

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

AVALIAÇÃO HORMONAL ADRENOCORTICAL EM CÃES
COM INFECÇÃO NATURAL POR *Ehrlichia canis*

Mariana Cristina Hoepfner Rondelli
Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Fevereiro 2012

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

AVALIAÇÃO HORMONAL ADRENOCORTICAL EM CÃES
COM INFECÇÃO NATURAL POR *Ehrlichia canis*

Mariana Cristina Hoeppner Rondelli

Orientadora: Profa. Dra. 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 2012

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARIANA CRISTINA HOEPPNER RONDELLI - nascida em 10 de outubro de 1984, em Araguaína, Tocantins. Médica veterinária formada pela Universidade Federal do Tocantins em 2007. Foi residente em Clínica Médica de Pequenos Animais no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal, de 2008 a 2010, sob a orientação da Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa. Fez estágio de residência em Medicina Interna de Pequenos Animais e Dermatologia Veterinária no Hospital Veterinário da Universidade do Tennessee, de agosto a setembro de 2009. Em fevereiro de 2010 ingressou no Mestrado no programa de pós-graduação em Medicina Veterinária, na área de Clínica Médica Veterinária, da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal, sob a mesma orientação. Atualmente, encontra-se matriculada no Doutorado do mesmo programa de pós-graduação, ainda sob a orientação da Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa.

“O esforço é justamente aquilo que precisamos em nossa vida. Se Deus nos permitisse passar pela existência sem quaisquer obstáculos, nos condenaria a uma vida atrofiada. Não seríamos tão fortes como poderíamos ter sido. Nunca poderíamos alçar voo.”

De Para que minha vida se transforme, de Maria Salette e Wilma Ruggeri

Dedico este trabalho a cada um dos cães incluídos neste estudo, que possivelmente “acharam” que foram abandonados por seus proprietários quando permaneceram no Hospital Veterinário para os testes desta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

Primeiramente, a Deus por todas as oportunidades que me foram dadas.

À minha família, porque sofremos com a distância e com a ausência. Aos meus pais Julio e Christina pela confiança, paciência e incentivo. Aos meus irmãos João Carlos, Raphael, André e Giuliana. Eu também tenho muito orgulho de vocês!

Aos meus colegas de laboratório e irmãos científicos Thiago Munhoz, Carolina Franchi, Andréa Calado, Érika Terra e Paulo Jark. Juntos, somos mais fortes.

Aos meus amigos e companheiros de república: Tathiana Motheo, Sofia Borin, Leandro Crivelenti e Paula Savi, porque nos tornamos a nossa outra família.

Ao meu namorado, companheiro e amigo Reinaldo, pelo apoio com o experimento, pelo carinho e por me deixar mais feliz a cada dia.

Aos amigos e residentes do Hospital Veterinário Reinaldo Garrido, Caroline Aoki, Felipe Adams e Ana Paula Tristão, aos pós-graduandos da Oftalmologia (Ivan, Luciano, Tiago e Roberta), às pós-graduandas da Obstetrícia e Reprodução Paula Savi e Tathiana Motheo, assim como às residentes Beatrice e Raquel, pela contribuição com o grupo dos animais doentes. Paula e Tathiana, desculpem desviar mais de 50% dos cães do experimento de vocês! A erliquiose está por toda a parte, não é?

Obrigada às meninas da Radiologia e Ultrassonografia (Michelle Avante, Adriana Meirelles, Carol Toni e Anelise Nepomuceno) pela grande ajuda com as punções aspirativas esplênicas.

Ao Prof. Dr. Áureo Evangelista Santana e à Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado por terem gentilmente cedido a estrutura dos Laboratórios de Patologia Clínica e de Imunoparasitologia, respectivamente, para as análises deste projeto.

Aos professores doutores Mário Roberto Hatayde e Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, pelas contribuições dadas no exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Ricardo Duarte Silva e ao Prof. Dr. Marlos Gonçalves Sousa, pelas sugestões para a finalização desta dissertação.

À equipe do Laboratório de Medicina Preventiva, especialmente ao doutorando Felipe Jorge da Silva, por proceder com as sorologias de leptospirose.

Ao Prof. Dr. Gener Tadeu Pereira, pela grande ajuda com a análise estatística. Também agradeço ao doutorando e amigo Evandro Zacché, pela atenção e pela paciência com a estatística e confecção dos gráficos.

Aos proprietários dos cães participantes deste projeto e aos amigos que gentilmente ajudaram a compor o grupo controle.

À Profa. Dra. Linda Frank, da Universidade do Tennessee, por colaborar com a metodologia deste trabalho. Espero retornar para agradecê-la pessoalmente.

Em especial aos que me ajudaram diretamente na execução deste trabalho: à pós-doutoranda Carla Roberta Freschi, por me ajudar no treinamento e na leitura dos testes de ELISA, e por ter se disposto a realizar as PCRs e as sorologias que foram essenciais neste trabalho. Ao doutorando Thiago Demarchi Munhoz, devo um agradecimento mais que especial, por me acompanhar em todos os passos da confecção das placas de ELISA e colorimetria, e por ter sido, praticamente, meu co-orientador em todo este processo. Graduanda Pâmela Bongiovanni Catandi, obrigada por ter me ajudado no manejo dos cães do experimento e por ter sido tão prestativa. Eugênio Campos Filho, Mateus Yamazaki e residente Mônica Chaves, obrigada por ajudar na execução dos exames de triagem. A todos os estagiários que ajudaram nos testes do experimento, muito obrigada.

Ao BET Laboratories, especialmente à Dra. Vanessa Andrade, por apoiar esta pesquisa e executar com rapidez e eficiência as análises de cortisol.

À Ouro Fino, por ter nos fornecido a quantidade necessária de doxiciclina para o tratamento dos animais deste experimento.

À FAPESP, pela concessão de bolsa de mestrado, bolsa de iniciação científica e de auxílio a esta pesquisa.

Por último, mas nunca por menos, à Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa, a nossa mãe científica, pelos ensinamentos científicos e pessoais. Ter visitado a Itália em sua companhia foi o melhor! Obrigada pela paciência, pela orientação, pelas oportunidades e por representar tanto em minha vida, desde a residência.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	1
1.1 Eritriose monocítica canina.....	1
1.2 Hormônios adrenocorticais.....	3
1.3 Alterações endócrinas e doença.....	6
1.4 Proteínas de fase aguda.....	9
2 OBJETIVOS.....	11
2.1 Objetivo geral.....	11
2.2 Objetivos específicos.....	11
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1 Seleção dos cães e dos grupos experimentais.....	12
3.1.1 Seleção dos cães para o grupo I (grupo cães doentes).....	13
3.1.2 Seleção dos cães para o grupo II (grupo controle).....	13
3.2 Exames de triagem.....	13
3.2.1 Hemograma.....	14
3.2.2 Exames bioquímicos séricos, urinálise e U:P/C.....	14
3.3 Exames específicos.....	15
3.3.1 “Dot-ELISA” para detecção de anticorpos anti- <i>E. canis</i>	15
3.3.2 Teste de estimulação com hormônio adrenocorticotrópico sintético (ACTH).....	15
3.3.3 Punção biópsia-aspirativa esplênica.....	16
3.3.4 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para detecção de anticorpos anti- <i>Babesia canis</i>	17
3.3.5 Detecção de anticorpos anti- <i>Leptospira</i> spp.....	18
3.3.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	18
3.3.6.1 Extração de DNA de sangue total	19
3.3.6.2 Seleção dos primers.....	19

3.3.6.3 Amplificação de DNA de <i>Ehrlichia</i> spp e de <i>E. canis</i>	19
3.3.6.4 Amplificação de DNA de <i>Babesia canis</i>	20
3.3.6.5 Eletroforese de DNA em gel de agarose.....	20
3.4 Dosagens de proteínas de fase aguda (Proteína C reativa e Haptoglobina).....	21
3.5 Dosagem de cortisol sérico.....	21
3.6 Dosagem de DHEA-S.....	21
3.7 Análise estatística.....	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1 Aspectos clínico-patológicos.....	23
4.2 Diagnóstico da erliquiose monocítica canina.....	26
4.3 Resultados das dosagens de cortisol e DHEA-S mediante o teste de estimulação com ACTH.....	28
4.4 Resultados das dosagens de proteína C reativa e da haptoglobina antes e após a estimulação com ACTH.....	33
4.5 Correlações entre as variáveis endócrinas e as proteínas de fase aguda.....	36
5 CONCLUSÕES	39
6 REFERÊNCIAS	40
ANEXOS	49

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Resumo da síntese do DHEA-S (baseado em KROBOTH et al., 1999; FELDMAN & NELSON, 2004 e BOONSTRA et al., 2008).....	5
Figura 2 Imagem do <i>kit</i> Immunocomb® (Biogal, Israel), empregado na detecção de anticorpos anti- <i>E. canis</i> , pelo método “Dot-ELISA”, Jaboticabal, 2012.....	15
Figura 3 Imagem do hormônio adrenocorticotrópico sintético (ACTH) empregado no teste de estimulação com ACTH (esquerda), e ilustração da administração intravenosa do ACTH durante teste de estimulação com ACTH (direita), Jaboticabal, 2012.....	16
Figura 4 Imagem ultrassonográfica, no momento da introdução da agulha (seta) no parênquima esplênico para a realização da citologia aspirativa, Jaboticabal, 2012.....	17
Figura 5 Representação gráfica <i>point plot</i> dos valores de hemácias, hemoglobina, hematócrito, leucócitos, plaquetas e albumina dos grupos I e II. A barra horizontal representa a média. O asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2012.....	24
Figura 6 Representação gráfica <i>point plot</i> dos valores de cortisol e DHEA-S pré-ACTH e pós-ACTH dos grupos I e II. A barra horizontal representa a média. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2012.....	31
Figura 7 Representação gráfica <i>point plot</i> dos valores de delta cortisol dos grupos I e II. A barra horizontal representa a média. Jaboticabal, 2012.....	32
Figura 8 Representação gráfica <i>point plot</i> dos valores de proteína C reativa e haptoglobina pré-ACTH e pós-ACTH dos grupos I e II. A barra horizontal representa a média. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2012.....	35
Figura 9 Representação gráfica demonstrando a correlação positiva do DHEA-S e da proteína C reativa (PCR) pré-ACTH (A) e do DHEA-S e da proteína C reativa (PCR) pós-ACTH (B) no grupo II. Jaboticabal, 2012.....	37

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Valores (média $\pm$ desvio padrão) de hemácias, hemoglobina, hematócrito, leucócitos, plaquetas e albumina dos grupos I e II. Jaboticabal, 2012.....	23
Tabela 2 Títulos de anticorpos anti- <i>Ehrlichia canis</i> , anti- <i>Babesia canis</i> e anti- <i>Leptospira</i> spp. e resultados de nPCR para <i>E. canis</i> , de PCR para <i>B. canis</i> de cães naturalmente infectados por <i>E. canis</i> (grupo I). Jaboticabal, 2012.....	27
Tabela 3 Valores (média $\pm$ desvio padrão) de cortisol e DHEA-S e pré-ACTH e pós-ACTH nos grupo I e II. Jaboticabal, 2012.....	29
Tabela 4 Valores (média $\pm$ desvio padrão) de delta cortisol nos grupo I e II. Jaboticabal, 2012.....	30
Tabela 5 Valores (média $\pm$ desvio padrão) de proteína C reativa e haptoglobina pré-ACTH e pós-ACTH nos grupo I e II. Jaboticabal, 2012.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% – por cento

µg – micrograma

µL – microlitro

ACTH – hormônio adrenocorticotrópico

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CRH – hormônio estimulador de corticotropina

DHEA – dehidroepiandrosterona

DHEA-S – sulfato de dehidroepiandrosterona

dL – decilitro

DNA – ácido desoxirribonucleico

ELISA – Teste Imunoenzimático de Absorbância

FCAV – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

FMVZ – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

g – grama

Hb – hemoglobina

HCl – ácido clorídrico

Ht – hematócrito

HV – Hospital Veterinário

IL-1 – interleucina-1

IL-6 – interleucina-6

KCl – cloreto de potássio

kg – quilograma

L – litro

mA – miliampere

mg – miligrama

mL – mililitro

mM – milimol

ng – nanograma

nm – nanômetro

nPCR – reação em cadeia da polimerase do tipo *nested*

°C – grau Celsius

PBS – tampão fosfato-salino

PCR – reação em cadeia da polimerase

PFA – proteína de fase aguda

pmol – picomol

RNA – ácido ribonucleico

SAS – Statistical Analysis System

TNF α – fator de necrose tumoral α

U – unidade

U:P/C – razão proteína:creatinina urinária

Unesp – Universidade Estadual Paulista

USP – Universidade de São Paulo

V – volts

AVALIAÇÃO HORMONAL ADRENOCORTICAL EM CÃES COM INFECÇÃO NATURAL POR *Ehrlichia canis*

RESUMO - A erliquiose em cães pode conduzir o animal ao óbito, tanto por alterações hematológicas quanto clínicas, que se explicam pelo caráter catabólico multifatorial da doença. O comprometimento adrenocortical pode ser esperado em virtude dos desafios impostos ao sistema imune, gerados pelas infecções e inflamações. Este estudo visou avaliar a ocorrência de alterações hormonais relacionadas às glândulas adrenais, em cães infectados naturalmente por *Ehrlichia canis* (n=21), positivos na identificação de anticorpos anti-*E.canis* (Dot-ELISA) e DNA da bactéria (nPCR). Para tanto, foram pesquisadas as concentrações séricas de cortisol, sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-S) e proteínas de fase aguda (proteína C reativa e haptoglobina) pré e pós-estimulação com o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), e comparadas com os valores obtidos de cães saudáveis (n=10). Os resultados demonstraram resposta semelhante dos cães doentes e saudáveis ao teste de estimulação com ACTH, no que concerne ao cortisol. Isto sugere que cães com erliquiose de ocorrência natural mantêm a capacidade de secretar cortisol adequadamente diante o estímulo do ACTH. As concentrações de DHEA-S foram significativamente mais elevadas nos cães doentes, nos momentos pré e pós-ACTH, em relação aos saudáveis, o que ilustra o estresse do organismo na doença em estudo. Não foram observadas diferenças significativas entre os momentos dentro de cada grupo. Aparentemente, a estimulação com ACTH não interferiu na concentração de DHEA-S dosado uma hora após sua administração, sugerindo que a resposta ao estímulo hormonal não foi detectada. Da mesma forma, a estimulação com ACTH não interferiu na concentração das proteínas de fase aguda, embora se apresentassem significativamente mais elevadas nos cães doentes, o que reforça a participação de um processo inflamatório no curso da doença. Os resultados indicam que a erliquiose naturalmente adquirida é estressante e interfere no eixo hipotálamo-hipófise-adrenocortical.

