

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ELETROFORESE DAS PROTEÍNAS SÉRICAS E URINÁRIAS
DE CÃES COM ERLIQUIOSE SUBCLÍNICA**

Stefanie Bertti Coelho

Médica Veterinária

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ELETROFORESE DAS PROTEÍNAS SÉRICAS E URINÁRIAS
DE CÃES COM ERLIQUIOSE SUBCLÍNICA**

Stefanie Bertti Coelho

Orientador: Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana

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

2015

Coelho, Stefanie Berti
C672e Eletroforese das proteínas séricas e urinárias de cães com
erliquiose subclínica / Stefanie Berti Coelho. -- Jaboticabal, 2015
viii, 65 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015
Orientador: Áureo Evangelista Santana
Banca examinadora: Raimundo Souza Lopes, Daniela Gomes da
Silva
Bibliografia

1. Análise da urina. 2. *Ehrlichia canis*. 3. Proteínas de fase aguda.
4. SDS-PAGE. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-072:636.7

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ELETROFORESE DAS PROTEÍNAS SÉRICAS E URINÁRIAS DE CÃES COM ERLIQUIOSE SUBCLÍNICA

AUTORA: STEFANIE BERTTI COELHO

ORIENTADOR: Prof. Dr. AUREO EVANGELISTA SANTANA

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

Prof. Dr. AUREO EVANGELISTA SANTANA

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. RAIMUNDO SOUZA LOPES

Departamento de Clínica Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu

Prof. Dra. DANIELA GOMES DA SILVA

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 02 de julho de 2015.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

STEFANIE BERTTI COELHO – nascida em 14 de dezembro de 1987 na cidade de São Paulo, SP, filha de Reinaldo Coelho e Margarete Sueli Bertti. Médica Veterinária formada pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Câmpus de Jaboticabal-SP em dezembro de 2012. Bolsista FAPESP de Iniciação Científica (2009/05344-4) na área de Clínica Médica Veterinária em 2009/2010. Em março de 2013, ingressou no curso de Mestrado na área de Clínica Médica Veterinária do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da FCAV, bolsista CNPq (130035/2015-7), sob orientação do Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana.

“Ao estudar as características e a índole dos animais,
encontrei um resultado humilhante para mim.”

Mark Twain

Dedico

Às pessoas que mais contribuíram não só para a conclusão desta fase, mas por todas as conquistas da minha vida. Meu pai Reinaldo Coelho, pelo apoio incondicional, pelo bom humor e simplicidade com os quais sempre me incentivou a enfrentar as dificuldades. Minha mãe Margarete Bertti, pelo imenso carinho, companheirismo, amor e dedicação que dispensou a mim para que eu pudesse alcançar meus sonhos. Agradeço por todas as batalhas que meus pais enfrentaram para que eu pudesse chegar tão longe e pelos belos ensinamentos que me inspiraram a seguir. E finalmente, minha irmã Ludmila Bertti Coelho, pelo apoio, pela amizade e por ter se tornado o exemplo de profissional no qual sempre me espelharei.

Ofereço

Aos meus avós pelo amor e carinho durante os primeiros anos da minha vida.

Agradecimentos

Agradeço ao Professor Doutor Aureo Evangelista Santana pelo excelente professor e orientador que tem sido, pela atenção, paciência, disponibilidade, compreensão, e pelos ensinamentos de vida que sempre faz questão de partilhar conosco.

À Dra. Sofia Borin e ao Dr. Leandro Crivelenti minha imensa gratidão pela confiança, disponibilidade em ajudar e pela atenção. Vocês se revelaram essenciais para a realização deste trabalho, muito obrigada.

Às pessoas que se tornaram muito mais que amigas durante todos esses anos que passei em Jaboticabal. Pastel (Diego Favero) pelo companheirismo incondicional, pelo carinho, apoio e sinceridade durante esses anos; Bitinga (Natali Calazança) pelas brincadeiras infundáveis, pelos conselhos, pela amizade e bom humor com o qual me ajudou em muitos momentos difíceis; Abafa (Jacqueline Ferraça) pelo enorme carinho, pela diversão e pelo exemplo de vida que me dá todos os dias; Vírgula (Aline Rocha) por sempre irradiar alto astral e boas energias, pela imensa amizade e por ser “a alegria da casa”; Maria da Graxa por todas as felicidades que me proporcionou. Obrigada, República Abundância!

Aos amigos que estiveram comigo durante esta jornada, nos momentos de dificuldade e de alegria, em especial à Catarina Micali Contin, pela parceria, amizade e companheirismo, se tornando não apenas uma companheira de trabalho, mas sim uma amiga muito especial.

E meu agradecimento também a todos do Laboratório de Patologia Clínica “Prof. Joaquim Martinz Ferreira Neto” da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, principalmente Douglas Luduvério, Matheus Yamasaki e Nathan da Cruz. Vocês tornaram todo o trabalho muito mais fácil.

Aos Professores Dr. Gener Tadeu Pereira e Dr. João Ademir de Oliveira, à funcionária da biblioteca da FCAV/UNESP Núbia Josefina Lopes Brichi e ao Dr. Paulo César da Silva pela paciência e prontidão quando precisei de ajuda. À Dra. Daniela Gomes da Silva pelas valiosas correções durante o Exame Geral de Qualificação, pela atenção e disponibilidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado.

O meu sincero agradecimento à Asociación de Universidades Grupo Montevideo (AUGM), à Universidad Nacional del Litoral (UNL), à UNESP e ao professor Aureo, por terem me dado a incrível oportunidade de concluir um semestre do mestrado em Santa Fé, Argentina.

A todos os animais usados nesta Universidade, muitos dos quais doam suas vidas para que nós, pós-graduandos, possamos realizar nossos experimentos.

Agradeço também à UNESP – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias por ter me dado a oportunidade de estudar na melhor faculdade de Medicina Veterinária do Brasil.

AGRADEÇO...

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Hemoparasitoses	2
2.2 Erliquiose monocítica canina	2
2.3 Gamopatia	8
2.4 Proteínas de fase aguda	10
2.5 Eletroforese.....	15
3. OBJETIVOS	16
3.1 Objetivo geral.....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1 Animais experimentais.....	17
4.2 Coleta e processamento de amostras de soro e urina.....	18
4.3 Avaliação sorológica e reação em cadeia da polimerase (PCR)	19
a) “Dot-ELISA” para detecção de anticorpos anti- <i>Ehrlichia canis</i>	19
b) Técnica sorológica para detecção de anticorpos IgG e IgM anti- <i>Leptospira</i> canina	19
c) Reação em cadeia da polimerase (PCR) para <i>Ehrlichia canis</i> , <i>Anaplasma</i> <i>platys</i> e <i>Babesia canis</i>	19
4.4 Análises laboratoriais	20
a) Hemograma.....	20
b) Análises bioquímicas.....	20
c) Urinálise.....	21
d) Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	21
4.5 Análise estatística	23

	Página
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1 Análises do sangue.....	24
5.1.1 Hemograma	24
5.1.2 Bioquímico	29
5.1.3 Eletroforese	33
5.2 Análises da urina.....	38
5.2.1 Bioquímico	38
5.2.2 Urinálise.....	40
5.2.3 Eletroforese urinária	42
6. CONCLUSÕES	45
7. REFERÊNCIAS.....	46
APÊNDICES	59



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

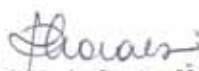


CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 12545/14 do trabalho de pesquisa intitulado "Eletroforese das proteínas séricas e urinárias de cães com erliquiose subclínica", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 07 de julho de 2014.

Jaboticabal, 07 de julho de 2014.


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

ELETROFORESE DAS PROTEÍNAS SÉRICAS E URINÁRIAS DE CÃES COM ERLIQUIOSE SUBCLÍNICA

RESUMO – A erliquiose é uma hemoparasitose que acomete cerca de 20 a 30% dos cães atendidos nas clínicas veterinárias do Brasil, podendo levá-los ao óbito. Predomina nas regiões mais quentes do planeta devido ao fato de seu hospedeiro intermediário, um artrópode, prevalecer nos locais de altas temperaturas. Em função da gravidade da enfermidade para os animais e ao potencial zoonótico da doença, estudos envolvendo as possíveis alterações renais são essenciais para o diagnóstico e prognóstico da doença. Neste ensaio, objetivou-se avaliar as proteínas séricas e urinárias de cães com erliquiose na fase subclínica, por meio da técnica de eletroforese em gel de poliagrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Os animais foram devidamente distribuídos em grupo controle (GC), 18 cães saudáveis e grupo doente (GD), integrado por 17 cães acometidos por erliquiose subclínica, sendo que o diagnóstico da infecção foi confirmado ou excluído levando-se em conta a associação de exames clínicos, sorológicos e PCR. Os resultados mostraram que os cães na fase subclínica da erliquiose apresentaram alterações laboratoriais como, trombocitopenia, hiperglobulinemia com hipoalbuminemia compensatória e aumento de proteínas totais, além de anemia. A partir do traçado eletroforético sérico, concluiu-se que os cães infectados na fase subclínica apresentaram elevação na concentração de transferrina, IgG de cadeia pesada, haptoglobina, alfa 1-glicoproteína ácida e proteína de peso molecular 23 kDa. A análise do traçado eletroforético urinário dos animais experimentais, associada com o resultado da UPC, o qual revela proteinúria limítrofe nos indivíduos doentes, demonstraram que existem lesões renais, tanto em nível glomerular quanto tubular, em cães com erliquiose na fase subclínica, entretanto, mais estudos se fazem necessários para esclarecer e detalhar melhor as referidas lesões.

Palavras-chave: análise da urina, *Ehrlichia canis*, proteínas de fase aguda, SDS-PAGE

ELECTROPHORESIS OF SERUM AND URINARY PROTEINS OF DOGS WITH SUBCLINICAL-PHASE ERLICHIOSIS

ABSTRACT - Ehrlichiosis is a hemoparasitosis that affects around 20 to 30% of dogs treated at veterinary clinics in Brazil, which may lead the animal to death. It predominates in the warmer regions of planet because of its intermediate host, an arthropod, that lives in high temperature regions. Due to the severity of the disease to animals and its zoonotic potential, studies involving the possible renal disorders are essential for the diagnosis and patient's prognosis. In this trial aimed to evaluate serum and urinary proteins of dogs with ehrlichiosis in the subclinical stage, by electrophoresis in polyacrylamide gel containing sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE). The animals were divided into control group (CG), 18 health dogs and sick group (SG), the last one with 17 dogs with diagnosis of ehrlichiosis subclinical, and the diagnosis of infection was confirmed or excluded by association of clinical exams, serological tests and PCR. The results showed that dogs on the subclinical stage of ehrlichiosis had laboratory changes as thrombocytopenia, hyperglobulinemia associated with compensatory hypoalbuminemia and increased total protein, and anemia. From the serum electrophoresis, it was concluded that the infected dogs in subclinical phase had increased concentration of transferrin, the heavy chain of IgG, haptoglobin, alpha 1-acid glycoprotein and protein molecular weight 23 kDa. The analysis of urinary electrophoretic trace of the experimental animals, the result associated with the UPC, which shows borderline proteinuria in diseased dogs, showed that there renal lesions, both as tubular glomerular level, in dogs with ehrlichiosis in the subclinical stage, however, more studies are needed to clarify and better detail these injuries.

Key words: urine analysis, *Ehrlichia canis*, acute phase proteins, SDS-PAGE

LISTA DE TABELAS

	Página
<p>Tabela 1. Estatística descritiva (média \pm erro padrão da média) e valores de P do teste t <i>student</i> da contagem de hemácias (He), hematócrito (Ht), taxa de hemoglobina (HG), contagem de plaquetas, leucócitos totais (LT), eosinófilos (EOS), neutrófilos segmentados (NS), neutrófilos bastonetes (NB), linfócitos (LINF) e monócitos (MON) de cães saudáveis (grupo controle – GC) e de cães com erliquiose na fase subclínica (grupo doente – GD). Jaboticabal, 2015.....</p>	25
<p>Tabela 2. Estatística descritiva (média \pm erro padrão da média) e valores de P do teste t <i>student</i> da atividade enzimática sérica de aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA) e da concentração sérica de creatinina, ureia, proteína total (PT), globulinas e albumina de cães saudáveis (grupo controle – GC) e de cães com erliquiose na fase subclínica (grupo doente – GD).Jaboticabal,2015.....</p>	30
<p>Tabela 3. Estatística descritiva (média \pm erro padrão da média) e valor de P da concentração sérica de IgA, ceruloplasmina, transferrina, albumina, alfa 1-antitripsina, IgG de cadeia pesada, proteína de peso molecular 44.000 Da, haptoglobina, alfa 1-glicoproteína ácida (Alfa 1-GA), IgG de cadeia leve e proteína de peso molecular 23.000 Da de cães saudáveis (grupo controle – GC) e de cães com erliquiose na fase subclínica (grupo doente – GD). Jaboticabal, 2015.....</p>	33
<p>Tabela 4. Estatística descritiva (média \pm erro padrão da média) da razão proteína/creatinina urinária (UPC) de cães saudáveis (grupo controle – GC) e de cães com erliquiose na fase subclínica (grupo doente – GD). Jaboticabal, 2015.....</p>	38
<p>Tabela 5. Classificação da excreção urinária de proteína, estimada pela razão proteína/creatinina urinária apresentada como número de animais e percentual em relação ao total de cães saudáveis (grupo controle – GC) e de cães com erliquiose na fase subclínica (grupo doente – GD). Jaboticabal, 2015.....</p>	39

Tabela 6.	Estatística descritiva qui-quadrado referentes ao aspecto, quantidade de leucócitos, valor de pH, quantidade de proteínas e hemácias presentes na urina de cães saudios (grupo controle – GC) e de cães com erliquiose na fase subclínica (grupo doente – GD). Jaboticabal, 2015.....	40
Tabela 7.	Estatística descritiva (média ± erro padrão da média) da densidade urinária de cães saudios (grupo controle – GC) e de cães com erliquiose na fase subclínica (grupo doente – GD). Jaboticabal, 2015.....	40
Tabela 8.	Frações de proteínas urinárias conforme seu peso molecular (kDa); n = número de animais experimentais que apresentaram a fração proteica observada em cada intervalo conforme o peso molecular; Frequência = porcentagem do aparecimento de cada fração proteica nos cães saudios (grupo controle – GC) e nos cães com erliquiose na fase subclínica (grupo doente – GD). Jaboticabal, 2015.....	42
Tabela 9.	Frequência de aparecimento das proteínas urinárias de acordo com seu peso molecular (BPM - baixo peso molecular, MPM - médio peso molecular e APM - alto peso molecular); n = número de proteínas observadas no grupo controle (GC) e no grupo com erliquiose na fase aguda (GD). Jaboticabal, 2015.....	43

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Valores médios de contagem de hemácias (He), hematócrito (Ht), taxa de hemoglobina (HG), contagem de plaquetas, contagem global de leucócitos totais (LT), eosinófilos (EOS), neutrófilos segmentados (NS), neutrófilos bastonetes (NB), linfócitos (LINF) e monócitos (MON) de cães sadios (grupo controle – GC) e de cães com erliquiose na fase subclínica (grupo doente – GD). Jaboticabal, 2015.....	26
Figura 2. Valores médios da atividade enzimática sérica de alanino aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA) e da concentração sérica de creatinina, ureia, proteína total (PT), globulinas e albumina de cães sadios (grupo controle – GC) e de cães com erliquiose na fase subclínica (grupo doente – GD). Jaboticabal, 2015.....	31
Figura 3. Valores médios da concentração sérica de IgA, ceruloplasmina, transferrina, albumina, alfa 1 – antitripsina, IgG de cadeia pesada, proteína de peso molecular 44.000 Da, haptoglobina, alfa 1–glicoproteína ácida, IgG de cadeia leve e proteína de peso molecular 23.000 Da de cães sadios (grupo controle – GC) e de cães com erliquiose na fase subclínica (grupo doente – GD). Jaboticabal, 2015.....	34
Figura 4. Valores médios da razão proteína/creatinina urinária (UPC) de cães sadios (grupo controle – GC) e de cães com erliquiose na fase subclínica (grupo doente – GD). Jaboticabal, 2015.....	39
Figura 5. Valores do teste qui-quadrado referentes ao aspecto, quantidade de leucócitos, valor de pH, quantidade de proteínas e hemácias presentes na urina de cães sadios (grupo controle – GC) e de cães com erliquiose na fase subclínica (grupo doente – GD). Jaboticabal, 2015.....	41

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo país com a maior população de *pets*, sendo 37,1 milhões de cães e 21,4 milhões de gatos, de acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (ABINPET, 2013). Diante desse panorama brasileiro e mundial, o cuidado dos proprietários com a saúde de seus animais aumenta a cada ano, o que exige avanços e inovações não apenas nos serviços de alimentação, beleza e cosméticos, mas principalmente em relação à medicina de animais de companhia. Isso engloba o diagnóstico precoce, o controle e o combate de enfermidades as quais acometem os *pets*, além da prevenção de doenças, inclusive daquelas que muitas vezes colocam em risco a saúde do ser humano.

Ehrlichia canis é uma bactéria intracelular obrigatória, transmitida principalmente pela picada do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. Causador da erliquiose monocítica canina (EMC), o agente etiológico gera agravos à saúde dos cães, portanto é essencial que estudos englobando novas abordagens a doença, métodos de diagnóstico e profilaxia sejam realizados a fim de proteger a saúde de humanos e animais (CARDOSO; MENDAO; CARVALHO, 2012).

