

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL

CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE PROTEÍNAS DE FASE  
AGUDA E IgG NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Ehrlichia*  
*canis*

Thiago Demarchi Munhoz  
Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
Fevereiro de 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL

CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE PROTEÍNAS DE FASE  
AGUDA E IgG NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Ehrlichia*  
*canis*

Thiago Demarchi Munhoz  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mirela Tinucci Costa

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 (Clínica Médica Veterinária).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
Fevereiro de 2009

Munhoz, Thiago Demarchi  
M966c Concentrações séricas de proteínas de fase aguda e IgG na  
infecção experimental por *Ehrlichia canis*/ Thiago Demarchi Munhoz.  
-- Jaboticabal, 2009  
vii, 55 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009  
Orientadora: Mirela Tinucci Costa  
Banca examinadora: José Jurandir Fagliari, Suely Nunes Esteves  
Beloni  
Bibliografia

1. Proteínas de fase aguda. 2. Infecção experimental. 3. *Ehrlichia  
canis*. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e  
Veterinárias.

CDU 619:616.981.71:636.7

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

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**THIAGO DEMARCHI MUNHOZ** – solteiro, nascido na cidade de Ilha Solteira – SP, em 15 de janeiro de 1982. Médico Veterinário formado em 2005 pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Jaboticabal – SP. Durante a graduação, foi bolsista de iniciação científica do CNPq/PIBIC pesquisando a ocorrência da erliquiose nos cães atendidos no Hospital Veterinário (HV) “Governador Laudo Natel” (GLN) da FCAV-UNESP/Jaboticabal entre os anos de 1990 a 2001. Participou do Programa de Aprimoramento Profissional em Medicina Veterinária, na área de Clínica Média de Pequenos Animais, no HV GLN da FCAV-UNESP/Jaboticabal, nos anos de 2005 e 2006. Ingressou no Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Clínica Médica Veterinária, na mesma faculdade, em fevereiro de 2007, sob orientação da Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa. Atualmente, está matriculado no curso de Doutorado desta referida faculdade.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	01
1.1. Erliquiose canina.....	01
1.2. Resposta orgânica na fase aguda de uma injúria.....	04
1.3. Proteinograma sérico.....	07
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	08
2.1. Objetivo geral.....	08
2.2. Objetivos específicos.....	08
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	09
3.1. Animais experimentais.....	09
3.2. Inóculo e infecção experimental.....	10
3.3. Tempos experimentais e avaliações.....	10
3.3.1. Técnica das reações de imunofluorescência indireta (RIFI) para <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Babesia canis</i> .....	12
3.3.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	12
3.3.3. Eletroforetograma das proteínas séricas.....	14
3.3.4. Proteína C-reativa.....	15
3.3.5. Tratamento dos animais infectados.....	15
3.3.6. Análise estatística dos resultados.....	15
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	16
4.1. Avaliação da infecção experimental.....	16
4.1.1. Exame físico dos animais.....	16
4.2. Parâmetros hematimétricos.....	18
4.3. Detecção da infecção.....	22
4.3.1. Parasitemia.....	22
4.3.2. Detecção de anticorpos anti- <i>E. canis</i> e anti- <i>B. canis</i> .....	23
4.3.3. Detecção de DNA de <i>E. canis</i> .....	24
4.4. Resultado do proteinograma.....	26
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	42
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	43
<b>7. ANEXOS</b> .....	51
A. Resultado dos hemogramas dos cães do grupo controle obtidos no período pré-inoculação (D0) até o final dos 76 dias.....	52
B. Resultados dos hemogramas dos cães do grupo infectado obtidos no período pré-inoculação (D0) até o final dos 76 dias.....	53
C. Valores hematológicos de referência para a espécie canina.....	54
D. Concentrações (mg/L) séricas da Proteína C-reativa, dos cães dos grupos controle e infectado, representadas pela média, no decorrer do período experimental. Jaboticabal, SP. Fevereiro/2009.....	55

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Variação diária de temperatura dos cães infectados com <i>E. canis</i> , amostra Jaboticabal, desde o dia 1 até o dia 30 pós inoculação. No canto superior esquerdo encontra-se a representação gráfica da média das temperaturas dos animais do grupo infectado, nos dias após inoculação*. Jaboticabal, SP. Fevereiro/2009.....	17
<b>Figura 2.</b>	Visibilização do DNA de <i>E. canis</i> obtido pela nPCR de amostras de sangue total de cães do grupo infectado, no momento 18. Canaleta 1: marcador de tamanho molecular (100 pb); canaleta 2: controle positivo; canaletas 3 a 7: animais do grupo controle; canaletas 8 a 13: animais do grupo infectados; canaleta 14: controle negativo (água); pb(pares de base). Jaboticabal, SP. Fevereiro /2009.....	25
<b>Figura 3.</b>	Representação de traçado densitométrico de uma amostra de soro de um cão do grupo controle (C) e de um cão do grupo infectado (I) por <i>E. canis</i> , amostra Jaboticabal, no momento 18. Jaboticabal, SP. Fevereiro/2009.....	27
<b>Figura 4.</b>	Representação gráfica das médias e desvios padrão das concentrações de ceruloplasmina nos cães controles e infectados, no decorrer do período experimental. *Diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Jaboticabal, SP. Fevereiro/2009.....	29
<b>Figura 5.</b>	Representação gráfica das médias e desvios padrão das concentrações de transferrina nos cães controles e infectados, no decorrer do período experimental. *Diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Jaboticabal, SP. Fevereiro/2009.....	30
<b>Figura 6.</b>	Representação gráfica das médias e desvios padrão das concentrações de albumina nos cães controles e infectados, no decorrer do período experimental. *Diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Jaboticabal, SP. Fevereiro/2009.....	31
<b>Figura 7.</b>	Representação gráfica das médias e desvios padrão das concentrações de haptoglobina nos cães controles e infectados, no decorrer do período experimental. *Diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Jaboticabal, SP. Fevereiro/2009.....	32
<b>Figura 8.</b>	Representação gráfica das médias e desvios padrão das concentrações de glicoproteína ácida nos cães controles e infectados, no decorrer do período experimental. *Diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Jaboticabal, SP. Fevereiro/2009.....	33

<b>Figura 9.</b>	Representação gráfica das médias e desvios padrão das concentrações de proteína C-reativa nos cães controles (C) e infectados(I). Jaboticabal, SP. Fevereiro/2009.....	34
<b>Figura 10.</b>	Representação gráfica das médias e desvios padrão das concentrações da PM 23 KDa nos cães controles e infectados, no decorrer do período experimental. *Diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Jaboticabal, SP. Fevereiro /2009.....	36
<b>Figura 11.</b>	Representação gráfica das médias e desvios padrão das concentrações de IgG de cadeia pesada nos cães controles e infectados, no decorrer do período experimental. *Diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Jaboticabal, SP. Fevereiro/2009.....	37
<b>Figura 12.</b>	Representação gráfica das médias e desvios padrão das concentrações de IgG de cadeia leve nos cães controles e infectados, no decorrer do período experimental. *Diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Jaboticabal, SP. Fevereiro/2009.....	38
<b>Figura 13.</b>	Representação gráfica das médias e desvios padrão das concentrações de IgA nos cães controles e infectados, no decorrer do período experimental. *Diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Jaboticabal, SP. Fevereiro/2009.....	38
<b>Figura 14.</b>	Perfil das proteínas de fase aguda de cães controles e experimentalmente infectados por <i>E. canis</i> , amostra Jaboticabal, durante o período experimental. Jaboticabal, SP. Fevereiro/2009.....	39
<b>Figura 15.</b>	Perfil das imunoglobulinas de cães controles e experimentalmente infectados por <i>E. canis</i> , amostra Jaboticabal, durante o período experimental. Jaboticabal, SP. Fevereiro/2009.....	40

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Valores médios do hemograma obtidos para as características eritrométricas* em cães controles (C) e infectados (I) experimentalmente com <i>E. canis</i> , amostra Jaboticabal. Jaboticabal, SP. Fevereiro/2009.....	20
<b>Tabela 2.</b>	Valores médios do hemograma obtidos para as características leucométricas* de cães controles (C) e infectados (I) experimentalmente com <i>E. canis</i> , amostra Jaboticabal. Jaboticabal, SP. Fevereiro/2009.....	21
<b>Tabela 3.</b>	Resultados da sorologia anti- <i>E.canis</i> e anti- <i>B.canis</i> obtidos por meio da RIFI, nos cães dos grupos controle (C) e infectado (I), nos períodos pré-determinados. Jaboticabal, SP. Fevereiro/2009.....	23
<b>Tabela 4.</b>	Resultados da nPCR de <i>E. canis</i> dos cães dos grupos controle (C) e infectado (I), nos períodos pré-determinados. Jaboticabal, SP. Fevereiro/2009.....	25



## CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE PROTEÍNAS DE FASE AGUDA NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL DA ERLIQUIOSE CANINA

**RESUMO** - A erliquiose canina é uma doença de alta incidência na região nordeste do Estado de São Paulo, sendo responsável pela morte de muitos cães. O diagnóstico precoce favorece a pronta instituição do tratamento e melhora o prognóstico do animal. Estudos têm apontado que a determinação da concentração de proteínas de fase aguda (PFA) pode contribuir para detecção precoce de doenças e auxiliar na predição do prognóstico. O presente estudo objetivou avaliar o perfil de proteínas de fase aguda (PFA) em cães experimentalmente infectados com *Ehrlichia canis*, amostra Jaboticabal, no início da infecção e após o tratamento. Para tanto, foram utilizados 10 cães sem contato prévio com hemoparasitas. Deste, cinco foram infectados e cinco serviram de controle da infecção. Hemogramas, nested PCR, detecção de anticorpos anti-*E. canis* e eletroforetograma de proteínas séricas foram realizados em períodos pré-determinados. Os resultados mostraram que a proteína-C reativa, ceruloplasmina e a  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida tiveram suas concentrações aumentadas antes do aparecimento dos sinais clínicos e das alterações de hemograma nos cães infectados. Os sinais clínicos da doença tornaram-se evidentes por volta do 17º dia de infecção. Trombocitopenia foi registrada a partir do 3º dia de infecção. Mórulas intracitoplasmáticas foram detectadas a partir do 15º dia. Títulos sorológicos anti-*E. canis*, variando de 1:2560 a 1:5120, e nPCR positiva foram evidenciados no 18º dia. Nas avaliações após o tratamento os cães infectados estavam assintomáticos, com nPCR negativo e acentuada redução dos títulos de anticorpos específicos em quatro dos cinco cães. Todas as PFA estudadas reduziram suas concentrações a títulos próximos aos iniciais. Este estudo mostrou que as mensurações das PFA contribuem para o diagnóstico precoce e predição de cura da erliquiose experimental em sua fase aguda, com o tratamento à base de cloridrato de doxiciclina.

**Palavras-chave:** *Ehrlichia canis*, proteína C-reativa, ceruloplasmina, glicoproteína ácida, cães, infecção experimental.

## THE SERUM-CONCENTRATION OF ACUTE-PHASE PROTEINS IN EXPERIMENTAL CANINE EHRLICHIOSIS

**SUMMARY** - Canine ehrlichiosis is an endemic disease, with high incidence in the Northwest area of Sao Paulo State – Brazil and it is responsible for the death of numerous dogs. The rapid and accurate diagnosis helps the prompt establishment of treatment and improves the prognosis of the animal. Evidence has shown that the measurement of acute phase proteins (APP) can contribute for the early detection of the disease and help to predict its prognosis. This study evaluated the profile of APP in dogs experimentally infected with *Ehrlichia canis*, Jaboticabal – SP – Brazil sample, at the onset of the infection and after its treatment. Ten dogs, with no previous hemoparasitosis, were randomly assigned in either the infected group (5 animals), which received the bacteria, or the control group (5 animals). In pre-determined intervals, their blood was collected and hemogram, nested PCR, anti-*E. canis* antibodies detection and titration and eletrophoresis of serum proteins were performed. We showed that, in infected dogs, the concentration of C-reactive protein, ceruloplasmin and  $\alpha$ -1 acid glycoprotein were increased previous to the clinical signs forthcoming and hemogram alterations. The clinical signs were evident around the 17th day of infection. Thrombocytopenia was found on the 3th day of infection. Intra-cytosolic morules were detected on the 15th day of infection. Sorologic titration of anti-*E. canis*, ranging from 1:2560 to 1:5120, and positive nPCR were found on the 18th day of infection. In the post-treatment evaluation, the infected dogs were asymptomatic with negative nPCR and decreased titration of specific antibodies in four out of five dogs. All APP analyzed were similar to basal levels. This study showed that the measurement of APP can, indeed, contribute for the early diagnosis and prediction of cure, after treatment, of the experimental acute phase of canine Ehrlichiosis.

**Key-words:** *Ehrlichia canis*, C-reactive protein, ceruloplasmin,  $\alpha$ -1-acid glycoprotein, dogs, experimental infection

## 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. Erliquiose canina

A erliquiose canina é causada pela bactéria Gram-negativa *Ehrlichia canis* e transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (LEWIS, 1977; TROY & FORRESTER, 1990). No Brasil, COSTA Jr et al. (2007) incluem também o *Amblyomma cajennense* como potencial vetor de *E. canis* em áreas rurais.

Desde 1935, a erliquiose é descrita em cães e sua incidência em áreas tropicais e subtropicais do mundo tem sido crescente (IRWIN, 2001). Organismos sorologicamente semelhantes à *E. canis* foram identificados em humanos nos Estados do sul dos EUA e na cidade de New Jersey (TROY e FORRESTER, 1990). Relatos da enfermidade em crianças e adultos têm aumentado o potencial zoonótico da *E. canis* (MAEDA et al., 1987; GOODMAN, 1999), figurando entre as doenças de importância zoonótica na Organização Pan-americana de Saúde (BENENSON, 1992).

No Brasil, a *E. canis* foi identificada pela primeira vez na cidade de Belo Horizonte-MG, por COSTA et al. (1973). CORDEIRO et al. (1996) registraram 342 casos da doença em uma pesquisa realizada no Hospital Veterinário Governador Laudo Natel-UNESP, Jaboticabal-SP, entre os anos de 1985 a 1994 ressaltando, inclusive a importância de métodos preventivos e de controle eficazes para a doença. Anos mais tarde, no mesmo Hospital, TINUCCI-COSTA e CAMACHO (2000-comunicação pessoal), citados por MUNHOZ et al. (2003), verificaram que os casos de erliquiose canina representavam 1,95% da casuística.

DINIZ et al. (2007) encontraram soropositividade a *E. canis* em 78% dos cães doentes avaliados, descrevendo o risco significativo da transmissão da doença aos humanos pelo carrapato *R. sanguineus* nas áreas urbanas do sudeste do Brasil. Também LABRUNA et al. (2007) registraram, pela primeira vez, a ocorrência de erliquiose canina na região Amazônica do Brasil. Na região Sul, SAITO et al. (2008) descreveram soropositividade de 4,8% dentre os cães avaliados, contra uma variação de 0,7-1,7% em um estudo anteriormente realizado na mesma região.

A doença tem um período de incubação de oito a 20 dias (TROY e FORRESTER, 1990) e, após esse período, seguem as fases aguda, subclínica e crônica (WANER et al., 1999). Na infecção experimental é possível diferenciar as três fases, o que não é tão evidente na infecção natural (HARRUS et al., 1999). A fase aguda perdura por duas a quatro semanas (TROY e FORRESTER, 1990), sendo caracterizada por hipertermia, perda de peso, anorexia, mucosas pálidas, depressão, linfadenomegalia, esplenomegalia, hepatomegalia, distúrbios cardio-respiratórios, diátese hemorrágica, vasculite, sinais neurológicos, musculares, oculares e poliartrite (WANER et al., 1999). As anormalidades hematológicas mais comuns durante esta fase incluem trombocitopenia, leucopenia branda e anemia, morfológicamente caracterizada como normocítica normocrômica, geralmente arregenerativa, devido à supressão da medula óssea (FARIA et al., 2003; CASTRO et al., 2004).

Os sinais clínicos da fase aguda podem, aparentemente, se resolver sem tratamento, porém a eliminação da *E. canis* pode ser difícil e os cães permanecem infectados, passando para fase subclínica (HARRUS, et al., 1998).

A fase subclínica tem duração muito variável estendendo-se por meses a anos (WANER et al., 1997). O paciente pode apresentar trombocitopenia persistente, leucopenia e ausência de sinais clínicos (HARRUS, et al., 2004). Esta fase é marcada pelo aumento e persistência dos títulos de anticorpos no soro devido ao seqüestro da bactéria nos tecidos, o que pode resultar na recidiva da doença (IQBAL & RIKIHISA, 1994).

Os cães, incapazes de montar uma resposta imune efetiva contra a bactéria, tornam-se cronicamente infectados e apresentam depressão, fraqueza, anorexia, emagrecimento, palidez das mucosas, febre, hemorragias, edemas periféricos, sinais pulmonares, glomerulonefrite, artrite, desordens reprodutivas, sinais oftálmicos e alterações neurológicas (HARRUS et al., 1999). Foi evidenciado, experimentalmente, que o desenvolvimento de anticorpos das classes IgA e IgM específicos ocorre cerca de quatro a sete dias após a infecção, enquanto que a IgG ocorre em aproximadamente 15 dias. O surgimento de IgG parece ser dependente da quantidade de organismos erliquiais aos quais o animal foi exposto (WANER et al., 2001).

Alguns mecanismos imunológicos que participam da patogênese da doença foram evidenciados por CASTRO et al. (2004). Esses pesquisadores observaram, por meio da imunistoquímica, aumento do número de linfócitos T CD3<sup>+</sup> em órgãos linfóides, sugerindo aumento na população de células T CD8<sup>+</sup> nestes órgãos, além de áreas foliculares positivas para IgG e IgM.