Palavras-chave: adrenocortical, cães, *Ehrlichia canis*, hormônios, sulfato de dehidroepiandrosterona

ADRENOCORTICAL HORMONAL EVALUATION IN DOGS WITH NATURAL INFECTION BY *Ehrlichia canis*

SUMMARY – Ehrlichiosis in dogs may lead to death both for hematological and for clinical alterations that might be explained for its multifactorial catabolic character. The adrenocortical disruption may be expected during the course of the disease due to challenges on the immune system, generated by infection and inflammation. This study aimed to evaluate the occurrence of hormonal disturbances associated to the adrenal glands in dogs naturally infected by *Ehrlichia canis* (n=21), positive at the identification of anti-*E. canis* antibodies and of the bacterial DNA (nPCR). For this purpose, serum concentration of cortisol, dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) and acute phase proteins (C reactive protein and haptoglobin) pre and post-stimulation with adrenocorticotrophic hormone (ACTH) were assessed and compared to values obtained from healthy dogs (n=10). The results have shown similar cortisol response to the ACTH stimulation test between sick and healthy dogs. It suggests that dogs with ehrlichiosis of natural occurrence maintain the capacity of secreting cortisol properly before the ACTH stimulation. DHEA-S concentrations were significantly increased in sick dogs at pre and post-ACTH moments, in relation to healthy dogs, which illustrates the organic stress in the studied disease. Significant differences between both moments were not observed in the groups. Apparently, ACTH stimulation has not interfered in DHEA-S concentration, assessed one hour after its administration, suggesting that the response to the hormonal stimulation was not detected. The same way, ACTH stimulation has not interfered in the acute phase concentrations, although they were significantly increased in sick dogs, which reinforces the role of an inflammatory process in the course of the disease. The results indicate that naturally acquired ehrlichiosis is stressful and interferes in the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis.

Keywords: adrenocortical, dogs, *Ehrlichia canis*, hormones, dehydroepiandrosterone sulfate

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Erliquiose monocítica canina

A erliquiose monocítica canina, provocada pela bactéria gram-negativa *Ehrlichia canis* (*E. canis*), é uma doença de ocorrência mundial que representa um grave problema de saúde para os cães (LAPPIN, 2006).

A *E. canis* é um parasita intracelular obrigatório, que tem tropismo por monócitos, macrófagos e trombócitos, apresentando-se na forma de *cluster* intracitoplasmático, denominado mórula (NEER & HARRUS, 2006). Esta bactéria foi identificada pela primeira vez por DONATIEN & LESTOQUARD (1935) na Argélia. Ganhou importância quando centenas de cães americanos, da raça Pastor Alemão, morreram durante a guerra do Vietnã, acometidos pela doença. No Brasil, a *E. canis* foi diagnosticada pela primeira vez em Belo Horizonte-MG, por COSTA et al. (1973).

O carrapato marrom do cão (*Rhipicephalus sanguineus*) é o vetor responsável pela transmissão da doença, por meio da inoculação do parasita pela secreção salivar infectada (MOREIRA et al., 2003; BULLA et al., 2004; DAGNONE, et al., 2009).

O período de incubação natural da doença é de oito a vinte dias, quando os parasitas multiplicam-se nos macrófagos, por divisão binária, espalhando-se pelo organismo (NEER & HARRUS, 2006). O curso subsequente da erliquiose canina se subdivide nas fases aguda, subclínica e crônica, embora estes estádios sejam mais apropriadamente observados na infecção experimental, não tanto na doença de curso natural (HARRUS et al., 2004; MUNHOZ et al., 2009; FARIA et al., 2011). Na fase aguda, que perdura de duas a quatro semanas, o animal apresenta sinais clínicos de febre, secreção óculo-nasal serosa ou purulenta, hiporexia a anorexia, perda de massa corporal, linfadenomegalia, uveíte e a infestação por carrapatos, normalmente, é reportada pelo proprietário (LAPPIN, 2006). Pode haver, ainda, esplenomegalia, trombocitopenia, leucopenia e anemia (NEER & HARRUS, 2006). A fase subclínica, por sua vez, se manifesta em meses ou anos após a infecção (LAPPIN, 2006), apresentando trombocitopenia (NEER & HARRUS, 2006) e altos títulos de anticorpos

anti-*E.canis*, atribuídos, por alguns pesquisadores, à permanência da bactéria no baço do animal (HARRUS et al., 2004). A fase crônica se estabelece quando as demais são ultrapassadas e, normalmente, manifesta-se por prostração, palidez de mucosas, dor abdominal, epistaxe, hemorragias, hepato-esplenomegalia, infiltrado inflamatório pulmonar, hifema, dor articular, déficit de nervos cranianos, convulsões, poliúria e polidipsia (LAPPIN, 2006), culminando em hipoplasia ou aplasia da medula óssea (NEER & HARRUS, 2006). Todavia, estudos de diferentes pesquisadores (TAJIMA & RIKIHISA, 2005; UNVER et al., 2006) claramente mostram que os sinais clínicos diferem, em ordem de manifestação e importância, entre os cães infectados por diferentes amostras de *E. canis*.

Cães infectados experimentalmente com a amostra *E. canis* de Jaboticabal, SP (*Gene Bank* n°DQ401044) apresentam, ao exame hematológico, anemia, trombocitopenia e leucopenia (CASTRO et al., 2004), sendo a trombocitopenia o achado mais frequente nesses animais, quer experimental ou naturalmente infectados (OLIVEIRA et al., 2000; CASTRO et al., 2004; HARRUS et al., 2004; NAKAGHI et al., 2008; MUNHOZ et al., 2009, FARIA et al., 2011) Na fase crônica, tal como o descrito na literatura (LAPPIN, 2006; NEER & HARRUS, 2006), cães com infecção naturalmente adquirida pela amostra *E. canis* desta região do estado, também desenvolvem hipoplasia ou aplasia das séries mieloide, eritroide ou megacariocítica, ou de todos os precursores da medula óssea (experiência pessoal).

Frequentemente, a doença conduz ao óbito, tanto por suas alterações hematológicas, quanto por outros fatores consequentes como letargia, apatia e anorexia, que se explicam pelo caráter catabólico multifatorial da doença (VARSHNEY et al., 2003).

O diagnóstico da erliquiose canina pode ser estabelecido por meio do exame físico e de outros complementares. A identificação de mórulas no sangue periférico (LAPPIN, 2006; NEER & HARRUS, 2006; FARIA et al., 2010) ou em aspirados esplênicos do animal suspeito (FARIA et al., 2011) é um diagnóstico definitivo. A reação de imunofluorescência indireta e o “Dot-Elisa” podem evidenciar a exposição à bactéria

(OLIVEIRA et al., 2000; LAPPIN, 2006), ou ainda, a reação em cadeia da polimerase (PCR) confirma a doença (NEER & HARRUS, 2006, NAKAGHI et al., 2010).

O tratamento é baseado na terapia de suporte e no uso de fármacos que controlam a multiplicação do parasita, tais como as tetraciclina, o cloranfenicol, o dipropionato de imidocarb e a amicarbalida. O uso do imidocarb é controverso. Alguns pesquisadores o recomendam (NEER & HARRUS, 2006), embora outros mostrem que a administração de doxiciclina, precedida ou não pelo dipropionato de imidocarb não modifica a resposta terapêutica de cães com erliquiose monocítica canina (SAINZ et al., 2000; SOUSA et al., 2004).

Um consenso no tratamento da erliquiose canina é o emprego das tetraciclina, que são os fármacos de escolha, sendo a doxiciclina e a minociclina as empregadas com maior frequência (NEER & HARRUS, 2006). Estes antimicrobianos são bacteriostáticos lipossolúveis, prontamente absorvidos e atingem concentrações séricas e intracelulares satisfatórias, fatores importantes na eliminação do parasita intracelular (SPINOSA, 2002). Todavia, um estudo recente sugere que a *E. canis* possa persistir em cães que desenvolveram a doença experimental e foram tratados com doxiciclina (10 mg/kg, via oral, a cada 24 horas por vinte e oito dias). Carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* que se alimentaram nesses cães após o tratamento apresentaram PCR positiva para a *E. canis* (McCLURE et al., 2010).

1.2 Hormônios adrenocorticais

As glândulas adrenais passaram a ser consideradas essenciais à sobrevivência dos mamíferos quando Addison, em 1855, descreveu as alterações relativas à destruição adrenal. Ainda, em 1932, Cushing descreveu as anormalidades metabólicas induzidas pela hiperatividade adrenocortical, destacando a porção cortical destas glândulas como mantenedora da vida, em relação à sua parte medular (GARCIA-LEME, 1989).

O córtex adrenal é composto por três camadas secretoras: a zona glomerulosa, que sintetiza e secreta aldosterona; as zonas fasciculada e reticulada, que sintetizam

hormônios sexuais e cortisol (HERRTAGE, 2009). A zona glomerulosa é deficiente da atividade da enzima 17- α -hidroxilase (renomeada como CYP17), o que rende a esta camada a incapacidade de sintetizar cortisol ou andrógenos. Em contraste, apenas as células da zona glomerulosa possuem as enzimas necessárias para a desidrogenação da 18-hidroxicorticosterona e síntese da aldosterona. A zona fasciculada, a mais espessa das três camadas adrenocorticais, atua em conjunto com a zona reticulada, mais interna. Apenas as células destas camadas possuem a enzima 17- α -hidroxilase (CYP17) e podem sintetizar 17-hidroxipregnenolona e 17-hidroxiprogesterona, precursores do cortisol e dos andrógenos adrenais (FELDMAN & NELSON, 2004).

A síntese dos esteroides se inicia com a ação enzimática sobre o colesterol. Lipoproteínas plasmáticas são as principais fontes de colesterol adrenal, embora a síntese a partir de acetato também ocorra. Um pequeno estoque de colesterol livre está disponível para as adrenais, para que haja rápida resposta ao estímulo. Quando este estímulo ocorre, há aumento na hidrólise de ésteres do colesterol, convertendo-o a colesterol livre, além do aumento do uso das lipoproteínas plasmáticas e aumento da síntese de colesterol adrenal (ENGELKING, 2010).

A produção de cortisol pelas adrenais é regulada pelo CRH (hormônio estimulador de corticotropina) hipotalâmico e pelo ACTH (hormônio adrenocorticotrópico) hipofisário (SCOTT-MONCRIEFF, 2007). As zonas fasciculada e reticulada respondem ao ACTH e são estimuladas à rápida síntese e secreção de cortisol e andrógenos, de modo que a concentração plasmática destes hormônios aumenta minutos após a liberação do ACTH (FELDMAN & NELSON, 2004, ENGELKING, 2010). O cortisol é transportado no plasma ligado a uma α -globulina chamada transcortina (ou globulina de ligação de corticosteroide) e, em menor grau, à albumina. Neste estado, o cortisol não é disponível biologicamente. Ainda, há pouco cortisol livre disponível para os tecidos (ENGELKING, 2010).

Os corticosteroides, de modo geral, exercem influência no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas e estão envolvidos na regulação hidro-eletrolítica (GARCIA-LEME, 1989), além de possuírem atividades anti-inflamatórias e imunossupressoras bem conhecidas (HERRTAGE, 2009).

O sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-S), um metabólito sulfatado do dehidroepiandrosterona (DHEA), é um precursor esteroide sintetizado a partir do colesterol e secretado pela zona reticulada adrenocortical. Há também uma pequena síntese deste hormônio pelas gônadas e pelo cérebro (BOONSTRA et al., 2008). O colesterol é enzimaticamente transformado em pregnenolona e posteriormente em 17-hidroxipregnenolona para, então, originar o DHEA e o DHEA-S. O DHEA-S é desconjugado a dehidroepiandrosterona, previamente à sua conversão a andrógenos (androstenediona e testosterona) e estrógenos (estradiol) (RABIN & McKENNA, 1982) (Figura 1). A síntese de DHEA-S ocorre, em sua maior parte, em resposta ao ACTH (BOONSTRA et al., 2008; FISCHLI et al., 2008).

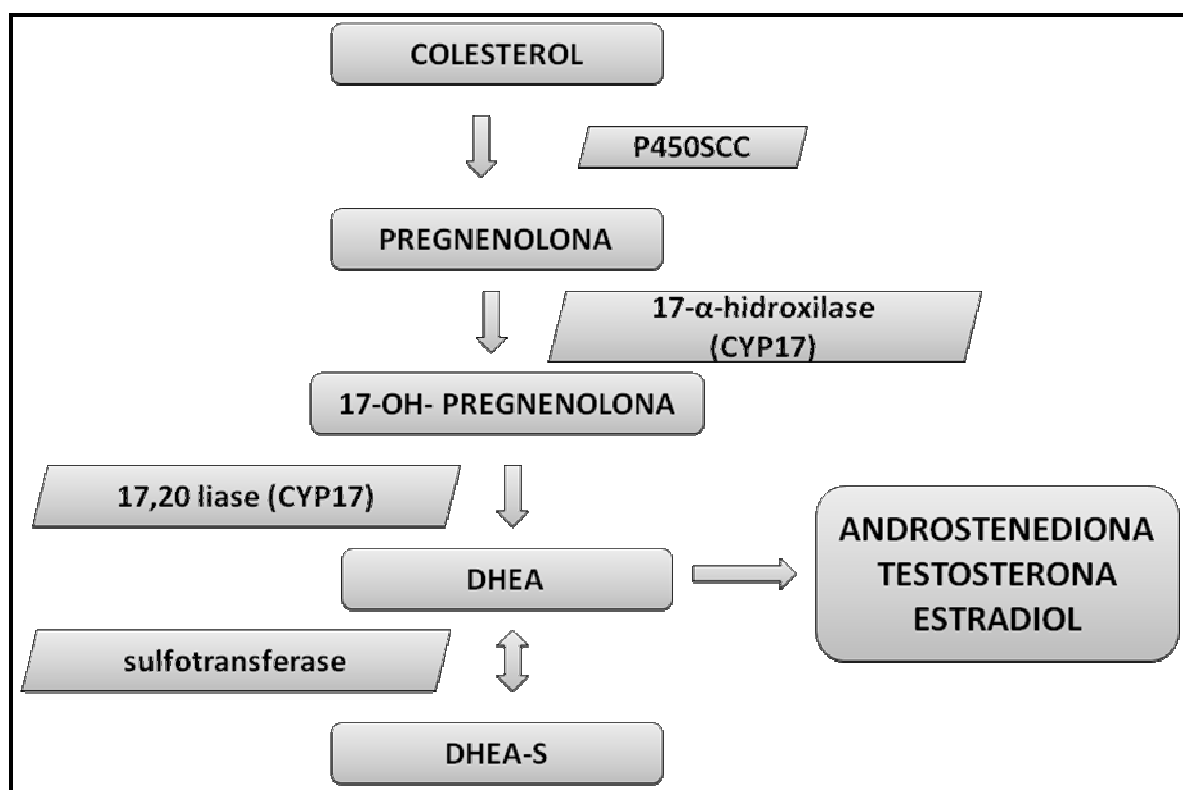


Figura 1- Resumo da síntese do DHEA-S (baseado em KROBOTH et al., 1999; FELDMAN & NELSON, 2004 e BOONSTRA et al., 2008).