Neste estudo objetivou-se elucidar algumas características da erliquiose na fase subclínica por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida, a melhor maneira de se detectar frações proteicas séricas e urinárias que possam indicar lesões glomérulo-tubulares nos animais, de modo a elucidar possíveis alterações relacionadas à fase subclínica da EMC em cães com infecção natural.

A referida afecção se manifesta de forma silenciosa podendo levar a lesões crônicas, especialmente em nível renal, com terminação em óbito (RONDELLI, 2012), ou ainda possibilitar a infecção do próprio dono e outros humanos que o rodeiam (COHN, 2003; VIEIRA et al., 2011). Situação que se agrava ainda mais quando observamos as estatísticas nacionais em que cerca de 20 a 30% dos cães atendidos na clínica médica de pequenos animais apresentam a doença em alguma de suas três fases (CHAVES; LEITE; NAVECA, 2007).

Neste contexto, estudos que busquem melhor entendimento da infecção por *E. canis* são essenciais para o estabelecimento de um diagnóstico precoce, tratamentos eficazes e prognósticos mais precisos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Hemoparasitoses

As hemoparasitoses são enfermidades muito prevalentes em cães e gatos, sendo responsáveis por grande parte da casuística de clínicas veterinárias (CHAVES, LEITE; NAVECA, 2007; WITTER et al., 2013). Transmitidas por artrópodes hematófagos (LOPES, 2013), tais infecções são causadas por microrganismos intracelulares obrigatórios e acometem diversas espécies animais, gerando sinais clínicos variados que podem culminar com a morte do hospedeiro (LABARTHE et al., 2003).

Ehrlichia sp. está entre os hemoparasitos de cães mais frequentes no Brasil (COSTA, 2011) e, devido ao fato de ser transmitida por um artrópode, o controle da enfermidade se torna ainda mais complicado (SILVA et al., 2014), sendo muito difícil ocorrer sua erradicação (ISOLA; CADIOLI; NAKAGE, 2012).

As doenças transmitidas por vetores representam uma ameaça mundial por tratar-se de enfermidades de contínua propagação, que não distinguem barreiras geográficas, financeiras ou temporais. Além disso, apresentam alta frequência, morbidade e potencial zoonótico (CARDOSO; MENDAO; CARVALHO, 2012).

2.2 Erliquiose monocítica canina

A erliquiose monocítica canina (EMC) foi registrada pela primeira vez em 1935 na Argélia, em um cão da raça Pastor Alemão e na década de 60, houve um grande surto da doença nos cães do exército dos EUA (CHAVES; LEITE; NAVECA, 2007). No Brasil, foi descrita pela primeira vez por Costa et al. (1973), em Belo Horizonte, sendo que, atualmente, a doença apresenta alta prevalência no país, onde é endêmica em várias regiões (BORIN; CRIVELANTI; FERREIRA, 2009; VIEIRA et al., 2011), achando-se presente em quase todos os Estados brasileiros (MACEDO; LEAL, 2005). Já em escala mundial, predomina nas áreas tropicais (RIKIHISA, 1999; HARRUS; WANER, 2011; SANCHEZ et al., 2012).

Existem cinco espécies relatadas do gênero *Ehrlichia* sendo elas, *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ruminantium*, *E. ewingii* e *E. muris* (AGUIAR, 2006; BORIN; CRIVELANTI; FERREIRA, 2009). *E. canis* é a espécie que mais acomete os cães e aquela que causa o quadro clínico mais severo (CHAVES; LEITE; NAVECA, 2007), sendo a responsável pela EMC (VIEIRA et al., 2011). É uma das mais importantes doenças infecciosas em cães, podendo afetar também os canídeos silvestres (ADRIANZÉN et al., 2003; SHERDING, 2008).

Trata-se de uma enfermidade cosmopolita, sendo que as espécies de *Ehrlichia* estão distribuídas pelo mundo de acordo com a presença do vetor, entretanto predominam nas regiões tropicais nos meses mais quentes do ano, devido ao desenvolvimento do artrópode ser maior quando as temperaturas estão mais altas. Embora não existam dados oficiais no Brasil, estudos indicam que cerca de 19,8% dos cães estudados em todo o país apresentaram soropositividade para *E. canis*, sendo ainda mais altas as porcentagens em alguns Estados como Mato Grosso do Sul, com 35,7% (LABARTHE et al., 2003).

Embora *E. canis* esteja fortemente associada a hospedeiros caninos, uma vez que é a principal espécie de *Ehrlichia* que acomete os cães, tal patógeno já foi identificado em felinos domésticos. Outras bactérias do mesmo gênero já foram identificadas em animais selvagens brasileiros, como a *Ehrlichia chaffeensis* em um cervo-do-pantanal e há relatos de exames sorológicos que apontam a existência de erliquiose em seres humanos no Brasil, apesar de não haver definição a respeito da espécie de *Ehrlichia* em questão (VIEIRA et al., 2011). Segundo Spickler (2005), realmente a erliquiose apresenta potencial zoonótico e há registros de seis casos da doença clínica em humanos, causada por microrganismo semelhante a *E. canis*, na Venezuela (PEREZ et al., 2005; SHERDING, 2008).

Há vários relatos sobre a ocorrência de outras espécies de *Ehrlichia* no Brasil, além da *E. canis*. Novos genótipos foram identificados nos animais silvestres brasileiros, uma vez que os mesmos funcionam como hospedeiros para o carrapato e para a bactéria (WIDMER et al., 2011). Já na América do Norte, os cães são comumente infectados por *E. chaffeensis* e *E. ewingii*, os quais são considerados agentes causadores de zoonoses, sendo o carrapato *Amblyomma* o principal vetor (McBRIDE; WALKER, 2010).

No Brasil há predomínio da *E. canis* como agente etiológico e do *Rhipicephalus sanguineus* como vetor da erliquiose (SHERDING, 2008). Esta espécie de carrapato fixa-se preferencialmente no pescoço, dorso, orelhas e espaço interdigital dos cães (LABRUNA; PEREIRA, 2001) e é bastante adaptada aos ambientes urbanos por possuir hábitos nidícolas (ADRIANZÉN et al., 2003; SHERDING, 2008), vivendo em tocas e ninhos escondidos pela casa (LABRUNA; PEREIRA, 2001). Deste modo, em seu período de vida livre é capaz de sobreviver no próprio abrigo do cão, o que facilita o posterior encontro do artrópode com seu hospedeiro (ADRIANZÉN et al., 2003; SHERDING, 2008).

O agente etiológico é um parasito dos leucócitos do sangue, especialmente dos monócitos circulantes, sendo classificado como uma bactéria Gram-negativa, pleomórfica e intracelular obrigatória (COHN, 2003; MELO et al., 2011), podendo acometer também os seres humanos (COHN, 2003). Trata-se de um microrganismo com o genoma muito conservado, uma vez que o gene 16 SrRNA apresenta 99,9% a 100% de igualdade em diferentes cepas isoladas nas Américas do Sul e do Norte, e na Ásia (SIARKOU et al., 2007).

O agente etiológico instala-se no citoplasma de leucócitos, principalmente monócitos, podendo formar as chamadas “mórulas”, as quais consistem em agregados de microrganismos envoltos por membrana. As células infectadas pela bactéria circulam através do sangue e dos vasos linfáticos pelo organismo (ADRIANZÉN et al., 2003). O parasito acomete também células polimorfonucleares e plaquetas, o que, neste último caso, explica o quadro de trombocitopenia na maioria dos pacientes infectados (CHAVES; LEITE; NAVECA, 2007). A EMC é classificada em monocitotrópica, quando o agente etiológico infecta principalmente monócitos circulantes e fagócitos, ou ainda em trombocitotópica, quando o parasito acomete os trombócitos (SHERDING, 2008).

Ao adentrar no organismo do cão a bactéria é fagocitada por células mononucleares, impedindo a formação do fagolisossoma, de modo que corpúsculos iniciais se multiplicam por divisão binária até constituírem as chamadas mórulas, as quais, quando maduras, se dissociam em outros corpúsculos iniciais, saem da célula por exocitose e parasitam novos leucócitos (CHAVES; LEITE; NAVECA, 2007). As mórulas consistem em um conjunto de corpúsculos elementares envoltos por uma

membrana (DAVOUST, 1993), enquanto que o corpúsculo inicial é constituído por grânulos e formado a partir de divisão binária dos corpúsculos elementares dentro do fagossoma (NYINDO et al., 1971). O período de incubação da *E. canis* varia entre 8 a 20 dias, de acordo com a carga parasitária e com o estado imunológico do hospedeiro (OLICHESKI, 2003).

A transmissão da EMC ocorre de maneira mecânica durante o repasto sanguíneo por meio da saliva do vetor *Rhipicephalus sanguineus*. O artrópode se infecta ao ingerir sangue de animais na fase aguda da doença, contendo leucócitos parasitados, os quais se disseminam pelo organismo do carrapato através dos hemócitos intestinais, alcançando as glândulas salivares. Outra maneira de transmissão da EMC é por transfusão de sangue infectado, sendo considerada uma infecção iatrogênica (CHAVES; LEITE; NAVECA, 2007).

A erliquiose monocítica canina (EMC) leva a alterações clínicas e hematológicas bastante inespecíficas nos animais (SOUSA et al., 2010) e está claro que não há predisposição sexual ou de idade (SOUSA et al., 2010; SANTOS et al., 2013). A EMC pode apresentar-se em três fases: aguda, subclínica e crônica (NEER, 1998; NELSON; COUTO, 2001), embora alguns cães infectados pela *Ehrlichia canis* apresentem sinais clínicos agudos seguidos de morte rápida sem passar pelas demais fases, enquanto outros podem ser assintomáticos (SANCHEZ et al., 2012).

Apesar do padrão de resposta imunológica em cães acometidos pela *E. canis* ainda não estar completamente esclarecido e compreendido (HESS et al., 2006), supõe-se que a existência de caninos infectados assintomáticos seja possível graças à tolerância imunológica à bactéria, ou a uma resposta inadequada do sistema imune (RIKIHISA, 2006). Além disso, há alguns relatos de que o agente etiológico da EMC detém mecanismos de fuga do sistema imune inato (BORJESSON et al., 2005).

Há alguns sinais clínicos que comumente aparecem nos animais infectados por *Ehrlichia* sp., os quais são muito inespecíficos, podendo ser facilmente confundido com outras doenças. Dentre eles, depressão, anorexia, letargia, epistaxe, hematuria, vômitos, tosse, petéquias, edema de membros, dispneia, hemorragia sub-retinal, cegueira, linfadenopatia, insuficiência renal e hepática, secreção nasal, glomerulonefrite (OLICHESKI, 2003; CHAVES; LEITE; NAVECA, 2007).

A fase aguda é caracterizada pela presença de sinais clínicos tais como perda de peso, palidez de mucosas, linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia, hipertermia, petéquias, equimoses, sinais neurológicos, poliartrite, proteinúria, alterações cardiorrespiratórias (HARRUS; NEER, 2006), edema de membros, poliúria, polidipsia (NAKAGHI et al., 2004), que podem perdurar por duas a quatro semanas (NELSON; COUTO, 2001; HARRUS; NEER, 2006). Alterações hematológicas como trombocitopenia e leucopenia branda também podem estar presentes (NAKAGHI et al., 2008). Entretanto, os sinais clínicos variam de acordo com a presença ou não de coinfeção, e da resposta imune do paciente (SILVA, 2010).

Nesta fase, primeiramente ocorre replicação do parasito em células mononucleares e linfócitos e, em seguida, a bactéria se espalha pelas células do sistema retículo endotelial do fígado, baço e linfonodos, causando hiperplasia linforreticular. Ocorre também vasculite nos pulmões, rins e meninges devido à interação entre as células infectadas e o endotélio vascular. Em decorrência da vasculite ocorre a destruição de células alvo, acentuando os quadros de trombocitopenia e leucopenia. A destruição de plaquetas ocorre devido ao processo inflamatório, o qual promove estimulação dos sistemas imune e de coagulação. Pode ocorrer também inibição da agregação plaquetária, provavelmente devido à presença de anticorpos antiplaquetas no soro de cães infectados com *E. canis*, contribuindo para aumentar ainda mais o tempo de sangria (OLICHESKI, 2003).

O animal na fase aguda pode vir a óbito (OLICHESKI, 2003), ou os sinais clínicos podem desaparecer sem tratamento, mas, como a eliminação do patógeno é difícil, os cães tendem a permanecer infectados, o que define a fase subclínica (HARRUS et al., 1998), ou seja, infecção assintomática com pequenas alterações laboratoriais, como hiperglobulinemia, neutropenia, linfocitose, monocitose (NELSON; COUTO, 2010), diminuição do número de plaquetas (GREENE, 2012) e aumento do títulos de anticorpos anti *E. canis* (IQBAL; RIKIHISA, 1994). Nesta fase, que pode durar de meses a anos (SHERDING, 2008), os cães são considerados reservatórios da doença, uma vez que o agente etiológico está alojado em tecidos e órgãos (IQBAL; RIKIHISA, 1994), como o baço (GREENE, 2012). Em alguns pacientes pode haver quadros de vômitos, poliúria, polidipsia, hematúria e úlceras na cavidade oral (OLICHESKI, 2003; SHERDING, 2008).

Além disso, a condição subclínica do animal por tempo prolongado é um indício de que este cão é um hospedeiro reservatório de carrapatos infectados, aumentando as chances de que a enfermidade acometa seres humanos (SHERDING, 2008). Nos casos em que o paciente se apresenta imunocompetente, a bactéria poderá ser eliminada. Por outro lado, cães imunodeprimidos entram na fase crônica, em que predominam sinais clínicos como, apatia, perda de peso crônica, febre, edema de membros, pneumonia, poliartrite, insuficiência renal (WANER; HARRUS, 2000), caquexia, dor abdominal, epistaxe, melena, hematúria, infecções secundárias, hepatomegalia (CHAVES; LEITE; NAVECA, 2007) e principalmente hipoplasia medular, com consequente monocitose, linfocitose e leucopenia (OLICHESKI, 2003).

O diagnóstico é laboratorial, realizado por meio de exames bioquímicos, hemograma e urinálise. Na infecção por *E. canis* os achados laboratoriais mais comuns são trombocitopenia, anemia normocrômica normocítica, eosinopenia, linfopenia, desvio de neutrófilos à esquerda (MENDONÇA et al., 2005), identificação de mórulas nos esfregaços de sangue periférico (LIBERATI; ALVARES; BETTINI, 2009). Testes sorológicos de imunofluorescência indireta e reação em cadeia da polimerase (PCR) são meios diagnósticos eficazes já que além de confirmarem a infecção, ajudam na determinação da espécie do parasito (LIBERATI; ALVARES; BETTINI, 2009).

Segundo Harrus, Waner e Neer (2012), o tratamento é eficiente em animais que estejam nas fases aguda ou subclínica e deve consistir em uma terapia de suporte associada a fármacos antibacterianos. De acordo com Shipov et al. (2008), cães na fase crônica não respondem ao tratamento por apresentarem mielodepressão grave e doença multissistêmica.

O fármaco de eleição continua sendo a doxiciclina, uma tetraciclina semissintética lipossolúvel de rápida absorção (HARRUS; WANER; NEER, 2012), que apresenta ampla distribuição pelos rins, pulmões, coração, músculos, bile, saliva, fluido sinovial e humores vítreo e aquoso (ANDRADE; SANTARÉM, 2002). Além de atingir elevadas concentrações no sangue e tecidos é capaz de penetrar nas células, o que é fundamental para o combate à infecção uma vez que o parasito é intracelular obrigatório (HARRUS; WANER; NEER, 2012). Trata-se de uma clortetraciclina que apresenta eficácia clínica com poucos efeitos adversos, com a vantagem de poder ser

administrada em pacientes doentes renais, uma vez que o fármaco é eliminado via gastrointestinal (ANDRADE; SANTARÉM, 2002).

Além disso, pode ser necessário a realização de uma terapia de suporte com fluidoterapia, transfusão sanguínea (HARRUS; WANER; NEER, 2012), suplementos vitamínicos (SHERDING, 2008) e esteróides androgênicos (OLOCHESKI, 2003; SHERDING, 2008).

A profilaxia mais eficaz é o controle da população de carrapatos, uma vez que não existem vacinas contra erliquiose. Aplicação de carrapaticidas de longa duração nos cães e no ambiente onde têm acesso reduz as chances dos animais se infectarem (SHERDING, 2008).

2.3 Gamopatia

Gamopatia ocorre quando há aumento da fração γ -globulina, a qual engloba a maioria das imunoglobulinas. Clones de linfócitos B e plasmócitos produzem imunoglobulinas de maneira policlonal, resultando em um aumento amplo das γ -globulinas no traçado eletroforético, o que caracteriza gamopatia do tipo policlonal (LASSEN; WEISER, 2007b). Resulta de uma proliferação de clones de plasmócitos, os quais, ao produzirem imunoglobulinas diversas, promovem uma zona ampla ou difusa no eletroforetograma, caracterizando a forma policlonal (ECKERSALL, 2008). Entretanto, quando há produção excessiva de imunoglobulinas por um único clone de linfócito B ou plasmócito, define-se como gamopatia monoclonal, caracterizada por apresentar a fração γ com base estreita no traçado eletroforético (LASSEN; WEISER, 2007b).