O diagnóstico da erliquiose canina é feito com base na história clínica, exame físico e exames complementares, como o hematológico, bioquímico, sorológico e a detecção do DNA do agente no sangue e baço (NAKAGHI, 2004; FARIA, 2006).

SANTOS et al. (2007), em estudo realizado em cães da cidade de Ribeirão Preto, SP, ressaltaram a importância da realização de exames complementares para o diagnóstico definitivo de erliquiose canina, como esfregaços sangüíneos e técnicas moleculares, em cães trombocitopênicos, embora esta alteração no exame hematológico deva ser considerada para a suspeita diagnóstica da doença.

A identificação direta de mórulas de *E. canis* em leucócitos ou plaquetas de sangue periférico têm sido utilizada como forma de diagnosticar a doença, embora na maioria dos casos de infecção natural, a detecção direta do parasita é dificultada devido ao pequeno número de células infectadas (ELIAS, 1991). MYLONAKIS et al. (2003) concluíram que a papa leucocitária e a punção de linfonodos são mais sensíveis, quando comparados aos outros métodos diagnósticos (esfregaço sangüíneo e de medula óssea), e sugerem que poderiam ser utilizados na rotina hospitalar. FARIA (2006) demonstrou ser a citologia esplênica mais efetiva na detecção de mórulas que a papa leucocitária em cães com erliquiose canina de ocorrência natural.

O tratamento da erliquiose canina é baseado no uso de tetraciclina, doxiciclina, dipropionato de imidocarb, quinolonas e terapia de suporte (TROY & FORRESTER, 1990).

Recentemente, alguns indicadores prognósticos foram estabelecidos em um estudo realizado por SHIPOV et al. (2008). Leucopenia severa ( $< 0,93 \times 10^3/\mu\text{L}$ ), anemia severa (hematócrito  $< 11,5\%$ ), hipocalemia ( $< 3,65 \text{ mmol/L}$ ) e tempo de tromboplastina parcial ativada ( $> 18,25$  segundos) são indicativos de mortalidade, com probabilidade de 100%. De forma contrária, leucócitos acima de  $5,18 \times 10^3/\mu\text{L}$ , contagem plaquetária acima de  $89,5 \times 10^3/\mu\text{L}$ , hematócrito superior a 33,5%, tempo

de tromboplastina parcial ativada abaixo de 14,5 segundos e hipercalemia ( $> 4,75$  mmol/L) indicam 100% de predição para sobrevivência. Os mesmos autores comentam que estes indicadores prognósticos podem ser facilmente obtidos, não são caros e podem ser úteis quanto a decisão sobre tratamento e prognóstico da erliquiose canina.

## **1.2. Resposta orgânica na fase aguda de uma injúria**

A resposta de fase aguda refere-se a uma reação complexa e inespecífica do organismo animal e se desenvolve rapidamente após qualquer injúria tecidual. A origem desta resposta pode ser atribuída a causas infecciosas, imunológicas, neoplásicas, traumáticas, ou outras e o seu propósito é restaurar a homeostase e remover a causa do desequilíbrio (CERÓN et al., 2005). Como consequência deste processo ocorrem diferentes efeitos sistêmicos que incluem febre, leucocitose, aumento do cortisol sangüíneo, diminuição nas concentrações de tiroxina, mudanças metabólicas (lipólise, glicogenólise, catabolismo muscular) e redução nas concentrações séricas de ferro e zinco. A resposta também inclui variações nas concentrações de proteínas plasmáticas, conhecidas como proteínas de fase aguda (PFA) (ECKERSALL, 2000).

A resposta de fase aguda é muito rápida. Desenvolve-se antes da resposta imune específica e, em muitos casos, antes do início dos sinais clínicos. Por isso, as PFA podem ser consideradas marcadores precoces de qualquer processo patológico ou doença. Podem ser muito úteis na detecção antecipada de doenças subclínicas ou de alterações no estado de saúde do animal, além de servirem como importantes ferramentas no manejo do paciente e monitorização do tratamento (CERÓN et al., 2005).

A maioria dessas proteínas constitui-se de glicoproteínas sintetizadas, principalmente, por hepatócitos (JAIN, 1989) e induzida por ação de citocinas pró-inflamatórias, sendo as mais importantes as interleucinas 1e 6 (IL-1, IL-6) e o fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  (CERÓN et al., 2005). Dependendo da espécie animal, as PFA são consideradas ótimas indicadoras da resposta sistêmica frente aos processos inflamatórios e infecciosos, quando comparadas a outras variáveis, tais como febre,

aumento na taxa de hemossedimentação e/ou presença de leucocitose associadas à neutrofilia (JAIN, 1989).

Dependendo do estímulo, essas PFA podem diminuir ou aumentar suas concentrações (MURATA et al., 2003). No cão, de acordo com a magnitude da resposta, a proteína C reativa (do inglês, CRP) e o amilóide sérico A (SAA) são classificados como PFA maiores, enquanto que a ceruloplasmina (Cp), a haptoglobina (Hp) e a  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida (AAG) são PFA moderadas. A albumina e a transferrina são PFA negativas (CERÓN et al., 2005).

A CRP apresenta peso molecular de 100 kD e foi a primeira PFA a ser descrita. Em humanos, é um marcador sistêmico sensível à inflamação e ao dano tecidual (PEPYS & HIRSCHFIELD, 2003). Sua concentração no plasma aumenta quando o dano tecidual é causado por infecção, inflamação, neoplasia ou trauma (HAYASHI et al., 2001; MARTÍNEZ-SUBIELA et al., 2003; MATIJATKO et al., 2006; MISCHKE et al., 2006).

SHIMADA et al. (2002) monitoraram os níveis plasmáticos de CRP em cães da raça Beagle experimentalmente infectados com *E. canis*. As concentrações de CRP começaram a aumentar entre os dias 4 e 6 pós inoculação e atingiram o pico entre os dias 15 e 42. Os autores concluíram que o aumento de CRP somente foi detectado quando a *E. canis* multiplicou-se no sangue.

NAKAMURA et al. (2008) avaliaram, em cães, a concentração de proteína C reativa em várias doenças e encontraram taxas mais elevadas em doenças neoplásicas e imunomediadas, ressaltando inclusive a importância da utilização deste método de auxílio diagnóstico para se diagnosticar processos inflamatórios que não possam ser detectados pela contagem de leucócitos ou de neutrófilos bastonetes.

A AAG participa, fundamentalmente, ligando-se à maioria das drogas básicas, tais como agentes bloqueadores e antiarrítmicos (DELLO et al., 1988), ajudando a manter inalterados os níveis desses fármacos durante a resposta de fase aguda, mesmo quando a albumina sérica, a principal proteína carreadora, diminui sua concentração (MURATA et al., 2003). As concentrações de AAG alteram-se significativamente após um processo inflamatório (CONNER et al., 1988) ou infeccioso (KOGIKA et al., 2003).

RIKIHISA et al. (1994) quantificaram a CRP e a AAG em cães experimentalmente infectados com *E. canis*. As concentrações plasmáticas da CRP aumentaram gradativamente até atingirem o pico entre os dias 4 e 6 pós inoculação. Comportamento semelhante ocorreu com a AAG. Ambas PFA tiveram suas concentrações reduzidas aos níveis pré infecção no dia 34. Com base nos resultados obtidos nesse estudo, os autores propuseram que se pode suspeitar de infecção por *E. canis* quando os níveis plasmáticos de CRP e AAG estiverem elevados.

A Hp, uma  $\alpha$ -proteína, liga-se à hemoglobina livre (que é tóxica e pró-inflamatória) no plasma e reduz o dano oxidativo associado com hemólise (MURATA et al., 2003). A concentração da Hp aumenta em processos inflamatórios agudos, estresse e, às vezes, durante processos neoplásicos recentes (KOGIKA et al., 2003). Muitos estudos têm utilizado as variações nas concentrações séricas da Hp como marcadores diagnósticos e prognósticos em vários processos inflamatórios (SOLTER et al., 1991).

A ceruloplasmina (Cp) é uma  $\alpha_2$ -glicoproteína e uma das PFA positivas. Embora não haja estudos sobre a estrutura da Cp canina ou felina, relatos sobre a Cp humana mostram que é uma proteína com peso molecular de 151 kD, contendo cerca de 0,34% de cobre. Dentre suas principais funções, destacam-se: transporte de cobre necessário para a maturação e cicatrização de feridas, além da formação de colágeno; proteção das células e tecidos contra compostos oxidantes gerados por fagócitos durante o combate a microrganismos ou debris; redução no número de neutrófilos fixos ao endotélio (CERÓN et al., 2005).

Assim como a albumina, a transferrina é considerada uma PFA negativa (GRUYS et al., 2005). O ferro é transportado entre alguns compartimentos pela transferrina plasmática, que possui uma cadeia polipeptídica simples com cerca de 700 aminoácidos (peso molecular aproximado de 80 kD). A transferrina é uma glicoproteína, assim como a maioria das proteínas plasmáticas (KANEKO et al., 1997). Em humanos, tem-se estudado a comparação entre os efeitos nutricionais e os provocados por doença na produção das PFA negativas. Uma hipótese recente é que a resposta de fase aguda tem um efeito maior que o nutricional nas concentrações de transferrina, albumina e outras PFA negativas. Portanto, uma concentração diminuída



de transferrina pode ser mais indicativa de uma resposta de fase aguda que uma dieta pobre (CÉRON et al., 2005).

A imunoglobulina (Ig) G é produzida e secretada pelos plasmócitos localizados no baço, linfonodos e medula óssea. É a imunoglobulina de maior concentração no sangue e, por esta razão, exerce o papel principal nos mecanismos de defesa mediados por anticorpos. Possui duas cadeias leves idênticas e duas cadeias pesadas. A IgA é secretada pelos plasmócitos, predominantemente, localizados nos tecidos imediatamente abaixo da superfície corpórea. É produzida nas paredes do trato intestinal, trato respiratório, sistema urinário, pele e glândula mamária impedindo a aderência de antígenos às superfícies corpóreas. Quando presente nas secreções, conjuga-se com um componente secretor, formando uma molécula complexa chamada de IgA secretora. Este componente secretor auxilia o transporte da IgA pela mucosa e protege esta imunoglobulina da degradação pelas secreções (TIZARD, 1998).

### **1.3. Proteinograma sérico**

O fracionamento eletroforético representa um dos mais confiáveis métodos de identificação e quantificação das proteínas dos fluidos corporais (KANEKO et al., 1997). GORDON (1995) relatou que o uso da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, contendo duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), além de ser relativamente simples e de baixo custo, possibilita a detecção de concentrações protéicas extremamente baixas e a identificação de 20 a 30 proteínas. Segundo EDINGER et al. (1992), outras técnicas utilizadas como a fita de acetato de celulose ou filme de agarose permitem a identificação de apenas cinco a sete grupos de proteínas. Adicionalmente, o gel de poliacrilamida é livre de cargas elétricas, ao contrário de outras matrizes, fornecendo bandas protéicas nítidas (GORDON, 1995).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar o perfil de proteínas de fase aguda (PFA) no início da infecção e após o tratamento dos cães experimentalmente infectados com *E. canis*, amostra Jaboticabal (*Gene Bank* nº DQ401044).

### 2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a infecção experimental por *E. canis* por meio de exames clínicos e hematológicos periódicos, detecção de anticorpos específicos (reação de imunofluorescência indireta - RIFI) e de DNA de *E. canis* (nested PCR).
- Avaliar se o tratamento à base de cloridrato de doxiciclina é eficiente em eliminar o parasita, por meio da nPCR.
- Avaliar se as alterações das PFA podem contribuir para a ratificação da suspeição clínica, o estabelecimento precoce do diagnóstico e predição da cura da erliquiose em cães.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA) da Universidade Estadual Paulista, câmpus de Jaboticabal (protocolo 002460-08).

Foram empregados 10 cães sem raça definida (SRD), irmãos, de um ou outro sexo, com idades de 2 anos, nascidos e mantidos no canil experimental do Hospital Veterinário (HV) – UNESP/ Jaboticabal, sem prévio contato com ectoparasitas.

No período pré-experimental todos os cães foram imunizados contra doenças infecciosas (Duramune Max 5-CvK/4L e Rai-Vac I - Fort Dodge<sup>®</sup>), vermifugados (Drontal Plus<sup>®</sup> - Bayer), conforme protocolo do HV – UNESP/ Jaboticabal, e preventivamente tratados com ectoparasiticida (Front Line<sup>®</sup> - Merial). Foram alimentados com ração comercial (Sabor e Vida Filhotes<sup>®</sup> - Guabi) e água à vontade.

Durante o período pré-inoculação, os cães foram periodicamente avaliados mediante exames clínico-laboratoriais, onde se procediam exames físicos completos e hemogramas, com o intuito de acompanhar o estado de saúde dos mesmos.

Imediatamente antes da infecção experimental foram coletados 10 mL de sangue, sendo uma alíquota recolhida em frasco contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), para realização de hemograma e nested PCR e a parte remanescente dessorada e empregada na detecção de anticorpos anti-*E. canis* e anti-*B. canis*. Esses mesmos procedimentos foram repetidos outras vezes para o controle da infecção experimental, conforme especificados no Quadro 1.

Após a inoculação, os cães inoculados ou não foram diariamente examinados, enfocando-se, principalmente, a temperatura corpórea, coloração das mucosas visíveis, ingestão hídrica e alimentar além do grau de hidratação, freqüências cardíaca e respiratória, tempo de preenchimento capilar, palpação dos órgãos abdominais e dos linfonodos. O exame físico foi realizado diariamente, até o término do período experimental, simultaneamente com a realização do hemograma semanal de todos os cães.

Hemogramas foram realizados segundo o protocolo de rotina do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da FCAV Jaboticabal - UNESP.

### **3.2. INÓCULO E INFECÇÃO EXPERIMENTAL**

Confirmada a ausência de infecção por ambos os parasitas, os 10 cães foram separados, aleatoriamente, em dois grupos experimentais: grupo I composto por cinco cães que receberam o inóculo de *E. canis* (I1 a I5) e o grupo C, composto pelos demais cães, que serviram como controle da infecção (C1 a C5).

Os cinco cães do grupo I foram inoculados, por via endovenosa, com alíquotas individuais de 3mL de sangue infectado com a amostra de *E. canis* Jaboticabal (*Gene Bank* nº DQ401044), isolada e criopreservada em nitrogênio líquido por R. Z. MACHADO, em 1993, seguindo técnica descrita por BUHLES Jr et al. (1974).

Após a inoculação, o aparecimento da parasitemia foi acompanhada por meio de exames diários, pautados na pesquisa de mórulas em esfregaços sangüíneos de ponta de orelha (ELIAS, 1991), além de exame físico diário.

Soros sangüíneos, coletados em intervalos descritos no Quadro 1, foram empregados para dosagem de proteínas de fase aguda e exames sorológicos.

### **3.3. TEMPOS EXPERIMENTAIS E AVALIAÇÕES**

Os tempos experimentais foram determinados com base no comportamento das PFA descrito na literatura (RIKIHISA et al., 1994; SHIMADA et al., 2002) e no curso clínico esperado da infecção experimental por *E. canis*, amostra Jaboticabal (CASTRO et al., 2004).

Os procedimentos realizados e tempos experimentais adotados previamente e durante a infecção experimental estão descritos no Quadro 1. As técnicas sorológicas (RIFI) e moleculares (nPCR) foram realizadas no Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV – UNESP/Jaboticabal.

**Quadro 1.** Protocolo experimental\* adotado para os cães controle e experimentalmente infectados com *E. canis*, amostra Jaboticabal, neste estudo.

TEMPO	AVALIAÇÕES
Pré-inoculação (dia 0)	Hemograma Sorologia para <i>E.canis</i> e <i>B.canis</i> nPCR para <i>E.canis</i> Dosagem de proteínas de fase aguda Inoculação da amostra <i>E.canis</i> Jaboticabal
3º dia pós inoculação (dia 3)	Hemograma Coleta de soro para dosagem de proteínas de fase aguda
6º dia pós inoculação (dia 6)	Hemograma Dosagem de proteínas de fase aguda
12º dia pós inoculação (dia 12)	Hemograma Dosagem de proteínas de fase aguda
18º dia pós inoculação (dia 18)	Hemograma Dosagem de proteínas de fase aguda nPCR para <i>E.canis</i> e sorologia para <i>E.canis</i>
30º dia pós inoculação (dia 30)	Hemograma Dosagem de proteínas de fase aguda Tratamento dos animais com cloridrato de doxiciclina
25º dia pós tratamento (dia 76)	Hemograma Dosagem de proteínas de fase aguda nPCR para <i>E.canis</i> e sorologia para <i>E.canis</i>

\*Intervalos experimentais determinados com base no descrito por RIKIHISA et al. (1994), SHIMADA et al. (2002) e CASTRO et al. (2004) para as proteínas de fase aguda e a infecção experimental de *E. canis*, amostra Jaboticabal, respectivamente.