Estudos médicos divergem sobre a secreção de DHEA-S. Enquanto uns observaram que ocorreu sincronia entre a secreção de DHEA-S com o cortisol (KROBOTH et al., 1999), outros mostraram não haver sincronia (LEAL et al., 2003; BUHIMSCHI et al., 2008). Em caninos hípidos, testes de estimulação com ACTH promoveram aumento de DHEA-S em fêmeas castradas, fêmeas inteiras e em machos castrados (FRANK et al., 2003). Por outro lado, a dexametasona reduz as concentrações séricas circulantes de cortisol e do DHEA-S, em animais que não apresentam alterações adrenais (PARKER & ODELL, 1980).

DHEA-S é considerado um hormônio imunomodulador, atuando na estimulação de linfócitos T auxiliares e na produção de citocinas (LEAL et al., 2003; BOONSTRA et al., 2008; MORGAN et al., 2009). Diversas pesquisas mostraram seu envolvimento na indução do parto (RABIN & McKENNA, 1982; BUHIMSCHI et al., 2008), na resposta do organismo ao estresse, no câncer mamário, depressão, doença renal crônica, doenças hepáticas, diabetes mellitus e pênfigo em humanos, e como marcador do envelhecimento fisiológico (KROBOTH et al., 1999). Há evidências de que o DHEA-S e o cortisol manifestam efeitos imunomodulatórios contrários; enquanto o cortisol suprime, o DHEA-S estimula a função do sistema imune (MITCHELL et al., 2002).

Outrossim, considerando a produção de cortisol, de intermediários esteroidais e de hormônios sexuais pelas glândulas adrenais, faz-se necessária a mensuração não somente do cortisol quando se pretende avaliar a atividade adrenocortical. Uma aplicação potencial para a mensuração dos intermediários esteroidais é quando se suspeita de hiperadrenocorticismos atípicos, quando um cão apresenta sinais clínicos compatíveis com a síndrome de Cushing, porém valores normais de cortisol perante os testes endócrinos tradicionais (FRANK et al., 2003; FELDMAN & NELSON, 2004).

1.3 Alterações endócrinas e doença

O aumento da secreção hormonal adrenocortical é observado durante o desenvolvimento de reações inflamatórias ou de infecções induzidas experimentalmente. Tais situações remetem à noção de que a inflamação/infecção

induz uma resposta orgânica de defesa modulada por hormônios, com poucas evidências dos mecanismos exatos envolvidos (GARCIA-LEME, 1989).

Desafios do sistema imune por infecções ou inflamações invariavelmente ativam o eixo hipotálamo-hipófise-adrenocortical. Essas ações são mediadas por citocinas liberadas por células do sistema imune e induzem, marcadamente, a liberação de ACTH e glicocorticoides (BUCKINGHAM et al., 1992). As citocinas estimulam, por ações diretas ou indiretas, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal que, por sua vez, inibe ou modula a inflamação pelos efeitos imunossupressores dos glicocorticoides (LEAL et al., 2003). Deste modo, a atividade secretória das glândulas adrenais mostra-se essencial para a adaptação do organismo às alterações ambientais internas e externas (KASS & FINLAND, 1953).

HERRTAGE (2009) considera ainda haver um grande paradoxo neste âmbito hormonal. Segundo o autor, embora o cortisol seja necessário para a sobrevivência de animais sob estresse, traumatizados ou infectados, muitos dos mecanismos de defesa parecem ser inibidos por altas concentrações de glicocorticoides. Explica-se assim o fato do cortisol estar beneficamente aumentado durante as primeiras respostas metabólicas, inflamatórias e imunes, de modo que cada vez mais cortisol é requerido, alterando diversas funções orgânicas e inibindo, por exemplo, a fosfolipase A, a cicloxigenase, a síntese de óxido nítrico e do fator ativador de plaquetas, prejudicando, portanto, a inflamação vascular.

Estabeleceu-se o conceito de síndrome de adaptação, descrita em três estádios, gerada quando há um estímulo estressante ao organismo (trauma, isquemia, inflamação ou infecção): o estado de alarme, o estado de resistência e o estado de exaustão. Este último estado ocorre quando o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal não é capaz de responder adequadamente (KASS & FINLAND, 1953). Na evolução deste raciocínio, é proposta em humanos a ocorrência da síndrome da insuficiência adrenal relativa, marcada por hipocortisolemia relativa em pacientes em sepse, que apresentam hipotensão, hipoglicemia, recuperação anestésica insatisfatória, fraqueza e desorientação, que respondem ao tratamento com corticosteroides, tais como a dexametasona ou a hidrocortisona (RAI et al., 2004). BURKITT et al. (2007)

descreveram a possibilidade da ocorrência desta síndrome em cães com sepse, embora HOLFORD et al. (2008) relatem que faltam estudos mais precisos para determinar sua veracidade em cães.

Assim, as alterações hormonais são foco de estudo em diversas doenças, especialmente pela escassez de informação consistente. Em humanos, alterações de cortisol, outros hormônios como o DHEA-S e interleucinas foram descritas nas pneumonias, tuberculose, brucelose, endocardite bacteriana, leptospirose, tétano, hepatite viral, malária, blastomicose (KASS & FINLAND, 1953), neoplasia mamária, doença renal crônica, diabetes mellitus, artrite reumatóide, pênfigo, lúpus eritematoso sistêmico (KROBOTH et al., 1999) e na paracoccidioidomicose (LEAL et al., 2003). Similarmente, alterações endócrinas já foram descritas em cães portadores de tripanossomíase (VARSHNEY & VARSHNEY, 1999), babesiose (VARSHNEY et al., 2003; SCHOEMAN & HERRTAGE, 2007) e na erliquiose canina. Nesta última, KUMAR et al. (2006) avaliaram o perfil tireoideano, adrenal e pancreático de cães naturalmente infectados na fase crônica, na presença ou ausência de *Babesia canis* e observaram, por meio de dosagens de T₃ e T₄ total, cortisol e insulina basais, concentrações aquém da normalidade dos hormônios tireoideanos. Não foram observadas alterações significativas com relação ao cortisol ou à insulina, de acordo com os valores de normalidade. Os autores do estudo julgaram a condição como a de cães eutireoideos doentes.

Hormônios sofrem variações na concentração sérica, particularmente o cortisol, pois seu valor basal, mesmo que em repouso, possui limitado valor diagnóstico (FISCHLI et al., 2008). Cerca de 10% dos cães com hiperfunção adrenal apresentam cortisol aumentado em repouso. Fatores estressantes, como condições ambientais, estado fisiológico, exercício, anestesia e jejum alimentar são conhecidos por influenciarem as concentrações séricas de cortisol (RIJNBERK & MOL, 1997). Desta forma, testes de estimulação ou supressão de eixos hormonais são propostos (BUSH, 2004).

1.4 Proteínas de fase aguda

Animais submetidos a desafios à saúde projetam uma resposta vigorosa que inclui a ativação do sistema imune inato e adaptativo. Dentre estes sistemas envolvidos, que contribuem para a resposta imune inata e inespecífica, estão as variadas reações de resposta de fase aguda, que conduzem à febre, leucocitose, alterações hormonais e depleção de proteína muscular, dentre outros fatores, que são combinados para minimizar o dano tecidual, enquanto o processo de reparação ocorre e o equilíbrio fisiológico é restabelecido (ECKERSALL, 2000; HERMAN et al., 2009).

A resposta de fase aguda é estimulada pela liberação de citocinas por macrófagos e monócitos, como a interleucina-1 (IL-1), a IL-6 e o fator de necrose tumoral α (TNF α), que induzem a síntese hepática das proteínas de fase aguda (PFAs) (KOGIKA et al., 2003). A concentração das PFAs está relacionada à severidade da condição patológica, o que estimula o estudo delas com o objetivo de se obter dados clínicos sobre as lesões inflamatórias ou infecciosas (ECKERSALL, 2000; KOGIKA et al., 2003), além de prover informação diagnóstica valiosa na detecção, no prognóstico e no monitoramento da doença (MYLONAKIS et al., 2011).

A proteína C reativa é a PFA positiva mais importante no diagnóstico de várias doenças em humanos, cães e suínos (ECKERSALL, 2000). Quantificada pelo método ELISA, mostrou-se elevada na presença de tumores (YAMAMOTO et al., 1993), em cães com *Bordetella bronchiseptica* (YAMAMOTO et al., 1994), na leptospirose (ECKERSALL, 2000), em enterites hemorrágicas bacterianas, na parvovirose (KOGIKA et al., 2003) e na erliquiose experimental causada por *E. canis* (RIKIHISA et al., 1994; MUNHOZ et al., 2009). As concentrações de proteína C reativa aumentaram mesmo antes que houvesse a manifestação clínica da erliquiose aguda experimentalmente induzida e atingiram o pico quando os sinais clínicos eram evidentes, sugerindo que esta PFA pode ser empregada, não somente como fator preditivo, mas também para monitorar a gravidade da doença (MUNHOZ et al., 2009).

A haptoglobina é uma alfa-2-proteína responsável pelo transporte de hemoglobina nas células do sistema mononuclear fagocitário e atua na modulação da função de

linfócitos e macrófagos (HARVEY & WEST, 1987). É reconhecida como a segunda PFA positiva em importância, depois da proteína C reativa em cães (ECKERSALL, 2006), sendo responsiva a doenças inflamatórias, infecciosas e ao estresse (CORAZZA, 1997). Em caninos, é particularmente sensível aos corticosteroides, de forma que elevados níveis de haptoglobina são verificados tanto após tratamento com corticosteroides, quanto na ocorrência de hiperadrenocorticism natural (HARVEY & WEST, 1987; MARTINEZ-SUBIELA et al., 2004; MCGROTTY et al., 2005). JAIN (1989) postulou que a haptoglobina aumenta de forma discreta em processos virais e de forma mais acentuada em processos bacterianos. Um estudo em cães apresentando diarreia hemorrágica, supostamente por parvovírus canino, revelou valores séricos elevados de PFAs. Dentre tais, a haptoglobina estava discretamente elevada (KOGIKA et al., 2003).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo desta pesquisa foi avaliar o grau de comprometimento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenocortical na erliquiose monocítica canina de ocorrência natural.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar as alterações de cortisol sérico pré e pós-estimulação com ACTH (hormônio adrenocorticotrópico) sintético em cães infectados naturalmente por *Ehrlichia canis*;
- Verificar as concentrações de DHEA-S (sulfato de dehidroepiandrosterona) pré e pós-estimulação com ACTH e sua possível alteração durante o estado de doença;
- Quantificar a proteína C reativa nos momentos pré e pós-estimulação com ACTH, como possível indicador de ativação do sistema imune e avaliar sua correlação com o eixo hipotálamo-hipófise-adrenocortical em cães com infecção natural por *E. canis*;
- Avaliar as concentrações de haptoglobina pré e pós a administração de ACTH a fim de verificar sua correlação com o estímulo hormonal adrenocortical;
- Comparar as concentrações da proteína C reativa, haptoglobina, cortisol sérico e DHEA-S pré e pós-estimulação com ACTH dos cães doentes com cães hígidos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo deste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal – SP (protocolo nº 003940/10). Os proprietários dos cães eram informados e consultados sobre a participação de seus animais no experimento. Cães com os exames de triagem indicativos eram internados no Hospital Veterinário, onde permaneciam por uma noite, em jejum alimentar de aproximadamente 12 horas. Às 9 horas do seguinte dia, coletava-se amostra de sangue pré e pós-estimulação com ACTH, obedecendo à metodologia descrita a seguir. Após este procedimento, os animais doentes recebiam alta hospitalar para, então, iniciar o tratamento domiciliar. Os animais hígidos foram submetidos aos mesmos procedimentos de internação e coletas.

Os animais doentes, que compuseram o grupo I, receberam tratamento com hiclato de doxiciclina (5 mg/kg via oral a cada 12 horas por 28 dias; Doxifin® – Ouro Fino), precedida por uma aplicação de sulfato de atropina (0,022 mg/kg ou 0,044 mg/kg via subcutânea; Atropion® – Ariston), seguida pela aplicação de dipropionato de imidocarb (5 mg/kg via subcutânea; Imicarb Pearson® – Eurofarma), repetidas com intervalo de 15 dias. O tratamento teve início logo após o teste com estimulação com ACTH.

3.1 Seleção dos cães e dos grupos experimentais

Os cães utilizados neste estudo foram selecionados a partir da casuística clínica do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da FCAV/Unesp - Câmpus de Jaboticabal, de janeiro a novembro de 2011. Foram incluídos no estudo apenas animais adultos, com idade entre um e 10 anos, com ou sem definição racial, machos e fêmeas.

Foram excluídos cadelas em estro, cães que apresentassem doenças pré-existentes, tais como endocrinopatias, doenças infecciosas, neoplasias, nefropatias ou hepatopatias e aqueles que receberam corticoterapia sistêmica ou tópica durante o atendimento, ou nos 60 dias que antecederam as coletas. Exames de triagem

realizados serviram como guia para a inclusão ou exclusão dos cães nos grupos experimentais.

3.1.1 Seleção dos cães para o grupo I (grupo cães doentes)

Foram selecionados 21 cães com história clínica compatível com erliquiose, que apresentassem ao menos dois critérios clínicos, além da presença de trombocitopenia, podendo coexistir anemia e/ou leucopenia, histórico ou presença de carrapatos, sorologia e *nested* PCR positivas para *E. canis*, sorologia e PCR negativas para *Babesia canis* e sorologia negativa para *Leptospira* spp..

Excluíram-se deste grupo cães que apresentassem alterações nos exames de triagem, que sugerissem comorbidades. Os valores de referência destes exames para a espécie canina foram aqueles adotados no HV da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal – SP.

3.1.2 Seleção dos cães para o grupo II (grupo controle)

Foram selecionados 10 cães hígidos, sem alterações detectáveis no exame físico, nos exames de triagem e nos específicos realizados (sorologia e *nested* PCR para *E. canis* negativos, sorologia e PCR para *B. canis* negativos, como também a sorologia para *Leptospira* spp).

Incluíram-se neste grupo apenas cães com os exames de triagem dentro dos padrões de normalidade para a espécie, como o descrito para os cães do grupo I.

3.2 Exames de triagem

Como exames de triagem foram realizados hemograma, glicemia, alanina-aminotransferase, fosfatase alcalina, creatinina, ureia, proteína total, albumina, colesterol, triglicerídeos, sódio e potássio séricos, assim como urinálise e a razão proteína:creatinina urinária (U:P/C) no momento do atendimento inicial, na véspera do

teste de estimulação com ACTH. As amostras foram processadas no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal – SP.

3.2.1 Hemograma

A contagem global dos eritrócitos, leucócitos, plaquetas, determinação do volume globular e da concentração de hemoglobina foram realizadas com auxílio de um contador automático (ABC Vet[®] – HORIBA ABX), e a contagem diferencial dos leucócitos pela leitura de esfregaços sanguíneos corados com uma solução de May-Grunwald (1 g), Giemsa (1,5 g), Wright (0,5 g) e Metanol (1 L) (CAMPOS FILHO, E., 2011 – comunicação pessoal), sob microscopia de luz, com aumento de 1000x.

