Oxford, v. 61, n.7/8, p. 1259–1272, 2003a.

ZARAGOZA, C.; BARRERA, R.; CENTENO, F.; TAPIA, J. A.; MAÑÉ, M. C. SDS-PAGE and Western blot of urinary proteins in dogs with leishmaniasis. **Veterinary Research**, Paris, v. 34, n. 2, p. 137-151, 2003b.

ZARAGOZA, C.; BARRERA, R.; CENTENO, F.; TAPIA, J. A.; MAÑÉ, M. C. Characterization of renal damage in canine leptospirosis by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blotting of the urinary proteins. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 129, n. 23, p. 169-178. 2003c.

ZINI, E.; BONFANTI, U.; ZATELLI, A. Diagnostic relevance of qualitative proteinuria evaluated by use of sodium dodecyl sulfate-agarose gel electrophoresis and comparison with renal histologic findings in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 65, n. 7, p. 964-971, 2004.

WADDLE, J. R.; LITTMAN, M. P. A retrospective study of 27 cases of naturally occurring canine ehrlichiosis. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Denver, v. 24, n. 6, p. 615-620, 1988.

WALDEMARIN, K. C. A.; MUNDIM, A. V.; BASTOS, J. E. D.; CUNHA, G. N. Alterações hematológicas em cães (*Canis familiaris*) naturalmente infectados por *Ehrlichia* spp. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v. 9, n. 2, p. 23-29, 2003.

WANER, T.; HARRUS, S. Canine monocytic ehrlichiosis. In:\_\_\_\_\_. **Recent advances in canine infectious diseases**. Ithaca: L. E. Carmichael, 2000.

WANER, T.; KEYSARY, A.; BARK, H.; SHARABANI, E.; HARRUS, S. Canine monocytic ehrlichiosis – an overview. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, Tel-Aviv, v. 54, n. 4, p. 103-107, 1999.

WEISER, G. Interpretação da resposta leucocitária nas doenças. In: THRALL, M. A. **Hematologia e bioquímica veterinária**. São Paulo: Editora Roca, 2007. cap. 12, p. 127-140.

WOODY, B. J.; HOSKINS, J. D. Ehrlichial diseases of the dog. **Veterinary Clinical North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 21, n. 1, p. 45-98, 1991.

YANG, F. M.; HAILE, D. J.; BERGER, F. G.; HERBERT, D. C.; VAN BEVEREN, E.; GHIO, A. J. Haptoglobin reduces lung injury associated with exposure to blood. **American Journal of Physiology-Lung Cell Molecular Physiology**, Bethesda, v. 284, n. 2, L402-L409, 2003.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A. Valores de referência para o hemograma canino.

**Tabela 1A.** Parâmetros eritro-leucométricos e plaquetários de referência para a espécie canina.

Parâmetros	Valores
<b>Hemácias</b> ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	5,5 – 8,0
<b>Hemoglobina</b> (g/dL)	12,0 – 18,0
<b>Hematócrito</b> (%)	37 – 55
<b>Plaquetas</b> (cél/s/ $\mu\text{L}$ )	180.000 – 400.000
<b>Leucócitos totais</b> (cél/s/ $\mu\text{L}$ )	6.000 – 18.000
<b>Basófilos</b> (cél/s/ $\mu\text{L}$ )	0
<b>Eosinófilos</b> (cél/s/ $\mu\text{L}$ )	120 – 1.800
<b>Neutrófilos bastonetes</b> (cél/s/ $\mu\text{L}$ )	0 – 500
<b>Neutrófilos segmentados</b> (cél/s/ $\mu\text{L}$ )	3.600 – 13.800
<b>Linfócitos</b> (cél/s/ $\mu\text{L}$ )	720 – 5.400
<b>Monócitos</b> (cél/s/ $\mu\text{L}$ )	180 – 1.800

**Fonte:** Laboratório de Patologia Clínica Veterinária “Professor Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto” do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, FCAV/UNESP – Câmpus de Jaboticabal, SP.

**APÊNDICE B.** Valores bioquímicos de referência para a espécie canina.**Tabela 1B.** Parâmetros bioquímicos séricos de referência para a espécie canina.