### **3.3.1. Técnica das Reações de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Ehrlichia canis* e *Babesia canis*.**

A RIFI foi realizada como descrito por CAMARGO (1973) e padronizada por NAKAGHI (2004), para o sistema *E. canis* e FURUTA (2004), para o sistema *B. canis*, respectivamente. As amostras de soros foram diluídas a 1:20 ou 1:40 em solução salina de fosfato tamponada (PBS pH 7,2), e empregadas na detecção de anticorpos anti-*E. canis* e anti-*B. canis*, respectivamente. Foram depositados 10 µL do soro diluído, em cada poço, nas lâminas com os respectivos antígenos fixados, reservando-se dois poços em cada lâmina para a adição das amostras de soros controle positivo e negativo, frente aos antígenos de *E. canis* e de *B. canis*. As lâminas foram incubadas a 37°C, por 30 minutos para *E. canis* e por 45 minutos para *B. canis*, em câmara úmida. Posteriormente, foram lavadas em PBS (pH 7,2), secas e a cada uma adicionados 10 µL de conjugado (anti-IgG de cão, marcado pelo isotiocianato de fluoresceína para as amostras testes e para os controles positivo e negativo), diluído conforme orientação do fabricante (Sigma®). O material foi então incubado, novamente, a 37°C por 30 minutos para *E. canis* e por 45 minutos para *B. canis*, em câmara úmida.

Após nova lavagem e secagem, as lâminas foram avaliadas à microscopia com emissão de luz ultravioleta. Para *E. canis*, foram considerados positivos aqueles soros que reagiram em diluições maiores ou iguais a 1:20; a positividade da reação foi dada pela observação de fluorescência nas mórulas, comparativamente às amostras de soro controle positivo e negativo. Para *B. canis*, foram consideradas positivas as reações em que toda a periferia do parasita apresentou fluorescência, a partir da diluição 1:40.

### **3.3.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

Neste estudo foi empregado a nPCR padronizada por NAKAGHI (2004) e também utilizada por FARIA (2006), descrita a seguir, resumidamente.

### ***Extração de DNA de sangue total***

A extração de DNA do sangue total foi realizada com o Mini Kit QIAamp DNA Blood (cat. n° 51104, Qiagen®), conforme descrito por e Harrus et al. (1998), e a técnica utilizada foi a preconizada pelo fabricante.

### ***Seleção dos primers***

Os primers utilizados para a PCR de *Ehrlichia* spp foram aqueles baseados na seqüência do gene 16S rRNA ECC e ECB que amplifica todo o gênero. Na nested PCR para amplificação do DNA da espécie *Ehrlichia canis* foram utilizados os primers ECAN e HE3 (HARRUS et al., 1998).

### ***Amplificação de DNA de Ehrlichia spp e de Ehrlichia canis***

As reações foram compostas por 5,0µL do DNA da amostra em 5,0 µL de tampão da PCR (PCR buffer 10X – 100mM Tris-HCl, pH 9,0, 500 mM KCl), 0,2mM de cada deoxinucleotídeo (dTTP, dATP, dGTP, dCTP, Invitrogen®), 2,5mM de Cloreto de Magnésio, 1pmol de cada primer (Invitrogen®), 1,25U de Taq DNA Polimerase Recombinante (Invitrogen®) e água (Gibco®) q.s.p. 50µL.

As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador (MJ Research - PTC 200). A amplificação com os primers ECC e ECB consistiu-se de um ciclo inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 65°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 2 minutos, e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Para a reação do nested foram utilizadas as mesmas soluções, além de 1,0µl da amostra de DNA amplificado e os primers espécie-específicos ECAN5 e HE3. A reação consistiu-se de 3 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 1,5 minuto e 37 ciclos de desnaturação a 92°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 1,5 minuto.

### ***Eletroforese de DNA em gel de agarose***

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose (Invitrogen<sup>®</sup>) a 1,5% corado com brometo de etídio (0,5µL/mL) em tampão de corrida TAE (40mM Tris-acetato, 2mM EDTA pH 8,0). A eletroforese foi realizada a 90V/ 50mA durante 90 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados foi utilizado um marcador de tamanho molecular de 100 pares de base (100bp ladder, Invitrogen<sup>®</sup>). Os resultados foram visibilizados e analisados por meio de um transiluminador de luz ultravioleta acoplado a um programa computacional analisador de imagens (Eagle Eye II - Stratagene<sup>®</sup>).

### **3.3.3. Eletroforetograma das proteínas séricas**

O proteinograma foi obtido por fracionamento eletroforético em sistema vertical pela técnica SDS-PAGE, segundo método de preparo de gel descrito por LAEMMLI (1970). Para tanto, foram utilizadas amostras de soro sanguíneo (10 µL) diluídas em tampão fosfato (30 µL PBS) e gel mix (20 µL). A seguir, as amostras foram aquecidas sobre água em ebulição durante 10 minutos. Uma fração de 5 µL desta mistura foi depositada no fosso do gel contido em uma placa que foi colocada em suporte apropriado, em contato com a solução tampão de pH 6,5 e submetida à corrente elétrica de 50 mA, em fonte apropriada. Terminada a separação, o gel foi corado durante 60 minutos em solução de azul de Comassie 0,2% e, em seguida, descorado em solução de ácido acético glacial a 7%, até que as frações se apresentassem nítidas. Os pesos moleculares e as concentrações das frações protéicas foram determinados mediante leitura em densitômetro computadorizado (Densitômetro Shimatzu CS-9301 – Tóquio – Japão), e as concentrações obtidas por cálculos manuais (NAOUM, 1999; THOMAS, 2000; FAGLIARI & SILVA, 2002). Para a identificação das proteínas no gel, foram utilizados 10 marcadores de pesos moleculares que variavam de 20 a 200 kDa, além das proteínas purificadas ceruloplasmina, transferrina,  $\alpha_1$ -antitripsina, IgG e haptoglobina.



### **3.3.4. Proteína C-Reativa**

Para a dosagem das concentrações de proteína c-reativa, utilizou-se o kit comercial PCR-Ultra Sensível – método turbidimétrico (CAT BT 20.017.00, BioTécnica, Minas Gerais), cujo princípio consiste de uma reação de aglutinação de partículas de látex recobertas com anticorpo anti-proteína C-reativa humana, quando misturadas com a proteína c-reativa presente na amostra de soro. A aglutinação causa uma mudança de absorvância proporcional à concentração de proteína C-reativa da amostra, que é quantificada pela comparação com um calibrador de concentração conhecida. O procedimento técnico foi seguido conforme as recomendações do fabricante.

### **3.3.5. Tratamento dos animais infectados**

Os animais do grupo infectado, após os trinta dias de infecção, foram tratados com cloridrato de doxiciclina (Doxifin<sup>®</sup>, Ouro Fino). A posologia utilizada foi de 5 mg/kg, por via oral, a cada 12 horas, durante 21 dias.

### **3.3.6. Análise estatística dos resultados**

Foi realizada análise de variância de medidas repetidas, com um fator entre as unidades experimentais (tempo) e um fator entre os grupos (controle/infectado). As comparações dos pares de médias foram feitas pelo teste de Tuckey. Um valor de diferença mínima significativa ( $p < 0,25$ ) para a interação momento/grupo foi considerado significativo e um valor de diferença mínima significativa ( $p < 0,05$ ) para os grupos foi considerado significativo.

Para a proteína C-reativa, utilizou-se a comparação das médias pelo teste T (ZAR, 1999).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Avaliação da infecção experimental

#### 4.1.1. Exame físico dos animais

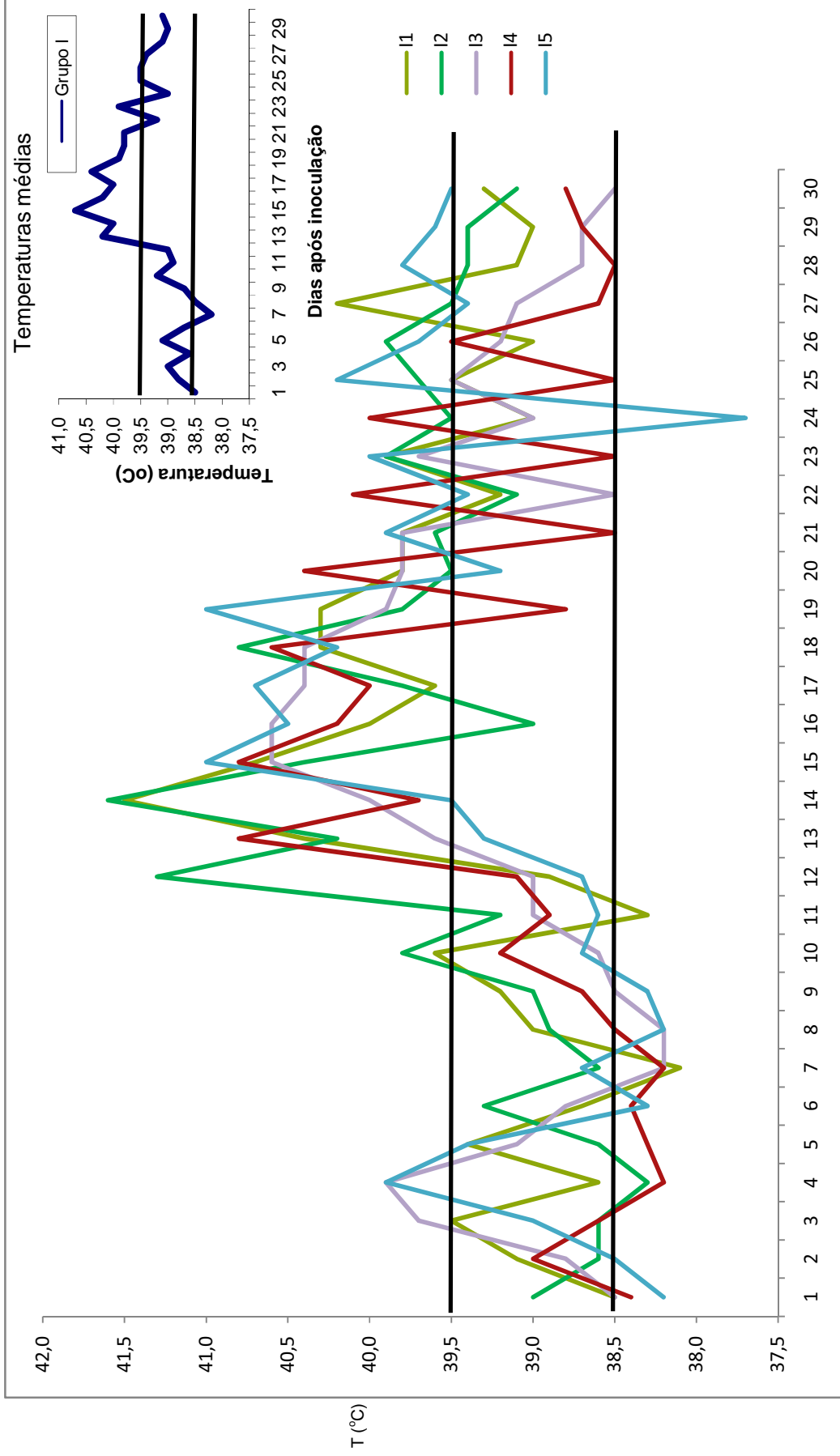
Os animais do grupo controle não apresentaram alterações significativas no exame físico durante todo o período experimental. Inversamente, todos os animais infectados tornaram-se inapetentes por volta do 17º dia pós inoculação (PI), havendo a necessidade de apoio nutricional (introdução de ração úmida ou dieta caseira para estimulação do apetite). O animal I2 foi alimentado, durante quatro dias, por sonda nasogástrica, voltando a se alimentar espontaneamente ao final deste período.

Nos animais de ambos os grupos não foram observadas alterações significativas quanto ao grau de hidratação, frequências cardíaca e respiratória e tempo de preenchimento capilar. Os animais do grupo I apresentaram alterações nas colorações das mucosas oral e ocular a partir do 22º dia PI, tornando-se de róseo-claras à pálidas, mantendo-se assim até o início do tratamento.

Quanto à temperatura retal (Figura 1), apesar de alguns animais apresentarem temperaturas superiores a 39,5°C logo nos primeiros dias PI, os picos de temperatura se concentraram entre os dias 12 e 20 PI. Após este período, houve alteração individual da temperatura até o dia 28 PI. Somente o animal I5 manteve a temperatura acima de 39,5°C até os dois últimos dias do que se considerou a fase aguda da infecção experimental.

Todos os animais infectados apresentaram linfadenomegalia (especialmente dos linfonodos submandibulares, pré-escapulares e poplíteos), coincidente com o início do quadro febril.

Quanto à palpação abdominal, dois animais (I1 e I4) apresentaram destacada esplenomegalia a partir do 14º dia PI, persistindo até o início do tratamento e, gradativamente, reduzindo ao longo do mesmo.



Dias após inoculação

**Figura 1.** Variação diária de temperatura dos cães infectados com *E. canis*, amostra Jaboticabal, desde o dia 1 até o dia 30 pós inoculação. No canto superior esquerdo encontra-se a representação gráfica da média das temperaturas dos animais do grupo infectado, nos dias após inoculação\*. Jaboticabal, SP. Fevereiro/2009. \*As linhas pretas paralelas indicam a faixa de variação fisiológica de temperatura para a espécie canina (NELSON & COUTO, 1998).

O exame físico dos animais infectados mostrou resultados semelhantes aos encontrados por CASTRO (1997), que fez o primeiro trabalho avaliando a infecção experimental por *E. canis*, amostra Jaboticabal. No estudo em questão, os animais passaram a apresentar sinais clínicos da doença entre os dias 10 e 14 PI, com aumento significativo da temperatura a partir da segunda semana de infecção, atingindo valores médios de 40,2°C. Linfadenomegalia generalizada foi observada em todos os animais do grupo infectado a partir do 12º dia PI. A esplenomegalia tornou-se clinicamente detectável no dia 16 PI em três dos 4 cães pertencentes ao grupo infectado. SILVA (2001) também descreve hiporexia, mucosas hipocoradas, emagrecimento, linfadenopatia, esplenomegalia e aumento de temperatura retal em animais inoculados com a mesma amostra.

Na erliquiose canina de ocorrência natural, apatia, anorexia, mucosas pálidas, linfadenomegalia, esplenomegalia e hipertermia são citações freqüentes (TROY & FORRESTER, 1990; WANER et al., 1999; NAKAGHI, 2004; FARIA, 2006), semelhantes às descritas para a infecção experimental.

Neste estudo, os achados de exame físico dos animais experimentalmente infectados por *E. canis*, amostra Jaboticabal, comparados com estudos pregressos e casos naturais da doença, mostraram que o método de inoculação empregado e a amostra foram eficientes na reprodução da enfermidade. Tais comparações também foram utilizadas por BUHLES Jr. et al. (1974) e CASTRO (1997) para assegurar o sucesso da inoculação.

Nenhum cão infectado precisou ser tratado com cloridrato de doxiciclina ou qualquer outro medicamento antes do tratamento proposto (Quadro 1). Após a introdução deste (D30), mesmo antes do término previsto, os animais já mostravam melhora nos parâmetros clínicos avaliados. Ao final do período de tratamento, os cães estavam completamente recuperados.

#### **4.2. Parâmetros hematimétricos**

Quando se avaliaram os resultados dos hemogramas, apresentados pela média, não se observaram alterações dignas de nota para os cães do grupo controle, como

podem ser conferidos nas Tabelas 1 e 2. Individualmente, cães deste grupo exibiram algumas poucas alterações nos resultados dos hemogramas, sem que estas pudessem ser relacionadas a processos patológicos. Sendo assim, foram atribuídas a variações individuais (Anexo A).

Por sua vez, a partir do D3, foi possível observar trombocitopenia nos cães do grupo infectado, que persistiu até o término do período experimental, mesmo após o tratamento. Leucopenia foi observada a partir do D6 e perdurou, da mesma forma que a trombocitopenia, até o final das avaliações. Quanto à contagem diferencial de leucócitos, o grupo apresentou eosinopenia nos dias 18 e 30, assim como neutropenia (neutrófilos segmentados) também no dia 18. A contagem de basófilos e neutrófilos bastonetes permaneceu dentro dos valores de normalidade para os dois grupos experimentais.

Anemia discreta foi registrada a partir do D12, se agravando nos D18 e D30, onde atingiu seus índices mais baixos. No D76, após o tratamento, as contagens médias de hemácias estavam dentro dos parâmetros fisiológicos normais para a espécie. Avaliação individual dos animais do grupo I podem ser observadas no Anexo B.

CASTRO (1997) descreveu o aparecimento de leucopenia transitória na segunda semana pós infecção experimental, normalizando os valores leucocitários na semana seguinte. Trombocitopenia foi coincidente com a leucopenia e a anemia, por sua vez, foi notada a partir da primeira semana PI, atingindo os índices mais baixos na terceira semana PI ( $2,9 \times 10^6$  hemácias/ $\mu$ L).

Ao se analisarem os resultados dos hemogramas deste estudo, pôde-se observar que as alterações referidas se assemelharam às descritas por CASTRO (1997). Entretanto, a maioria destas alterações ocorreram mais precocemente, embora nos dois estudos os cães tenham sido inoculados com a amostra Jaboticabal de *E. canis*.

**Tabela 1.** Valores médios do hemograma obtidos para as características eritrométricas\* em cães controles (C) e infectados (I) experimentalmente com *E. canis*, amostra Jaboticabal. Jaboticabal, SP. Fevereiro/2009.

\*Consultar no Anexo C os valores de referência para a espécie canina.

	Dias experimentais						
	0	3	6	12	18	30	76
<b>Hemácias/<math>\mu</math>L</b>							
C	7.000.000	6.890.000	6.680.000	6.090.000	6.020.000	7.530.000	6.450.000
I	7.220.000	6.940.000	6.970.000	5.980.000	4.510.000	4.220.000	6.560.000
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>							
C	17,44	16,42	16,18	15,68	15,08	19,58	15,86
I	17,92	16,72	17,10	15,62	11,88	10,94	15,82
<b>Hematócrito (%)</b>							
C	48,98	48,88	47,02	42,66	42,42	53,26	46,22
I	50,50	49,14	48,64	42,36	30,78	29,30	45,28
<b>Plaquetas/<math>\mu</math>L</b>							
C	247.600	241.800	249.600	233.200	226.200	225.400	203.400
I	222.400	181.000	140.200	187.200	56.400	166.200	181.400

**Tabela 2.** Valores médios do hemograma obtidos para as características leucométricas\* de cães controles (C) e infectados (I) experimentalmente com *E. canis*, amostra Jaboticabal. Jaboticabal, SP. Fevereiro/2009.