3.2.2 Exames bioquímicos séricos, urinálise e U:P/C

Os exames para avaliações séricas de alanina-aminotransferase, fosfatase alcalina, creatinina, ureia, proteína total, albumina, colesterol, triglicerídeos, sódio e potássio, assim como a bioquímica urinária (proteína e creatinina para estabelecimento do U:P/C) foram realizados por *kits* comerciais, em método semi-automatizado. A glicemia dos animais foi mensurada com um glicosímetro digital (Accu-Chek Performa[®] – Roche) .

A urinálise foi feita no mesmo laboratório, cumprindo-se as etapas: exame físico da urina, por meio da observação macroscópica; densidade urinária, mensurada por refratômetro digital; análise química da urina, por meio da fita reagente comercial, e a sedimentoscopia, realizada após a centrifugação da amostra e observação do sedimento à microscopia óptica.

3.3 Exames específicos

3.3.1 “Dot-ELISA” para detecção de anticorpos anti-*E. canis*

Para a detecção de anticorpos anti-*E. canis* da classe IgG foi empregado o *kit* Immunocomb® (Biogal, Israel) (Figura 2). A metodologia empregada foi a descrita pelo fabricante, que considera títulos positivos (reagentes) acima de 1:80. Este teste foi utilizado para a identificação dos animais soropositivos e negativos, que foram submetidos ao teste de estimulação com ACTH. Amostras de sangue total e de soro destes animais foram reservadas a -20°C para realização da nPCR para *E. canis*, PCR para *B. canis* e as sorologias para *B. canis* e *Leptospira* spp.



Figura 2- Imagem do *kit* Immunocomb® (Biogal, Israel), empregado na detecção de anticorpos anti-*E. canis*, pelo método “Dot-ELISA”, Jaboticabal, 2012.

3.3.2 Teste de estimulação com hormônio adrenocorticotrópico sintético (ACTH)

Os animais dos grupos I e II foram submetidos ao teste de estimulação com ACTH, às nove horas da manhã, após permanecerem em canil apropriado, com água à vontade e sob jejum alimentar, como já referido.

Para o teste, procedeu-se da seguinte forma: inicialmente foi coletado sangue por venopunção jugular (pré-ACTH) e a seguir foram administrados 5 µg/kg de ACTH sintético (Synacthen 1mg/mL – Biofutura Pharma, Itália) (Figura 3) por via intravenosa, priorizando-se a veia cefálica cranial. Após uma hora, nova venopunção jugular para coleta de sangue foi realizada (pós-ACTH). A metodologia empregada foi a descrita por FRANK et al. (2000), FRANK et al. (2004) e HOLFORD et al. (2008) e recomendada por FELDMAN & NELSON (2004), para a avaliação hormonal do córtex adrenal.

As amostras de soro pré e pós-ACTH foram criopreservadas a -20°C e armazenadas para a posterior dosagem de cortisol, haptoglobina, proteína C reativa e DHEA-S.

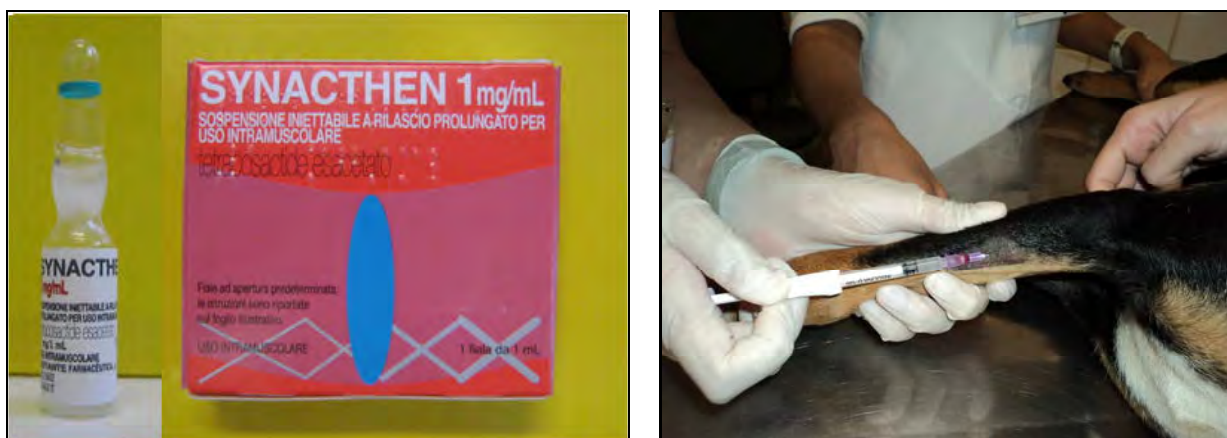


Figura 3- Imagem do hormônio adrenocorticotrópico sintético (ACTH) empregado no teste de estimulação com ACTH (esquerda), e ilustração da administração intravenosa do ACTH durante teste de estimulação com ACTH (direita), Jaboticabal, 2012.

3.3.3 Punção biopsia-aspirativa esplênica

Após a coleta de sangue pós-ACTH, descrita a seguir, procedia-se a punção aspirativa esplênica com agulha fina guiada por ultrassonografia (Figura 4) nos animais do grupo I. A seguir, confeccionavam-se esfregaços do material em lâminas de

microscopia, depois de secos ao ar eram corados (como descrito no item 3.2.1) e montados, seguindo as técnicas citológicas e lidos sob microscopia de luz, com aumento de 1000X, para pesquisa das mórulas de *E. canis*, empregando a técnica descrita por FARIA et al. (2010).

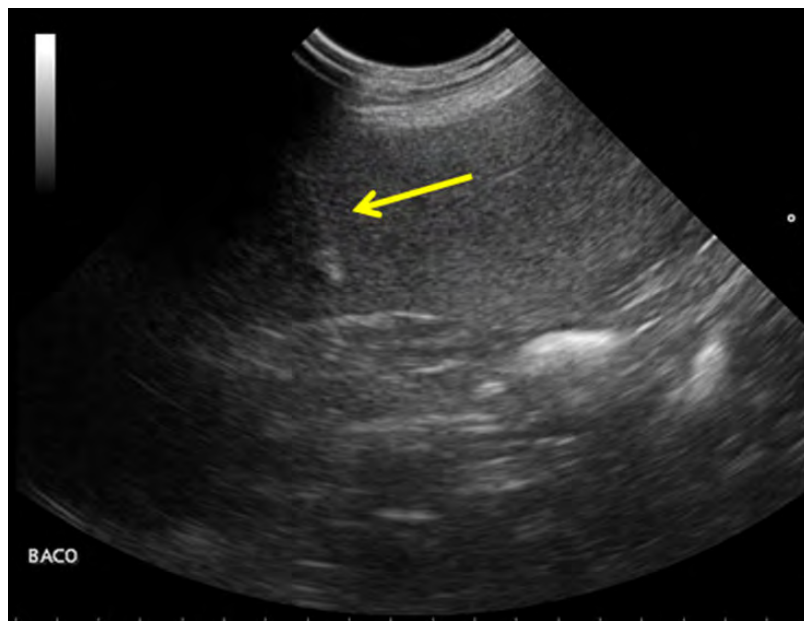


Figura 4- Imagem ultrassonográfica, no momento da introdução da agulha (seta) no parênquima esplênico para a realização da citologia aspirativa, Jaboticabal, 2012.

3.3.4 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para detecção de anticorpos anti-*Babesia canis*

Os soros dos cães foram individualmente diluídos em PBS e a técnica utilizada foi a preconizada por FURUTA et al (2009). Resumidamente, 2 µL dos soros sanguíneos diluídos (1:40; 1:80; 1:160; 1:320; 1:640; 1:1280) foram adicionados às áreas demarcadas das lâminas contendo antígenos de *B. canis*, gentilmente cedidas

pela Profa. Dra. Mitika K. Hagiwara (FMVZ/USP). As lâminas foram então incubadas durante 45 minutos a 37°C em câmara úmida. Posteriormente foram feitas lavagens em tampão por imersão e depois de secas foi adicionado o conjugado (IgG de coelho anti-IgG de cão, marcado pelo isotiocianato de fluoresceína – Sigma® catálogo nº F7884), diluído a 1:80, conforme orientação do fabricante. As lâminas foram incubadas em câmara úmida por 40 minutos, lavadas, secas e montadas em glicerina tamponada. As leituras das lâminas foram realizadas em um microscópio equipado com luz fluorescente (Olympus® BX60) e foram considerados positivos aqueles soros que reagiram em diluições maiores ou iguais a 1:40. As reações sorológicas foram realizadas no Laboratório de Imunoparasitologia Veterinária no Departamento de Patologia da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal – SP.

3.3.5 Detecção de anticorpos anti-*Leptospira* spp.

A sorologia para pesquisa de sorovares de *Leptospira* spp. foi realizada no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal – SP, por meio da técnica de soroaglutinação microscópica (SAM) e os sorovares utilizados foram: Andamana, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, Pomona, Panama, Autumnalis, Shermani, Copenhageni, Patoc, Castellonis, Pyrogenes, Tarassovi, Whiticombi, Australis, Hebdomadis, Butembo, Wolffi, Hardjo, Sentot, Canicola, Bratislava, Bataveae, Cynopteri e Javanica.. Títulos menores ou iguais a 1:100 foram considerados negativos.

3.3.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As pesquisas de DNA de *E. canis* (nested PCR) e de *B. canis* (PCR) seguiram as técnicas descritas por NAKAGHI et al. (2010) e por CARRET et al. (1999),

respectivamente, descritas a seguir, e foram conduzidas no Laboratório de Imunoparasitologia Veterinária no Departamento de Patologia da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal – SP.

3.3.6.1 Extração de DNA de sangue total

A extração de DNA do sangue total foi realizada por meio do Mini *Kit* QIAamp DNA Blood (catálogo nº 51104, Qiagen®), como descrita por HARRUS et al. (1998) e a técnica utilizada foi a preconizada pelo fabricante.

3.3.6.2 Seleção dos *primers*

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados para a PCR de *Ehrlichia* spp foram aqueles baseados na sequência 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* ECAN5 e HE3 (HARRUS et al., 1998).

3.3.6.3 Amplificação de DNA de *Ehrlichia* spp e de *E. canis*

A amplificação do tipo *nested* para *E. canis* foi realizada utilizando-se os produtos obtidos da primeira amplificação (para gênero) como moldes para os *primers* para as próximas reações. Para as reações específicas para *E. canis* foram utilizados os *primers* ECAN5 (5'CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA3') e HE3 (5'TATAGGTA CCGTCATT ATCTTCCCTAT-3').

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

A amplificação com os *primers* ECC e ECB foram conduzidas em termociclador (MJ Research® - PTC 200) e consistiram 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 1,0 µL da amostra de DNA amplificado e os *primers* espécie-específicos ECAN5 e HE3. A reação consistiu 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.

3.3.6.4 Amplificação de DNA de *Babesia canis*

Os *primers* utilizados na PCR foram baseados na sequência parcial do gene da subunidade menor do 18S rDNA, presente na maioria das espécies de *Babesia* spp., Piro A (5'AATACCCAATCCTGACACAGGG-3') e Piro B (5'-TTAAATACGAATGCCCCCAAC-3'). A técnica da PCR foi realizada utilizando-se as mesmas soluções e concentrações da PCR para *E. canis*, com exceção da Taq Polimerase (Invitrogen®), da qual foi utilizada 0,5 U. A reação consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 5 minutos, seguidos por extensão final a 72°C durante 5 minutos.

3.3.6.5 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose (Invitrogen®) a 1,5%, corado com brometo de etídio (0,5 µL/mL) em tampão de corrida TAE (40 mM Tris-acetato, 2 mM EDTA pH 8,0). A eletroforese foi realizada a 90 V/50 mA durante 90 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados utilizou-se um marcador de tamanho molecular de 100 pares de base (100 bp ladder, Invitrogen®).

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 - Startagene®).

3.4 Dosagens de proteínas de fase aguda (Proteína C reativa e Haptoglobina)

Os soros sanguíneos dos cães dos grupos I e II foram empregados nas dosagens de proteína C reativa por ELISA (UCLAB USA®, catálogo nº E-40CRP) utilizando-se *kits* comerciais específicos e obedecendo às recomendações do fabricante. A haptoglobina foi detectada por método enzimático colorimétrico (Tridelta Phase®, catálogo nº TP 801). As amostras de soro foram processadas no Laboratório de Imuno-histoquímica da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal – SP e as placas foram lidas (Leitor de ELISA Dynex Revelation – Dynex Technologies) em comprimentos de ondas de 450nm para proteína C reativa e de 630nm para a haptoglobina, no Laboratório de Imunoparasitologia Veterinária no Departamento de Patologia da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal – SP.

3.5 Dosagem de cortisol sérico

As amostras de soro foram enviadas a um laboratório terceirizado (BET Laboratories, Rio De Janeiro-RJ-Brasil) para dosagens de cortisol sérico basal e pós-estimulação com ACTH e processadas pelo método de radioimunoensaio. Os valores de referência para a espécie foram aqueles adotados pelo laboratório.

3.6 Dosagem de DHEA-S

Foi empregado *kit* comercial ELISA (In Vitro®, catálogo nº 55060) para dosagem de DHEA-S, seguindo-se as orientações do fabricante. As amostras de soro foram processadas no Laboratório de Imuno-histoquímica da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal – SP e as placas do teste Elisa lidas a 450nm (Leitor de ELISA Dynex

Revelation – Dynex Technologies) no Laboratório de Imunoparasitologia Veterinária no Departamento de Patologia da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal – SP.

3.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram executadas no programa computacional SAS ("*Statistical Analysis System*", 1996). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade do resíduo (Cramér-von-Mises). Foi também empregado o teste de Tukey-Kramer para as avaliações de cortisol, DHEA-S, proteína C reativa e haptoglobina nos momentos pré-ACTH e pós-ACTH, e o teste T Student para as análises dos valores de hemácias, hemoglobina, hematócrito, leucócitos, plaquetas, albumina e delta cortisol. As correlações entre as proteínas de fase aguda e cortisol e DHEA-S foram obtidas pelo teste de Pearson. O nível de significância adotado foi de 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Aspectos clínico-patológicos

Dentre as anormalidades clínico-patológicas observadas nos cães com erliquiose (Anexo B), excetuando-se a trombocitopenia evidenciada em 100%, já que se tratava de um dos principais fatores de inclusão dos cães no experimento, a hipoalbuminemia estava presente em 76%, a leucopenia em 52% e a anemia em 42,85% dos animais do grupo I. Todos os parâmetros clínico-patológicos avaliados dos cães do grupo II se encontravam dentro da normalidade para a espécie (Anexo C).

Foram observadas diferenças significativas nos parâmetros hematológicos (hemácias, hemoglobina, hematócrito, leucócitos, plaquetas) e na concentração de albumina sérica entre os grupos (Tabela 1 e Figura 5).