Identificar tal componente monoclonal é muito importante para definir o diagnóstico, o prognóstico e o tratamento da gamopatia, além de permitir que seja realizado o diagnóstico diferencial com a gamopatia policlonal, a qual está relacionada às inflamações, enquanto a monoclonal se relaciona a processos malignos (KYLE et al., 2006).

A hiperglobulinemia em cães com erliquiose é comum e geralmente responsável pela hiperproteinemia nestes pacientes (MEYER; HARVEY, 2004). O intenso estímulo antigênico da enfermidade está relacionado à gamopatia policlonal,

embora muitos cães infectados possam apresentar gamopatia monoclonal (BREITSCHWERDT, 2000).

A erliquiose canina promove alterações imunológicas, bioquímicas e celulares (BONNARD; DRALEZ, 1999) tais como a infiltração de plasmócitos em órgãos, resultando em resposta humoral a qual influencia na patogenia da enfermidade, como a deposição de imunoglobulinas nos rins (GREENE, 1995).

Segundo Codner e Farris-Smith (1986), Sousa et al. (2010), Greene (2012), Isola, Cadioli e Nakage (2012), Parmar, Pednekar e Jayraw (2013), a enfermidade causada pela *E. canis* promove um grande aumento na produção de imunoglobulinas. Codner, Roberts e Ainsworth (1985) e Couto (1998), asseguram que 50 a 75% dos cães com sorologia positiva para *E. canis* apresentam a referida alteração ao eletroforetograma. Este aumento ocorre em todas as fases da EMC, com consequente hipergamaglobulinemia não associada aos títulos de anticorpos anti-*E. canis*. Portanto, os anticorpos produzidos são inespecíficos e a resposta imune engendrada, ainda que excessiva, é pouco eficiente contra o antígeno da EMC (HARRUS et al., 1998). Kataoka, Santana e Seki (2006) asseveram que a eletroforese sérica é uma maneira de detectar a gamopatia e, em seus ensaios, identificaram hipergamaglobulinemia significativa em cães infectados naturalmente por *E. canis*.

O aumento de globulinas séricas em cães com erliquiose leva à hiperviscosidade sérica, danos ao endotélio vascular e perturbações morfofuncionais das plaquetas, de modo a prejudicar a coagulação e a venoestase (GOULD et al., 2000). A hipergamaglobulinemia ocorre devido ao estímulo antigênico da bactéria (VARELLA, 2003) e pode estar relacionada ao quadro de hipoalbuminemia, o qual, segundo Santarém (2008), é um mecanismo compensatório à elevação da viscosidade sanguínea consequente à alta concentração de globulinas.

O estímulo antigênico supracitado pode causar glomerulopatias por deposição de imunocomplexos nos glomérulos (CODNER et al., 1992), desencadeando proteinúria (HEIENE et al., 2007). A destruição progressiva dos glomérulos e túbulos promove a formação de um tecido afuncional, proveniente de cicatrizações (BARROS et al., 2006), e leva à obstrução de alças glomerulares devido ao excesso de elementos da matriz extracelular, causando lesões que passam a não mais depender do estímulo inicial pré-existente, o que resulta em doença renal crônica. Avaliar a

quantidade de proteínas na urina do paciente é fundamental para a definição do tipo de lesão predominante e do tratamento mais eficaz. Proteinúria de origem glomerular é mais intensa e ocorre quando há aumento da carga filtrada, enquanto a proteinúria por déficits na reabsorção é menos acentuada e tem origem tubular (LEES, 2004).

A proteinúria glomerular patológica ocorre devido a lesões na barreira de filtração tanto pela carga quanto pelo tamanho das proteínas, sendo importante para diferenciação de glomerulopatias seletivas e não-seletivas. No caso da proteinúria tubular são encontradas proteínas de baixo peso molecular decorrente da não reabsorção protéica nos túbulos (GRAUER, 2005).

Portanto, associar a análise urinária com a avaliação eletroforética da urina e do soro de cães com erliquiose subclínica, pode ser uma alternativa para antecipar o diagnóstico e melhorar a eficácia do tratamento.

2.4 Proteínas de fase aguda

A resposta de fase aguda caracteriza-se por ser uma reação complexa que o organismo animal desenvolve com o objetivo de restaurar a homeostase diante de qualquer injúria em tecidos, seja de origem neoplásica, infecciosa, imunológica ou traumática (CERÓN; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005). Além de promover alterações sistêmicas, como febre, leucocitose, lipólise, glicogenólise, aumento do cortisol circulante, esta resposta também propicia variações nas concentrações das proteínas plasmáticas e séricas, que são denominadas proteínas de fase aguda (PFA) (ECKERSALL, 2000), as quais podem apresentar aumento ou diminuição nas suas taxas séricas de acordo com o estímulo ou supressão de sua biossíntese (MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004).

Trata-se de um mecanismo de defesa o qual, além de indicar sinais de uma infecção que está principiando, contribui para a resolução do processo mórbido (CRAY; ZAIAS; ALTMAN, 2009), pois representa uma primeira linha de defesa. As PFA contribuem para o restabelecimento da homeostase de maneira independente dos anticorpos (MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004), de maneira a conceder tempo ao organismo para ativar defesas mais específicas, como aquelas engendradas

pelo sistema imune humoral e celular (CERÓN; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005).

Portanto, as PFA são conhecidas como marcadores iniciais da enfermidade, uma vez que podem ser detectadas precocemente em quadros subclínicos ou clínicos (CERÓN; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005) já que apresentam variações em suas concentrações muito prematuramente, antecedendo os sinais clínicos e as alterações laboratoriais causadas por um processo infeccioso (MUNHOZ et al., 2012). Também são úteis no monitoramento de pacientes submetidos a tratamentos (CERÓN; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005).

Segundo um estudo realizado por Munhoz (2009), foi possível detectar as alterações das PFA durante o curso da infecção experimental por EMC em dez cães sem raça definida. Outros estudos, como o de Codner, Roberts e Ainsworth (1985), também relatam variações nas concentrações seroproteicas em cerca de 50 a 75% dos cães infectados com *E. canis*.

Atualmente, há um importante corpo de conhecimento com relação à fisiopatologia da resposta do organismo frente a uma injúria, a qual sustenta a investigação laboratorial das PFA e funciona como importante ferramenta no diagnóstico e prognóstico clínico em medicina veterinária (ECKERSALL; BELL, 2010).

Além disso, grande número de pesquisas indica que essas proteínas apresentam promissoras perspectivas no monitoramento de cães saudáveis e enfermos, com relação à detecção de doenças subclínicas na rotina da clínica médica (ECKERSALL; BELL, 2010). Na prática médica, consentânea, a mensuração dessas PFA tem sido cada vez mais utilizada como teste rápido da presença de enfermidades graves tais como meningite e pneumonia (LINDBACK et al., 1989).

Existem diversos tipos de proteínas de fase aguda, as quais desempenham variadas funções, como manter a pressão oncótica; transportar componentes do plasma; catalisar reações bioquímicas; formar a base estrutural de células e tecidos; participar do sistema imune (ECKERSALL, 2008).

Os hepatócitos são responsáveis pela produção de grande parte das proteínas plasmáticas, com exceção das imunoglobulinas, cuja produção é realizada pelos linfócitos B e plasmócitos. Já a regulação desta síntese é promovida por citocinas diversas (ECKERSALL, 2008). A interleucina-1 (IL-1), por exemplo, é a responsável

por modular a produção hepática, ou seja, fornece um estímulo à síntese de proteínas de fase aguda positivas, como a proteína C-reativa, a haptoglobina, a ceruloplasmina, o fibrinogênio e a alfa - 1 glicoproteína ácida, ao mesmo tempo em que inibe a produção das proteínas classificadas como negativas, como albumina e transferrina. Já a interleucina-6 (IL-6) realiza a liberação de tais proteínas para a circulação sanguínea (PALTRINIERI, 2008).

As PFA são constantemente removidas do organismo por meio do catabolismo, das perdas urinárias e pelo trato gastrointestinal (THOMAS, 2000). Portanto, possuem uma meia vida curta (LASSEN; WEISER, 2007b), o que torna necessária a reposição das mesmas por meio da produção pelo fígado ou pelos plasmócitos (THOMAS, 2000).

Os dois grandes componentes fracionários das proteínas plasmáticas são da albumina e das globulinas, as quais podem ser quantificadas individualmente por meio de provas colorimétricas (ECKERSALL, 2008). Para a separação em bandas mais específicas comumente se realizam análises de eletroforese, nas quais a amostra de plasma ou soro é submetida a um campo elétrico o qual separa cada fração proteica, definindo a porcentagem de cada uma delas na amostra total (BUSH, 2004).

Segundo Thomas (2000), a albumina é a fração que possui maior proporção dentre as proteínas plasmáticas, representando 35 a 50% das PFA nos animais e, de acordo com Lassen e Weiser (2007b), responde por 80% da manutenção da pressão oncótica. Também apresenta função de carreadora de substâncias, como ácidos biliares, bilirrubina, cálcio, medicamentos (LASSEN; WEISER, 2007b), aminoácidos, hormônios e metais, além de ter papel importante na regulação do pH sanguíneo (THRALL, 2007).

Por ser uma PFA negativa, diante de uma inflamação ocorre diminuição de sua concentração devido às citocinas pro-inflamatórias que promovem a inibição de sua síntese (PEREIRA; BURINI, 1992). Vários estudos relatam diferença significativa nos níveis de albumina em cães hígidos e cães infectados com *E. canis* (BRANDÃO, 2005).

Já as globulinas estão relacionadas principalmente à resposta imune uma vez que abrangem várias moléculas de anticorpos (LASSEN; WEISER, 2007b). Entretanto, também atuam como enzimas, fatores de coagulação e carreadoras de

lipídeos, hormônios e vitaminas. As globulinas são classificadas em α -globulinas, β -globulinas e γ -globulinas, sendo que nos cães ainda existe a subdivisão em α -1 e α -2, β -1 e β -2, γ -1 e γ -2 (WERNER; TURNWALD, 1999).

Ceruloplasmina, lipoproteína e haptoglobina fazem parte da fração α -globulina e apresentam como principal função o transporte de substâncias. A fração β -globulina engloba a proteína C-reativa, o plasminogênio, o fibrinogênio e ainda proteínas carreadoras, como a transferrina e a ferritina (LASSEN; WEISER, 2007b). Por fim, segundo Eckersall (2008), a fração γ -globulina é constituída por diversas imunoglobulinas (Ig), como IgM, IgA, IgE, IgG.

Em cães, a proteína C-reativa é a PFA que apresenta maior concentração sérica, sendo que sua taxa pode aumentar rapidamente em diferentes quadros infecciosos (CERÓN; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005). Sintetizada pelo fígado após danos teciduais causados por infecções, traumas ou inflamações (LINDBACK et al., 1989), foi a primeira PFA a ser descrita (CERÓN; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005). Em um estudo realizado por Shimada et al. (2002), verificou-se que os níveis de proteína C-reativa de cães da raça Beagle infectados experimentalmente com *E. canis* aumentaram quando o parasito se multiplicou no sangue dos animais, ou seja, 4 a 6 dias após a inoculação e entre os dias 15 e 42. Em outro ensaio, de Rikihisa et al. (1994), relacionaram-se altas concentrações séricas de proteína C-reativa e α ₁- glicoproteína ácida (AGP) com uma suspeita de infecção por *E. canis*. A AGP também é produzida pelos hepatócitos após danos teciduais (LINDBACK et al., 1989).

A AGP, segundo Cerón, Eckersall e Martínez-Subiela (2005), possui função imunomoduladora, cicatrizante, anti-inflamatória, além de aumentar a secreção de IL-1, sendo que sua concentração aumenta moderadamente no sangue em enfermidades como babesiose e erliquiose.

A ceruloplasmina é uma α ₂-glicoproteína classificada como PFA positiva e apresenta como função o transporte de cobre, essencial para formação de colágeno, para a cicatrização e para a eritropoiese. Em caso de resposta aguda, a ceruloplasmina apresenta elevação moderada de sua concentração (CERÓN; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005). Munhoz et al. (2012) avaliaram o perfil das PFA em cães experimentalmente infectados com *Ehrlichia canis* e concluíram que os níveis de

proteínas de fase aguda, principalmente da ceruloplasmina e AGP, se elevaram antes mesmo do aparecimento dos sinais clínicos e de outros achados laboratoriais, contribuindo para o diagnóstico precoce da enfermidade.

A haptoglobina é uma α -proteína que tem a capacidade de ligar-se a substâncias tóxicas como a hemoglobina livre no plasma de modo a reduzir danos oxidativos (MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004). Também participa do metabolismo de lipídeos e estimula a angiogênese. Em cães a haptoglobina tende a elevar sua concentração em processos inflamatórios, traumáticos e alguns processos infecciosos (CERÓN; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005).

A IgG, produzida por plasmócitos do baço, linfonodos e medula óssea é a globulina que apresenta maior concentração sanguínea, sendo fundamental nos mecanismos de defesa imunológicos dependentes de anticorpos. Já a IgA protege as superfícies epiteliais do organismo contra a ação de antígenos. Plasmócitos localizados nas paredes do intestino, trato respiratório, sistema urinário e pele são os responsáveis por sua produção e liberação (TIZARD, 1998).

A transferrina é uma β_1 -globulina e PFA negativa que tem como função o transporte sanguíneo de ferro (CERÓN; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005), além de apresentar ação bactericida (JAIN; GAUTAM; NASEEM, 2011). Estudos médicos têm comprovado que diminuições nas concentrações de transferrina estão mais relacionadas às respostas de fase aguda do que com uma dieta deficiente (CERÓN; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005).

Entretanto, variações nos níveis de proteínas totais sanguíneas se devem a alterações da concentração de albumina ou globulina, de modo que se faz necessário identificar cada fração para interpretar corretamente a alteração de níveis proteicos (LASSEN; WEISER, 2007b). A eletroforese é um dos meios mais confiáveis para identificar e quantificar proteínas presentes em fluidos corporais, sendo possível utilizá-la para detecção de PFA (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 1997). Além de ser simples e de baixo custo, o uso da técnica em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) permite que concentrações muito baixas de proteínas sejam identificadas, além de fornecer bandas protéicas nítidas (GORDON, 1995).

2.5 Eletroforese

Eletroforese é um teste laboratorial de rotina que consiste na submissão de pequenas quantidades de fluidos orgânicos, como soro ou urina, a um campo elétrico visando à migração e separação das proteínas em cinco frações principais de acordo com suas cargas elétricas e pesos moleculares (ATTAELMANNAN; LEVINSON, 2000). É um dos métodos mais confiáveis para identificar e quantificar as proteínas nos fluidos biológicos (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 1997).

Trata-se de um teste simples utilizado para detecção de alterações proteicas séricas ou urinárias indicativas de enfermidades metabólicas, renais, hematológicas (ATTAELMANNAN; LEVINSON, 2000), fato que ressalta sua importância clínica e na investigação experimental.

Existem vários meios de suporte usados na eletroforese, como fita de acetato de celulose, de menor custo e fácil realização, e gel de agarose, mais caro e trabalhoso, porém, que apresenta resultados de melhor qualidade (NAOUM, 1999). Segundo Gordon (1995), o gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) é um meio simples, de baixo custo, que permite a identificação de concentrações proteicas muito baixas e fornece bandas bastante nítidas.

A corrente elétrica aplicada no sistema é essencial para que haja migração das moléculas em direção ao ânodo ou ao cátodo, de acordo com sua carga elétrica. As frações resultantes são visualizadas após o uso de corante sobre o gel onde a amostra foi submetida ao potencial elétrico (LASSEN; WEISER, 2007a).

Na técnica de SDS-PAGE, a fração da albumina apresenta maior carga negativa, de modo que migra mais rapidamente ao ânodo (ECKERSALL, 2008). A banda gama é constituída pelas cinco maiores classes de imunoglobulinas, IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Por fim, as frações são quantificadas por meio de densitometria, para originar gráficos a serem analisados, os quais permitem o cálculo das porcentagens de cada fração (FERNANDES, 2010; LASSEN; WEISER, 2007a).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O principal objetivo foi o de avaliar as proteínas urinárias e séricas por meio da eletroforese SDS-page em cães com erliquiose na fase subclínica para investigação dos tipos de glomérulo-tubulopatias. Secundariamente, foram também investigadas as concentrações séricas das proteínas de fase aguda.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Patologia Clínica “Professor Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto” do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” e no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular no Departamento de Tecnologia, ambos na FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP. As análises de PCR foram realizadas no Laboratório de Imunoparasitologia Veterinária do Departamento de Patologia na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Câmpus de Botucatu, SP.

4.1 Animais experimentais

Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal/SP (protocolo 12545/14).

O estudo envolveu a avaliação de 35 cães atendidos no Hospital Veterinário (HV) “Governador Laudo Natel” da FCAV/UNESP, Jaboticabal/SP. Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

- Grupo Controle (GC): constituído por 18 cães clinicamente saudáveis e sem quaisquer manifestações ou sinais de doença (vide “critérios de exclusão”, abaixo). Salienta-se que o estado de saúde dos cães do grupo controle foi aquilatado pela realização de cuidadoso exame físico, associado à avaliação do quadro hematológico e bioquímico sérico e urinário, sorologias e PCR negativas para *E. canis*.
- Grupo Doente (GD): constituído por 17 cães assintomáticos, com sorologia e PCR positivos para *E. canis*. Os pacientes fizeram parte do estudo após consentimento dos proprietários, com ficha assentindo o protocolo experimental.