	Dias experimentais						
	0	3	6	12	18	30	76
Leucócitos/ $\mu$ L							
C	8.180	8.240	8.900	8.620	8.160	7.820	6.560
I	7.380	7.240	5.180	5.540	3.520	5.100	5.180
Eosinófilos/ $\mu$ L							
C	890	990	440	770	500	940	850
I	520	430	310	220	40	50	260
Segmentados/ $\mu$ L							
C	4.260	4.780	5.970	5.440	5.460	4.390	3.540
I	3.980	4.130	3.110	3.990	2.390	3.520	3.370
Linfócitos/ $\mu$ L							
C	2.870	2.300	1.790	2.070	1.640	2.270	2.040
I	2.660	2.390	1.500	1.050	840	1.270	1.240
Monócitos/ $\mu$ L							
C	160	170	530	170	400	150	130
I	220	290	260	170	180	210	210

\*Consultar no Anexo C os valores de referência para a espécie canina.

A exata explicação para estas sutis diferenças não foi bem definida. Uma possibilidade seria a origem do inóculo, uma vez que CASTRO (1997) se utilizou de uma amostra original criopreservada, ao passo que a empregada neste estudo sofreu uma passagem em cultivo em uma linhagem de monócitos caninos (DH82-ATCC, CRL-10389, USA) (AGUIAR et al., 2007). Este procedimento poderia ter aumentado a virulência da amostra, como descrito para outros agentes infectantes (WELLMAN et al., 1988).

Outra possibilidade seriam os cães receptores do inóculo. CASTRO (1997) inoculou *E. canis*, amostra Jaboticabal, em filhotes de Pastores alemães de 4 meses de idade, que sabidamente desenvolvem um quadro clínico severo da doença (TROY & FORRESTER, 1990; SHIMADA et al., 2002). Neste estudo, foram empregados cães sem definição racial e com 2 anos. Desta forma, o esperado seria um quadro clínico muito mais brando o que, de fato, não ocorreu. Estas variações demonstram a necessidade de se melhor avaliar a patogenia da erliquiose canina experimental, pois sugerem que outros fatores, que não a raça e idade, possam estar envolvidos, além de apontarem para variações na virulência das amostras.

### **4.3. Detecção da infecção**

#### **4.3.1. Parasitemia**

Mórulas intracitoplasmáticas foram encontradas em três (I2, I4 e I5) dos 5 animais do grupo infectado a partir do D15, em esfregaços sangüíneos de ponta de orelha, confirmando a parasitemia e a infecção por *E. canis*. CASTRO (1997) e SILVA (2001) observaram mórulas intracitoplasmáticas no 12<sup>o</sup> dia PI, em todos os animais do grupo infectado (4 cães), coincidente com o período em que os animais apresentavam-se febris e condizente com o observado no presente estudo.

Na infecção natural, a detecção do parasita no sangue, na maioria das vezes, é ineficiente. Estudos de FRANK & BREITSCHWERDT (1999) e de OLIVEIRA et al. (2000) relataram a presença de mórula de *E. canis* em um cão dos 62 pesquisados e em um cão entre outros 52 analisados, respectivamente. Atribui-se isso ao baixo



número de células infectadas pelo agente em infecções naturais (HARRUS et al., 1997). Estudos recentes mostraram maior eficiência na pesquisa de mórulas, em cães naturalmente infectados, em exames de citologias esplênicas (FARIA, 2006).

#### 4.3.2. Detecção de anticorpos anti-*E.canis* e anti-*B.canis*

Os resultados da pesquisa de anticorpos anti-*E. canis* e anti-*B.canis*, por meio da RIFI, foram negativos para todos os animais deste experimento no dia 0, demonstrando que se tratavam de cães não expostos aos hemoparasitas. Nas avaliações subseqüentes (D18 a D76), os animais do grupo controle permaneceram negativos aos anticorpos anti-*E.canis*, sendo o inverso visto nos animais infectados, em ambos os tempos experimentais. Os títulos variaram de 1:2.560 a 1:5.120 no D18 a 1:320 a 1:2.560 no D76, como pode ser visto na Tabela 2.

**Tabela 3.** Resultados da sorologia anti-*E.canis* e anti-*B.canis* obtidos por meio da RIFI, nos cães dos grupos controle (C) e infectado (I), nos períodos pré-determinados. Jaboticabal, SP. Fevereiro/2009.

	<i>E. canis</i> (D0)	<i>B. canis</i> (D0)	<i>E. canis</i> (D18)	<i>E. canis</i> (D76)
<b>C1</b>	-	-	-	-
<b>C2</b>	-	-	-	-
<b>C3</b>	-	-	-	-
<b>C4</b>	-	-	-	-
<b>C5</b>	-	-	-	-
<b>I1</b>	-	-	1:2.560	1:320
<b>I2</b>	-	-	1:2.560	1:2.560
<b>I3</b>	-	-	1:2.560	1:1.280
<b>I4</b>	-	-	1:5.120	1:640
<b>I5</b>	-	-	1:2.560	1:1.280

Pesquisadores relataram a detecção de anticorpos anti-*E. canis* em cães Pastores alemães, infectados experimentalmente com a amostra Oklahoma, a partir do segundo dia PI, com títulos crescentes até o décimo dia PI, mantendo-se elevados após este período (1:160 a 1:1.024) (RIKIHISA et al., 1994). Contudo, outros pesquisadores observaram a soroconversão de Beagles infectados com a mesma amostra Oklahoma entre os dias 5 e 15 PI, com títulos crescentes, chegando a atingir título de 1:40.960 no dia 65 PI (SHIMADA et al., 2002).

Segundo WANER et al. (2001), a detecção inicial de IgG parece ser dependente da quantidade de organismos erliquiais aos quais o animal foi exposto. Além disso, a discrepância entre resultados da RIFI pode ocorrer pela diversidade antigênica entre as amostras de *E. canis* de diferentes regiões do mundo, duração do processo infeccioso e diferenças entre as raças de cães quanto à resposta imune frente a erliquiose canina. Estudos anteriores afirmam que cães podem permanecer com altos títulos de IgG por um longo período, mesmo após a eliminação do parasita (IQBAL et al., 1994; HARRUS et al., 1998).

#### **4.3.3. Detecção do DNA de *E. canis***

O DNA de *E. canis* foi detectado nos cães infectados no 18º dia PI, tornando-se negativos após o tratamento (D76) (Tabela 3). Os produtos amplificados, fragmentos de 398 pares de base de *E. canis* dos cães do grupo infectado, no momento 18, podem ser vistos na Figura 2.

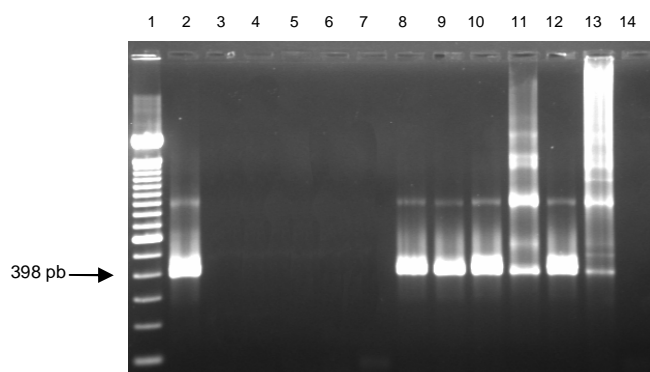
A nPCR é considerada uma prova altamente específica e sensível, especialmente quando analisada em conjunto com a RIFI, para o diagnóstico da erliquiose canina (WEN et al., 1997), podendo também ser empregada para avaliação da eficácia da terapia contra *E. canis* (HARRUS et al., 1998).

Neste experimento, a detecção de anticorpos anti-*E. canis* teve como propósito apenas verificar se os cães infectados estavam respondendo à infecção e, posteriormente, na detecção seguinte (D76), avaliar se o tratamento dos animais poderia impedir a progressão dos títulos, o que seria o esperado em casos não tratados. A marcada redução dos títulos de anticorpos na maioria dos cães (4 dos 5) no

D76, juntamente com a ausência de detecção de DNA de *E. canis* após o tratamento apontam para o sucesso da terapia adotada e a eliminação do agente, concordante com a opinião de HARRUS et al. (1998).

**Tabela 4.** Resultados da nPCR de *E. canis* dos cães dos grupos controle (C) e infectado (I), nos períodos pré-determinados. Jaboticabal, SP. Fevereiro/2009.

	<i>E. canis</i> (D0)	<i>E. canis</i> (D18)	<i>E. canis</i> (D76)
<b>C1</b>	-	-	-
<b>C2</b>	-	-	-
<b>C3</b>	-	-	-
<b>C4</b>	-	-	-
<b>C5</b>	-	-	-
<b>I1</b>	-	+	-
<b>I2</b>	-	+	-
<b>I3</b>	-	+	-
<b>I4</b>	-	+	-
<b>I5</b>	-	+	-



**Figura 2.** Visibilização do DNA de *E. canis* obtido pela nPCR de amostras de sangue total de cães do grupo infectado, no momento 18. Canaleta 1: marcador de tamanho molecular (100 pb); canaleta 2: controle positivo; canaletas 3 a 7: animais do grupo controle; canatelas 8 a 13: animais do grupo infectados; canatela 14: controle negativo (água); pb (pares de base). Jaboticabal,SP. Fevereiro/2009.

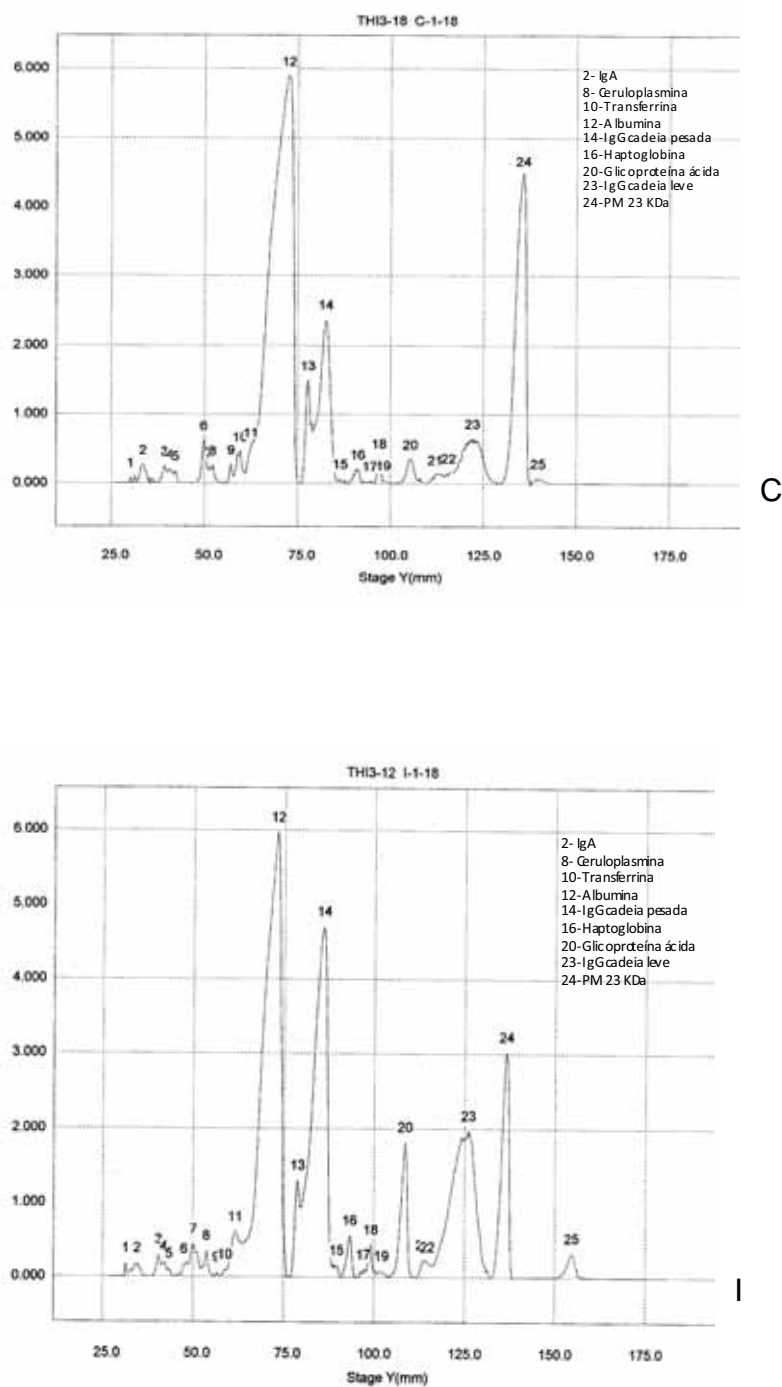
#### 4.4. Resultado do proteinograma

O eletroforetograma revelou a presença de 25 frações protéicas no traçado densitométrico dos soros sanguíneos dos animais deste experimento. Destas, nove proteínas foram consideradas importantes para o estudo, por serem imunoglobulinas e proteínas de fase aguda. São elas: imunoglobulina (Ig) A (139 KDa), ceruloplasmina (125 KDa), transferrina (79 KDa), albumina (69 KDa), IgG de cadeia pesada (58 KDa), haptoglobina (45 KDa), glicoproteína ácida (40 KDa), IgG de cadeia leve (35 KDa) e proteína de peso molecular 23 KDa (PM 23 KDa). Um exemplo do traçado densitométrico de uma amostra de soro de um cão do grupo controle (C) e um do grupo infectado (I) estão representados na Figura 3.

Comparando-se os traçados densitométricos dos soros dos cães dos diferentes grupos (controle e infectado) e nos diferentes tempos experimentais, foi possível observar traçados distintos, o que levou a diferentes curvas de concentração destas proteínas.

Todas as nove proteínas destacadas apresentaram interações significativas ( $p < 0,25$ ) momento/grupo, indicando que as curvas seguiram tendências diferentes entre os grupos, no decorrer do período experimental. As concentrações destas 9 proteínas, apresentadas pela média, juntamente com seus respectivos desvios padrão, encontram-se na Tabela 4.

A concentração da ceruloplasmina, nos animais infectados, aumentou gradativamente a partir do D3, atingindo, precocemente, as máximas concentrações nos D6 e D12 (fato também observado para a glicoproteína ácida e não para as demais PFA) seguindo em queda acentuada até o D30, data na qual o processo se reverteu. Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos nos dias 6 e 12 PI (Figura 4).

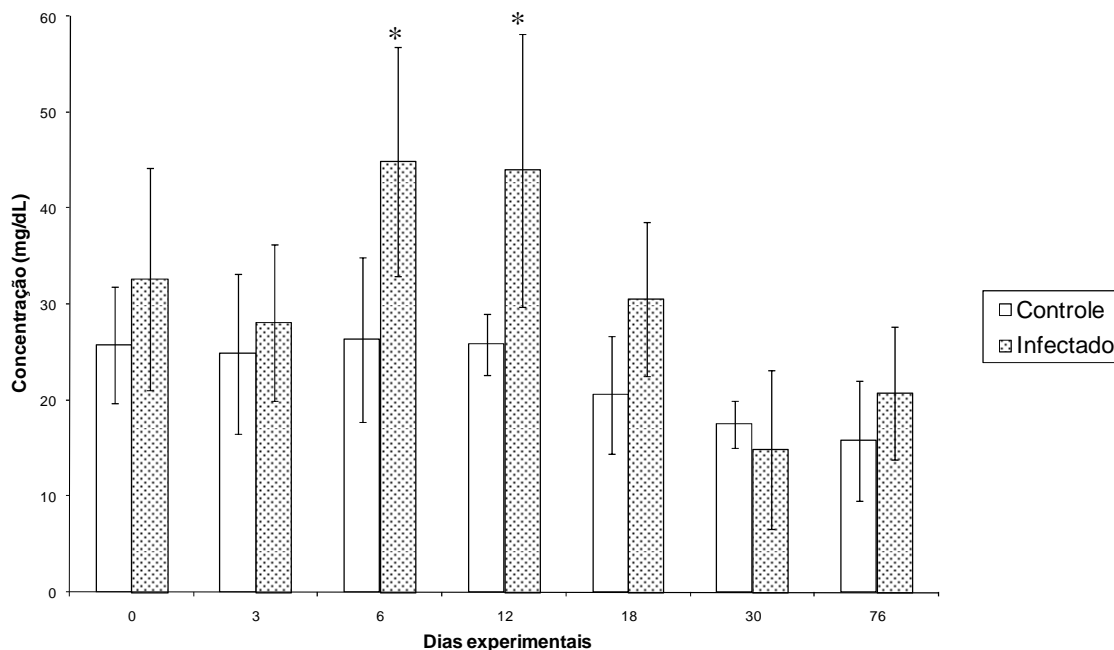


**Figura 3.** Representação de traçado densitométrico de uma amostra de soro de um cão do grupo controle (C) e de um cão do grupo infectado (I) por *E. canis*, amostra Jaboticabal, no momento 18. Jaboticabal, SP. Fevereiro/2009.

**Tabela 4.** Médias e respectivos desvios padrão das concentrações séricas de proteínas (mg/dL) obtidas em gel de poliacrilamida dos cães do grupo controle (C) e do grupo infectado (I), durante o período experimental.