<b>Parâmetros</b>	<b>Valores</b>
<b>Creatinina</b> (mg/dL)	0,5 – 1,5
<b>Ureia</b> (mg/dL)	15 – 65
<b>Cálcio</b> (mg/dL)	8,6 – 11,2
<b>Fósforo</b> (mg/dL)	2,2 – 5,5
<b>ALT</b> (U/L)	10 – 88
<b>FA</b> (U/L)	20 – 150
<b>Proteína total</b> (g/dL)	5,8 – 7,9
<b>Albumina</b> (g/dL)	2,6 – 4,0
<b>Globulina</b> (g/dL)	2,7 – 4,4

**Fonte:** Laboratório de Patologia Clínica Veterinária “Professor Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto” do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, FCAV/UNESP – Câmpus de Jaboticabal, SP.

**Tabela 2B.** Parâmetro bioquímico urinário de referência para a espécie canina.

<b>Parâmetro</b>	<b>Valores</b>
<b>Densidade urinária específica (DEU)</b>	1,020 – 1,045

**Fonte:** Laboratório de Patologia Clínica Veterinária “Professor Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto” do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, FCAV/UNESP – Câmpus de Jaboticabal, SP.

**APÊNDICE C. REAGENTES PARA ELETROFORESE (SDS-PAGE)****TRIZ HCL – 2,0 M – Ph 8,9 (GEL DE CORRIDA)**

Triz Base (PM: 121,1).....121,1g

Completar para 500 mL com água deionizada

Acertar para pH 8,9

Filtrar a solução e guardar em geladeira

**TRIZ HCL 0,617 M (GEL EMPILHADOR)**

Triz Base (PM: 121,1).....7,475g

Completar para 100 mL com água deionizada

Acertar pH 6,8

Filtrar solução e guardar em geladeira

**ACRILAMIDA/BIS (30% T / 1,866% C) (para sangue)**

Acrilamida para eletroforese Sigma (PM: 71,08).....73,00g

N,N-metileno-bis-acrilamida para eletroforese Sigma.....2,00g

Completar para 250 mL com água deionizada (aquecer se necessário)

**EDTA 0,5M**

(Etilenodinitrilo) ácido tetracético tetrassódico(PM: 380,20).....19,01g

Completar para 100 mL com água deionizada

Acertar pH 8,3

**LAURIL SULFATO DE SÓDIO (SDS) 10%**

Lauril sulfato de sódio Sigma (PM: 288,4).....10,00g

Completar para 100 mL com água deionizada

**COMASSIE BLUE 0,2% (BRILLIANT BLUE R – 250)**

Metanol.....500mL

Ácido acético.....100mL

Água bidestilada.....400mL

Comassie blue (Brilliant blue R).....2g  
 Deixar em repouso durante 2 horas e filtrar

### **GEL MIX (TAMPÃO DA AMOSTRA PARA PROTEINAS DESNATURADAS)**

Lauril sulfato de sódio 10%.....10,0mL  
 EDTA 0,5M.....4,0mL  
 Triz-fosfato 0,617 M, pH 6,8.....5,0mL  
 Mercaptoetanol.....3,0mL  
 Glicerol.....10,0mL  
 Água deionizada.....18,0mL  
 Azul de bromofenol (Bromphenol Blue).....5,0mg  
 Separar em frações de uso (450 ou 900 µL) – manter no freezer até o momento do uso

### **PERSULFATO DE AMÔNIA 10%**

Persulfato de amônia.....0,1g  
 Água deionizada.....1,0mL  
 Preparar no momento da confecção do gel

### **PREPARAÇÃO DAS ALÍQUOTAS DO MARKER E DAS PROTEINAS PURIFICADAS**

8 µL de marker  
 2 µL de gel mix  
 Congelar até o momento do fracionamento (ou preparar na hora do uso)

### **PBS – CÁLCIO FREE ( TAMPÃO FOSFATO SALINA)**

NaCl.....2,0g  
 KCl.....0,0625g  
 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. 12H<sub>2</sub>O.....0,2875g  
 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....0,050g  
 Completar para 250 mL com água deionizada  
 Ajustar pH para 7,2 – conservar em geladeira

**DESCORANTE**

Metanol.....250,0mL

Ácido acético.....100,0mL

Completar para 1000 mL com água destilada

Para acelerar o processo de descoloração, os géis podem ser colocados em estufa a 40°C

**TAMPÃO DE CORRIDA CONCENTRADO (10x)**

Trizma Base.....63,2g

Glicina.....39,9g

SDS.....10g

Completar para 1000 mL com água destilada

Obs: para uso na corrida usar tampão de corrida diluído

**TAMPÃO DE CORRIDA DILUÍDO (tampão de uso na cuba)**

Medir 100 mL do Tampão de corrida concentrado (10x) e completar o volume para 1000 mL