Critérios de exclusão

Foram excluídos os animais com sinais clínicos e/ou exames compatíveis com outras comorbidades (ex. endocrinopatias, neoplasia, dermatopatias, etc). Para tanto

fizeram parte dos critérios de avaliação hemograma completo, perfil bioquímico sérico (ALT, FA, creatinina, ureia, proteína total e albumina), além de exames comprobatórios como PCR (*Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* e *Babesia* sp.), sorologia para leptospirose e erliquiose. Outros exames, como os hormonais foram realizados quando pertinentes, sendo esses: estimulação com ACTH e/ou supressão com dexametasona e hormônios da tireóide.

4.2 Coleta e processamento de amostras de soro e urina

As amostras de sangue dos animais foram obtidas por venopunção jugular (5 mL) e armazenadas em tubos sem anticoagulante (Vacutainer®) previamente identificados. Após coagulação do sangue, o sistema foi centrifugado a 800 x g, durante 5 minutos, para separação do soro. Uma vez separado, o soro foi transferido para microtubos (do tipo Eppendorf) identificados, e sequencialmente congelados e armazenados a -20°C. Amostras de urina foram obtidas pelo método de micção espontânea ou cateterização vesical. Após a realização da urinálise, as amostras foram centrifugadas, e uma fração do sobrenadante de aproximadamente 4 mL foi congelada a -20°C para posterior determinação da razão proteína/creatinina urinária (UPC) e eletroforese das proteínas da urina.

A UPC foi estabelecida após dosagens de proteína urinária pelo método de vermelho de pirogalol (kit Sensiprot¹), bem como de creatinina urinária pelo método de picrato em meio alcalino, ambas com leitura em espectrofotômetro semiautomático² em modo colorimétrico. Para o cálculo da razão proteína/creatinina urinária utilizou-se da seguinte fórmula:

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

Onde,

UPC = razão proteína/creatinina urinária

UPt = concentração urinária de proteínas

Ucr = concentração urinária de creatinina

¹ Kit Sensiprot – Labtest Diagnóstica S.A., Minas Gerais, Brasil.

² LABQUEST-Labtest Diagnóstica S.A. – Lagoa Santa – MG

4.3 Avaliação sorológica e reação em cadeia da polimerase (PCR)

As avaliações sorológicas e de PCR foram realizadas nas amostras de sangue total de todos os animais do estudo, de acordo com os critérios de inclusão ou exclusão citados anteriormente.

a) “Dot-ELISA” para detecção de anticorpos anti-*Ehrlichia canis*

Os testes utilizados para detecção de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* da classe IgG foram realizados no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária “Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto” (FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal) empregando-se o kit Immunocomb^{®3}. Utilizou-se a metodologia empregada e descrita pelo fabricante, a qual considera títulos positivos (reagentes) acima de 1:80.

b) Técnica sorológica para detecção de anticorpos IgG e IgM anti-*Leptospira* canina

Os testes utilizados para detecção da presença de anticorpos anti-*Leptospira* sp. nos soros caninos foram também realizados no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária “Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto” (FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal) por meio de kits específicos para detecção de IgM⁴ e IgG⁵ seguindo as informações do fabricante.

c) Reação em cadeia da polimerase (PCR) para *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* e *Babesia canis*

As técnicas de PCR foram realizadas segundo a rotina do Laboratório de Imunoparasitologia Veterinária do Departamento de Patologia da UNESP, Câmpus de Botucatu/SP, na qual a extração do DNA de amostras do sangue total foram realizadas

³ Biogal, Israel

⁴ Test-IT[™] *Leptospira canine* IgM, JMR Trading LTDA, Paraná, Brazil.

⁵ Immuno Comb *Leptospira canina* IgG, JMR Trading LTDA, Paraná, Brazil.

empregando-se a *nested* PCR para detecção de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* e *Babesia* sp.

4.4 Análises laboratoriais

a) Hemograma

As contagens globais de eritrócitos, leucócitos e plaquetas, bem como a taxa de hemoglobina e hematócrito, foram obtidos com o auxílio de um contador automático (Counter ABX⁶). As contagens diferenciais de leucócitos foram realizadas em esfregaços sanguíneos corados com mistura de Metanol, corante de May-Gruwald e Giemsa.

b) Análises bioquímicas

Nas amostras de soro foram dosadas as atividades séricas enzimáticas de alanino aminotransferase (método de Reitman e Frankel) e fosfatase alcalina (método da hidrólise da timolftaleína em meio alcalino) e as concentrações de ureia (método da urease), creatinina (método Jaffé modificado), albumina (método verde de bromocresol) e proteína total (método do biureto). Nas amostras de urina foram dosadas creatinina e proteína total a partir do sobrenadante. As análises bioquímicas foram conduzidas utilizando-se conjuntos de reagentes do sistema Labtest⁷ e leituras espectrofotométricas⁸ com auxílio de espectrofotômetro semiautomático. Para o cálculo da globulina, subtraiu-se os valores da concentração sérica de albumina (g/dL) dos valores da concentração de proteína total (g/dL) de cada cão.

⁶ ABX Diagnostic, Montpellier, France.

⁷ Labtest - Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG

⁸ Labquest-Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG

c) Urinálise

O exame físico da urina foi realizado por meio de avaliação macroscópica. Para os testes químicos foram utilizadas fitas reagentes Combur⁹. A densidade urinária foi mensurada em refratômetro digital¹⁰. Para o estudo e quantificação das variáveis sedimentoscópicas, as amostras de urina foram centrifugadas (Centrífuga Excelsa Baby II¹¹) a 800 x g, durante cinco minutos, sendo o sobrenadante quase que totalmente desprezado, e deixando-se 0,5mL de urina para ressuspensão do sedimento.

A partir de uma gota do sedimento, foram feitas as preparações úmidas do referido sedimento, entre lâmina e lamínula, e sua imediata análise em microscópio óptico¹², sob objetivas de 10x a 40x.

d) Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese das proteínas séricas e urinárias foi realizada nas respectivas amostras de animais dos grupos controle e doente. A técnica seguiu os procedimentos de rotina do Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV/UNESP – Câmpus de Jaboticabal.

O fracionamento eletroforético foi realizado segundo a técnica descrita por LAEMMLI (1970) modificada, utilizando-se o sistema vertical de eletroforese¹³. A polimerização do gel foi possível pela adição de tetrametiletilenodiamina (TEMED)¹⁴ e persulfato de amônia a 10%.

A placa contendo o gel foi colocada em suporte apropriado¹⁵ em contato com uma cuba superior contendo solução tampão constituída de tris-base, glicina, dodecil sulfato de sódio (SDS) e água destilada estéril suficiente para completar um litro de solução (Apêndice D). As placas foram preenchidas com o gel de separação a 10% e

⁹ Combur 10 Test UX®, Boehringer Mannheim S.A., Buenos Aires, Argentina.

¹⁰ Refratômetro Digital – UGI (1000-1050) – Atago, Tóquio, Japão

¹¹ Centrífuga Excelsa Baby II, Modelo 206 – R FANEM® - São Paulo – Brasil.

¹² Microscópio Nikon Eclipse – E 200 NIKON Corporation, Tóquio, Japão.

¹³ PROTEAN II XI, VERTICAL ELETOPHORESIS CELLS®, BIO-RAD

¹⁴ Sigma, ST. Louis-MO, Estados Unidos da América

¹⁵ Fotodyne, Fotodyne Inc, Houston, TX, EUA

gel de empilhamento a 4%. As amostras para o fracionamento das proteínas foram preparadas utilizando-se 10 µL de soro sanguíneo diluídos em 30 µL de tampão-fosfato (PBS) e 20 µL de gel mix. Posteriormente, foram aquecidas sobre água em ebulição por 10 minutos. Uma alíquota de 5 µL das referidas amostras foi depositada no fosso do gel.

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

Os pesos moleculares e as concentrações das frações proteicas foram determinados por densitometria computadorizada¹⁶ por meio do escaneamento dos géis das amostras. Para a identificação das proteínas foram utilizados marcadores¹⁷ de pesos moleculares de 200, 116, 97, 66, 55, 45, 36, 29 e 20 kDa, além das proteínas purificadas albumina, α_1 -antitripsina, haptoglobina, ceruloplasmina, transferrina e IgG. Para a avaliação densitométrica das bandas proteicas confeccionaram-se curvas de referência a partir da leitura do marcador padrão.

A metodologia para realização da eletroforese das proteínas urinárias foi a mesma, porém, antes de serem utilizadas, as amostras passaram pelo processo de liofilização no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, do Departamento de Tecnologia da FCAV/UNESP. Alíquotas de 1000 µL de cada amostra de urina foram transferidas para tubos Falcon de 15 mL e congeladas a temperatura de -18°C. As amostras foram assim inseridas no liofilizador¹⁸. O processo de liofilização ocorreu durante 48 horas, à -40°C e 4 atm de pressão. O produto final foi ressuscitado com 100 µL de PBS e centrifugado durante 10 minutos ao final do processo. Foram utilizados 50 µL do sobrenadante de cada amostra e 20 µL de gel mix (corante). Foram levadas para o aquecimento, como descrito anteriormente, e então o processo seguinte foi semelhante àquele aplicado ao soro dos animais.

O traçado eletroforético sérico dos cães revelou a presença de 24 frações proteicas, sendo que apenas onze foram incluídas nas análises devido a sua

¹⁶ Shimadzu CS-9301, Shimadzu Corp., Kyoto-Japão

¹⁷ SIGMAMARKER™, wide range, 6,5 a 200 kDa, Sigma, Aldrich Biotechnology LP

¹⁸ Savant, Super Modulyo, EUA

importância para este experimento. São elas, IgA (139 KDa), ceruloplasmina (125 KDa), transferrina (79 KDa), albumina (69 KDa), alfa 1-antitripsina (52 KDa), IgG de cadeia pesada (58 KDa), proteína de peso molecular 44.000 Da (44 KDa), haptoglobina (45 KDa), alfa 1-glicoproteína ácida (40 KDa), IgG de cadeia leve (35 KDa) e proteína de peso molecular de 23.000 Da (23 KDa).

4.5 Análise estatística

Os resultados foram submetidos ao teste t *student* para amostras independentes de modo a avaliar se houve diferenças estatísticas entre os animais do grupo controle e do grupo doente. Quando as amostras não atendiam aos padrões de homogeneidade, aplicou-se a correção de *Welch* no referido teste (PETRIE; WATSON, 2007). As variáveis que tiveram distribuição não paramétrica ou não Gaussiana foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney. Para cada variável observada no experimento foram apresentadas as estatísticas descritivas de média e erro padrão da média. Sempre que necessário considerou-se o nível de significância de $p < 0,05$. As análises estatísticas foram processadas com auxílio do programa GraphPad Prism¹⁹, com exceção da análise urinária, a qual foi processada pelo programa R²⁰, por meio do teste Qui-Quadrado.

¹⁹ GraphPad Prism version 4.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com

²⁰ R version 3.1.2 Copyright © 2014. The Foundation for Statistical Computing Platform, Pennsylvania, USA.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O grupo GC foi constituído pelas raças Fila Brasileiro, Pastor Alemão, Poodle e ainda por cães sem raça definida, somando 38,88% de fêmeas e 61,11% de machos. A média de idade do referido grupo foi 10,33 meses. Já o grupo GD foi composto por 76,47% de fêmeas e 23,52% de machos e pelas raças Dachshund, Poodle, Boxer, rottweiler, Cocker Spaniel e também por animais sem raça definida, com média de idade igual a 17,05 meses.

5.1 Análises do sangue

5.1.1 Hemograma

Os resultados obtidos para as variáveis do hemograma, dos animais dos grupos experimentais, estão apresentados na Tabela 1 e Figura 1. Verifica-se que não houve diferença significativa entre os grupos experimentais em relação à contagem de neutrófilos bastonetes e linfócitos. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos controle e doente na contagem de hemácias, no hematócrito, na taxa de hemoglobina, na contagem de plaquetas, leucócitos totais, eosinófilos, neutrófilos segmentados e monócitos.

Tabela 1. Estatística descritiva (média \pm erro padrão da média) e valores de P do teste t *student* para contagem de hemácias (He), hematócrito (Ht), taxa de hemoglobina (HG), contagem de plaquetas, leucócitos totais (LT), eosinófilos (EOS), neutrófilos segmentados (NS), neutrófilos bastonetes (NB), linfócitos (LINF) e monócitos (MON) de cães saudáveis (grupo controle – GC) e de cães com erliquiose na fase subclínica (grupo doente – GD). Jaboticabal, 2015.

Grupos	GC	GD	Valor de P
He ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	6,39 \pm 0,23 ^a	5,297 \pm 0,322 ^b	0,0089
Ht ² (%)	43,91 \pm 1,192 ^a	36,33 \pm 2,239 ^b	0,0064
HG ² (g/dL)	15,04 \pm 0,46 ^a	12,38 \pm 0,7707 ^b	0,0064
Plaquetas ² (/ μL)	276.300 \pm 12.780 ^a	198.100 \pm 29.920 ^b	0,0255
LT (/ μL)	9406 \pm 479,3 ^a	6207 \pm 594,2 ^b	0,0002
EOS ² (/ μL)	836,6 \pm 180,5 ^a	389,0 \pm 109,8 ^b	0,0435
NS (/ μL)	5871 \pm 394,6 ^a	3576 \pm 420,1 ^b	0,0003
NB ^{1, 2} (/ μL)	4,22 \pm 4,22 ^a	110,1 \pm 62,29 ^a	0,0561
LINF ^{1, 2} (/ μL)	2236 \pm 204,8 ^a	2726 \pm 1085 ^a	0,0832
MON ^{1, 2} (/ μL)	442,2 \pm 50,43 ^a	524,9 \pm 270,3 ^b	0,0270

* Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$)

1- Valores submetidos ao teste Mann-Whitney para atender aos padrões de homogeneidade das amostras

2- Valores não paramétricos submetidos à correção de *Welch*

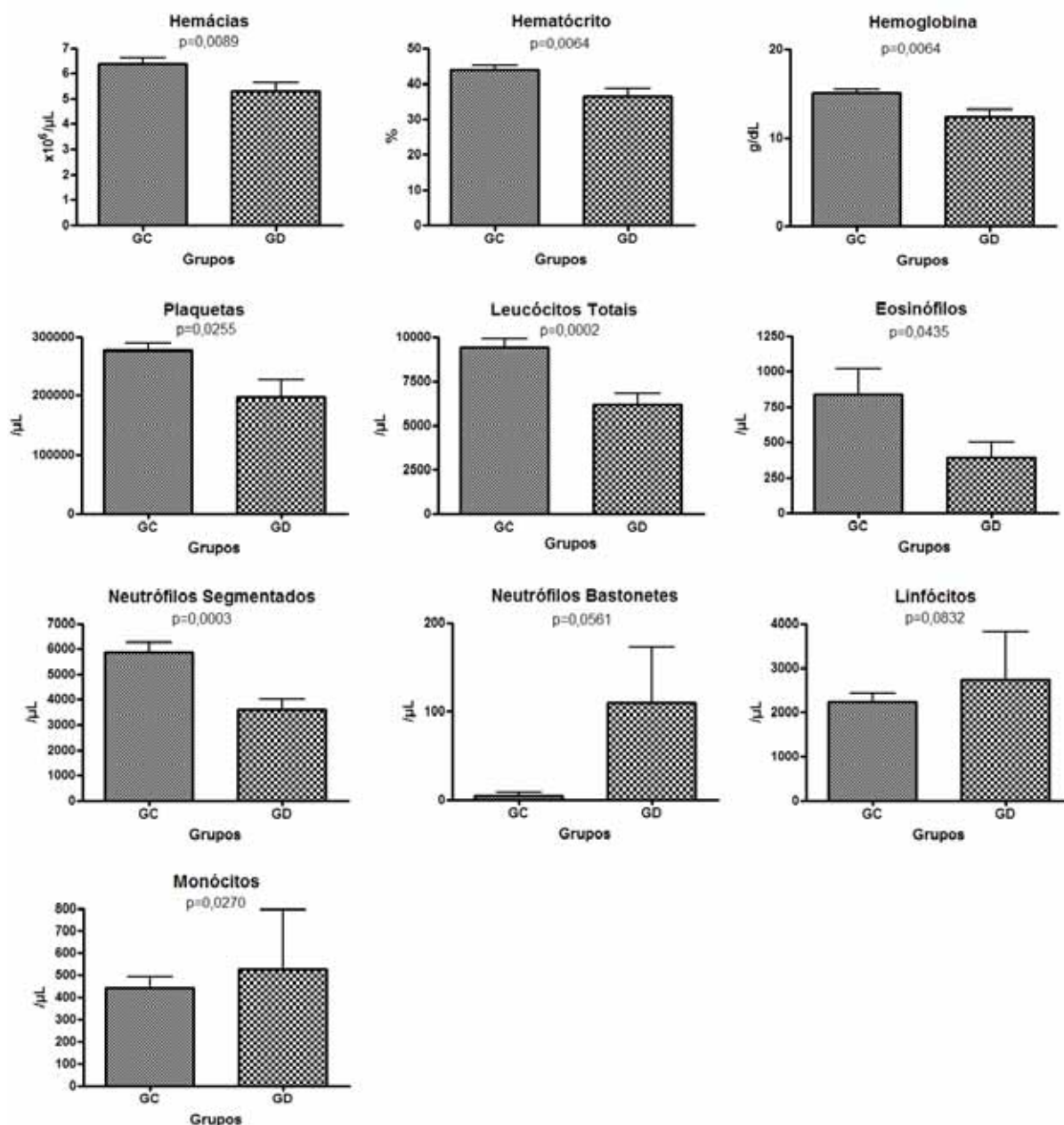


Figura 1. Valores médios obtidos para contagem de hemácias (He), hematócrito (Ht), taxa de hemoglobina (HG), contagem de plaquetas, contagem global de leucócitos totais (LT), eosinófilos (EOS), neutrófilos segmentados (NS), neutrófilos bastonetes (NB), linfócitos (LINF) e monócitos (MON) de cães saudáveis (grupo controle – GC) e de cães com erliquiose na fase subclínica (grupo doente – GD). Jaboticabal, 2015.