PROTEÍNA	G	Dia 0	Dia 3	Dia 6	Dia 12	Dia 18	Dia 30	Dia 76
IgA	I	61,7±7,83Aa	47,92±3,56 Aab	28,98±11,08 Ac	38,84±13,30 Abc	29,64±5,69 Bc	25,34±8,11 Bc	46,96±12,43 Aab
	C	55,1±3,25Aa	51,17±7,66 Aa	36,97±4,62 Aa	47,87±15,29 Aa	41,05±9,06 Aa	40,3±4,51Aa	42,55±10,17 Aa
Cerul.	I	32,67±11,55 Aab	28,0±8,11 Aab	44,88±11,92 Aa	43,96±14,18 Aa	30,54±8,05 Aab	14,84±8,28 Ac	20,76±6,91 Abc
	C	25,77±6,11 Aa	24,9±8,33 Aa	26,37±8,57 Ba	25,85±3,23 Ba	20,55±6,1 Aa	17,5±2,5 Aa	15,75±6,26 Aa
Transf.	I	80,22±11,38 Acd	75,32±14,4 Ad	91,94±21,49 Acd	108,34±19,06 Abc	175,42±75,50 Ba	136,94±29,79 Bab	102,66±32,61 Abcd
	C	73,1±5,34 Aab	78,0±26,84 Aab	85,22±21,03 Aa	87,67±29,9 Aa	68,9±11,53 Aab	54,3±13,62 Ab	75,55±22,26 Aab
Alb.	I	3817,44±711,21 Aa	3499,92±281,56 Aab	3397,2±246,69 Aab	3070,64±183,03 Abc	2427,62±153,68 Bcde	2381,68±424,89 Be	2841,52±236,0 Acd
	C	3312,78±228,96 Aa	3241,4±290,86 Aa	3388,15±64,87 Aa	3219,73±288,61 Aa	3170,03±164,28 Aa	2880,08±201,27 Aab	2529,68±178,63 Ab
IgG CP	I	615,8±225,79 Abc	458,6±63,31 Ac	512,9±137,47 Ac	813,16±296,25 Aab	1122,56±283,85 Aa	1233,04±583,43 Aa	592,66±113,34 Abc
	C	549,95±146,27 Aa	529,45±110,83 Aa	547,62±101,23 Aa	550,52±128,95 Aa	561,37±111,94 Ba	560,6±126,36 Ba	452,7±43,99 Aa
Haptog.	I	43,02±7,35 Aab	44,26±4,47 Aab	54,78±7,3 Aa	43,52±12,69 Aab	60,38±7,10 Ba	35,8±11,03 Ab	28,78±5,24 Ab
	C	43,5±10,75 Aab	38,92±4,97 Aab	47,95±5,02 Aa	38,57±11,74 Aab	29,37±8,77 Abc	37,67±3,97 Aab	23,42±10,49 Ac
Glicop. Ac.	I	83,63±46,82 Ab	71,78±44,28 Abc	163,45±133,62 Aab	195,5±40,37 Aa	162,2±148,29 Aab	32,82±10,85 Ac	75,64±36,15 Ab
	C	49,4±8,26 Aa	48,86±16,47 Aa	50,0±19,94 Ba	63,27±19,73 Ba	69,17±36,16 Aa	55,47±23,39 Aa	29,5±13,19 Aa
IgG CL	I	334,64±148,72 Abc	283,96±28,52 Ac	291,78±79,92 Ac	398,82±164,82 Ab	673,84±278,37 Aa	877,98±381,83 Aa	315,48±64,03 Abc
	C	301,0±73,73 Aa	265,05±68,77 Aab	293,32±62,02 Aa	327,12±89,67 Aa	256,72±75,04 Bab	265,87±56,01 Bab	219,3±54,38 Ab
PM 23 KDa	I	1076,0±172,3 Aa	1092,46±115,26 Aa	1065,66±114,16 Aa	983,28±161,25 Aa	667,88±121,59 Bbb	679,64±209,69 Bbb	1046,64±119,9 Aa
	C	1004,18±127,72 Aab	954,07±63,52 Aab	1028,5±26,94 Aab	1123,1±51,4 Aa	1022,85±64,73 Aab	952,87±109,14 Aab	828,0±63,57 Bb

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes, nas colunas, indicam diferença significativa entre grupos (  $p < 0,05$ ). Médias seguidas por letras minúsculas diferentes, nas linhas, indicam diferença significativa entre momentos (  $p < 0,05$ ) (Teste de Tukey – base log). Cerul. (ceruloplasmina), Transf. (transferrina), Alb. (albumina), IgG CP (IgG cadeia pesada), Haptog. (haptoglobina), Glicop. Ac. (glicoproteína ácida), IgG CL (IgG cadeia leve).

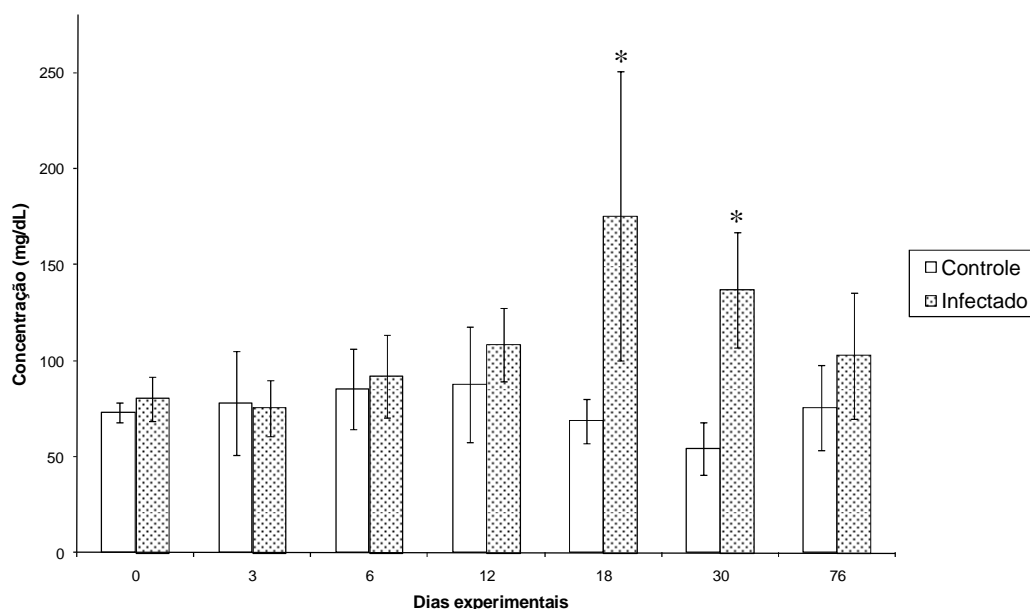


**Figura 4.** Representação gráfica das médias e desvios padrão das concentrações de ceruloplasmina nos cães controles e infectados, no decorrer do período experimental. \* Diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Jaboticabal, SP. Fevereiro/2009.

Concentrações séricas elevadas de ceruloplasmina foram observadas em cadelas com piometra (FARIA Jr, 2004), na babesiose canina de ocorrência natural (ULUTAS et al., 2005) e em cães com gastroenterite hemorrágica (KOGIKA et al., 2003). Nestes últimos, os autores concluíram que a determinação da ceruloplasmina poderia ser um indicador precoce do processo inflamatório. Estas informações são coincidentes com as do presente estudo, pois esta PFA, logo após a infecção experimental, exibiu um dos picos mais precoces (D6), mesmo antes do aparecimento dos sinais clínicos. Contudo, nenhuma outra descrição sobre as concentrações séricas de ceruloplasmina em cães com erliquiose foi encontrada, fato que impede estabelecer comparações.

A transferrina, diferentemente do esperado, por se tratar de uma proteína de fase aguda negativa, comportou-se como uma PFA positiva, tendo suas concentrações, no grupo infectado, crescentes até o D18, no qual verificou-se sua concentração máxima, reduzindo a partir de então, próximas às iniciais. No grupo controle, esta proteína apresentou a curva inversa à vista no grupo infectado, a partir

do D12 até o D30, com a concentração retornando próxima à do D0, no D76. Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos, em D18 e D30 (Figura 5).



**Figura 5.** Representação gráfica das médias e desvios padrão das concentrações de transferrina nos cães controles e infectados, no decorrer do período experimental. \* Diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Jaboticabal, SP. Fevereiro/2009.

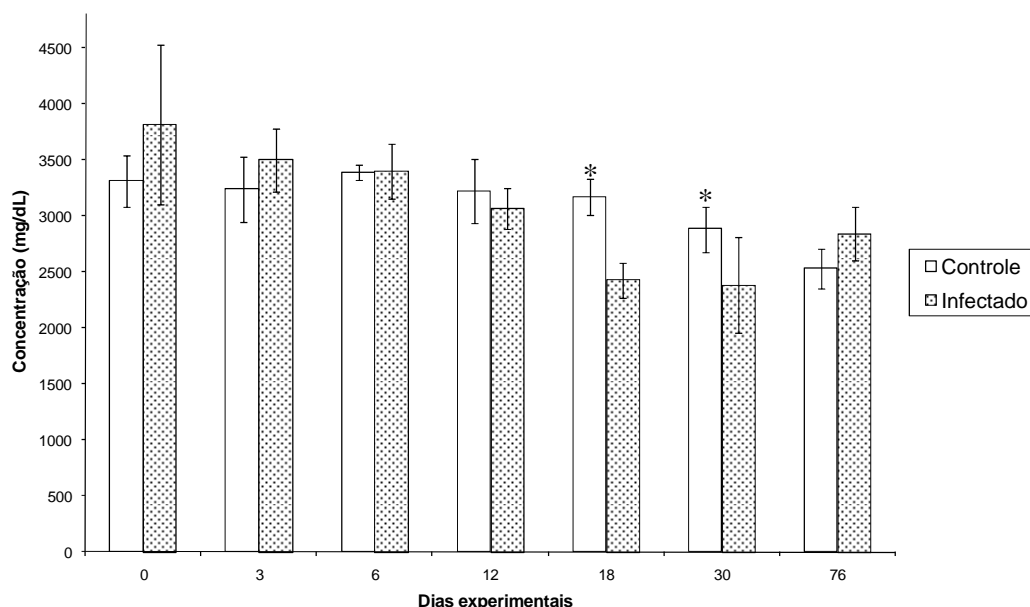
RODRIGUES (2006) observou valores maiores de transferrina em cadelas submetidas à cesariana quando comparadas àquelas com parto fisiológico. Do mesmo modo, cães reagentes à RIFI para leishmaniose visceral canina apresentaram concentrações séricas mais elevadas desta PFA em relação aos cães não reagentes (RIBEIRO, 2007). Aparentemente, o processo inflamatório envolvido nas situações anteriormente descritas desencadeie um aumento na produção da transferrina, coincidente com o observado neste estudo.

Embora a literatura a considere uma PFA negativa (CERÓN et al., 2005; GRUYS et al., 2005) esperar-se-ia que na medida em que a infecção experimental progredisse, sua concentração também se reduziria, o que não ocorreu. Todavia, tem sido descrito que existem variações na resposta de fase aguda entre as proteínas e entre as espécies (MARTINEZ-SUBIELA et al., 2001).



De acordo com MURATA et al. (2003), o incremento nos valores séricos de transferrina durante a inflamação pode ajudar o organismo afetado na defesa contra agentes infecciosos. Possivelmente por este motivo, também na infecção aguda da *E. canis*, esse evento possa ocorrer.

A albumina, uma PFA negativa, apresentou concentrações decrescentes até o D30, percebendo-se aumento das mesmas a partir deste ponto até o D76, no grupo infectado. No grupo controle, as concentrações decresceram durante todo o período experimental. Os grupos diferiram, significativamente ( $p < 0,05$ ), em D18 e D30 (Figura 6).



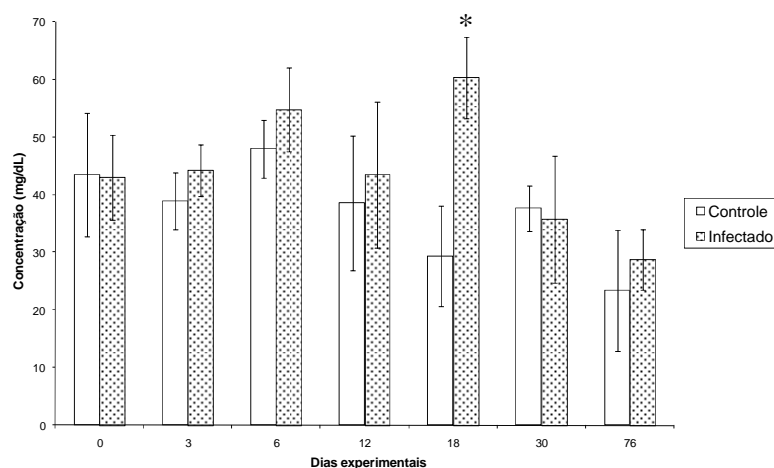
**Figura 6.** Representação gráfica das médias e desvios padrão das concentrações de albumina nos cães controles e infectados, no decorrer do período experimental. \* Diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Jaboticabal, SP. Fevereiro/2009.

Além da redução na concentração sérica da albumina, como esperado, por ser uma PFA negativa, significativa hipoalbuminemia foi descrita em cães com erliquiose de ocorrência natural por TROY & FORRESTER (1990), HARRUS et al. (1996) e NELSON & COUTO (1998). Atribui-se a hipoalbuminemia encontrada à anorexia, perda periférica de albumina nos líquidos edematosos resultantes do aumento da

permeabilidade vascular, perda sangüínea, nefropatias e ao decréscimo da síntese protéica devido a hepatopatias concomitantes (HARRUS et al., 1996).

Todavia, como a meia-vida da albumina varia de oito a nove dias, no cão (ETTINGER & FELDMAN, 1997), e as concentrações desta proteína neste experimento foram decrescentes durante o período de infecção, acredita-se que as mesmas tenham diminuído devido à doença, possivelmente por um mecanismo compensatório do estado de hiperglobuliménia que ocorre em cães infectados por *E. canis*, como descrito por HARRUS et al. (1999). Além disso, a hiporexia/anorexia tornou-se evidente a partir do D17, o que pode ter colaborado com as reduções nas concentrações séricas de albumina.

A haptoglobina, no grupo infectado, atingiu suas concentrações máximas nos D6 e D18 e, a partir deste último momento, as concentrações decresceram gradativamente até atingirem níveis inferiores aos iniciais, ao final do período experimental. No grupo controle, o pico deu-se no dia 6 e depois em D30, embora bem inferiores aos do grupo infectado, decaindo então a valores próximos aos deste último grupo, ao final do experimento. Houve diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ) somente no D18 (Figura 7).

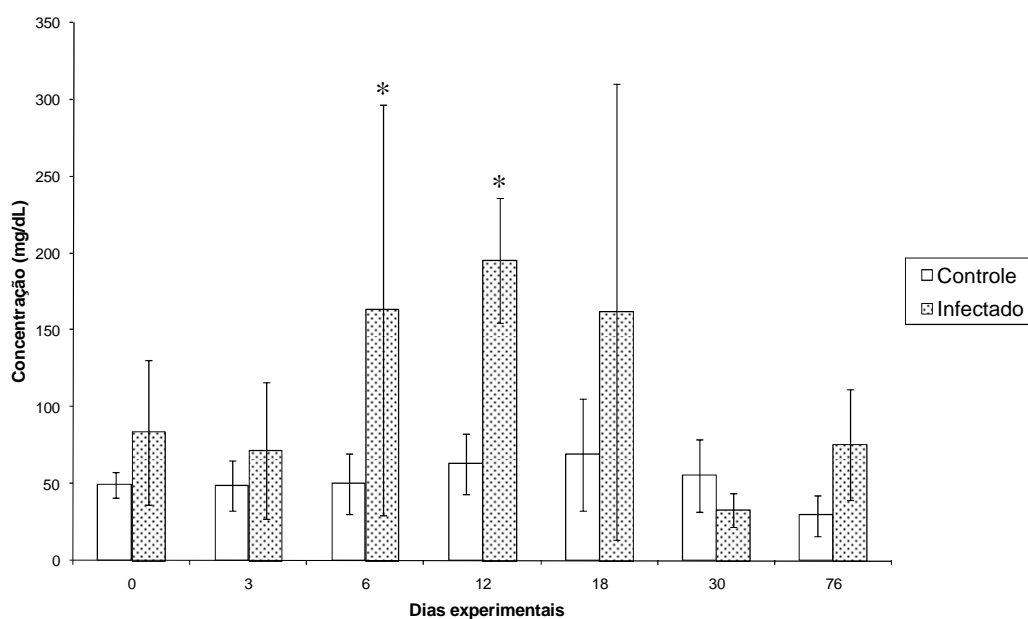


**Figura 7.** Representação gráfica das médias e desvios padrão das concentrações de haptoglobina nos cães controles e infectados, no decorrer do período experimental. \* Diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Jaboticabal, SP. Fevereiro/2009.

Embora ainda não descrita na erliquiose canina, a haptoglobina foi dosada, recentemente, em vários estudos incluindo doenças infecciosas (KOGIKA et al., 2003;

MATIJATKO et al., 2006; DABROWSKI et al., 2007), inflamatórias (BAYRAMLI & ULUTAS, 2008; LOWRIE et al., 2008) e neoplásicas (MISCHKE et al., 2006) . Em todas essas situações foram encontradas maiores concentrações de haptoglobina quando comparadas com animais controle. BAYRAMLI & ULUTAS (2008) consideraram esta PFA como um importante marcador de condições inflamatórias e infecciosas, sendo útil para monitorar tratamentos e avaliar prognóstico em cães.