Tabela 1- Valores (média $\pm$ desvio padrão) de hemácias, hemoglobina, hematócrito, leucócitos, plaquetas e albumina dos grupos I e II. Jaboticabal, 2012.

Parâmetro	Grupo I (n=21)	Grupo II (n=10)	p
Hemácias (/ μ L)	5.873.810 $\pm$ 1.545.511	7.046.000 $\pm$ 854.182	0,0337
Hemoglobina (g/dL)	12,53 $\pm$ 2,89	16,5 $\pm$ 1,83	0,0004
Hematócrito (%)	40,07 $\pm$ 9,87	51,1 $\pm$ 6,40	0,0032
Leucócitos (/ μ L)	7.075 $\pm$ 3.925	11.400 $\pm$ 2.802	0,0041
Plaquetas (/ μ L)	88.857 $\pm$ 25.100	308.300 $\pm$ 106.273	<0,0001
Albumina (g/dL)	2,14 $\pm$ 0,57	2,93 $\pm$ 0,48	0,0007

Teste T Student

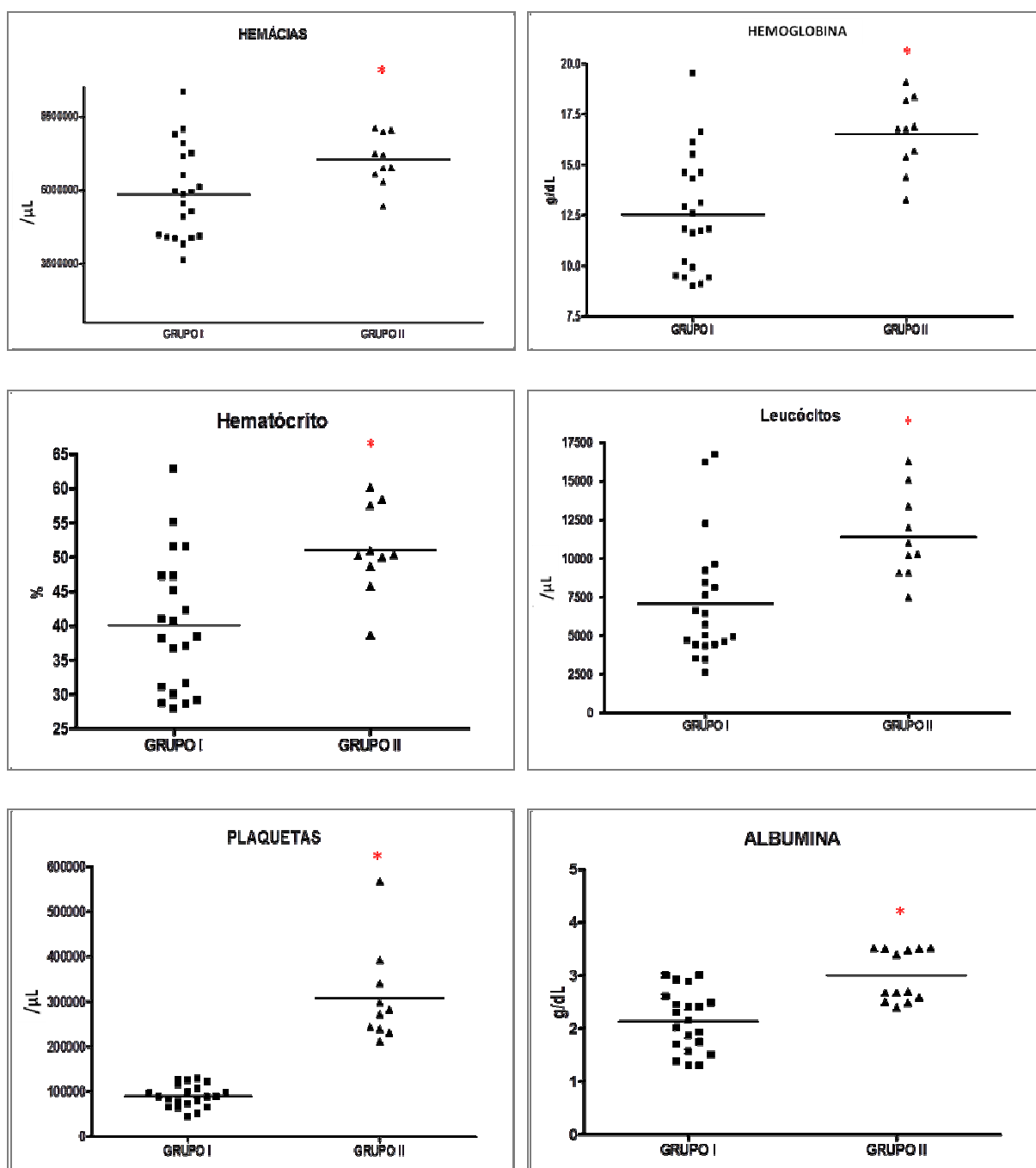


Figura 5- Representação gráfica *point plot* dos valores de hemácias, hemoglobina, hematócrito, leucócitos, plaquetas e albumina dos grupos I e II. A barra horizontal representa a média. O asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2012.

Os resultados das avaliações hematológicas dos cães do grupo I foram semelhantes aos descritos nos estudos de OLIVEIRA et al. (2000), CASTRO et al. (2004), HARRUS et al. (2004), NAKAGHI et al. (2008), BORIN et al. (2009), MUNHOZ et al. (2009) e FARIA et al. (2011). Anemia e leucopenia coexistiram, na maior parte das vezes, com a trombocitopenia nos cães doentes (grupo I). Embora apenas a concentração da albumina sérica e a contagem de plaquetas estivessem aquém dos valores mínimos considerados para a espécie (Anexo A), a diferença significativa entre as médias dos grupos, quanto a estes e aos outros parâmetros hematimétricos, ilustram a higidez dos cães do grupo II, critério essencial para a inclusão dos mesmos neste grupo.

A hipoalbuminemia em cães com erliquiose pode ser explicada por um conjunto de fatores. Na fase aguda da doença, há o extravasamento da albumina para o espaço intersticial, em consequência da permeabilidade vascular alterada, enquanto que, na fase crônica pode ser devido a glomerulopatias resultantes da deposição de complexos imunes (LAPPIN, 2006). Esta condição pode ocorrer, ainda, em função de um mecanismo compensatório do estado de hiperglobulinemia que ocorre em cães infectados por *E. canis* (HARRUS et al., 1996), verificada em 66,66% dos cães do grupo I (Anexo B). Anorexia,, vômitos e diarreia, sinais que foram observados em alguns cães do grupo I (Anexo B), também podem conduzir à hipoalbuminemia pela redução da síntese proteica e por má absorção entérica (BUSH, 2004). Ademais, a albumina sérica pode diminuir em doenças inflamatórias, o que permite classificá-la como uma proteína de fase aguda negativa (ECKERSALL, 2000; HERMAN et al., 2009).

Todavia, nas condições do nosso estudo, não foi-nos possível saber o exato mecanismo desencadeante da hipoalbuminemia evidenciada no grupo I. Como se tratavam de cães domiciliados, não tínhamos controle sobre a dieta que recebiam, nem sobre os protocolos de vacinação ou vermifugação praticados, o que não permite relacionar a redução da albumina sérica estritamente à erliquiose.

4.2 Diagnóstico da erliquiose monocítica canina

Os exames específicos mostraram a reatividade aos anticorpos anti-*E. canis* e a presença do DNA da bactéria, confirmando o diagnóstico, embora não se tenham detectado mórulas nos esfregaços sanguíneos ou na citologia aspirativa com agulha fina de baço dos cães do grupo I.

A identificação de mórulas de *E. canis* em sangue periférico (LAPPIN, 2006; NEER & HARRUS, 2006; FARIA et al., 2010) ou em aspirado esplênico (FARIA et al., 2011) é uma forma de diagnóstico definitivo da erliquiose monocítica canina. FARIA et al. (2010) encontraram 42,9% a mais de mórulas em aspirados esplênicos em comparação à pesquisa em papa de leucócitos de cães naturalmente infectados por *E. canis*, provenientes da rotina clínica do mesmo HV. MUNHOZ et al. (2009) encontraram mórulas em esfregaços sanguíneos de três dos cinco cães infectados experimentalmente por *E. canis*. Em outro estudo sobre erliquiose monocítica canina de ocorrência natural, mórulas de *E. canis* foram identificadas no sangue periférico de 80,9% dos cães diagnosticados com a doença (BORIN et al., 2009). Estes dados diferem do que foi observado no estudo em tela e nos de HARRUS et al. (2004), já que em nenhum destes foram evidenciadas mórulas em sangue periférico ou em aspirado esplênico. Embora a presença de mórulas confirme a parasitemia e sugira a ocorrência da fase aguda da erliquiose, este quesito não foi um fator de inclusão dos cães neste estudo, já que há divergência sobre o tema na literatura.

As mais frequentes comorbidades vistas em cães atendidos no HV onde se desenvolveu este estudo foram pesquisadas (Tabela 2). A ausência de reatividade indica que esses agentes infecciosos não interferiram na patogenia da erliquiose, uma vez que estas doenças também são capazes de provocar alterações clínicas nos animais e na concentração das proteínas de fase aguda (ECKERSALL, 2000; ECKERSALL, 2006). Mais especificamente, na infecção por *Babesia canis*, alterações do cortisol podem ocorrer em cães parasitados, como mostraram SCHOEMAN & HERRTAGE (2007).

Foi similarmente importante que o grupo II fosse composto por cães hígidos, soronegativos para *E. canis*, *B. canis* e *Leptospira* spp., e apresentassem nPCR e PCR negativas para *E. canis* e *B. canis*, respectivamente, o que permitiu uma comparação mais segura entre os grupos, já que todos os animais deste experimento eram advindos da rotina clínica hospitalar.

Tabela 2- Títulos de anticorpos anti-*Ehrlichia canis*, anti-*Babesia canis* e anti-*Leptospira* spp. e resultados de nPCR para *E. canis*, de PCR para *B. canis* de cães naturalmente infectados por *E. canis* (grupo I). Jaboticabal, 2012.

Cão número	Títulos de anticorpos anti- <i>E. canis</i>	Títulos de anticorpos anti- <i>B. canis</i>	Títulos de anticorpos anti- <i>Leptospira</i> spp.	nPCR <i>E. canis</i>	PCR <i>B. canis</i>
1	1:640	-	-	+	-
2	1:320	-	-	+	-
3	1:640	-	-	+	-
4	1:640	-	-	+	-
5	1:320	-	-	+	-
6	1:320	-	-	+	-
7	1:640	-	-	+	-
8	1:640	-	-	+	-
9	1:640	-	-	+	-
10	1:640	-	-	+	-
11	1:320	-	-	+	-
12	1:160	-	-	+	-
13	1:320	-	-	+	-
14	1:640	-	-	+	-
15	1:160	-	-	+	-
16	1:320	-	-	+	-
17	1:640	-	-	+	-
18	1:320	-	-	+	-
19	1:640	-	-	+	-
20	1:640	-	-	+	-
21	1:320	-	-	+	-
Média	1:472,3	—	—	—	—

+ positivo; - negativo.

4.3 Resultados das dosagens de cortisol e DHEA-S mediante o teste de estimulação com ACTH

Não houve diferença dos valores de cortisol entre os momentos pré e pós-ACTH entre os grupos, embora as concentrações deste hormônio fossem menores em ambos os momentos no grupo I em relação ao grupo II. Ainda, as concentrações do cortisol pré e pós-ACTH diferiram nos grupos I e II, de modo que os valores do hormônio em ambos os grupos foram menores no momento pré-ACTH, em comparação ao pós-ACTH, mostrando que mesmo sob condições de doença, no caso a erliquiose monocítica canina, o eixo hipófise-adrenal se mantém responsivo.

Quanto ao DHEA-S, não houve diferença significativa na quantificação deste hormônio nos momentos pré e pós-ACTH nos grupo I e II, mas esta foi significativa nos momentos pré-ACTH e pós-ACTH entre os dois grupos. Ademais, quando se comparam os valores deste hormônio entre os grupos, observam-se concentrações maiores no grupo I, tanto no momento pré quanto no pós-ACTH. Os valores obtidos das dosagens de cortisol e de DHEA-S pré e pós-ACTH estão apresentados na Tabela 3 e representados na Figura 6.

Neste estudo, os valores de referência de cortisol foram aqueles adotados pelo laboratório privado que realizou as dosagens (Anexo A). Empregando-se esses valores como base, foi visto que um dos cães doentes apresentou o cortisol basal aquém do valor mínimo de referência (4,2 ng/mL), e outro o cortisol pós-ACTH ligeiramente acima do limite máximo (221,4 ng/mL). Já entre os cães do grupo controle, dois apresentaram o cortisol basal (65,6 ng/mL e 100,7 ng/mL) e dois o cortisol pós-ACTH (227,7 ng/mL e 242,1 ng/mL) acima da referência máxima.

Os valores basais de cortisol não são úteis na avaliação adrenocortical, quando usados isoladamente, uma vez que sofrem variação durante o dia, até mesmo em repouso, por estresse, no manejo hospitalar e no estado de doença (BUSH, 2004; GILOR & GRAVES, 2011). Portanto, não julgamos estas variações verificadas no cortisol basal dos cães doentes e saudáveis como um fator relevante para sua condição clínica. As concentrações de cortisol pós-ACTH, que se mostraram mais elevadas que a

média, não foram muito além do limite máximo para a espécie. Estas podem ser alterações individuais e não indicam hipercortisolismo natural, ou alterações devido à infecção por *E. canis*.

A interpretação da resposta do cortisol ao teste de estimulação com ACTH foi baseada no critério adotado por HOLFORD et al. (2008). Estes pesquisadores consideraram como resposta ideal a elevação do cortisol pós-ACTH acima de 50% do valor pré-ACTH. De acordo com este critério, todos os cães utilizados neste estudo, de ambos os grupos, demonstraram resposta adequada ao teste de estimulação com ACTH no que concerne ao cortisol. Esse fato também foi observado quando analisamos os valores de delta cortisol, que constitui a diferença das concentrações de cortisol pós-ACTH e basal e representa um parâmetro de avaliação da reserva adrenocortical (SCHOEMAN & HERRTAGE, 2008). Neste estudo, não houve diferença significativa entre os valores de delta cortisol entre os grupos avaliados (Tabela 4 e Figura 7). A análise conjunta destes resultados sugere que os cães com erliquiose natural mantêm a capacidade de secretar cortisol em concentrações adequadas diante o estímulo do ACTH.

Tabela 3- Valores (média $\pm$ desvio padrão) de cortisol e DHEA-S e pré-ACTH e pós-ACTH nos grupo I e II. Jaboticabal, 2012.