Alterações nos exames laboratoriais hematológicos são comuns em animais na fase subclínica da erliquiose, como citopenia, trombocitopenia, neutropenia e eosinopenia (NELSON; COUTO, 2001; OLICHESKI, 2003; MENDONÇA et al., 2005;

SHERDING, 2008), as quais ocorreram nos cães do presente estudo infectados por *E. canis*. A trombocitopenia é apontada por Davoust (1993) como uma alteração hematológica que ocorre em todas as fases da doença, e também relata que os pacientes apresentam quadro de pancitopenia. Outros estudos corroboram que a trombocitopenia na fase subclínica da referida enfermidade geralmente ocorre de forma branda mesmo que os animais não apresentem sinais clínicos (MÉNDEZ, 2004; HARRUS, WANER, 2011) e afirmam que 92% dos animais positivos para *E. canis* no exame de PCR em qualquer fase da doença, apresentaram trombocitopenia (MOYA-ARAUJO et al., 2012), embora um estudo realizado no Distrito Federal relate trombocitopenia em 30,7% dos animais com erliquiose (LIMA, 2013). A fase subclínica sucede a fase aguda da enfermidade, e apesar de caracterizar-se pela ausência de sinais clínicos, ocorrem alterações hematológicas, como trombocitopenia devido à disfunção na agregação plaquetária e leucopenia (NELSON; COUTO, 2001). Além disso, outras explicações válidas para o quadro de trombocitopenia são a aplasia medular ou a supressão de sua atividade eritropoiética, leucopoiética e trombocitopoiética; diminuição da meia-vida das plaquetas; produção de anticorpos antiplaquetários por efeito direto da bactéria (WANER et al., 1997).

No presente estudo, 47,05% dos animais infectados apresentaram quadro de trombocitopenia, sendo que o grupo GD mostrou número de plaquetas significativamente menor que o grupo GC. O fato de ser uma porcentagem abaixo da relatada por Moya-Araujo et al. (2012), de 92%, sugere que os animais doentes do presente estudo estavam na fase subclínica da enfermidade, enquanto que o ensaio alheio trabalhou com cães em qualquer fase da erliquiose, além de haver diferenças regionais entre ambos os estudos, o que pode gerar diferenças nos resultados.

Almosny (2002) ressalta, além da diminuição do número médio de plaquetas, a alta frequência dos quadros de anemia e leucopenia em cães infectados por *E. canis*. No estudo de Waner et al. (1997), 78% dos cães com erliquiose apresentaram número de leucócitos totais abaixo do valor de referência (Apêndice A), e Moya-Araujo et al. (2012), afirmam que 84% dos animais infectados demonstraram leucopenia, uma alteração muito comum em animais com *E. canis*, e que pode ser explicada pelo quadro de vasculite induzida pela bactéria e produção de interleucina 1 (IL-1), promovendo marginação e adesão dos leucócitos à parede vascular e saída dos

mesmos aos focos de inflamação (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1989). Os animais do grupo GD apresentaram número médio de leucócitos totais, significativamente inferior ao dos cães pertencentes ao grupo GC, sendo que 47,05% do total de cães infectados estavam leucopênicos, porcentagem menor do que a relatada por Waner et al. (1997) e Moya-Araujo et al. (2012), e mais alta do que a porcentagem de 32,7%, encontrada por Waldemarin, Mundin e Bastos (2003), de 24,63% relatada por Borin, Crivelenti e Ferreira (2009) e de 23,07% encontrada no ensaio de Lima (2013). Embora os animais doentes do presente estudo tenham apresentado valor de contagem de leucócitos significativamente inferior ao dos cães saudáveis, a média do referido parâmetro do grupo GD permaneceu dentro do intervalo de normalidade para a espécie canina (Apêndice A).

Não houve diferença significativa entre os grupos GD e GC em relação ao número de neutrófilos bastonetes (NB) e apenas um animal pertencente ao grupo GD apresentou número de NB acima do valor de referência (Apêndice A), o que representa 5,88% do total de animais infectados.

Houve diferença significativa entre os grupos experimentais em relação ao número de eosinófilos, o qual foi inferior no grupo GD quando comparado ao GC. Entretanto, a eosinopenia foi detectada em apenas 29,41% dos animais infectados, embora existam estudos relatando que a alteração ocorre na maioria dos cães com erliquiose (MENDONÇA et al., 2005).

Em relação ao número de linfócitos não se observou diferença significativa entre ambos os grupos estudados e somente 23,5% dos animais infectados apresentaram quadros de linfopenia. A eosinopenia e a linfopenia são alterações atribuídas à ação de catecolaminas liberadas durante a fase aguda da doença, de estresse (MENDONÇA et al., 2005), o que pode explicar o fato de a maioria dos animais do estudo não apresentarem tais alterações hematológicas, já que estão na fase subclínica. A diferença significativa entre os dois grupos em relação ao número de eosinófilos e o fato de existirem alguns animais com as alterações mencionadas pode ser devido aos cães recentemente terem enfrentado a transição da fase aguda para a subclínica.

Apesar de haver diferença significativa entre os grupos estudados em relação ao número de monócitos, a média dos animais doentes foi maior que a dos cães

saudáveis, há relatos de que 12,81% dos animais infectados por *E. canis* apresentaram monocitopenia (BORIN; CRIVELENTI; FERREIRA, 2009). No presente estudo a porcentagem foi de 35,3%, mas segundo Thrall (2007), a baixa contagem de monócitos na espécie canina é considerada insignificante. A média estatisticamente maior do grupo GD deve-se ao fato de que um animal infectado apresentou valor de contagem de monócitos excessivamente elevado (4788/ μ L), de maneira a aumentar a média do referido grupo sem haver representatividade por tratar-se de um caso isolado.

Os resultados deste estudo confirmam que há diminuição no número de hemácias e no valor do hematócrito, o que justifica a anemia citada por Gould et al. (2000), Almosny (2002), Cohn (2003), Mendonça et al. (2005), Borin, Crivelenti e Ferreira (2009) e Sousa et al. (2010). Além disso, a forte estimulação antigênica causada pela bactéria, promove a formação de complexos autoimunes que promovem lise e fagocitose de eritrócitos, plaquetas e leucócitos (NEER, 1999), contribuindo para os quadros de anemia, trombocitopenia e leucopenia descritos nos animais do presente estudo.

5.1.2 Bioquímico

Os exames bioquímicos realizados nos soros dos cães evidenciaram que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais para a atividade sérica de FA e concentração sérica de creatinina, PT, globulinas e albumina. Para os demais parâmetros, ALT e ureia, não houve diferença significativa entre os grupos, como retratado na Tabela 2 e Figura 2.

Tabela 2. Estatística descritiva (média \pm erro padrão da média) e valores de P do teste *t student* da atividade enzimática sérica de aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA) e da concentração sérica de creatinina, ureia, proteína total (PT), globulinas e albumina de cães saudáveis (grupo controle – GC) e de cães com erliquiose na fase subclínica (grupo doente – GD). Jaboticabal, 2015.

Parâmetros	GC	GD	Valor de P
ALT (U/L)	34,11 \pm 4,15 ^a	41,65 \pm 5,69 ^a	0,2886
FA ² (U/L)	120,4 \pm 13,35 ^a	64,33 \pm 7,31 ^b	0,0011
Creatinina (mg/dL)	1,11 \pm 0,05 ^a	0,95 \pm 0,04 ^b	0,0230
Ureia (mg/dL)	31,82 \pm 2,80 ^a	36,12 \pm 3,28 ^a	0,3277
PT ² (g/dL)	5,53 \pm 0,14 ^a	7,51 \pm 0,28 ^b	0,0001
Globulinas ² (g/dL)	2,46 \pm 0,15 ^a	5,06 \pm 0,34 ^b	0,0001
Albumina (g/dL)	3,06 \pm 0,09 ^a	2,45 \pm 0,12 ^b	0,0003

* Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$)

1-Valores submetidos ao teste Mann-Whitney para atender aos padrões de homogeneidade das amostras

2- Valores não paramétricos submetidos à correção de *Welch*

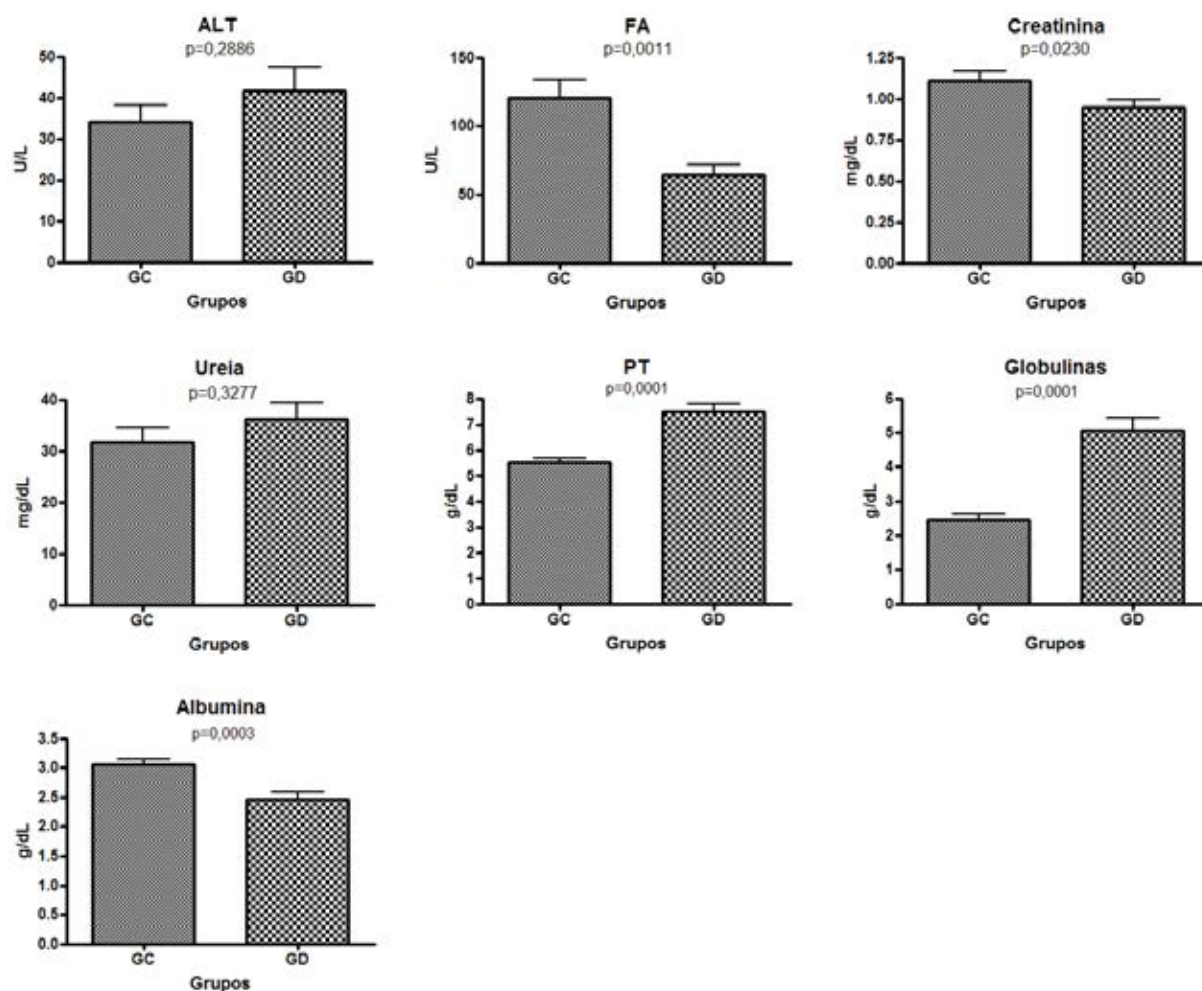


Figura 2. Valores médios da atividade enzimática sérica de alanino aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA) e da concentração sérica de creatinina, ureia, proteína total (PT), globulinas e albumina de cães saudáveis (grupo controle – GC) e de cães com erliquiose na fase subclínica (grupo doente – GD). Jaboticabal, 2015.

A creatinina é originada a partir da creatina dos músculos e por ser excretada por meio da urina, juntamente com a ureia, é um excelente marcador de filtração glomerular (GREENE et al., 2006). A média sérica de creatinina foi significativamente maior nos animais do grupo GC quando comparada a dos cães do grupo GD. Apesar da diminuição na concentração de creatinina sérica, provavelmente não há significância clínica uma vez que os resultados estão dentro valor de normalidade para a espécie canina (Apêndice B). Além disso, não houve diferença significativa entre os animais dos grupos GC e GD em relação à concentração sérica de ureia, ambos os grupos apresentaram a média dentro do intervalo de referência (Apêndice B). Alves (2013) relata ter encontrado média significativamente maior do referido parâmetro nos

cães com erliquiose subclínica quando comparados aos animais saudáveis, resultado que difere do presente estudo. Entretanto, em outro relato, 74% dos animais com erliquiose apresentaram valores médios de concentração sérica de ureia dentro da normalidade (WADDLE; LITTMAN, 1988), confirmando o presente resultado.

Apesar dos animais jovens poderem apresentar concentração sérica de FA elevada (LORENZ, 1996), em 61,12% dos indivíduos jovens do grupo GC, não houve aumento no nível de fosfatase alcalina. Dessa forma, provavelmente essa não é essa causa da leve elevação da concentração de FA em 38,8% dos cães controle, o que provavelmente não apresenta significado clínico em decorrência da proximidade dos resultados e do intervalo de normalidade.

Os animais do grupo GD apresentaram média de proteína total sérica significativamente maior que os cães do grupo GC. Já o grupo de cães doentes, apesar de apresentar média de concentração sérica de PT dentro da normalidade (Apêndice B), possui cinco animais (29,41% do total) com valores acima da normalidade (>7,9 g/dL). A hiperproteinemia é uma alteração comum em todas as fases da EMC (CODNER; FARRIS-SMITH, 1986), e há um estudo afirmando que 30% a 40% dos cães na fase subclínica da erliquiose têm hiperproteinemia (MÉNDEZ, 2004), corroborando o resultado do presente estudo.

A hiperglobulinemia é uma das alterações laboratoriais frequentes em cães na fase subclínica da erliquiose (NELSON; COUTO, 2010) e geralmente é responsável pela hiperproteinemia nestes pacientes (MEYER; HARVEY, 2004) o que corrobora o resultado do presente estudo. Os animais doentes possuem médias de concentração sérica de globulinas acima da normalidade (Apêndice B) e significativamente maior que a média dos cães saudáveis, o que pode ser explicado pelo intenso estímulo antigênico promovido pela bactéria, com consequente gamopatia (BREITSCHWERDT, 2000; VARELLA, 2003).

A hipergamaglobulinemia pode estar relacionada ao quadro de hipoalbuminemia, a qual funciona como um mecanismo compensatório ao aumento da viscosidade sanguínea gerada pela alta concentração de globulinas (SANTARÉM, 2008), o que corrobora os resultados do presente estudo.

5.1.3 Eletroforese

Dentre as análises de eletroforese realizadas com o soro dos cães dos grupos experimentais, a mensuração da transferrina, albumina, IgG de cadeia pesada, alfa1-glicoproteína ácida, IgG de cadeia leve e proteína de peso molecular 23 kDa apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre ambos os grupos, como mostrado na Tabela 3 e Figura 3. Já em relação à concentração de IgA, ceruloplasmina, alfa 1-antitripsina, proteína de peso molecular 44 kDa e haptoglobina, não houve diferença significativa entre os animais de ambos os grupos.

Tabela 3. Estatística descritiva (média \pm erro padrão da média) e valor de P da concentração sérica de IgA, ceruloplasmina, transferrina, albumina, alfa 1-antitripsina, IgG de cadeia pesada, proteína de peso molecular 44 kDa, haptoglobina, alfa 1-glicoproteína ácida (Alfa 1-GA), IgG de cadeia leve e proteína de peso molecular 23 kDa de cães sadios (grupo controle – GC) e de cães com erliquiose na fase subclínica (grupo doente – GD). Jaboticabal, 2015.