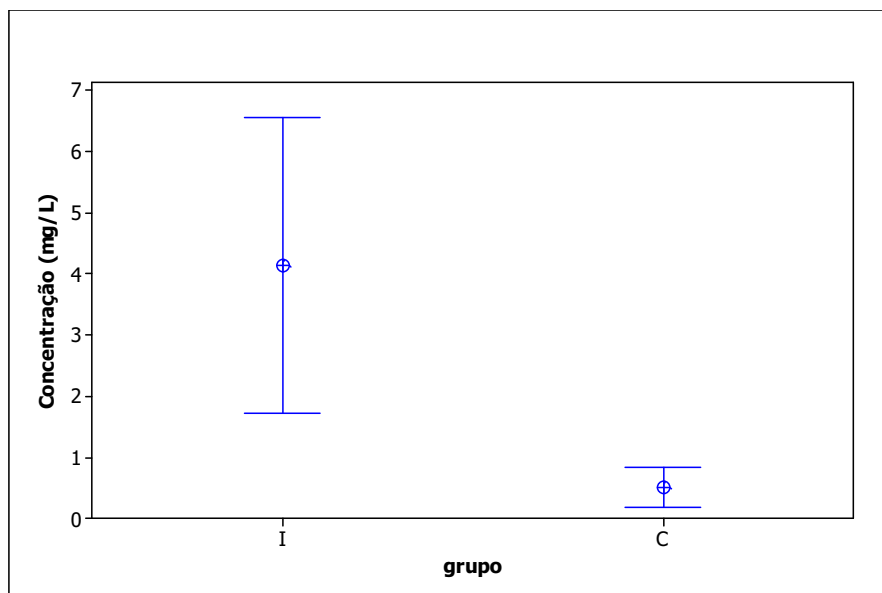
As concentrações séricas da glicoproteína ácida, no grupo infectado, elevaram-se a partir do D3, fazendo pico no D12, com posterior queda das mesmas, atingindo valores semelhantes aos do D0, com diferença significativa entre os grupos em D6 e D12. No grupo controle, não houve diferença ( $p > 0,05$ ) entre os momentos (Figura 8).



**Figura 8.** Representação gráfica das médias e desvios padrão das concentrações de glicoproteína ácida nos cães controles e infectados, no decorrer do período experimental. \* Diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Jaboticabal, SP. Fevereiro/2009.

A proteína C-reativa, no grupo infectado, mostrou aumento crescente nas suas concentrações séricas a partir do D3, persistindo até D18 e D30, onde se notou sua concentração máxima. A partir de então, houve redução dos níveis desta proteína para valores próximos aos do D0 (Figura 9), sendo significativa ( $p < 0,05$ ), pelo teste T, a

diferença quando se compararam as curvas entre os grupos. As concentrações da CRP dos grupos, nos momentos, estão no Anexo D.



**Figura 9.** Representação gráfica das médias e desvios padrão das concentrações de proteína C-reativa nos cães controles (C) e infectados (I). Jaboticabal, SP. Fevereiro/2009.

Concentrações crescentes da glicoproteína ácida e da proteína C-reativa em cães Pastores alemães experimentalmente inoculados com *E. canis*, amostra Oklahoma, foram identificadas por RIKIHISA et al. (1994) a partir do dia 2 PI, atingindo as maiores concentrações entre os dias 4 e 6 PI. Trabalho semelhante, conduzido por SHIMADA et al. (2002), utilizando, inclusive, o mesmo inóculo Oklahoma em cães da raça Beagle, demonstrou aumento nas concentrações de CRP entre os dias 4 e 16 PI, com picos entre os dias 15 e 42, em dois diferentes cães, entre cinco testados. No presente estudo, ambas as PFA apresentaram aumento nas suas concentrações a partir do dia 3 PI, porém com picos no dia 12 PI para a glicoproteína ácida e no dia 18 para a proteína C-reativa, datas em que foram mensuradas.

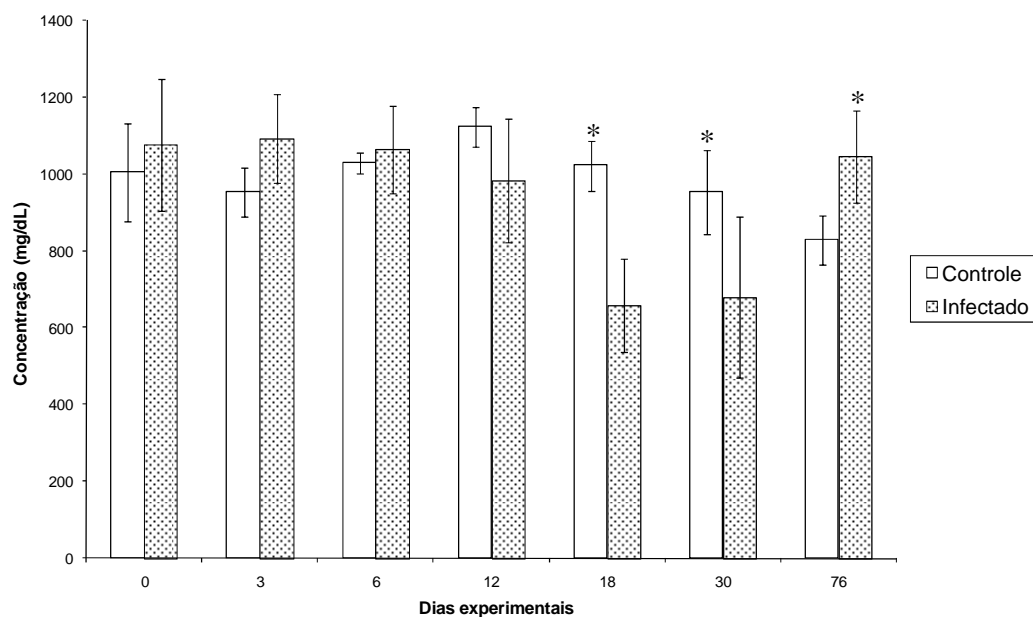
Neste experimento e nos outros dois citados, confirmou-se o uso destas duas PFA como importantes ferramentas para se avaliar a gravidade das lesões inflamatórias nos cães com erliquiose. Porém, as diferenças encontradas em relação aos picos da CRP podem ser atribuídas às cepas utilizadas, de diferente

patogenicidade, dose inoculada e raças de cães, além de que no presente estudo as mensurações não terem sido diárias, como as realizadas por RIKIHISA et al. (1994) e SHIMADA et al. (2002). Como o objetivo deste estudo foi avaliar cães somente na fase aguda, os mesmos foram tratados após o dia 30 PI, com redução significativa de CRP e AAG pós tratamento. RIKIHISA et al. (1994) e SHIMADA et al. (2002) levaram a infecção por períodos mais prolongados (76 e 90 dias PI, respectivamente), observando decréscimo nas concentrações dessas PFA a títulos semelhantes ao período pré-inoculação, sem tratamento, concluindo que as mesmas não devem ser utilizadas como indicador de eliminação de *E. canis* com antibioticoterapia.

Quando foram observadas as quedas nas concentrações de proteína C-reativa e glicoproteína ácida por RIKIHISA et al. (1994) e SHIMADA et al. (2002), os animais já não estavam na fase aguda da doença e, portanto, não apresentavam mais a sintomatologia clínica, podendo-se inferir que estavam na fase subclínica. Como a CRP e a AAG são PFA de resposta rápida, que aumentam tão logo o organismo entra em contato com o agente agressor seria esperado, na fase subclínica da doença, um declínio em suas concentrações. Portanto, suas mensurações durante a fase aguda poderiam realmente ser úteis para auxiliar no diagnóstico precoce e monitoramento do tratamento da erliquiose em cães.

A PM 23KDa, no grupo infectado, assemelhou-se a uma proteína de fase aguda negativa, com queda das concentrações a partir do D3, acentuando-se no D12 e atingindo o menor patamar no D18, que perdurou até o D30. A partir de então, elevou-se a níveis superiores aos iniciais. No grupo controle, esta proteína apresentou concentrações decrescentes até D3, elevando-se até D12. Desde ponto em diante, houve diminuição das concentrações até o D76. Os grupos diferiram, significativamente ( $p < 0,05$ ) em D18, D30 e D76 (Figura 10).

Não foram encontrados dados na literatura sobre esta proteína, na erliquiose canina. Porém, já foi detectada em alguns traçados eletroforéticos (FARIA Jr., 2004; RODRIGUES, 2006) sem que se saiba exatamente seu papel. No presente estudo, mostrou-se como proteína de fase aguda negativa, que apresenta comportamento semelhante ao da albumina presente no soro canino em concentrações séricas bem inferiores a esta.



**Figura 10.** Representação gráfica das médias e desvios padrão das concentrações da PM 23 KDa nos cães controles e infectados, no decorrer do período experimental. \* Diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Jaboticabal, SP. Fevereiro/2009.

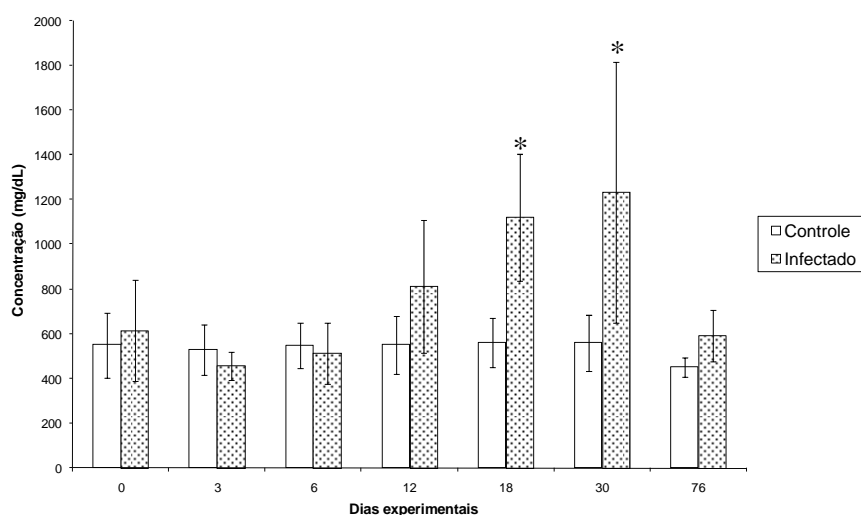
Outras proteínas identificadas no traçado eletroforético foram as imunoglobulinas A e G. As concentrações de IgG de cadeia pesada e leve apresentaram traçados muito semelhantes entre os grupos e entre elas.

Nos animais do grupo infectado, a IgG de cadeia pesada (Figura 11) e a IgG de cadeia leve (Figura 12) aumentaram suas concentrações séricas a partir do D6, sendo máximas no D30. No D76, as concentrações estavam bem próximas às encontradas no D0 para ambas. De forma geral, as concentrações de IgG aumentaram significativamente ( $p < 0,05$ ) em D18 e D30, no grupo infectado, decrescendo a valores próximos aos do grupo controle, no D76. Neste grupo, as concentrações tiveram oscilações mínimas, mas com significância entre os momentos ( $p < 0,05$ ) para a IgG de cadeia leve, possivelmente por variações individuais desta imunoglobulina.

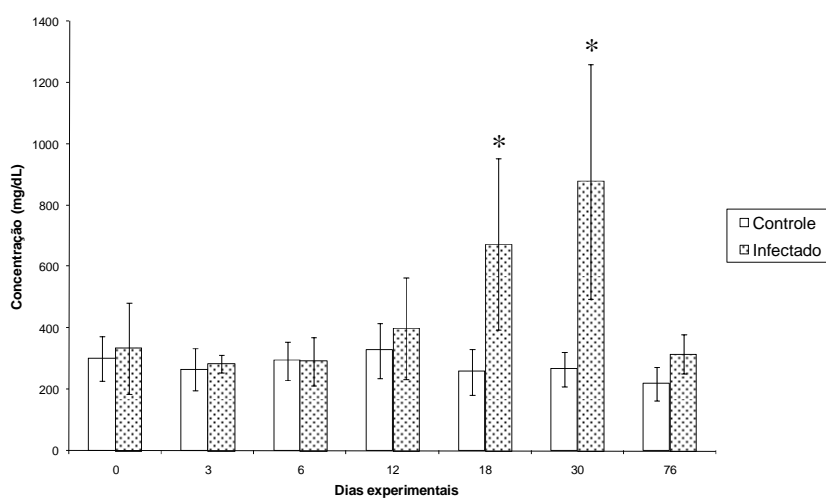
O aumento das IgGs de cadeia leve e pesada a partir do D12, com pico em D18, sugere o desenvolvimento de imunidade humoral. Por outro lado, pesquisadores têm demonstrado anticorpos anti-*E.canis* a partir do segundo dia PI (RIKIHISA et al., 1994). Recentemente, HESS et al. (2006), também detectaram anticorpos específicos na

infecção experimental por *E. canis*. Contudo, estes anticorpos não protegeram os cães infectados, quando desafiados por uma nova infecção. Também estes mesmos pesquisadores não observaram alterações significativas de IgM, IgG e IgA na doença experimentalmente induzida, durante os 4 meses de estudo. Por fim, sugerem que a resposta imune destes animais não foi severamente afetada durante a enfermidade. Esses resultados contrastam com os encontrados por RIKIHISA (2006) que revelam ocorrer disfunção imune durante o curso da erliquiose humana e animal, envolvendo principalmente a supressão da ativação de fagócitos, eventos de apoptose e IFN- $\gamma$ , o que possibilita a evasão do hemoparasita.

Outros estudos estão sendo conduzidos por este grupo de pesquisa, buscando melhor compreender a fase aguda da erliquiose experimental antes e após tratamento.

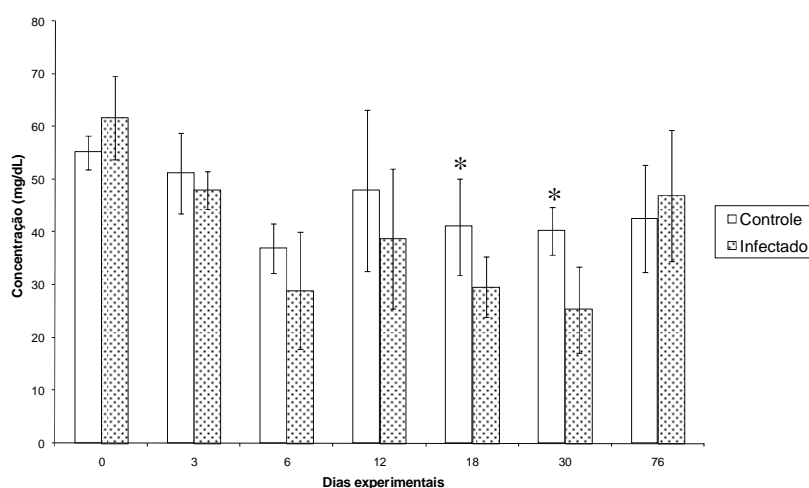


**Figura 11.** Representação gráfica das médias e desvios padrão das concentrações de IgG de cadeia pesada nos cães controles e infectados, no decorrer do período experimental. \* Diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Jaboticabal, SP. Fevereiro/2009.



**Figura 12.** Representação gráfica das médias e desvios padrão das concentrações de IgG de cadeia leve nos cães controles e infectados, no decorrer do período experimental. \* Diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Jaboticabal, SP. Fevereiro/2009.

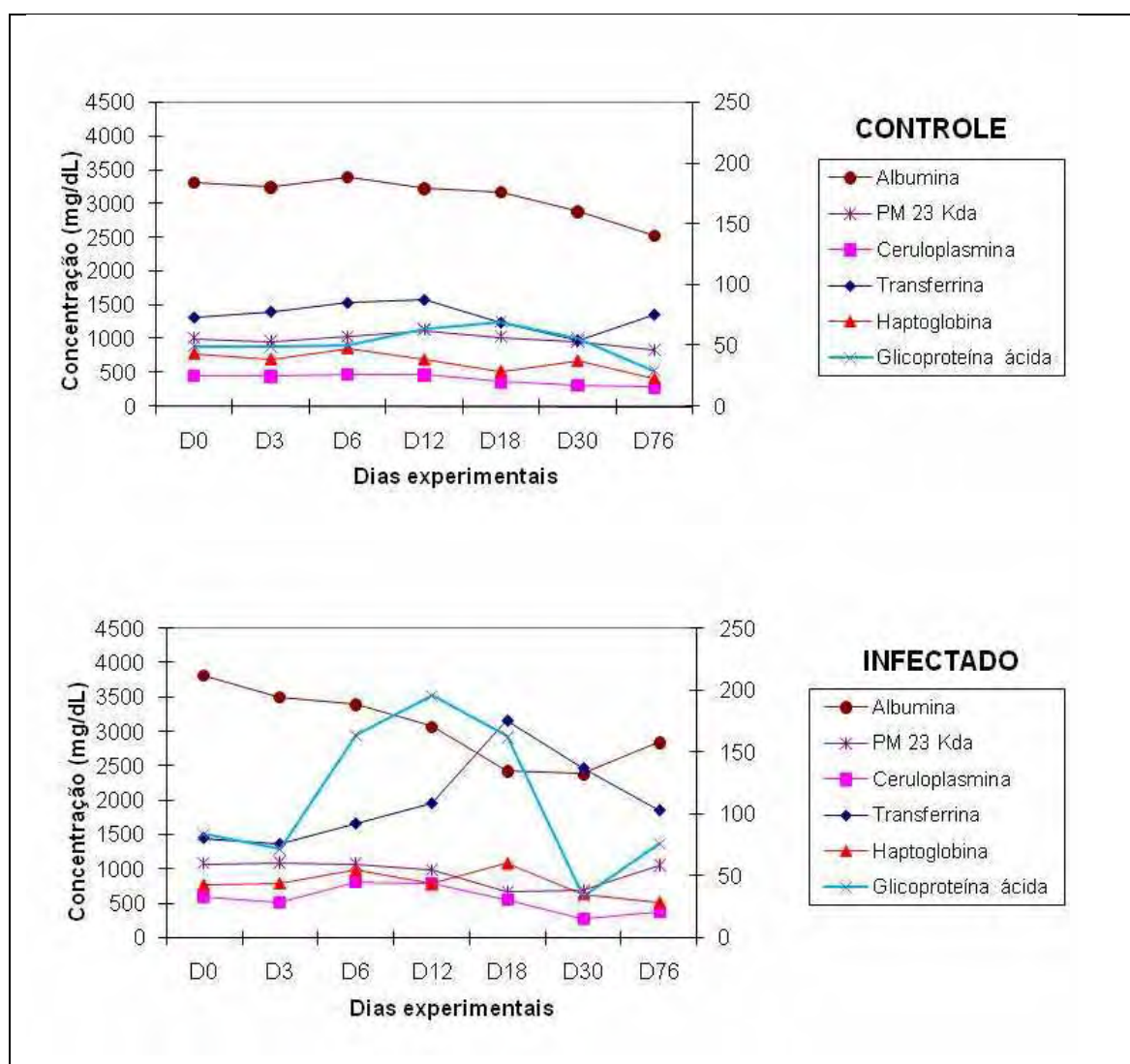
As curvas de concentração protéica de IgA se assemelharam entre os grupos até o D12, com decréscimo significativo ( $p < 0,05$ ) no D18 e no D30 para o grupo infectado e posterior elevação, que perdurou até o final do experimento (Figura 13). Comportamento semelhante apresentou os animais do grupo controle.