Parâmetro	Grupo I (n=21)		Grupo II (n=10)	
	Pré-ACTH	Pós-ACTH	Pré-ACTH	Pós-ACTH
Cortisol (ng/mL)	28,78 $\pm$ 14,76 ^a	143,80 $\pm$ 43,42 ^b	38,52 $\pm$ 26,65 ^a	165,72 $\pm$ 48,18 ^b
DHEA-S (μg/mL)	0,064 $\pm$ 0,052 ^a	0,071 $\pm$ 0,066 ^a	0,021 $\pm$ 0,028 ^b	0,023 $\pm$ 0,030 ^b

Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$, Teste de Tukey-Kramer).

Tabela 4- Valores (média $\pm$ desvio padrão) de delta cortisol nos grupo I e II. Jaboticabal, 2012.

Delta cortisol	Grupo I (n=21)	Grupo II (n=10)
(ng/mL)	115,02 $\pm$ 38,77 ^a	127,2 $\pm$ 42,66 ^a

Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$, Teste T Student).

A concentração do hormônio DHEA-S neste estudo não mostrou variação entre os momentos pré e pós-ACTH em ambos os grupos, o que sugere que a resposta ao estímulo hormonal não foi detectada uma hora após a administração do ACTH. O mesmo foi observado por FRANK et al. (2003), em caninos machos não-castrados submetidos ao mesmo teste hormonal. Uma possível explicação foi apontada por KROBOTH et al. (1999), em estudos médicos. Esses pesquisadores sugerem que maiores quantidades de DHEA-S são secretadas em pulsos. Isto difere do cortisol, que é secretado em pequenas quantidades, conforme a necessidade frente a um estímulo (ENGELKING, 2010). Também é possível que a concentração de DHEA-S pós-ACTH em cães seja atingida em tempo menor ou maior que os 60 minutos do teste de estimulação com ACTH. No entanto, isto difere do que se tem encontrado em estudos com humanos (FISCHLI et al., 2008), e com esquilos (BOONSTRA et al., 2008), nos quais o DHEA-S se mostrou responsivo ao estímulo com ACTH, uma hora após sua administração.

Além disto, o comportamento do DHEA-S varia sensivelmente frente a diferentes doenças. Em humanos com hipercortisolismo natural, o DHEA-S apresentou concentração dentro do normal, enquanto que em pacientes com insuficiência cardíaca crônica e com outras doenças críticas, tais como queimaduras severas, houve aumento do cortisol e redução do DHEA-S (KROBOTH et al., 1999). Segundo LEAL et al. (2003), esta dissociação entre o cortisol e o DHEA-S é mais observada em doenças crônicas, embora os mecanismos não sejam bem esclarecidos. Sugere-se que, nestes quadros

crônicos, há prioridade na síntese de cortisol e a consequente redução da secreção dos andrógenos sexuais adrenais (WADE et al., 1988).

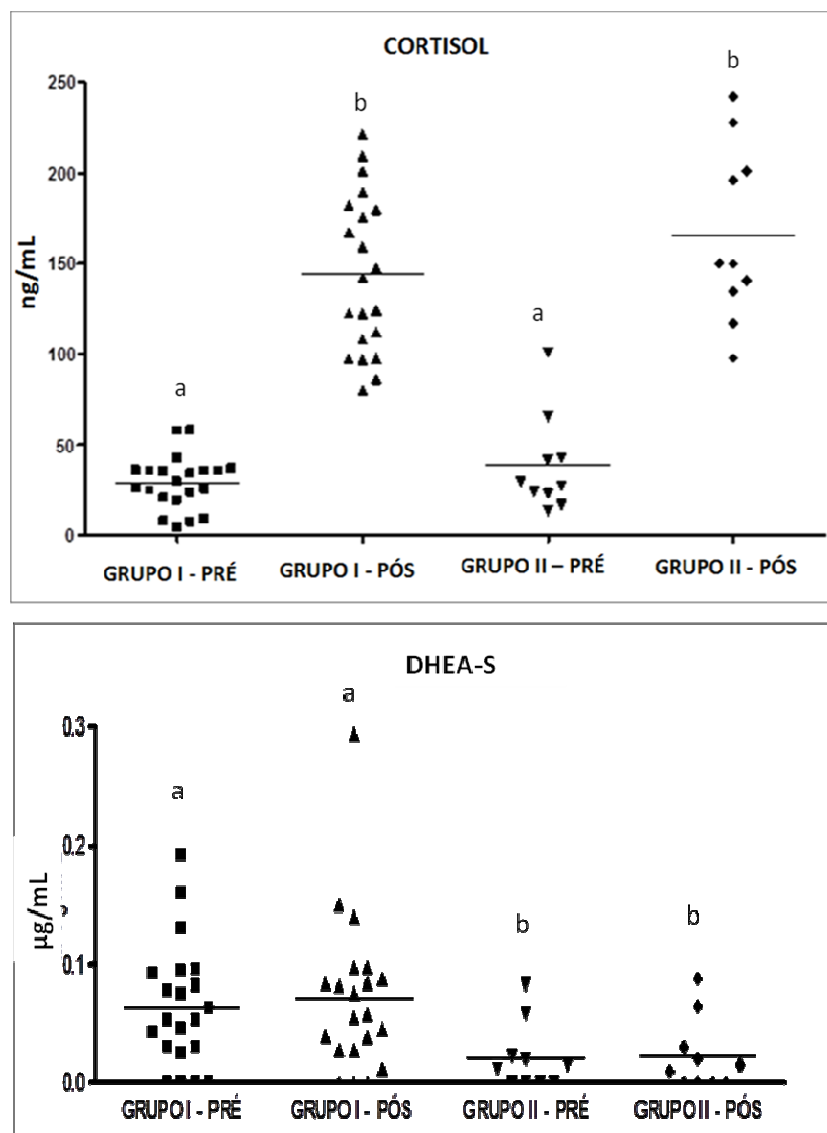


Figura 6- Representação gráfica *point plot* dos valores de cortisol e DHEA-S pré-ACTH e pós-ACTH dos grupos I e II. A barra horizontal representa a média. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2012.

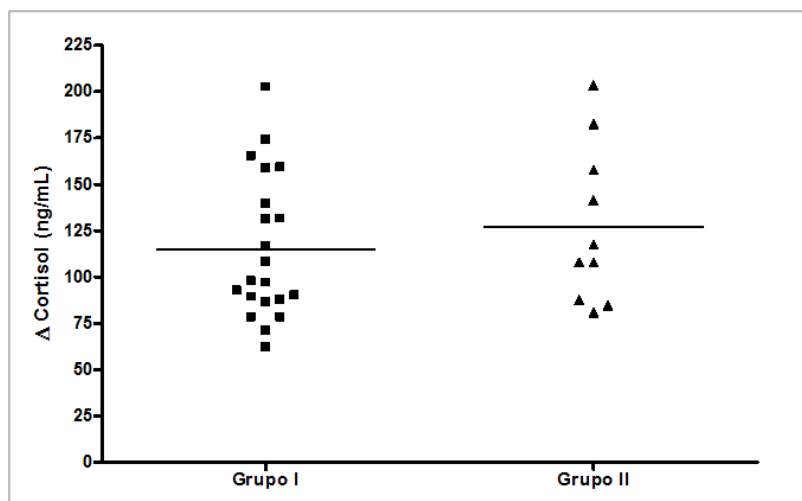


Figura 7- Representação gráfica *point plot* dos valores de delta cortisol dos grupos I e II. A barra horizontal representa a média. Jaboticabal, 2012.

O curso clínico da erliquiose monocítica canina pode ser dividido, sequencialmente, nas fases aguda, subclínica e crônica (HARRUS et al., 2004; LAPPIN, 2006; MYLONAKIS et al., 2011), de modo que a evolução da doença se deve aos mecanismos de escape que o parasita utiliza para se evadir das reações do sistema imune do hospedeiro (LAPPIN, 2006). Conforme a doença avança, a debilidade orgânica é notada, o que faz da erliquiose uma enfermidade catabólica e estressante (VARSHNEY et al., 2003). Neste estudo, foram incluídos cães com erliquiose naturalmente adquirida, o que não permite o julgamento adequado das fases evolutivas, que são melhor distinguidas na doença experimentalmente induzida (HARRUS et al., 2004; MYLONAKIS et al., 2011). Entretanto, nenhum animal com evidências de mielossupressão foi incluído neste estudo, o que sugere, de acordo com os sinais clínicos manifestados (Anexo B), que os cães estavam na fase aguda ou subclínica da doença. Assim, as concentrações aumentadas de DHEA-S no grupo I ilustram o estresse envolvido na erliquiose monocítica canina naturalmente adquirida, pois, uma vez que o estresse é capaz de alterar as concentrações de DHEA-S, qualquer estado

de doença que provoque estresse significativo pode, então, modificar as concentrações deste hormônio (KROBOTH et al., 1999). Neste sentido, é possível que se novas avaliações tivessem sido feitas após o tratamento prescrito para os cães do grupo I, as concentrações de DHEA-S reduzissem próximo às encontradas para o grupo II.

4.4 Resultados das dosagens de proteína C reativa e da haptoglobina antes e após a estimulação com ACTH

As concentrações de proteína C reativa não diferiram nos momentos pré e pós-ACTH nos grupos, mas houve diferença significativa entre os grupos, verificando-se valores maiores desta proteína de fase aguda nos cães do grupo I. Comportamento semelhante foi observado quanto à haptoglobina, que também estava mais elevada nos cães do grupo I em relação ao grupo II, sem haver, todavia, diferença significativa entre os momentos pré e pós-ACTH nos grupos. Os valores de proteína C reativa e haptoglobina pré e pós-ACTH estão apresentados na Tabela 5 e na Figura 8.

Tabela 5- Valores (média $\pm$ desvio padrão) de proteína C reativa e haptoglobina pré-ACTH e pós-ACTH nos grupo I e II. Jaboticabal, 2012.

Parâmetro	Grupo I (n=21)		Grupo II (n=10)	
	Pré-ACTH	Pós-ACTH	Pré-ACTH	Pós-ACTH
Proteína C				
reativa (ng/mL)	75,473 $\pm$ 66,950 ^a	78,250 $\pm$ 66,522 ^a	13,456 $\pm$ 20,485 ^b	21,056 $\pm$ 42,960 ^b
Haptoglobina (mg/mL)	1,78 $\pm$ 1,04 ^a	1,81 $\pm$ 1,04 ^a	1,16 $\pm$ 0,623 ^b	1,40 $\pm$ 1,028 ^b

Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$, Teste de Tukey-Kramer).

Como esperado e descrito na literatura (RIKIHISA et al., 1994; MUNHOZ et al., 2009; MYLONAKIS et al., 2011), as proteínas de fase aguda mostraram concentrações maiores no grupo I. Em um estudo do nosso grupo de pesquisa MUNHOZ et al. (2009), demonstraram que a proteína C reativa atingiu sua concentração máxima 18 dias após a infecção experimental de cães com a amostra *E. canis* de Jaboticabal (*Gene Bank* nºDQ401044), e esta elevação perdurou até o trigésimo dia pós-infecção, quando teve início o tratamento dos cães, reduzindo, então, as concentrações dessa PFA. Ademais, nesse mesmo estudo, o aumento na concentração sérica da proteína C reativa 18 dias após a infecção experimental precedeu o aparecimento dos sinais clínicos dos cães, o que levou os autores a sugerir que a proteína C reativa poderia ser um marcador da fase aguda da erliquiose. Da mesma forma, a haptoglobina também mostrou maior concentração no dia 18 pós-infecção experimental, diferindo do grupo controle (MUNHOZ, 2009).

MYLONAKIS et al. (2011) também detectaram aumento da proteína C reativa e da haptoglobina em cães com erliquiose de ocorrência natural, condizente com o que foi observado em nosso estudo. Esses autores avaliaram estas PFAs em cães com mielossupressão decorrente da erliquiose e em cães com a doença, porém sem complicações medulares, e notaram que estas proteínas estavam em maior concentração no estado de mielossupressão. Para os autores, isso sugere que a proteína C reativa e a haptoglobina também são expressas nas demais fases da erliquiose, e não somente na fase aguda; ainda, que as PFAs são ferramentas importantes para avaliar a gravidade da erliquiose monocítica canina, quando utilizada em conjunto com outros testes clínico-patológicos. Assim como no estudo de MYLONAKIS et al. (2011), a elevação das proteínas de fase aguda nos cães com erliquiose em nosso estudo representa a capacidade do parasita em promover inflamação em seu hospedeiro.

O aumento das PFAs na erliquiose pode, ainda, estar relacionado à produção de citocinas que induzem a síntese hepática destas proteínas, tais como as interleucinas IL-1 β e IL-8 (TAJIMA & RIKIHISA, 2005; UNVER et al., 2006) e o TNF- α (FARIA et al., 2011). Esses últimos autores ressaltam a participação do TNF- α na patogenia da

erliquiose, como reflexo da disfunção do sistema imune provocada pelo parasita no hospedeiro.

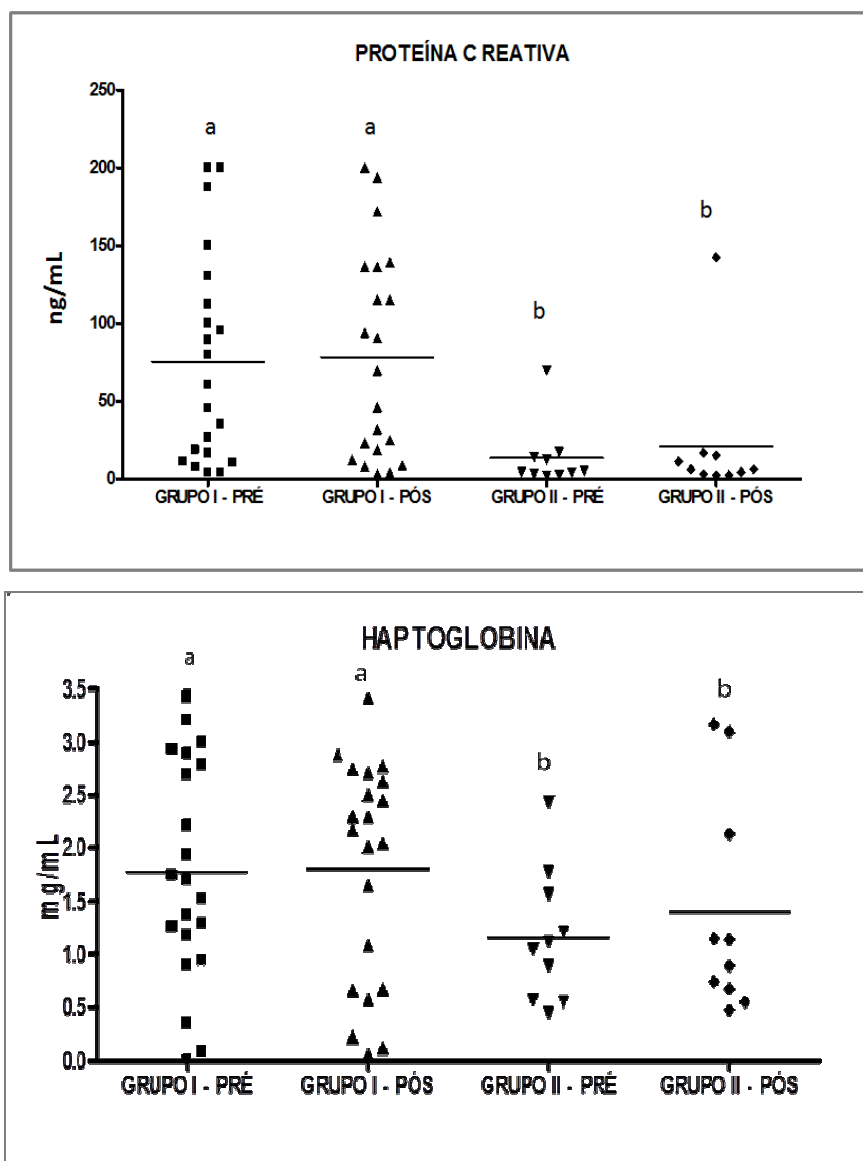


Figura 8- Representação gráfica *point plot* dos valores de proteína C reativa e haptoglobina pré-ACTH e pós-ACTH dos grupos I e II. A barra horizontal representa a média. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2012.