Parâmetros	GC	GD	Valor de P
IgA (mg/dL)	15,26 \pm 2,29 ^a	22,83 \pm 3,47 ^a	0,0782
Ceruloplasmina (mg/dL)	30,41 \pm 4,55 ^a	29,94 \pm 6,67 ^a	0,9538
Transferrina ² (mg/dL)	181,4 \pm 20,14 ^a	354,6 \pm 39,10 ^b	0,0007
Albumina ² (mg/dL)	3480 \pm 89,16 ^a	3074 \pm 143,5 ^b	0,0237
Alfa 1- antitripsina (mg/dL)	193,1 \pm 9,15 ^a	183,6 \pm 13,83 ^a	0,5791
IgG cadeia pesada (mg/dL)	801,4 \pm 200,1 ^a	1665 \pm 136,3 ^b	0,0012
44 kDa ² (mg/dL)	13,21 \pm 3,73 ^a	6,75 \pm 1,50 ^a	0,1391
Haptoglobina ² (mg/dL)	40,03 \pm 8,22 ^a	168,5 \pm 43,58 ^b	0,0100
Alfa 1-GA ² (mg/dL)	19,99 \pm 5,41 ^a	67,23 \pm 8,72 ^b	0,0001
IgG cadeia leve (mg/dL)	222,6 \pm 34,33 ^a	1215 \pm 182,4 ^b	0,0001
23 kDa ² (mg/dL)	419,8 \pm 14,12 ^a	537,7 \pm 43,70 ^b	0,0213

* Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$)

1-Valores submetidos ao teste Mann-Whitney para atender aos padrões de homogeneidade das amostras

2- Valores não paramétricos submetidos à correção de *Welch*

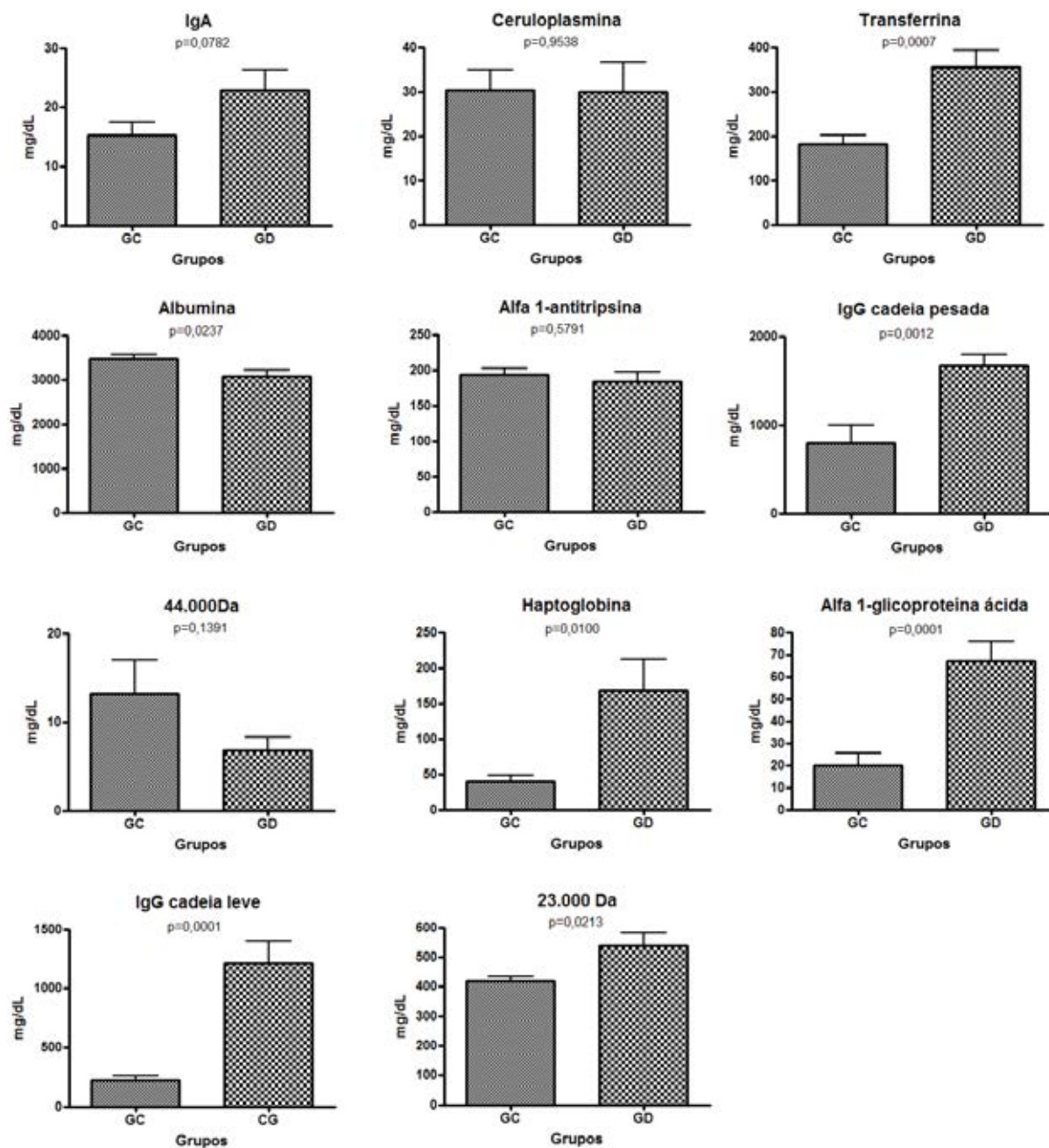


Figura 3. Valores médios da concentração sérica de IgA, ceruloplasmina, transferrina, albumina, alfa 1 – antitripsina, IgG de cadeia pesada, proteína de peso molecular 44 kDa, haptoglobina, alfa 1–glicoproteína ácida, IgG de cadeia leve e proteína de peso molecular 23.000 Da de cães saudáveis (grupo controle – GC) e de cães com erliquiose na fase subclínica (grupo doente – GD). Jaboticabal, 2015.

Alterações seroproteicas em cães com erliquiose são relatos frequentes na literatura (HARRUS et al., 1998; KATAOKA; SANTANA; SEKI, 2006), o que corrobora os resultados deste estudo. O traçado eletroforético sérico dos cães deste estudo

revelou a presença de 24 frações proteicas, sendo que apenas onze foram incluídas nas análises devido a sua importância para o experimento. São elas, IgA (139 kDa), ceruloplasmina (125 kDa), transferrina (79 kDa), albumina (69 kDa), alfa 1-antitripsina (52 kDa), IgG de cadeia pesada (58 kDa), proteína de peso molecular 44.000 Da (44 kDa), haptoglobina (45 kDa), alfa 1-glicoproteína ácida (40 kDa), IgG de cadeia leve (35 kDa) e proteína de peso molecular de 23.000 Da (23 kDa).

A elevação da concentração sérica de ceruloplasmina é um indicador de processo inflamatório, uma vez que se trata de uma PFA positiva (CERÓN; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005) a qual tem seu nível sérico elevado antes mesmo do aparecimento dos sinais clínicos (MUNHOZ et al., 2012). No presente estudo, não houve diferença significativa entre a concentração sérica de ceruloplasmina dos cães dos grupos GD e GC, o que é corroborado por Conner (1988), o qual afirma que tal proteína tem um aumento de sua concentração sérica imediatamente após ocorrer uma injúria, podendo se elevar 1,4 vezes em relação ao seu nível basal e assim permanecer por até nove dias. O estudo de Munhoz (2009), relata uma elevação precoce desta PFA em cães experimentalmente infectados por *E. canis*, entretanto, houve uma queda na concentração de ceruloplasmina após 30 dias de infecção, não havendo mais diferença significativa entre os animais doentes e sadios no período que possivelmente já corresponde a fase subclínica da doença (HARRUS; NEER, 2006) e está de acordo com os resultados deste ensaio, provavelmente pela fase em que se encontram os animais e pela ausência de sinais clínicos.

A transferrina é uma PFA negativa (CERÓN; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005), de modo que sua concentração sérica tende a diminuir conforme a infecção progride. No presente estudo, ocorreu diferença significativa entre os animais sadios e infectados, porém, ao contrário do que relata a literatura, os cães do grupo GD apresentaram níveis séricos maiores desta proteína do que os indivíduos do grupo GC. Entretanto, variações na concentração sérica das PFA frente a uma injúria podem ocorrer (MARTÍNEZ-SUBIELA et al., 2001) e são descritas no ensaio de Munhoz (2009), no qual houve aumento da concentração de transferrina nos cães com erliquiose, assim como neste estudo. Apesar de ser uma PFA negativa, a transferrina pode ter seus níveis séricos alterados por problemas cardíacos e hepáticos,

mudanças no metabolismo do ferro (FUHRMAN; CHARNEY; MUELLER, 2004) e tem sua concentração mais elevada nos cães adultos (PIRES et al., 2011). Entretanto, é mais provável que a elevação do nível sérico de transferrina nos animais do grupo GD seja para contribuir com o mecanismo de defesa do organismo frente a uma injúria infecciosa (MURATA, SHIMADA, YOSHIOKA, 2004).

Houve diferença significativa entre os grupos GD e GC em relação à concentração sérica de albumina. No grupo de animais doentes, os valores da referida PFA mostraram-se significativamente menores que nos cães do grupo GC, resultado que condiz com a literatura, uma vez que se trata de uma PFA negativa (PEREIRA; BURINI, 1992). Além disso, a hipergamaglobulinemia causada pelo forte estímulo antigênico da *E. canis* (VARELLA, 2003) contribui para o quadro de hipoalbuminemia, o qual funciona como um mecanismo compensatório à elevação da viscosidade sanguínea consequente à alta concentração de globulinas (SANTARÉM, 2008; SOUSA et al., 2010). Embora Davoust et al. (1993) tenham relatado que a hipoalbuminemia é comum em animais nas fases aguda e crônica da erliquiose, sendo que na fase subclínica esta alteração não ocorre, existem estudos que encontraram resultados que indicam a diminuição da concentração sérica de albumina em cães na fase subclínica da enfermidade (WADDLE; LITTMAN, 1988; MÉNDEZ, 2004).

A alfa 1-antitripsina é uma PFA que apresenta aumento precoce de sua concentração sérica em quadros infecciosos, porém retorna a seu nível normal muito rapidamente após o estímulo inicial promovido pela injúria (CARAPETO et al. 2006). Estes relatos corroboram o resultado do presente estudo, o qual não revelou diferença significativa entre os animais doentes e saudáveis em relação à alfa 1-antitripsina. Provavelmente, nos cães infectados do grupo GD, por estarem na fase subclínica da doença, a concentração sérica da PFA já havia sido normalizada no momento da coleta, após um aumento ocorrido devido ao estímulo inicial da infecção.

A IgG de cadeia pesada é a imunoglobulina predominante no soro (TIZARD, 2008) e pode ter seu nível sérico aumentado em processos infecciosos (ECKERSALL, 2008). As concentrações séricas de IgG de cadeia pesada e de IgG de cadeia leve mostraram-se significativamente maiores nos animais do grupo GD em relação aos indivíduos do grupo GC. Há relatos de que cães com erliquiose apresentam aumento nos níveis destas PFA na fase aguda da doença, entre o 18º e o 30º dia após o início

da infecção (MUNHOZ et al., 2012). Ou seja, no período provável de ser a transição entre as fases aguda e subclínica (NELSON; COUTO, 2001; HARRUS; NEER, 2006), suposição que concorda com a alta concentração de ambas as frações séricas de IgA, nos cães infectados do presente estudo.

No estudo de Munhoz (2009) não houve diferença significativa entre os animais infectados experimentalmente com *E. canis* e os indivíduos sadios em relação à haptoglobina a partir do 30º dia após a inoculação, período em que os cães possivelmente já estavam no período subclínico da enfermidade (NELSON; COUTO, 2001; HARRUS; NEER, 2006). No presente estudo, houve diferença significativa entre os animais dos grupos GC e GD em relação à referida PFA, entretanto, a haptoglobina, frente a uma injúria tende a aumentar mais tardiamente sua concentração sérica, permanecendo com altos níveis durante várias semanas (MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004; CERÓN; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005), o que pode explicar o fato de os animais com erliquiose deste ensaio, apresentarem alta concentração sérica da proteína em questão, apesar de estarem na fase subclínica da doença.

A alfa 1-glicoproteína ácida apresentou concentração significativamente maior nos animais do grupo GD em relação aos cães do grupo GC. Há relatos de que essa PFA se elevou durante os primeiros 12 dias de infecção experimental por *E. canis*, o que corresponderia a fase aguda da doença, sendo que a partir dos dezoito dias após o início da inoculação não houve mais diferença significativa entre ambos os grupos. Isso significa que na fase subclínica da doença, a concentração da alfa 1-glicoproteína ácida já estava reduzida (MUNHOZ, 2009; MUNHOZ et al., 2012), o que difere do resultado encontrado no presente estudo. Entretanto, os valores de ambos os grupos experimentais, apesar de diferentes significativamente, estavam dentro da normalidade para a espécie canina, a qual varia de 4,0 a 83,3 mg/dL (KURABAYASHI et al., 2003).

Neste estudo houve diferença significativa entre os cães dos grupos GC e GD em relação à proteína de peso molecular 23.000 Da, sendo que a média dos animais doentes para a concentração sérica desta PFA foi maior. Em um estudo realizado em cães experimentalmente infectados com *E. canis*, houve queda inicial no nível da proteína de peso molecular 23.000 Da nos animais doentes, seguida de uma elevação

na concentração da referida proteína, de modo que no 76º dia após a inoculação, período em que os animais provavelmente já estavam na fase subclínica da doença, houve diferença significativa entre ambos os grupos de cães saudáveis e infectados, ocorrendo maior valor de concentração sérica da referida PFA nos animais com erliquiose (MUNHOZ et al., 2012). No presente estudo os cães doentes apresentaram maior nível sérico da proteína de peso molecular 23.000 Da quando comparados com os indivíduos do grupo GC.

5.2 Análises da urina

5.2.1 Bioquímico

A avaliação bioquímica da urina dos cães dos grupos experimentais revelou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos GD e GC, em relação à razão proteína/creatinina urinária (UPC), como mostrado na Tabela 4 e Figura 4. A variável UPC foi obtida a partir da razão entre o valor das concentrações urinárias de proteína total e creatinina.

Tabela 4. Estatística descritiva (média \pm erro padrão da média) da razão proteína/creatinina urinária (UPC) de cães sadios (grupo controle – GC) e de cães com erliquiose na fase subclínica (grupo doente – GD). Jaboticabal, 2015.

Grupos	GC	GD	Valor de P
UPC ^{1, 2}	0,13 \pm 0,02 ^a	0,49 \pm 0,15 ^b	0,016

* Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$)

1-Valores submetidos ao teste Mann-Whitney para atender aos padrões de homogeneidade das amostras

2- Valores não paramétricos submetidos à correção de *Welch*

Tabela 5. Classificação da excreção urinária de proteína, estimada pela razão proteína/creatinina urinária apresentada como número de animais e percentual em relação ao total de cães saudáveis (grupo controle – GC) e de cães com erliquiose na fase subclínica (grupo doente – GD). Jaboticabal, 2015.

UPC	GC (n=18)	GD (n=17)
Não proteinúrico ($\leq 0,2$)	15 (83,33%)	10 (58,82%)
Proteinúria limítrofe (0,2-0,5)	3 (16,66%)	2 (11,76%)
Proteinúria moderada (0,5 \geq 2,0)	-	4 (23,52%)
Proteinúria severa ($>2,0$)	-	1 (5,88%)

* Classificação proposta pela International Renal Interest Society (IRIS, 2009).

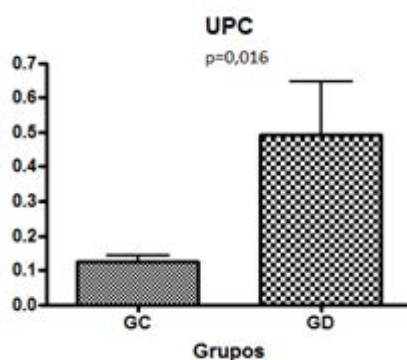


Figura 4. Valores médios da razão proteína/creatinina urinária (UPC) de cães saudáveis (grupo controle – GC) e de cães com erliquiose na fase subclínica (grupo doente – GD). Jaboticabal, 2015.

No presente estudo a comparação da média dos valores de UPC dos animais do grupo GD com a média do grupo GC demonstrou diferença significativa. Os cães saudáveis deste estudo apresentaram média mais baixa de UPC (0,13) a qual está classificada como não proteinúrica ($\leq 0,2$), enquanto que os cães do grupo GD apresentaram, em média, proteinúria limítrofe (0,2-0,5) (IRIS, 2009), como mostrado na Tabela 5. Cães acometidos por *E. canis* podem ter glomerulopatias devido à deposição de imunocomplexos (CODNER et al., 1992) e com consequente proteinúria (FRANK; BREITSCHWERDT, 2002).

Um estudo realizado com cães naturalmente infectados por *E. canis*, na fase subclínica da EMC, revela que houve alteração funcional glomerular nos animais e ocorreu proteinúria em 53% dos cães com erliquiose aguda (ALVES, 2013). Já na fase subclínica, no presente estudo, 41,18% dos animais do grupo GD apresentaram proteinúria.

5.2.2 Urinálise

Não foram registradas diferenças significativas entre os grupos controle e doente em relação aos valores médios obtidos para aspecto, leucócitos, pH urinário, proteínas, hemácias e densidade urinária, como pode ser observado nas Tabelas 6 e 7 e Figura 5.