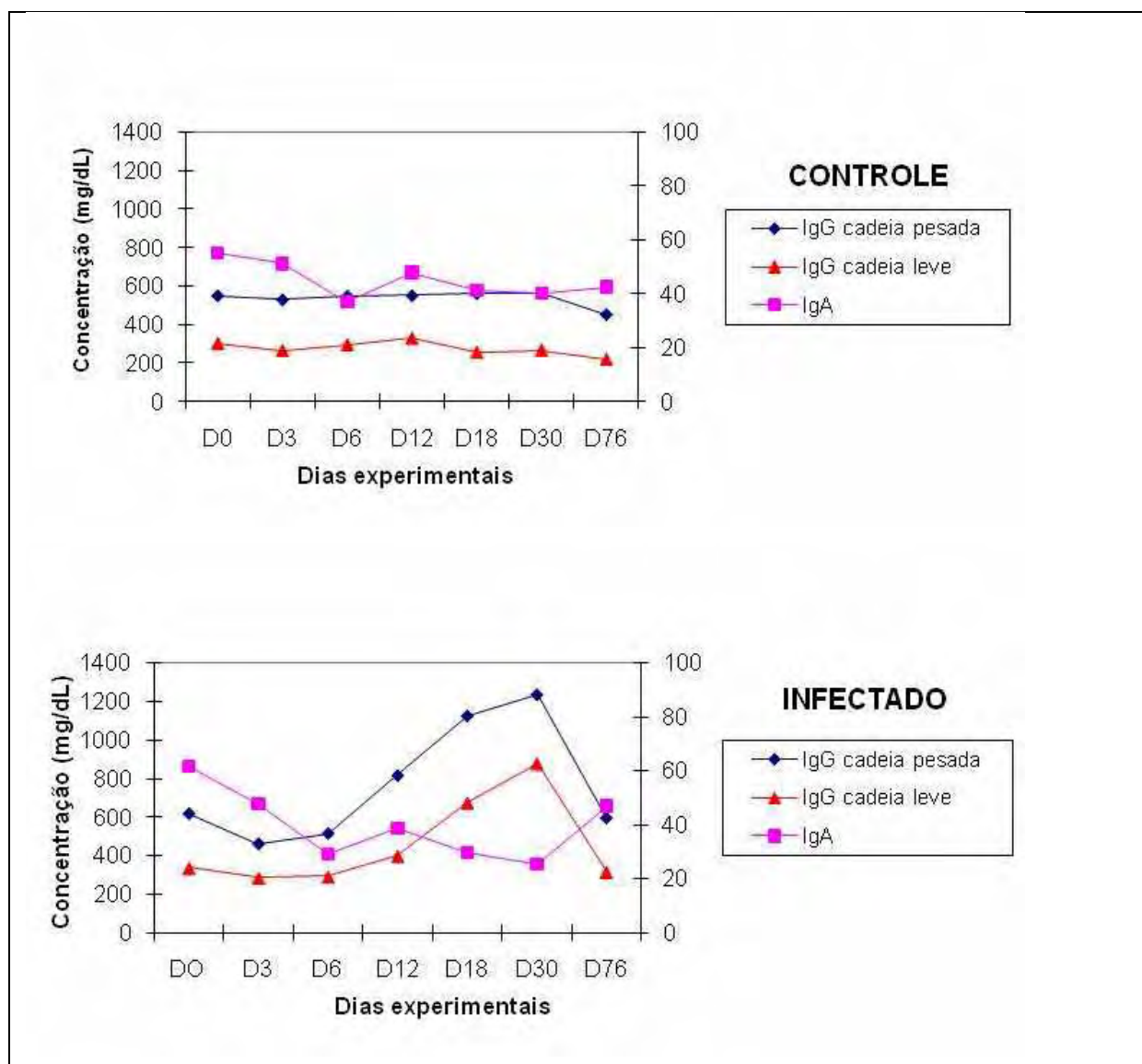
**Figura 13.** Representação gráfica das médias e desvios padrão das concentrações de IgA nos cães controles e infectados, no decorrer do período experimental. \* Diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Jaboticabal, SP. Fevereiro/2009.



Nas Figuras 14 e 15 encontram-se os traçados eletroforéticos das seis proteínas de fase aguda e das três imunoglobulinas, respectivamente, apresentadas em conjunto. Comparativamente, é possível visibilizar as diferenças nas concentrações tanto das PFA como das imunoglobulinas entre os grupos controle e infectado.



**Figura 14.** Perfil das proteínas de fase aguda de cães controles e experimentalmente infectados por *E. canis*, amostra Jaboticabal, durante o período experimental. Jaboticabal, SP. Fevereiro/2009.



**Figura 15.** Perfil das imunoglobulinas de cães controles e experimentalmente infectados por *E. canis*, amostra Jaboticabal, durante o período experimental. Jaboticabal, SP. Fevereiro/2009.

De modo geral, a partir do D3, todas as PFA tiveram suas concentrações alteradas em relação ao D0. Entretanto, as maiores mensurações foram observadas no D18, com exceção da ceruloplasmina e da glicoproteína ácida, que mostraram picos mais precoces (respectivamente D6 e D12). Importante lembrar que entre D12 e D18 registraram-se as temperaturas mais altas, a detecção de mórulas intracitoplasmáticas em três dos 5 animais infectados, aparecimento de sintomatologia clínica e alterações

expressivas no hemograma (pancitopenia). Tais fatos podem ser explicados pelo ciclo que a bactéria desenvolve no organismo.

Durante a fase aguda, a *E. canis* se multiplica em células mononucleares circulantes e tecidos fagocitários mononucleares do fígado, baço e linfonodos. As células infectadas são transportadas pelo sangue para outros órgãos, principalmente pulmões, rins e meninges, onde as células infectadas se aderem ao endotélio vascular, produzindo vasculite e infecção do tecido subendotelial (TROY & FORRESTER, 1990).

A febre, provavelmente, deveu-se por liberação de pirógenos e substâncias antigênicas pelo parasito, com possível estimulação para produção aumentada de IL-1, sabidamente um pirógeno endógeno, produzido por vários tipos celulares (TIZARD, 1998).

Um experimento conduzido por BARNEWALL & RIKIHISA (1994) mostrou que o IFN- $\gamma$  foi capaz de provocar a morte de monócitos infectados por *E. chaffeensis* "in vitro". Anos mais tarde, FENG & WALKER (2004) observaram que há um efeito sinérgico do TNF- $\alpha$  juntamente com o IFN- $\gamma$  no combate a *E. muris* em camundongos infectados pelo agente. Estes achados sugerem que o IFN- $\gamma$  estimule os macrófagos a eliminarem *Ehrlichia* spp por um efeito protetor (RIKIHISA, 2006).

Esses resultados demonstram que as citocinas produzidas por células Th1 estão envolvidas na patogenia da erliquiose. IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e outras citocinas Th1 são responsáveis por ativar macrófagos e outras células fagocíticas para que exerçam suas atividades antimicrobianas (TIZARD, 1998). Por sua vez, essas mesmas citocinas atuam nos hepatócitos e os induzem a produzir as PFA.

Levando todos esses fatos em consideração, além das alterações clínicas, laboratoriais e sorológicas, infere-se à erliquiose canina uma forte estimulação do sistema imune adaptativo, na tentativa de debelar a infecção, mesmo com todos os mecanismos de escape desenvolvidos pelo parasita. Neste sentido, mesmo as PFA sendo consideradas parte de uma resposta inespecífica do sistema imune inato, observou-se que elas também estão diretamente envolvidas no processo inflamatório gerado pela *E. canis* no organismo animal, com alteração nas suas concentrações sendo notadas precocemente, podendo ser utilizadas como marcadores precoces da infecção.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste experimento, nas condições em que foi conduzido, permitiram concluir que:

- O método de inoculação e a amostra de *E. canis* empregados foram capazes de provocar a doença clínica e alterações antigênicas representadas pela soroconversão nos cães inoculados, além de causar a reprodução do agente, com possibilidade de recuperação do DNA erliquial.
- O tratamento dos animais com cloridrato de doxiciclina foi eficiente em levar a melhora clínica dos animais e a eliminação do parasita, pois após o mesmo, quatro dos cinco cães inoculados apresentaram redução nos títulos de anticorpos e todos os cinco animais mostraram-se negativos na nPCR.
- Proteínas de fase aguda puderam ser detectadas durante o curso da infecção experimental, sendo as mais importantes para este estudo a proteína C-reativa, a glicoproteína ácida e a ceruloplasmina, pois foram essas que aumentaram suas concentrações antes do aparecimento dos sinais clínicos e laboratoriais da afecção.
- As mensurações das proteínas de fase aguda podem contribuir para a suspeição clínica, diagnóstico precoce e predição de cura da erliquiose quando os cães se encontrarem na fase aguda da enfermidade.

## 6. REFERÊNCIAS\*

AGUIAR, D.M. et al. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. **Ciênc. Rural**, v. 37, n. 3, p. 796-802, 2007.

BARNEWALL, R.E. & RIKIHISA, Y. Abrogation of gamma interferon-induced inhibition of *Ehrlichia chaffeensis* infection in human monocytes with iron-transferrin. **Infect. Immun.**, v. 62, n. 11, p. 4804-10, 1996.

BAYRAMLI, G. & ULUTAS, B. Acute phase protein response in dogs with experimentally induced gastric mucosal injury. **Vet. Clin. Pathol.**, v. 37, n. 3, p. 312-316, 2008.

BENENSON, A.S. Ehrlichiosis. In:\_\_\_\_. **El control de las enfermedades transmisibles en el hombre**. 15 ed. Washington D.C: Organization Mundial de Salud, 1992. p.115-7.

BUHLES Jr., W. C.; HUXSOLL, D. L.; RISTIC, M. Tropical canine thrombocytopenia: clinical, hematologic and serologic response of dogs to *Ehrlichia canis* infection, tetracycline therapy and challenge inoculation. **J. Infect. Dis., Chicago**, v.130, n.4, 1974.

CAMARGO, M.E. **Introdução às técnicas de imunofluorescência**. São Paulo: Instituto de Medicina Tropical. p. 107, 1973.

CASTRO, M. B. **Avaliação das alterações hematológicas, imunológicas e anatomopatológicas na infecção aguda experimental de cães por *E. canis* (Donatien e Lestoquard, 1935) Moshkovshi 1945**. 1997. 69 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 1997.

CASTRO, M. B. **Caracterização imunoistoquímica das células mononucleares em lesões observadas na infecção aguda experimental em cães por *Ehrlichia canis*** 2004. 76 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2004.

\*ABNT – NBR 6023. Ago. 2002

- CASTRO, M. B. et al. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Vet. Parasit.**, 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. **Vet. Clin. Pathol.**, v. 34, n. 2, p. 85-99, 2005.
- CODNER, E. C., FARRIS-SMITH, L. L. Characterization of the subclinical phase of ehrlichiosis in dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 189, n.1, p. 47-49. 1986.
- CONNER, J.G. et al. Acute phase response in the dog following surgical trauma. **Res. Vet. Sci.**, v. 45, n. 1, p. 107-110, 1988.
- CORDEIRO, F.F.; TINUCCI-COSTA, M.; CAMACHO, A.A. Estudo da ocorrência da erliquiose canina na região nordeste do Estado de São Paulo – Brasil. **Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias**, XV, Campo Grande – MS, p.143, 1996.
- COSTA, J.O. et al. *Ehrlichia canis* infection in dog in Belo Horizonte-Brazil, **Arq. Esq. Vet. UFMG**, Belo Horizonte, v.25, n.2, p.199-200, 1973.
- COSTA Jr., L.M. et al. Sero-prevalence and risk indicators for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil. **The Vet. J.**, v. 174, p. 673-676, 2007.
- 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**, v. 67, p. 321-27, 2007.
- DELLO, C. P. et al. Influence of inflammation on serum concentration, molecular heterogeneity and drug binding properties of canine alpha-1-acid glycoprotein. **J. Vet. Pharmacol. Therap.**, v. 11, n. 1, p. 71-76, 1988.
- DINIZ, P.P.V.P. et al. Surveillance for zoonotic vector-borne infections using sick dogs from southeastern Brazil. **Vector-Borne Zoonotic Dis.**, v. 7, p. 689-697, 2007.
- ECKERSALL, P.D. Acute phase proteins as markers of infection and inflammation: monitoring animal health, animal welfare and food safety. **Irish Vet. J.**, v. 53, p. 307-311, 2000.
- EDINGER, V.H. et al. Electrophoretic serum protein patterns in laminitic horses. **Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.**, Hannover, v. 99, p. 426-30, 1992.

- ELIAS, E. Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusion bodies or morulae of *E. canis*. **J. Small Anim. Pract.**, London, v. 33, n. 11, p.540-543, 1991.
- ETTINGER, S.J. & FELDMAN, E.C. Tratado de medicina interna veterinária. 4. ed. São Paulo: Manole, 1997. 3020 p.
- FAGLIARI, J. J. & SILVA, S. L. Hemograma e proteinograma plasmático de eqüinos hígidos e de eqüinos acometidos por abdômen agudo, antes e após laparotomia. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 54, n. 6, p. 559-67, 2002.
- FARIA Jr., 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, Jaboticabal, 2004.
- FARIA, J. L. M. **Estudo comparativo de detecção de DNA de *Ehrlichia canis* em sangue total e em aspirado de baço pelo nested PCR em cães naturalmente infectados**. 2006. 80f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.
- FARIA, J. L. M.; RIBEIRO, S. C. A.; TINUCCI-COSTA, M. Estudo da sintomatologia e alterações do hemograma e urinálise em cães com ehrlichiose na fase aguda. In: Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais, 24., 2003, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Congress, 2003. 1 CD-ROM.
- FENG, H.; WALKER, D. H. Mechanisms of immunity to *Ehrlichia muris*: a model of monocytotropic ehrlichiosis. **Infect. Immun.** v. 72, n. 2, p. 966-971, 2004.
- FRANK, J.R.; BREITSCHWERDT, E.B. A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 13, n. 3., p. 194-201, 1999.
- FURUTA, P. I. **Avaliação comparativa entre o ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) na detecção da anticorpos da classe IgG em cães naturalmente infectados com *Babesia canis***. 2004. 48 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2004.
- GOODMAN, J.L. Ehrlichiosis-ticks, dogs and doxycycline. **New Engl. J. Med.**, v.341, n.3, p.195-197.

- GORDON, A.H. **Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels**. New York: Elsevier Science Publishers, 1995. 213 p.
- GRUYS, E. et al. Acute phase reaction and acute phase proteins. **J. Zhejiang. Univ. Sci. B.**, Kuala Lumpur, v. 6B, p. 1045-56, 2005.
- HARRUS, S. et al. Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. **Vet. Parasit.**, v. 66, p. 241-249. 1996. HARRUS, S. et al. Amplification of Ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n. 1, p. 73-6, 1998.
- HARRUS, S. et al. Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment of experimental *Ehrlichia canis* infection. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 11, p. 4488-4490, 2004.
- HARRUS, S. et al. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n. 9, p. 2745-2749, 1999.
- HAYASHI, S. et al. Comparison of the concentrations of C-reactive protein and  $\alpha$ 1-acid glycoprotein in the serum of young and adult dogs with acute inflammation. **Vet. Res. Commun.**, v. 25, p. 117-126, 2001.
- HESS, P.R. et al. Experimental *Ehrlichia canis* infection in the dog does not cause immunosuppression. **Vet. Immun. Immunopathol.**, v. 109, p. 117-125, 2006.
- IQBAL, Z.; RIKIHISA, Y. Application of the polymerase chain reaction for the detection of *Ehrlichia canis* in tissues of dogs. **Vet. Microbiol.**, v. 42, n. 4, p. 281-7, 1994.
- IRWIN P.J. The first report of canine ehrlichiosis in Australia. **Aust. Vet J.**; 79(8):552-3, 2001.
- JAIN, N.C. Acute phase proteins. In: KIRK, R.W. **Current veterinary therapy X: small animal practice**. Philadelphia: Saunders, 1989. p. 468-471.
- JAIN, N.C. **Essentials of Veterinary Hematology**. 1. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417 p.
- KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997. 932 p.
- KOGIKA, M.M. et al. Determinação sérica de haptoglobina, ceruloplasmina e  $\alpha$ -glicoproteína ácida em cães com gastroenterite hemorrágica. **Ciênc. Rural**, v. 33, n. 3, p. 513-517, 2003.