As concentrações das proteínas de fase aguda não variaram estatisticamente com a estimulação do ACTH. O teste de estimulação não resultou em aumento significativo dos valores das proteínas de fase aguda em questão, mesmo quando houve aumento do cortisol pós-ACTH em relação ao basal. CORAZZA (1997) comenta que a concentração sérica da haptoglobina é particularmente sensível ao aumento do cortisol sérico. Por sua vez, ECKERSALL (2010) observou que a síntese destas proteínas ocorre rapidamente, entretanto, são necessárias horas ou alguns dias para que sua concentração aumente diante de um estímulo. Assim, como o teste de estimulação com ACTH teve curta duração e pouco estresse envolvido, pode ter sido incapaz de mobilizar e estimular a produção destas proteínas. Embora não se tenham encontrado estudos que dosaram essas PFAs pós-ACTH em tempos maiores ou menores que uma hora pós-estimulação, não se pode desconsiderar que nesses outros tempos elas pudessem ter sofrido influência do hormônio.

4.5 Correlações entre as variáveis endócrinas e as proteínas de fase aguda

O cortisol, o DHEA-S e as PFAs tiveram suas correlações avaliadas pelo teste de Pearson entre os momentos pré e pós-ACTH em ambos os grupos. Não houve correlação significativa entre o cortisol e as PFAs e nem entre o DHEA-S e as PFAs em ambos os momentos no grupo I. Entretanto, houve correlação positiva entre o DHEA-S e a proteína C reativa pré-ACTH no grupo II ($r^2=0,7294$; $p=0,0017$) e entre as mesmas variáveis no momento pós-ACTH, também no grupo II ($r^2=0,6306$; $p=0,0061$) (Figura 9).

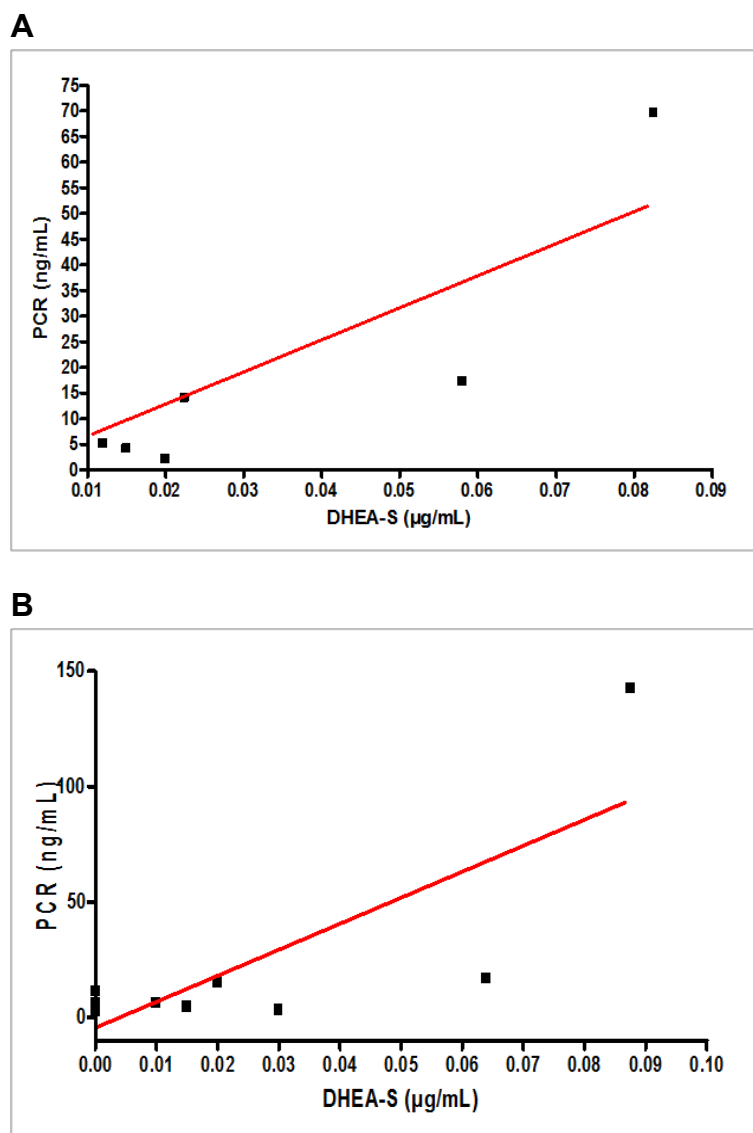


Figura 9- Representação gráfica demonstrando a correlação positiva do DHEA-S e da proteína C reativa (PCR) pré-ACTH (A) e do DHEA-S e da proteína C reativa (PCR) pós-ACTH (B) no grupo II. Jaboticabal, 2012.

As correlações positivas entre o hormônio DHEA-S e a proteína C reativa nos cães saudáveis aponta que, em condições de higidez, ambos se espelham, mas esta correlação não se mantém em momentos de doença, ao menos na erliquiose

monocítica canina. Isto difere de alguns estudos médicos, a exemplo do estudo de COUTINHO et al. (2007), em que o DHEA-S e a proteína C reativa demonstraram correlação inversa em humanos acometidos por intenso parasitismo intestinal. Diante deste resultado, pode-se inferir que a erliquiose em cães desequilibra mecanismos homeostáticos do organismo. Todavia, as limitações deste experimento, em relação ao número de cães saudáveis e doentes, não permitem extrair conclusões acerca desses resultados. Ademais, literatura pertinente para embasar estes achados não foi encontrada.

5 CONCLUSÕES

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

- A erliquiose monocítica canina de ocorrência natural é uma doença que causa estresse orgânico e interfere no eixo hipotálamo-hipófise-adrenocortical;
- Cães com erliquiose monocítica naturalmente adquirida mantêm a capacidade de secretar cortisol em concentrações adequadas diante o estímulo do ACTH;
- A erliquiose monocítica canina de ocorrência natural promove estresse evidenciado pelo aumento do DHEA-S nos cães doentes;
- A erliquiose monocítica canina de ocorrência natural induz a elevação da concentração das proteínas de fase aguda, o que sinaliza o comprometimento inflamatório do organismo durante a doença;
- Aparentemente, o DHEA-S e a proteína C reativa se correlacionam positivamente em cães saudáveis e essa correlação é perdida na erliquiose monocítica canina de ocorrência natural;
- As concentrações de DHEA-S e das proteínas de fase aguda não se alteraram uma hora após a estimulação com ACTH.

6 REFERÊNCIAS*

BOONSTRA, R. et al. Plasm DHEA levels in wild, territorial red squirrels: Seasonal variation and effect of ACTH. **General and Comparative Endocrinology**, v. 158, p. 61-67, 2008.

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

BUCKINGHAM, J.C., SMITH, T., LOXLEY, H.D. The control of ACTH secretion. In:___ JAMES V.H.T. **The Adrenal Gland**. 2.ed. New York: Raven Press, Ltda., 1992. p. 131-138.

BUHIMSCHI, C.S. et al. Fetal adrenal gland volume and cortisol/dehydroepiandrosterone sulfate ratio in inflammation-associated preterm birth. **Obstetrics & Gynecology**, v. 111, n. 3, p. 715-722, 2008.

BULLA, C. et al. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Veterinary Research**, v. 35, n. 1, p. 141 - 146, 2004.

BURKITT, J.M. et al. Relative adrenal insufficiency in dogs with sepsis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 2, p. 226-231, 2007.

BUSH, B.M. Hormônios. In:___ **Interpretação de Resultados Laboratoriais para Clínicos de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, 2004. p. 290-308.

*ABNT – NR 6023:2002

CARRET, C. et al. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 46, p. 298–303, 1999.

CASTRO, M. B. et al. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Veterinary Parasitology**, v. 119, n. 1, p. 73-86, 2004.

CORAZZA, M. et al. Dati preliminari sulla determinazione dell'aptoglobinemia in cani sani ed affetti da patologie in fase acuta e cronica. **Annali della Faculta di Medicina Veterinaria de Pisa**, v.L, p. 241-249, 1997.

COSTA, J.O. et al. *Ehrlichia canis* infection in dog in Belo Horizonte-Brazil. **Arquivos da Escola Superior de Veterinária da UFMG**, Belo Horizonte, v. 25, n. 2, p.199-200,1973.

COUTINHO, H.M. et al. Higher Serum Concentrations of DHEAS Predict Improved Nutritional Status in Helminth-Infected Children, Adolescents, and Young Adults in Leyte, the Philippines. **The Journal of Nutrition**, v. 137, p. 433–439, 2007.

DAGNONE, A.S. et al. Molecular diagnosis of Anaplasmatidae organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 4, p. 20 – 25, 2009.

DONATIEN, A.; LESTOQUARD, F. Existence en Algérie d'une *Rickettsia* du chien. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v. 28, p. 418–419, 1935.

ECKERSALL, P.D. Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. **Revue de Medecine Veterinaire**, v. 151, n. 7, p. 577-584, 2000.

ECKERSALL, P.D. **Acute phase proteins as biomarkers of disease in companion and laboratory animals**. American College of Veterinary Pathologists and American Society for Veterinary Clinical Pathology. Tucson. 2006. Disponível em: www.ivis.org. Acesso em <20 de maio de 2010>

ENGELKING, L.R. Hormônio adrenocorticotrófico e glicocorticóides. In: ____ ENGELKING, L.R. **Fisiologia Endócrina e Metabólica em Medicina Veterinária**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2010. p. 72-79.

FARIA, J.L.M. et al. *Ehrlichia canis* morulae and DNA detection in whole blood and spleen aspiration samples. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 2, p. 98-102, 2010.

FARIA, J.L.M. et al. *Ehrlichia canis* (Jaboticabal strain) induces the expression of TNF- α in leukocytes and splenocytes of experimentally infected dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 71-74, 2011.

FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. Canine Hyperadrenocorticism (Cushing's Syndrome) In: ____ **Canine and Feline Endocrinology and Reproduction**, 3.ed., St. Louis: Saunders, 2004. p. 252-357.

FISCHLI, S. et al. Dehydroepiandrosterone Sulfate in the Assessment of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 93, p. 539-542, 2008.

FRANK, L.A. et al. Cortisol concentrations following stimulation of healthy and adrenopathic dogs with two doses of tetracosactrin. **Journal of Small Animal Practice**, v. 41, p. 308-311, 2000.

FRANK, L.A. et al. Steroid hormone concentrations profiles in healthy intact and neutered dogs before and after cosyntropin administration. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 24, p. 43-57, 2003.

FRANK, L.A.; DAVIS, J.A.; OLIVER, J.W. Serum concentrations of cortisol, sex hormones of adrenal origin, and adrenocortical steroid intermediates in healthy dogs following stimulation with two doses of cosyntropin. **American Journal of Veterinary Research**, v.65, n. 12, p. 1631-1633, 2004.

FURUTA, P. I. et al. Comparison between a soluble antigen-based ELISA and IFATT in detecting antibodies against *Babesia canis* in dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 3, p. 41 – 45, 2009.

GARCIA-LEME, J. Principles of hormone action. In: ____ GARCIA-LEME, J. **Hormones and Inflammation**. CRC Press, 1989. p. 1-31.

GILOR, C.; GRAVES, T.K. Interpretation of laboratory tests for canine Cushing's Syndrome. **Topics in Companions Animal Medicine**, v. 26, p. 98-108, 2011.

HARRUS, S. et al. Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 66, p. 241-249, 1996.

HARRUS, S. et al. Amplification of Ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 73-76, 1998.

HARRUS, S. et al. Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment of experimental *Ehrlichia canis* infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 11, p. 4488-4490, 2004.

HARVEY, J.W.; WEST, C.L. Prednisolone-induced increases in serum alpha-2-globulin and haptoglobin concentration in dogs. **Veterinary Pathology**, v. 24, p. 90-92, 1987.

HERMAN, W.A. et al. Assessment of selected serum inflammatory markers of acute phase response and their correlations with adrenal androgens and metabolic syndrome in a population of men over the age of 40. **Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej**, v. 119, p. 704-710, 2009.

HERRTAGE, M.E. Hiperadrenocorticism canino. In: ____ MOONEY, C.T.; PETERSON, M.E. **Manual de Endocrinologia Canina e Felina**. 3.ed. São Paulo: Roca, 2009. p. 181-206.

HOLFORD, A.L. et al., Adrenal response to adrenocorticotrophic hormone in dogs before and after surgical attenuation of a single congenital portosystemic shunt. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, p. 832-838, 2008.

JAIN, N.C. Acute phase proteins. In: ____ KIRK, R.W. **Current veterinary therapy X: small animal practice**. Philadelphia: Saunders, 1989. p. 468-471.

KASS, E.H.; FINLAND, M. Adrenocortical hormones in infection and immunity. **Annual Review of Microbiology**, v. 7, p. 361-388, 1953.

KOGIKA, M. et al. Determinação sérica de haptoglobina, ceruloplasmina e glicoproteína ácida em cães com gastrenterite hemorrágica. **Ciência Rural**, v. 33, n. 3, p. 513-517, 2003.

KROBOTH, P.D. et al. DHEA and DHEA-S: a review. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 39, p. 327-348, 1999.

KUMAR, A., VARSHNEY, J.P., VARSHNEY, V.P. Endocrine dysfunction in chronic severe Ehrlichiosis with or without Babesiosis in dogs. **Veterinary Research Communication**, v. 30, p. 911-916, 2006.

LAPPIN, M. R. Erliquiose Canina. In: ____ NELSON, R.; COUTO, G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p.1229 – 1232.

LEAL, A.M.O. et al. Adrenocortical Hormones and Interleukin Patterns in Paracoccidioidomycosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 187, p. 124-127, 2003.

MARTINEZ-SUBIELA, S., GINEL, P.J., CERON, J.J. Effects of different glucocorticoid treatments on serum acute phase proteins in dogs. **Veterinary Record**, v. 154, p. 814-817, 2004.

McCLURE, J.C. et al. Efficacy of a doxycycline treatment regimen initiated during three different phases of experimental ehrlichiosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 5012-5020, 2010.