Tabela 6. Estatística descritiva qui-quadrado referentes ao aspecto, quantidade de leucócitos, valor de pH, quantidade de proteínas e hemácias presentes na urina de cães saudáveis (grupo controle – GC) e de cães com erliquiose na fase subclínica (grupo doente – GD). Jaboticabal, 2015.

Variável	Qui-quadrado observado**	Valor de P*
Aspecto	5,3294	0,0696
Leucócitos	1,0295	0,5977
Ph	0,8721	0,6466
Proteínas	1,432	0,2314
Hemácias	0,5509	0,7592

* Valores de $p > 0,05$ indicam que não houve diferença significativa entre os grupos

**Qui-quadrado tabelado (GL=2, $\alpha=0,05$) = 5,99

Tabela 7. Estatística descritiva (média \pm erro padrão da média) da densidade urinária de cães saudáveis (grupo controle – GC) e de cães com erliquiose na fase subclínica (grupo doente – GD). Jaboticabal, 2015.

Grupos	GC	GD	Valor de P
Densidade^{1, 2}	1,035 \pm 0,0027 ^a	1,050 \pm 0,0157 ^a	0,8689

* Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$)

1-Valores submetidos ao teste Mann-Whitney para atender aos padrões de homogeneidade das amostras

2- Valores não paramétricos submetidos à correção de *Welch*

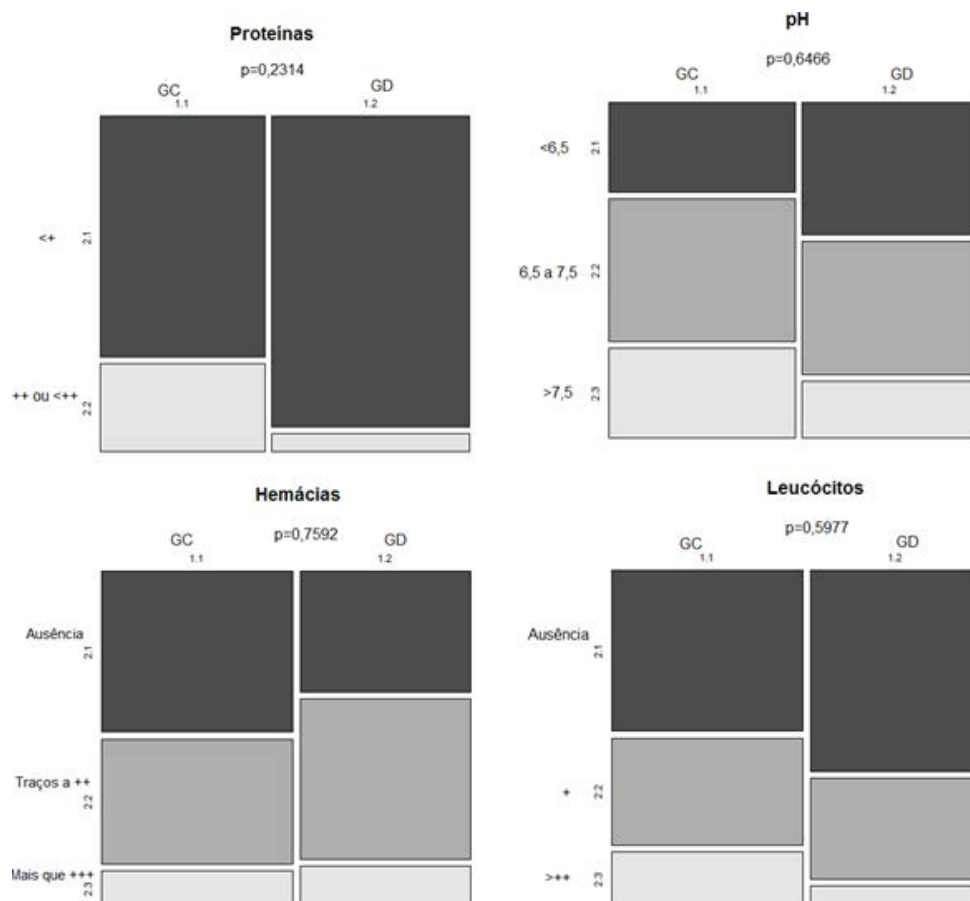


Figura 5. Valores do teste qui-quadrado referentes ao aspecto, quantidade de leucócitos, valor de pH, quantidade de proteínas e hemácias presentes na urina de cães saudáveis (grupo controle – GC) e de cães com erliquiose na fase subclínica (grupo doente – GD). Jaboticabal, 2015.

Os resultados da urinálise não colocaram em evidência diferenças significativas entre os animais dos grupos GD e GC em relação à densidade urinária, sendo que o grupo GD apresentou média acima dos padrões de normalidade para a espécie canina (Apêndice B), o que pode ocorrer devido ao aumento de proteínas urinárias.

A avaliação sedimentoscópica revelou sedimento inativo, assim como no estudo de Alves (2013), embora alguns animais, de ambos os grupos, tenham apresentado pequenas quantidades de células epiteliais transitórias. Como foi um resultado semelhante nos dois grupos, não foi considerado significativo para o presente estudo. Segundo Alves (2013), a densidade e a sedimentoscopia urinárias não são capazes de identificar alterações no comprometimento renal em cães com erliquiose na fase subclínica, quando utilizados de forma isolada.

Não houve diferenças significativas entre os animais dos grupos controle e doente em relação ao aspecto, leucócitos, pH, proteínas e hemácias, à urinálise.

5.2.3 Eletroforese urinária

A eletroforese urinária não revelou diferença significativa ($p < 0,05$) entre animais controle e doentes em relação a todas as frações proteicas evidenciadas no referido traçado eletroforético, como verificado na Tabela 8.

Tabela 8. Frações de proteínas urinárias conforme seu peso molecular (kDa); n = número de animais experimentais que apresentaram a fração proteica observada em cada intervalo conforme o peso molecular; Frequência = porcentagem do aparecimento de cada fração proteica nos cães sadios (grupo controle – GC) e nos cães com erliquiose na fase subclínica (grupo doente – GD). Jaboticabal, 2015.

Frações proteicas (kDa)	N	Frequência		Valor de P
		GC (%)	GD (%)	
10 a 20	6	5,50 (1)	29,41 (5)	0,0880
21 a 30	28	72,22 (13)	88,23 (15)	0,4328
31 a 40	25	61,11 (11)	82,35 (14)	0,4915
41 a 50	24	61,11 (11)	76,47 (13)	0,8421
51 a 60*	30	72,22 (16)	82,35 (14)	0,0420
61 a 70	30	83,33 (15)	88,23 (15)	0,1440
71 a 80	25	83,33 (15)	58,82 (10)	0,7304
81 a 90	10	22,22 (4)	35,29 (6)	0,3671
91 a 100	7	22,22 (4)	17,64 (3)	0,3397
101 a 110*	22	61,11 (11)	64,70 (11)	0,0171
111 a 120	10	33,33 (6)	23,52 (4)	0,0629
121 a 130	3	5,55 (1)	11,76 (2)	0,1645
131 a 140	4	11,11 (2)	11,76 (2)	0,1709
141 a 150	5	11,11 (2)	17,64 (3)	0,6580
151 a 160	5	5,55 (1)	23,52 (4)	0,1770
161 a 170	5	11,11 (2)	17,64 (3)	0,6380
171 a 180	6	22,22 (4)	11,76 (2)	0,3632
>180	10	38,88 (7)	17,64 (3)	0,4212

* Houve diferença significativa entre os grupos GD e GC ($p < 0,05$)

Tabela 9. Frequência de aparecimento das proteínas urinárias de acordo com seu peso molecular (BPM - baixo peso molecular, MPM - médio peso molecular e APM - alto peso molecular); *n* = número de proteínas observadas no grupo controle (GC) e no grupo com erliquiose na fase aguda (GD). Jaboticabal, 2015.

Grupo	n	Frequência (%)		
		BPM (<60 kDa)	MPM (60 a 80 kDa)	APM (> 80 kDa)
GC	174	44,8	23,5	28,1
GD	194	61,8	28	23,7

A eletroforese das proteínas urinárias evidenciou maior número de frações proteicas nas amostras dos cães doentes, 194 frações totais foram detectadas na urina dos 17 cães infectados, em relação aos animais do grupo controle, em que 174 frações totais foram observadas na urina dos 18 cães. Embora sejam números próximos, é possível inferir que a proteinúria foi maior nos cães com erliquiose na fase subclínica, como mostra a Tabela 9.

É possível observar também, na Tabela 8, que o grupo GD revela altas porcentagens de cães apresentando as bandas proteicas de 21 a 30 kDa, 31 a 40 kDa, 41 a 50 kDa, 51 a 60 kDa, 61 a 70 kDa, 71 a 80 kDa e 101 a 110 kDa na urina. As frações de menor peso molecular, como a de 10 a 20 kDa, prevaleceram no eletroforetograma dos animais doentes, 29,41% contra 5,55% de cães saudáveis que apresentaram tal fração, mostrando um provável acometimento tubular nessa fase da doença. As proteínas de baixo peso molecular (<60 kDa) em alta concentração na urina indicam que a proteinúria é consequência de danos tubulares (ZARAGOZA et al., 2003), já que essas proteínas não foram devidamente absorvidas ao longo dos túbulos, conseqüentemente são eliminadas pela urina (SMETS et al., 2010).

Apesar das frações mais pesadas, 171 a 180 kDa e maiores que 180 kDa, não apresentarem diferenças significativas entre grupos, o aumento da UPC em conjunto ao aumento das bandas entre 51 kDa a 60 kDa e 101kDa a 110 kDa, nos cães doentes, indica o acometimento glomerular concomitante (ALMEIDA, 2009).

A fração proteica 61 a 70 kDa, que se refere à albumina (ZARAGOZA et al., 2003), não apresentou diferença significativa entre ambos os grupos. Talvez, esse achado possa ser relacionado ao tipo de glomerulopatia, em que provavelmente não há glomerulopatia seletiva. Desta maneira, a análise do traçado eletroforético urinário

dos animais associada com o resultado da UPC, o qual revela proteinúria limítrofe nos indivíduos doentes, demonstraram que houve lesões renais, tanto em nível glomerular quanto tubular, em cães com erliquiose na fase subclínica, entretanto, mais estudos se fazem necessários para esclarecer e detalhar melhor as referidas lesões.

6. CONCLUSÕES

A UPC nos animais com erliquiose na fase subclínica revelou que houve quadro de proteinúria limítrofe. A densidade e a sedimentoscopia urinárias não foram capazes de identificar alterações no comprometimento renal em cães com erliquiose na fase subclínica, quando utilizados de forma isolada.

Algumas frações proteicas séricas, como transferrina, IgG de cadeia pesada, haptoglobina, alfa 1-glicoproteína ácida, IgG de cadeia leve e proteína de peso molecular 23 kDa estão aumentadas na fase subclínica, porém suas relações com as alterações renais encontradas ainda não são conclusivas, necessitando de estudos adicionais para verificar sua importância clínica.

A análise do traçado eletroforético urinário dos animais experimentais associada com o resultado da UPC, o qual revela proteinúria limítrofe nos indivíduos doentes, demonstram que existem lesões renais, tanto em nível glomerular quanto tubular, em cães com erliquiose na fase subclínica, entretanto, mais estudos se fazem necessários para esclarecer e detalhar melhor as referidas lesões.

7. REFERÊNCIAS

ABINPET - Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação, 2013.

ADRIANZÉN, J. G.; CHAVES, A. V.; CASAS E. A.; LI, O. E. Seroprevalencia de la dirofilariosis y ehrlichiosis canina em tres distritos de Lima. **Revista de Investigaciones Veterinárias del Peru**, Lima, v. 14, n. 1, p. 43-48, 2003.

AGUIAR, D. M. **Aspectos epidemiológicos da erliquiose canina no Brasil**. 2006. 95 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

ALMEIDA, A. O. **Estudo da proteína urinária em cães Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD), através da eletroforese em gel de poliacrilamida, indício de lesão renal precoce?** 2009. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ALMOSNY, N. R. P. **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses**. Rio de Janeiro: L.F. Livros de Veterinária, 2002. 120 p.

ALVES, M. A. M. K. **Erliquiose monocítica canina subclínica, naturalmente adquirida – diagnóstico, aspectos clínico-laboratoriais, envolvimento renal e evolução com tratamento**. 2013. 58 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2013.

ANDRADE, S. F.; SANTARÉM, V. A. Endoparasitocidas e ectoparasitocidas. In: ANDRADE, S. F. **Manual de terapêutica veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2002. p. 437-476.

ATTAELMANNAN, M.; LEVINSON, S. S. Understanding and identifying monoclonal gammopathies. **Clinical Chemistry**, Birmingham, v. 46, n. 8, p. 1230-1238, 2000. pt. 2.

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

BONNARD, P.; DRALEZ. Cas clinique: pancytopenie canine. **Le point Veterinaire**, Maisons-Alfort, v. 22, n. 128, p. 57-62, 1999.

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

BORJESSON, D. L.; KOBAYASHI, S. D.; WHITNEY, A. R.; VOYICH, J. M.; ARGUE, C. M.; DeLEO, F. R. Insights into pathogen immune evasion mechanisms: *Anaplasma phagocytophilum* fails to induce an apoptosis differentiation program in human neutrophils. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 174, n. 10, p. 6364-6372, 2005.

BRANDÃO, L. P. **Envolvimento da resposta imune humoral no desenvolvimento da anemia e das alterações quantitativas e qualitativas das plaquetas na Erliquiose canina experimental**. 2005. 76 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

BREITSCHWERDT, E. B. The rickettsioses. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Textbook of veterinary internal medicine**. 5. ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 2000. 2 v, v.1, cap. 86, p. 400-407.

BREITSCHWERDT, E. B. Ehrlichiosis: a new zoonosis? **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, Princeton Junction, v. 1, n. 24, p. 10-14, 2002.

BUSH, B. M. **Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2004. 384 p.

CARAPETO, M. V.; BARRERA, R.; MAÑE, M. C.; ZARAGOZA, C. Serum α -globulin fraction in horses is related to changes in the acute phase proteins. **Journal of Equine Veterinary Science**, New York, v. 26, n. 3, p. 120-127, 2006.

CARDOSO, L.; MENDAO, C.; CARVALHO, L. M. Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* spp. and *Leishmania infantum* in apparently healthy and CVBD-suspect dogs in Portugal - a national serological study. **Parasites & Vectors**, Londres, v. 5, p. 62, 2012.

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

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

CODNER, E. C.; ROBERTS, R. E.; AINSWORTH, A. G. Atypical findings in 16 cases of canine ehrlichiosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Washington, DC, v. 186, n. 2, p. 166-169, 1985.

CODNER, E. C.; FARRIS-SMITH, L. L. Characterization of the subclinical phase of ehrlichiosis in dogs. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 189, n. 01, p. 47-50, 1986.

CODNER, E. C.; CACECI, T.; SAUNDERS, G. K.; SMITH, C. A.; ROBERTSON, J. L.; MARTIN, R. A.; TROY, G. C. Investigation of glomerular lesions in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 53, n. 12, p. 2286-2291, 1992.

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

CONNER, J. G. Acute phase response in the dog following surgical trauma. **Research in Veterinary Science**, London, v. 45, n. 1, p. 107-110, 1988.

COSTA, J. O.; BATISTA JÚNIOR, J. A.; SILVA, M.; GUIMARÃES, P. M. *Ehrlichia canis* infection in dog in Belo Horizonte, MG., Brazil. **Arquivo da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, v. 25, n. 2, p. 199-200, 1973.

COSTA, H. X. **Interação de hemoparasitoses em casos clínicos de trombocitopenia em cães no município de Goiânia-GO**. 2011. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Escola de Veterinária – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. Inflammation and repair. In: ROBBINS, S. L. **Pathologic basis of disease**. 4th ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1989. p. 39-86.

COUTO, C. G. Doenças Rickettsiais. In: BICHARD, S. J.; SHERDING, R. G. Manual Saunders. **Clínica de Pequenos Animais**. São Paulo: Ed. Roca Ltda, 1998. cap.15, p. 138-142.

CRAY, C.; ZAIAS, J.; ALTMAN, N. H. Acute phase response in animals: a review. **Comparative Medicine**, Memphis, v. 59, n. 6, p. 517-526, 2009.

DAVOUST, B. L. Ehrlichiose canine. **Le point Veterinaire**, Paris, v. 25, n. 151, p. 43-51, 1993.

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

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

ECKERSALL, P. D.; BELL, R. Acute phase proteins: biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. **The Veterinary Journal**, London, v. 185, n. 1, p. 23-27, 2010.

FERNANDES, C. F. **Análise retrospectiva do achado de pico monoclonal em proteinogramas de rotina. Impacto no diagnóstico de gamapatias monoclonais**. 2010. 33 f. Dissertação (Mestrado em Medicina) Faculdade Ciências da Saúde – Universidade da Beira Interior, Covilhã - Portugal, 2010.

FRANK, J. R.; BREITSCHWERDT, E. B. A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from north California and Virginia. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 13, n. 3, p. 194-201, 1999.

FUHRMAN, M. P.; CHARNEY, P.; MUELLER, C. M. Hepatic proteins and nutrition assessment. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v. 104, n. 8, p. 1258-1264, 2004.

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

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

GRAUER, G. F. Early detection of renal damage and disease in dogs and cats. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 35, n. 3, p. 581-596, 2005.