- LABRUNA, M.B. et al. A preliminary investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. **Vet. Parasit.**, v. 143, p. 189-195, 2007.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. **Nature**, v. 227, p. 680-85, 1970.
- LEWIS, G. E. The brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* and the dog as experimental hosts of *Ehrlichia canis*. **A. J. Vet. Res.**, Chicago, v. 32, n. 12, p. 1953-1955, 1977.
- LOWRIE, M. et al. The role of acute phase proteins in diagnosis and management of steroid-responsive meningitis arteritis in dogs, **The Vet. J.** (2008), doi: 10.1016/j.tvjl.2008.05.001.
- MACHADO, R. Z. et al. Isolation of *Babesia bigemina* e *B. bovis* merozoites by ammonium chloride lysis of infected erythrocytes. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 27, p. 2591-2598, 1994.
- MAEDA, K. et al. Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia. **New Engl. J. Med.**, v.316, n.14, p.1987.
- MARTÍNEZ-SUBIELA, S. et al. Proteínas de fase aguda: conceptos básicos y principales aplicaciones clínicas en medicina veterinaria. **An. Vet.**, v. 17, p. 97-114, 2001.
- MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; BERNAL, L.J.; CERÓN, J.J. Serum concentrations of acute-phase proteins in dogs with leishmaniosis during short-term treatment. **Am. J. Vet. Res.**, v. 64, n. 8, p. 1021-1026, 2003.
- MATIJATKO, V. et al. Evidence of an acute phase response in dogs naturally infected with *Babesia canis*, **Vet. Parasitol.** (2006), doi: 10.1016/j.vetpar.2006.10.004.
- MISCHKE, R.; WATERSTON, M.; ECKERSALL, P.D. Changes in C-reactive protein and haptoglobin in dogs with lymphatic neoplasia, **The Vet. J.** (2006), doi: 10.1016/j.tvjl.2006.05.018.
- MUNHOZ, T.D.; OKADA, Y.G.; TINUCCI-COSTA, M. Incidência de ocorrência da erliquiose canina na Região Nordeste do Estado de São Paulo. In: Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo, 11<sup>o</sup>, 2003, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Congress, 2003. 1 CD-ROM.

- MURATA, H.; SHIMADA, N.; UOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **The Vet. J.**, v. 168, p. 28-40, p. 28-40, 2003.
- MYLONAKIS, M. E. et al. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. **Vet. Microbiol.**, v. 91, p. 197-204, 2003.
- NAKAGHI, A. C. H. **Estudo comparativo entre métodos de diagnóstico direto e indireto de *Ehrlichia canis* em cães com suspeita clínica de erliquiose.** 2004. 63f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.2004.
- NAKAMURA, M. et al. C-reactive protein concentration in dogs with various diseases. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 70, n. 2, p. 127-131, 2008.
- NAOUM, P.C. **Eletroforese – técnicas e diagnósticos.** Rio de Janeiro: Livraria Santos Editora, 1999. 225 p.
- NELSON, R.W. & COUTO, C.G. **Medicina interna de pequenos animais.** 2.ed., Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1998. 1084 p.
- OLIVEIRA, D. et al. Anti-*Ehrlichia canis* antibodies detection by “Dot-ELISA” in naturally infected dogs. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 9, n. 1, p. 1-5, 2000.
- ORIÁ, A.P. **Correlação entre uveítes, achados de patologia clínica, sorológicos (Reação de Imunofluorescência Indireta e Dot-blot Elisa) e de anatomopatologia do bulbo do olho em animais da espécie canina, natural e experimentalmente infectados pela *Ehrlichia canis*.** 2001. 79 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.
- PEPYS, M.B.; HIRSCHFIELD, G.M. C-reactive protein: a critical update. **J. Clin. Invest.**, v. 111, p. 1805-1812, 2003.
- RIBEIRO, C.R. **Aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais de cães sororreagentes para leishmaniose visceral, em foco de transmissão no Distrito Federal – DF – Brasil.** 2007. 63 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

- RIKIHISA, Y. Ehrlichia subversion of host innate responses. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 9, n.1, p. 95-101, 2006.
- RIKIHISA, Y. et al. C-reactive protein and  $\alpha$ 1-acid glycoprotein levels in dogs infected with *Ehrlichia canis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, n. 4, p. 912-917, 1994.
- 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, Jaboticabal, 2006.
- SAITO, T.B. et al. Canine infection by Rickettsiae and Ehrlichiae in southern Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 79, n. 1, p. 102-108, 2008.
- SANTOS, F. et al. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **The Vet. J.** (2007), doi: 10.1016/j.tvjl.2007.08.017.
- SHIMADA, T. et al. Monitoring c-reactive protein in beagle dogs experimentally inoculated with *Ehrlichia canis*. **Vet. Res. Commun.**, v. 26, n. 3, p. 171-177, 2002.
- SHIPOV, A. et al. Prognostic indicators for canine monocytic ehrlichiosis. **Vet. Parasitol.** (2008), doi: 10.1016/j.vetpar.2008.01.009.
- SILVA, V. L. D. **Avaliação das alterações hematológicas e dos aspectos citológicos e histopatológicos da medula óssea na erliquiose canina aguda: estudo experimental.** 2001. 102f. Dissertação (Mestrado em Patologia Veterinária Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- SOLTER, P.F. et al. Haptoglobin and ceruloplasmin as determinants of inflammation in dogs. **Am. J. Vet. Res.**, v. 52, p. 1738-1742, 1991.
- THOMAS, J.S. Protein electrophoresis. In: FELDMAN, B.V.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology.** 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 899-903.
- TIZARD, I.R. **Imunologia veterinária: uma introdução.** 5. ed., São Paulo: Roca, 1998. 545 p.
- TROY, G. C.; FORRESTER, S. D. Canine ehrlichiosis. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat.** Philadelphia: W. B. Saunders, 1990. p. 404-418.

ULUTAS, B. et al. Serum concentration of some acute phase proteins in naturally occurring canine babesiosis: a preliminary study. **Vet. Clin. Pathol.**, v. 34, n. 2, p. 144-47, 2005.

WANER, T. et al. Characterization of subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagles dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 69, p. 307-317, 1997.

WANER, T. et al. Canine monocytic ehrlichiosis – an overview. **Isr. J. Vet. Med.**, Rishon Le, v. 54, n. 4, p. 103-107, 1999.

WANER, T. et al. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. **Vet. Parasitol.**, v. 95, p. 1-5, 2001.

WELLMAN, M.L. et al. A macrophage-monocyte cell line from a dog with malignant histiocytosis. **In Vitro Cell. Dev. Biol.**, v. 24, p. 223-29, 1988.

WEN, B. et al. Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n. 7, p. 1852-55, 1997.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. 4. ed. New Jersey. Prattice Hall, 1999. 560 p.

## **7. ANEXOS**

**Anexo A. Resultados dos hemogramas dos cães do grupo controle obtidos no período pré-inoculação (D0) até o final dos 76 dias.**

	He	Le	Hb	Ht	PlaQ	Bas	Eos	NB	NS	Linf	Mon	
C1	D0	6,64	9,40	17,5	48,6	279,0	0	1,88	0	3,76	3,67	0,09
	D3	6,75	8,80	17,4	50,2	262,0	0	1,14	0	5,45	1,95	0,26
	D6	6,35	7,70	16,2	46,8	223,0	0	0,07	0,07	5,39	1,71	0,46
	D12	6,84	10,30	17,9	48,4	270,0	0	1,35	0,10	5,97	2,68	0,20
	D18	5,70	10,00	15,2	42	283,0	0	0,60	0,20	6,80	1,90	0,50
	D30	6,50	7,10	17,6	48,3	313,0	0,07	1,28	0,07	3,69	1,85	0,14
	D76	6,19	6,70	15,2	45,7	239,0	0	0,68	0	3,68	1,94	0,40
C2	D0	6,55	7,40	15,5	43,9	241,0	0	0,67	0	3,33	3,33	0,07
	D3	6,56	6,80	14,9	44,7	219,0	0	0,14	0	4,35	2,31	0
	D6	7,32	7,50	16,6	50,3	353,0	0	0,07	0,07	5,18	1,80	0,38
	D12	5,56	6,20	13,7	37,9	242,0	0	0,31	0	3,41	2,42	0,06
	D18	6,06	7,40	14,5	41,1	190,0	0	0,15	0,15	3,92	2,81	0,37
	D30	8,27	7,00	20,8	56,5	176,0	0	0,21	0,07	4,20	2,38	0,14
	D76	6,00	6,70	15,2	45,7	183,0	0	0,47	0	3,89	2,34	0
C3	D0	7,06	6,90	17,6	49,0	238,0	0	0,48	0	4,62	1,73	0,07
	D3	7,00	4,80	16,7	49,2	222,0	0	0,29	0,05	2,78	1,58	0,10
	D6	7,30	6,10	17,5	51	191,0	0	0,19	0,06	3,84	1,59	0,42
	D12	6,39	5,80	16,9	44,8	221,0	0	0,75	0	3,19	1,51	0,35
	D18	6,42*	5,60	16,1	44,8	194,0	0	0,11	0,05	4,03	1,02	0,39
	D30	8,49	6,40	22,2	60	138,0	0	0,38	0,06	4,16	1,54	0,26
	D76	6,36	6,00	15,6	44,3	191,0	0	0,18	0	3,66	2,16	0
C4	D0	7,49	7,50	18,8	52,2	180,0	0	0,53	0	3,52	3,30	0,15
	D3	7,19	11,00	17,3	50,9	288,0	0	0,33	0	6,6	3,74	0,33
	D6	5,55	13,50	13,8	38,7	239,0	0	0	0,95	9,31	2,43	0,81
	D12	5,05	11,10	12,7	35,7	172,0	0	0	0,11	9,43	1,33	0,23
	D18	5,35*	6,50	13,1	37,9	179,0	0	0,20	0,13	4,74	1,11	0,32
	D30	6,52	8,10	16,8	46,1	281,0	0	0,24	0,08	4,21	3,40	0,17
	D76	7,01	5,30	17,1	48,4	198,0	0	0,48	0	2,86	1,75	0,21
C5	D0	7,30	9,70	17,8	51,2	300,0	0	1,16	0,10	5,92	2,23	0,29
	D3	6,97	9,80	16,8	49,4	218,0	0	3,43	0	4,41	1,76	0,20
	D6	6,90	9,70	16,8	48,3	242,0	0	1,75	0,10	6,40	1,07	0,38
	D12	6,64	9,70	17,2	46,5	261,0	0	1,45	0,10	6,21	1,84	0,10
	D18	6,58	11,30	16,5	46,3	285,0	0	1,70	0,34	7,35	1,81	0,10
	D30	7,88	10,50	20,5	55,4	219,0	0	2,94	0,21	5,15	1,99	0,21
	D76	6,73	8,10	16,2	47	206,0	0	2,99	0	3,24	1,79	0,08

He (hemácias) x 10<sup>6</sup>/μL; Le (leucócitos) x 10<sup>3</sup>/μL; Hb (hemoglobina) g/dL; Ht (hematócrito) %; PlaQ (plaquetas) x 10<sup>3</sup>/μL; Bas (basófilos) x 10<sup>3</sup>/μL; Eos (eosinófilos) x 10<sup>3</sup>/μL; NB (neutrófilos bastonetes) x 10<sup>3</sup>/μL; NS (neutrófilos segmentados) x 10<sup>3</sup>/μL; Linf (linfócitos) x 10<sup>3</sup>/μL; Mon (monócitos) x 10<sup>3</sup>/μL; \* (hemácias nucleadas).

**Anexo B.** Resultados dos hemogramas dos cães do grupo infectado com *E. canis*, amostra Jaboticabal, obtidos no período pré-inoculação (D0) até o final dos 76 dias.

	He	Le	Hb	Ht	Plaq	Bas	Eos	NB	NS	Linf	Mon
	D0	7,92	6,60	19,4	55,2	181,0	0	0,52	3,57	2,31	0,20
	D3	7,09	7,30	16,6	49,9	147,0	0,07	0,58	4,68	1,61	0,36
	D6	7,07	6,90	17,3	49,1	161,0	0	0,07	5,10	1,10	0,63
I1	D12	6,05	5,30	15,4	41,8	162,0	0	0,10	4,40	0,59	0,16
	D18	4,47*	2,60	10,9	29,7	50,0	0	0,02	2,05	0,35	0,13
	D30	4,18*\$	5,60	10,8	28,5	187,0	0	0	4,37	0,84	0,34
	D76	6,89	4,70	16,7	47	168,0	0	0,38	3,15	0,94	0,19
	D0	7,09	7,80	17,6	49,8	176,0	0	0,71	2,57	4,29	0,23
	D3	6,66	7,60	16,2	47	185,0	0	0,46	3,34	3,50	0,30
	D6	6,78	5,90	16,8	47,7	185,0	0	0,30	3,30	2,00	0,30
I2	D12	5,56	5,90	14,5	39,1	135,0	0	0,06	4,90	0,71	0,17
	D18	4,45	4,60	11,2	30,1	62,0	0	0,04	3,23	1,01	0,28
	D30	3,70*	6,30	9,7	25,2	160,0	0	0,06	4,85	0,88	0,38
	D76	5,97	4,60	14,7	41,6	148,0	0	0,28	2,76	1,38	0,18
	D0	7,32	7,30	18,0	51,0	233,0	0,07	0,95	3,36	2,77	0,15
	D3	7,13*	7,60	17,1	50,6	177,0	0	0,30	4,94	1,98	0,38
	D6	7,01	3,90	16,6	49,3	105,0	0	0,74	1,56	1,40	0,20
I3	D12	6,06	7,10	17,2	44,8	312,0	0	0,71	3,91	2,27	0,07
	D18	4,85*	2,90	14,9	33,1	48,0	0	0	1,65	0,96	0,23
	D30	5,80*	3,60	14,8	40,6	169,0	0	0,07	2,24	1,08	0,14
	D76	7,22	6,30	16,9	49,3	209,0	0	0,19	3,78	1,95	0,25
	D0	6,91	8,00	16,8	48,0	259,0	0	0,32	5,04	2,08	0,48
	D3	6,63	5,80	16,2	46,3	166,0	0	0,35	2,09	3,19	0,17
	D6	7,38	5,50	18,2	50,9	136,0	0	0,22	2,92	2,15	0,16
I4	D12	6,29	4,90	16,4	43,1	139,0	0	0,15	2,98	1,47	0,20
	D18	4,32	4,90	10,9	29,5	56,0	0	0,05	3,53	1,03	0,24
	D30	3,64*	6,90	9,4	25,2	180,0	0	0,07	3,93	2,90	0
	D76	6,61	5,60	16	45,5	185,0	0	0,28	3,53	1,51	0,17
	D0	6,89	7,20	17,8	48,5	263,0	0	0,14	5,05	1,87	0,14
	D3	7,20	7,90	17,5	51,9	230,0	0	0,47	6,16	1,11	0,16
	D6	6,61	3,70	16,6	46,2	114,0	0	0,04	2,78	0,66	0,18
I5	D12	5,97	4,50	14,6	43,0	188,0	0	0,13	3,56	0,54	0,18
	D18	4,49	2,60	11,5	31,5	66,0	0	0,05	1,56	0,86	0,08
	D30	3,82*	3,10	10,0	27,0	135,0	0	0,03	2,23	0,65	0,16
	D76	6,13	4,70	14,8	43,0	197,0	0	0,23	3,39	0,66	0,33

He (hemácias) x 10<sup>6</sup>/μL; Le (leucócitos) x 10<sup>3</sup>/μL; Hb (hemoglobina) g/dL; Ht (hematócrito) %; Plaq (plaquetas) x 10<sup>3</sup>/μL; Bas (basófilos) x 10<sup>3</sup>/μL; Eos (eosinófilos) x 10<sup>3</sup>/μL; NB (neutrófilos bastonetes) x 10<sup>3</sup>/μL; NS (neutrófilos segmentados) x 10<sup>3</sup>/μL; Linf (linfócitos) x 10<sup>3</sup>/μL; Mon (monócitos) x 10<sup>3</sup>/μL. \*(hemácias nucleadas); § (anisocitose).

**Anexo C.** Valores hematológicos de referência\* para a espécie canina.

Eritrócitos ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	5,0 – 8,5
Leucócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	6,0 – 17,0
Hemoglobina (g/dL)	12 – 18
Hematócrito (%)	37 – 55
Plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	200 – 500
Basófilos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0 – 0
Eosinófilos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0,12 – 1,8
Neutrófilos bastonetes ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0 – 0,5
Neutrófilos segmentados ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	3,6 – 13,8
Linfócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0,72 – 5,4
Monócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0,18 – 1,8

\*Fonte: JAIN, N.C. Essentials of Veterinary Hematology. 1. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417 p.



**Anexo D:** Concentrações (mg/L) séricas da Proteína C-reativa, dos cães dos grupos controle e infectado, representadas pela média, no decorrer do período experimental. Jaboticabal, SP. Fevereiro/2008.

	D0	D3	D6	D12	D18	D30	D76
Controle	0,83	0,60	1,09	0,24	0,32	0,37	0,08
Infectado	0,54	4,48	5,54	5,80	6,36	5,99	0,28