McGROTTY, Y.L. et al. Haptoglobin concentrations in dogs undergoing trilostane treatment for hyperadrenocorticism. **Veterinary Clinical Pathology Journal**, v. 34, p. 255-258, 2005.

MITCHELL, J.B. et al. Effect of exercise, heat stress and hydration on immune cell number and function. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 34, p. 1941-1950, 2002.

MOREIRA, S.M. et al. Retrospective study (1998-2001) on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, MG, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 2, p.141-147, 2003.

MORGAN, C.A. et al. Relationships among plasma dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate, cortisol, symptoms of dissociation, and objective performance in humans exposed to underwater navigation stress. **Biological Psychiatry**, p. 1-7, 2009.

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

MUNHOZ, T.D. et al. Mensuração da proteína C-reativa na infecção experimental por *Ehrlichia canis* (Amostra Jaboticabal) e após o tratamento com cloridrato de doxiciclina em cães. **Veterinária Notícias**, v. 15, n. 2, p. 65-79, 2009.

MYLONAKIS, M.E. et al. Serum acute phase proteins as clinical phase indicators and outcome predictors in naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25. p. 811-817, 2011.

NAKAGHI, A. C. H. et al. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p. 766-770, 2008.

NAKAGHI, A. C. H. et al. Sensitivity evaluation of a single-step PCR assay using *Ehrlichia canis* p28 gene as a target and its application in diagnosis of canine ehrlichiosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 2, p. 75 – 79, 2010.

NEER, T. M.; HARRUS, S. Canine Monocytotropic Ehrlichiosis and Neorickettiosis (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ruminatum*, *N. sennetsu*, and *N. risticii* Infections). In: ____ GREENE, C. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. Philadelphia: Saunders Company, 2006. p. 203 – 216.

OLIVEIRA, D. et al. Anti-*Ehrlichia canis* antibodies detection by “Dot-ELISA” in naturally infected dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 9, n. 1, p. 1-5, 2000.

PARKER LN; ODELL WD. Control of adrenal androgen secretion. **Endocrine Review**, v. 1, p. 392- 410, 1980.

RABIN, D.; McKENNA, T.J. Adrenal Sex Hormones: Physiology and Pathology. In: ____ RABIN, D.; McKENNA, T.J. **Clinical Endocrinology and Metabolism: principles and practice**. Grune & Stratton Inc, 1982. p. 479-483.

RAI, R., COHEN, J., VENKATECH, B. Assessment of adrenocortical function in the critically ill. **Critical Care and Resuscitation**, v. 6, p. 123-129, 2004.

RIJNBERK, A.; MOL, J.A. Adrenocortical function. In: ____ KANEKO, J.J. et al.. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5.ed. San Diego, 1997. p. 553-570.

RIKIHISA, Y. et al. C-reactive protein and α 1- acid glycoprotein levels in dogs infected with *Ehrlichia canis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 912-917, 1994.

SAINZ, A. et al. Prospective comparative study of 3 treatment protocols using doxycycline or imidocarb dipropionate in dogs with naturally occurring ehrlichiosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 14, p. 134-139, 2000.

SCHOEMAN, J.P.; HERRTAGE, M.E. The response of the pituitary-adrenal and pituitary-thyroidal axes to the plasma glucose perturbations in *Babesia canis rossi* babesiosis. **Journal of the South African Veterinary Association**. v. 78, n. 4, p. 215-220, 2007.

SCHOEMAN, J.P.; HERRTAGE, M.E. Adrenal response to low dose ACTH stimulation test and the cortisol-to-adrenocorticotrophic hormone ratio in canine babesiosis. **Veterinary Parasitology**. v. 154, p. 205-213, 2008.

SCOTT-MONCRIEFF, C. **Role of sex hormones in diagnosis of adrenal dysfunction**. North American Veterinary Conference. Orlando. 2007. Disponível em: www.ivis.org.<Acesso em 22 junho 2010>

SOUSA, M.G. et al. Tratamento da erliquiose canina de ocorrência natural com doxiciclina, precedida ou não pelo Dipropionato de Imidocarb. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 3, n. 2, p. 126-130, 2004.

SPINOSA, E.de S. Antibióticos: Tetraciclina, Cloranfenicol e Análogos. In: ____ SPINOSA, E.de S., GORNIÁK, S.L., BERNARDI, M.M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 420-424.

TAJIMA, H., RIKIHISA, Y. Cytokine responses in dogs infected with *Ehrlichia canis* Oklahoma strain. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1063, p. 429-432, 2005.

UNVER, A.; HUANG, H.; RIKIHISA, Y. Cytokine gene expression by peripheral blood leukocytes in dogs experimentally infected with a new virulent strain of *Ehrlichia canis*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 482-486, 2006.

VARSHNEY, J.P.; VARSHNEY, V.P. Effect of non-thyroidal illness on thyroid hormones in dogs. **Journal of Remount Veterinary Corps**, v. 38. p. 1-5, 1999.

VARSHNEY, J.P.; VARSHNEY, V.P.; HOQUE, M. Clinico-haematological, biochemical, endocrinological and ultrasonographic findings in canine babesiosis. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 13, p. 1099-1101, 2003.

WADE, C.E. et al. Upon- admission adrenal steroidogenesis is adapted to the degree of illness in intensive care unit patients. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 67, p. 223- 227, 1988.

YAMAMOTO, S. et al. Changes in serum C-reactive protein levels in dogs with various disorders and surgical traumas. **Veterinary Research Communication**, v. 17, p. 85-93, 1993.

YAMAMOTO, S. et al. Serum C-reactive protein and immune-responses in dogs inoculated with *Bordetella bronchiseptica* (Phase-I cells). **Veterinary Research Communication**, v. 18, p. 347-357, 1994.

ANEXOS

ANEXO A – Valores de referência dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e de cortisol pré e pós-ACTH para a espécie canina.

Hemácias*	5.500.000 – 8.500.000/ μ L
Hemoglobina*	12 – 18 g/dL
Hematócrito*	37 – 55%
Leucócitos*	6.000 – 18.000/ μ L
Plaquetas*	180.000 – 400.000/ μ L
Albumina*	2,6 – 4,0 g/dL
Cortisol pré-ACTH⁺	5 – 60 ng/mL
Cortisol pós-ACTH⁺	60 – 170 ng/mL Limite: 170 – 220 ng/mL

* Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp/Jaboticabal.

⁺ BET Laboratories, Rio de Janeiro – RJ – Brasil

ANEXO B- Anormalidades clínicas e clínico-patológicas de cães infectados naturalmente por *E. canis* (grupo I). Jaboticabal, 2012.

Anormalidade clínica	Número de cães	Porcentagem
Apatia	7/21	33,33%
ECC < 5	10/21	47,62%
ECC = 5	6/21	28,57%
ECC > 5	5/21	23,81%
Emaciação	5/21	23,81%
Êmese/diarréia	4/21	19,05%
Esplenomegalia	17/21	80,95%
Febre	3/21	14,29%
Hematúria	1/21	4,76%
Hiperalgesia	1/21	4,76%
Hiporexia/anorexia	9/21	42,86%
Ixodidiose	16/21	76,19%
Linfadenomegalia	3/21	14,29%
Mucosas hipocoradas	7/21	33,33%
Oligodipsia	1/21	4,76%
Tendências hemorrágicas	2/21	9,52%
Uveíte	4/21	19,05%
Anormalidade clínico -patológica		
Anemia	9/21	42,85%
Leucopenia	11/21	52%
Trombocitopenia	21/21	100%
Hipoproteinemia	3/21	14,28%
Hiperproteinemia	9/21	42,85%
Hipoalbuminemia	16/21	76%
Hiperglobulinemia	14/21	66,66%

ECC – escore de condição corporal (< 5 magro; = 5 normal; > 5 sobrepeso/obeso)

ANEXO C1- Valores de hemácias, hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), leucócitos, plaquetas e albumina de cães naturalmente infectados por *E. canis* (grupo I). Jaboticabal, 2012.

Cão número	Hemácias/ µL	Hb (g/dL)	Ht (%)	Leucócitos/ µL	Plaquetas / µL	Albumina g/dL
1	4.430.000	10,2	31,6	6.400	64.000	1,3
2	5.090.000	11,8	37	4.700	50.000	1,3
3	7.260.000	14,3	47,2	9.600	63.000	1,86
4	5.860.000	12,6	40,7	4.400	72.000	2,88
5	4.170.000	9	28,6	5.700	107.000	1,93
6	5.940.000	13,1	40,9	4.600	128.000	1,56
7	8.070.000	15,5	51,5	3.500	127.000	1,5
8	4.480.000	9,1	30	5.000	125.000	1,74
9	4.400.000	9,9	31,1	4.900	114.000	2,01
10	4.370.000	9,4	28,7	2.600	64.000	2,45
11	9.350.000	19,5	62,8	6.600	87.000	2,4
12	7.140.000	14,6	47,2	8.400	121.000	3
13	7.890.000	16,6	55,1	8.100	98.000	2,91
14	6.500.000	14,6	45,1	16.700	87.000	3
15	6.100.000	12,9	42,2	12.250	79.000	2,4
16	5.530.000	11,8	38,1	7.600	97.000	2,15
17	5.930.000	11,7	38,4	3.430	80.000	1,38
18	4.360.000	9,5	29,1	4.400	43.000	1,7
19	5.260.000	11,6	36,7	4.300	77.000	2,6
20	7.600.000	16,1	51,5	9.200	95.000	2,3
21	3.620.000	9,4	27,9	16.200	88.000	2,48
Média	5.873.810	12,5	40,07	7.075	88.857	2,14

ANEXO C2- Valores de hemácias, hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), leucócitos, plaquetas e albumina de cães saudáveis (grupo II). Jaboticabal, 2012.

Cão número	Hemácias/ μL	Hb (g/dL)	Ht (%)	Leucócitos/ μL	Plaquetas/ μL	Albumina g/dL
1	8.050.000	19,1	58,4	7.500	283.000	2,68
2	7.990.000	18,2	57,6	9.100	341.000	3,51
3	7.240.000	15,7	50,4	9.100	232.000	3,52
4	8.120.000	18,4	60,2	15.100	568.000	3,4
5	6.760.000	16,8	51	13.400	244.000	2,7
6	6.560.000	16,8	48,7	11.000	240.000	2,6
7	7.210.000	16,9	50,2	12.000	298.000	2,51
8	5.470.000	13,3	38,7	16.300	393.000	2,4
9	6.290.000	14,4	45,8	10.300	272.000	2,49
10	6.770.000	15,4	50	10.200	212.000	3,48
Média	7.046.000	16,5	51,1	11.400	308.300	2,93

ANEXO D1- Valores de cortisol e DHEA-S séricos pré e pós-ACTH, e de delta cortisol de cães naturalmente infectados por *E. canis* (grupo I). Jaboticabal, 2012.

Cão número	Cortisol ng/mL			DHEA-S µg/mL	
	Pré	Pós	Delta cortisol	Pré	Pós
1	7,6	85,9	78,3	0,0525	0,0575
2	23,5	182	158,5	0,0625	0,075
3	25,6	112,2	86,6	0,095	0,0975
4	42,7	159,2	116,5	0,13	0,0975
5	34,2	142,3	108,1	0	0
6	36,8	124,3	87,5	0,03	0,045
7	7,3	97,4	90,1	0,0925	0,0875
8	8,8	79,7	70,9	0,0525	0,055
9	35,3	97,3	62	0,16	0,15
10	4,2	96,7	92,5	0,0425	0,04
11	20,3	179,4	159,1	0,0775	0,14
12	35,7	209,6	173,9	0,025	0,0275
13	57,8	188,8	131	0,0743	0,082
14	25,8	122,7	96,9	0,192	0,294
15	57,9	147,2	89,3	0,03	0,028
16	29,7	108	78,3	0,082	0,084
17	19	221,4	202,4	0,094	0,084
18	35,7	175,1	139,4	0	0
19	35,9	201,1	165,2	0	0
20	35,7	167	131,3	0	0,012
21	24,8	122,5	97,7	0,045	0,0384
Média	28,78	143,8	115,02	0,064	0,071

ANEXO D2- Valores de cortisol e DHEA-S séricos pré e pós-ACTH, e de delta cortisol de cães saudáveis (grupo II). Jaboticabal, 2012.

Cão número	Cortisol ng/mL			DHEA-S µg/mL	
	Pré	Pós	Delta cortisol	Pré	Pós
1	23,1	140,5	117,4	0,015	0,015
2	65,6	150,2	84,6	0,0825	0,0875
3	41,7	149,7	108	0,0225	0,02
4	16,7	97,5	80,8	0	0
5	27,1	135	107,9	0,012	0,01
6	13,3	196	182,7	0,02	0,03
7	29,6	117,5	87,9	0	0
8	43,1	201	157,9	0	0
9	100,7	242,1	141,4	0,058	0,064
10	24,3	227,7	203,4	0	0
Média	38,52	165,72	127,2	0,021	0,023

ANEXO E1- Valores de haptoglobina e proteína C reativa séricas pré e pós-ACTH de cães naturalmente infectados por *E. canis* (grupo I). Jaboticabal, 2012.

Cão número	Haptoglobina		Proteína C reativa	
	mg/mL		ng/mL	
	Pré	Pós	Pré	Pós
1	0,34	0,22	112,121	69,696
2	1,75	1,08	100	115,151
3	2,21	2,29	60,606	93,939
4	2,69	2,75	26,515	31,818
5	2,93	2,5	150	136,363
6	3	2,88	45,454	46,212
7	2,78	2,63	130,303	139,393
8	1,71	2,04	11,174	12,3106
9	0,09	0,12	187,5	136,363
10	0,89	0,66	89,393	115,151
11	1,18	2,17	3,8825	3,125
12	1,93	2,3	16,666	18,75
13	1,52	2,71	4,0719	3,892
14	3,43	2,77	18,75	23,046
15	2,89	2,45	7,812	8,789
16	3,21	3,42	200	200
17	1,29	0,57	95,312	171,875
18	0	0,06	200	193,75
19	1,37	2,01	35,15	25
20	1,26	1,65	10,546	8,007
21	0,94	0,67	79,687	90,625
Média	1,781	1,81	75,473	78,25

ANEXO E2- Valores de haptoglobina e proteína C reativa séricas pré e pós-ACTH de cães saudáveis (grupo II). Jaboticabal, 2012.

Cão número	Haptoglobina mg/mL		Proteína C reativa ng/mL	
	Pré	Pós	Pré	Pós
1	0,57	0,55	4,071	4,4507
2	0,89	1,15	69,696	142,424
3	1,78	3,1	14,015	15,151
4	0,55	0,67	4,2968	6,25
5	1,57	2,13	5,175	6,25
6	1,05	0,74	2,148	3,125
7	1,21	0,89	3,125	2,441
8	1,12	1,14	12,5	11,328
9	0,44	0,47	17,187	16,796
10	2,43	3,17	2,343	2,343
Média	1,161	1,401	13,456	21,056