GREENE, C. E.; SYKES, J. F.; BROWN, C. A.; HARTMANN, K. Leptospirosis. In: **Infectious diseases of the dog and cat**. 3 ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2006. p. 402-415.

GREENE, C. E. Ehrlichia and Anaplasma Infections. **Infectious Diseases of the dog and cat**. 4th ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2012. cap. 26, p. 227 – 260.

GREENE, R. T. Canine ehrlichiosis: clinical implications for humoral factors In: BONAGURA, J. D.; KIRK, R. W. **Kirk's current veterinary therapy XII – small animal practice**. Philadelphia: Saunders, 1995. p. 290-293.

HARRUS, S.; WANER, T.; AIZENBERG, I.; FOLEY, J. E.; POLAND, A. M.; BARCK, H. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 1, p. 73-6, 1998.

HARRUS, S.; NEER, T. M. E. Canine monocytotropic ehrlichiosis and neorickettsiosis (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ruminatum*, *N. sennetsu*, and *N. risticii* infections). In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3rd. ed. Philadelphia: Elsevier B. V. Saunders Company, 2006. p. 212-213.

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

HARRUS, S.; WANER, T.; NEER, T. M. Ehrlichia and anaplasma infections. In: GREENE, C. E. (Ed). **Infectious diseases of the dog and cat**. 4. ed. Amsterdam: Elsevier Science Health Science Division, 2012.

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

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

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

IRIS. **Staging of CKD**, 2009. Disponível em: <http://www.iris-kidney.com/guidelines/en/staging_ckd.shtml> Acesso em: 07 abr. 2015.

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

JAIN, S.; GAUTAM, V.; NASEEM, S. Acute-phase proteins: as diagnostic tool. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, New Delhi, v. 3, n.1, p. 118-127, 2011.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5th. ed. San Diego: Academic Press, 1997. 932 p.

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

KYLE, R. A.; THERNEAU, T. M.; RAJKUMAR, S. V.; OFFORD, J. R.; LARSON, D. R.; PLEVAK, M. F. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 354, n. 13, p. 1362-1369, 2006.

KURABAYASHI, T.; SHIMIZU, M.; SHIMADA, T.; HONJYO, T.; YAMAMOTO, Y.; KUBA, K.; YAMAMOTO, S. Alpha 1-acid Glycoprotein (AAG) levels in healthy and pregnant beagles dogs. **Experimental Animals**, Tokyo, v. 52, n. 5, p. 377-381, 2003.

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

LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C. Carrapatos em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 6, n. 30, p. 24-32, 2001.

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

LASSEN, E. D.; WEISER, G. Tecnologia laboratorial em medicina veterinária. In: THRALL, M. A. et al. **Hematologia e bioquímica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007a. cap. 1, p. 376-387.

LASSEN, E. D.; WEISER, G. Avaliação laboratorial das proteínas do plasma e do soro sanguíneo. In: THRALL, M. A. et al. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007b. cap. 26, p. 3-36.

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

LIBERATI, M. N.; ALVARES, A. A. A.; BETTINI, C. M. Eficácia do diagnóstico laboratorial na erliquiose canina. In: ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA, 6., 2009, Maringá. **Anais...** [S.l.: s.n.], 2009.

LIMA, M. A. **Ocorrência de *Ehrlichia canis* spp. no Distrito Federal e suas alterações laboratoriais**. 2013. 30 f. Monografia (Trabalho de Graduação em Medicina Veterinária) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

LINDBACK, S., HELLGREN, U.; JULANDER, J.; HANSSON, L. The value of C-reactive protein as a marker of bacterial infection in patients with septicaemia, endocarditis, and influenza. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, Estocolmo, v. 21, n. 5, p. 543-549, 1989.

LOPES, L. C. **Hemoparasitoses em animais de companhia: erliquiose, babesiose e micoplasmose**. 2013. 103 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) Escola de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real–Portugal, 2013.

LORENZ, M. D. Atraso do crescimento. In: LORENZ, M. D.; CORNELIUS, L. M. (Eds.). **Diagnóstico clínico em pequenos animais**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interlivros, 1996. cap.12, p. 72-77.

MACEDO, A. B.; LEAL, E. R. V. Ehrlichiose canina: estudo retrospectivo e principais achados hematológicos. **Revista Nosso Clínico**, São Paulo, n. 45, p. 30-34, 2005.

MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; TECLES, M. D.; PARRA, J. J.; CERÓN. Proteínas de fase aguda: conceptos básicos y principales aplicaciones clínicas em medicina veterinária. **Anales Veterinaria Murcia**, Murcia, v. 17, p. 97-114, 2001.

McBRIDE, J. W.; WALKER, D. H. Progress and obstacles in vaccine development for the ehrlichioses. **Expert Review of Vaccines**, London, v. 9, n. 9, p. 1071-1082, 2010.

MELO, A. L. T.; MARTINS, T. F.; HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B. Seroprevalence and risk factors to *Ehrlichia* spp. and *Rickettsia* spp. in dogs from the Pantanal Region of Mato Grosso State, Brazil. **Ticks Tick-borne Disease**, Muenchen, v. 2, n. 4, p. 213-218, 2011.

MENDÉZ, C. L. **Evaluación hematológica e inmunofenotípica de la “ehrliquiosis canina”: evolución tras la administración de “dipropionato de imidocarb”**. 2004. 307 f. Tese (Doutorado em Medicina e Cirurgia Animal) – Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 2004.

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

MEYER, D. J.; HARVEY, J. W. Plasma proteins In:_____. **Veterinary Laboratory Medicine Interpretation and Diagnosis**. 3rd. ed. Missouri: Saunders Elsevier Inc., 2004. p. 156-168.

MOYA-ARAUJO, C. F.; BATISTA, G. D. H.; RIBEIRO, M. G.; STURION, T. T.; ARAÚJO, D. C.; ARAÚJO JUNIOR, J. P. Correlação dos achados clínicos e hematológicos com diagnóstico definitivo de erliquiose canina por meio de PCR. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 6, p. 2301-2306, 2012.

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

MUNHOZ, T. D.; FARIA, J. L. M.; HÉRNANDEZ, G. V.; FAGLIARI, J. J.; SANTANA, A. E.; MACHADO, R. Z.; COSTA, M. T. Experimental *Ehrlichia canis* infection changes acute-phase proteins. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 21, n. 3, 2012.

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

NAKAGHI, A. C. H.; LABRUNA, M. B.; MACHADO, R. Z.; TINUCCI-COSTA, M.; ANDRE, M. R.; BALDANI, C. D.; ANDRADE, G. M. Estudo comparativo entre a PCR baseada no gene *dsb* e a nested PCR no diagnóstico da erliquiose canina. In: CONGRESSO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA E I SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETISIOSES, 1., 2004, Ouro Preto. **Anais...** Ouro Preto: Sociedade Brasileira de Parasitologia Veterinária, 2004.

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

NEER, T. M. Canine monocytic granulocytic ehrlichiosis. In: GREENE, C. E. (Ed). **Infectious Disease of the Dog and Cat**. 2nd ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1998. p. 139-147.

NEER, T. M. Efficacy of enrofloxacin for the treatment of experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 13, n. 5, p. 501-504, 1999.

NAOUM, P. C. Proteínas plasmáticas. In: NAOUM, P. C. **Eletroforese – técnicas e diagnóstico**. 2. ed. São Paulo: editora Santos, 1999. cap. 2, p. 13-38.

NELSON, R. W.; COUTO, G. E.; Doenças riquetsianas polissistêmicas. In: NELSON, R. W.; COUTO, G. E. **Medicina interna de pequenos animais**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 1006-1011.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. Doenças Riquetsiais Polissêmicas, 4. ed. São Paulo: Elsevier Editora, 2010. cap. 96, p. 1322 – 1335.

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

OLICHESKI, A. T. **Comparação entre os métodos de coloração panótico rápido e Giemsa para diagnóstico de protozoários do gênero *Babesia* (Starcovici, 1893) e de riquetsias do gênero *Ehrlichia* (Ehrlich, 1888) em cães (*Canis familiaris*) no município de Porto Alegre, RS, Brasil**. 2003. 30 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

PARMAR, C.; PEDNEKAR, R.; JAYRAW, M. G. Comparative diagnostic methods for canine ehrlichiosis. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, Ankara, v. 37, n. 3, p. 282-290, 2013.

PALTRINIERI, S. The feline acute phase reaction. The **Veterinary Journal**, London, v. 177, n. 1, p. 26–35, 2008.

PEREIRA, P. C. M.; BURINI, R. C. Reação metabólica à infecção no hospedeiro. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina**, São Paulo, v. 47, n. 3, p. 111-115, 1992.

PEREZ, P.; BORDOR, M.; ZHANG, C.; RIKIHISA, Y. *Ehrlichia canis* detection in symptomatic humans in Venezuela. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON RICKETTSIAE AND RICKETTSIAL DISEASES, 4, 2005, Logroño, Espanha. **Anais...** Logroño: American Society for Rickettsiae and Rickettsiology, 2005. p. 45.

PETRIE, A.; WATSON, P. Hypothesis tests 1 – The t-Test: Comparing One of Two Means. In:____. **Statistics for veterinary and animal science**. 2nd ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2007. p. 83-94.

PIRES, L. S. A.; DITTRICH, R. L.; SOUZA, A. C. S.; BERTO, M. A. F.; PATRICIO, L. F. L. Parâmetros utilizados na avaliação do metabolismo do ferro em cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 2, p. 272-277, 2011.

RIKIHISA, Y.; YAMAMOTO, S.; KWAK, I.; IQBAL, Z.; KOCIBA, G.; MOTT, J.; CHICHANASIRIWITHAYA, W. C-reactive protein and alfa1-acid glycoprotein levels in dogs infected with *Ehrlichia canis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Whashington, v. 32, n. 4, p. 912-917, 1994.

RIKIHISA, Y. *Ehrlichiae* of Veterinary Importance. In: **Rickettsiae and Tickborne Diseases at the turn of the third Millennium**. Paris: Elsevier, 1999. p. 393-405.

RIKIHISA, Y. *Ehrlichia* Subversion of host innate responses. **Current Opinion in Microbiology**, Kidlington, v. 9, n. 1, p. 95-101, 2006.

RONDELLI, M. C. H. **Avaliação hormonal adrenocortical em cães com infecção natural por *Ehrlichia canis***. 2012. 57f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2012.

SANCHEZ, I. X. B.; SOCARRAS, T. J. O.; SILVA, M. L.; PAREIRA, N. B.; MACHADO, R. Z.; VASCONCELOS, A. C. Apoptose na infecção experimental de cães domésticos com *Ehrlichia canis*. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 8, 2012.

SANTARÉM, V. A. Alterações bioquímicas em cães citopênicos e não citopênicos com ehrlichiose. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 4, p. 845 – 852, 2008.

SANTOS, L. G. F.; MELO, A. L. T.; MORAES-FILHO, J.; WITTER, R.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M. Molecular detection of *Ehrlichia canis* in dogs from the Pantanal of Mato Grosso State, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 22, n. 1, 2013.

SHERDING, R. G. Riquetsiose, erliquiose, anaplasmose e neoriquetsiose. In: BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders, clínica de pequenos animais**. 3. ed. São Paulo: Roca, 2008. cap.17, p.182-189.

SHIMADA, T.; ISHIDA, Y.; SHIMIZU, M.; NOMURA, M. KAWATO, K. IGUCHI, K.; JINBO, T. Monitoring c-reactive protein in beagle dogs experimentally inoculated with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v. 26, n. 3, p. 171-177, 2002.

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

SIARKOU, V. I.; MYLONAKIS, M. E.; BOURTZI-HATZOPOULOU, E.; KOUTINAS, A. F. Sequence and phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene of *Ehrlichia canis* strains in dogs with clinical monocytic ehrlichiosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 125, p. 304-312, 2007.

SILVA, L. S. **Erlíquiose e anaplasnose canina em Teresina, Piauí**. 2010. 92 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2010.

SILVA, M. C. A.; MUNDIM, A. V.; MENDONÇA, G. A.; MUNDIM, M. J. S.; GUIMARÃES, E. C. Hemoparasitos em cães domésticos naturalmente infectados, provenientes das zonas urbana e rural do município de Abadia dos Dourados, Minas Gerais, Brasil. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 2, p. 892-900, 2014.

SMETS, P. M. Y.; MEYER, E.; MADDENS, B. E. J.; DUCHATEAU, L.; DAMINET, S. Urinary markers in healthy young and aged dogs and dogs with chronic kidney disease. **Journal Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 24, n. 1, p. 65-72, 2010.

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

SPICKLER, A. R. **Ehrlichiosis**, 2005. Disponível em: <<http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.php>>. Acesso em 19 abr. 2014.

THOMAS, J. S. Overview of plasma proteins. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott, 2000. cap. 134, p. 891-898.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 5. ed., São Paulo: Roca, 1998. 545 p.

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

THRALL, M. A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. 592 p.

VARELLA, A. S. Tick-born Ehrlichiae and Rickettsiae of dogs. In: BOWMAN, D. D. **Companion and Exotic Animal Parasitology**, 2003. Disponível em: <<http://www.ivis.org>>. Acesso em: 18 mar. 2014.

VIEIRA, R. F. C.; BIONDO, A. W.; GUIMARÃES, A. M. S.; SANTOS, A. P.; SANTOS, R. P.; DUTRA, L. H. Ehrlichiosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 20, n. 1, p. 1-12, 2011.

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

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

WANER, T.; HARRUS, S. Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME). In: CARMICHAEL, L.E. (Ed.) **Recent Advances in Canine Infectious Diseases, International Veterinary Information Service**, 2000. Disponível em: http://www.ivis.org/advances/Infect_Dis_Carmichael/waner/ivis.pdf Acesso em: 04 abr. 2014.

WANER, T.; HARRUS, S.; BARK, H.; BOGIN, E.; AVIDAR, Y.; KEYSARY, A. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 69, n. 3-4, p. 307-317, 1997.

WERNER, L. L.; TURNWALD, G. H. Immunologic and plasma protein disorders. In: WILLARD, M. D.; TVEDTEN, H.; TURNWALD, G. H. **Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods**. 3rd ed., Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1999. cap. 12, p. 248-264.

WIDMER, C. E.; AZEVEDO, F. C.; ALMEIDA, A. P.; FERREIRA, F.; LABRUNA, M. B. Tickborne bacteria in free-living jaguars (*Panthera onca*) in Pantanal, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, New York, v. 11, n. 8, p. 1001-1005, 2011.

WITTER, R.; VECCHI, N. S.; PACHECO, T. A.; MELO, A. L. T.; BORSA, A.; SINKOC, A. L.; MENDONÇA, A. J.; AGUIAR, D. M. Prevalência da erliquiose monocítica canina e anaplasmose trombocítica em cães suspeitos de hemoparasitose em Cuiabá, Mato Grosso. **Revista Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 6, 2013.

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

APÊNDICES

APÊNDICE A. Valores de referência para o hemograma canino.

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

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

Fonte: Laboratório de Patologia Clínica Veterinária “Professor Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto” do HVGLN, FCAV/UNESP – Câmpus de Jaboticabal, SP.

APÊNDICE B. Valores bioquímicos de referência para a espécie canina.

Tabela 1B. Parâmetros bioquímicos de referência para a espécie canina.

PARÂMETROS	VALORES DE REFERÊNCIA
Creatinina (mg/dL)	0,5 – 1,5
Ureia (mg/dL)	15 – 65
ALT (U/L)	10 – 88
Fosfatase Alcalina (U/L)	20 – 150
Proteína Total (g/dL)	5,8 – 7,9
Albumina (g/dL)	2,6 – 4,0
Globulina (g/dL)	2,7 – 4,4

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

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

Parâmetros	Valores
Densidade urinária específica (DEU)	1,020 – 1,045

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

APÊNDICE C. Animais experimentais.

Tabela 1C. Dados referentes à idade, sexo e raça dos cães saudáveis (grupo controle – GC) e nos cães com erliquiose na fase subclínica (grupo doente – GD). Jaboticabal, 2015.

Grupo	Nome	Idade	Sexo	Raça
GC	Tchutchuquinha	7 m	Fêmea	SRD
GC	Sadan	7 m	Macho	SRD
GC	Bareta	8 m	Macho	SRD
GC	Pantera	3 a	Fêmea	Fila Brasileiro
GC	Poli	8 m	Fêmea	SRD
GC	Dark	8 m	Macho	SRD
GC	Lobo	9 m	Macho	Pastor Alemão
GC	Kapucho	7 m	Macho	SRD
GC	Mel	9 m	Fêmea	SRD

GC	Nina	9 m	Fêmea	SRD
GC	Lola	6 m	Fêmea	SRD
GC	Pepita	10 m	Fêmea	SRD
GC	Snoop	10 m	Macho	SRD
GC	Thor	12 m	Macho	Poodle
GC	Simba	12 m	Macho	SRD
GC	Ted	13 m	Macho	SRD
GC	Thor	7 m	Macho	SRD
GC	Ursão	8 m	Macho	SRD
GD	Aiko	12 m	Macho	Dachshund
GD	Neymar	3 a	Macho	Dachshund
GD	S/N	3 a	Macho	Poodle
GD	Cuca	6 m	Fêmea	SRD
GD	Viviane	2 a	Fêmea	Poodle
GD	Duda	6 a	Fêmea	Poodle
GD	July	7 m	Fêmea	Cocker
GD	Pandora	9 m	Fêmea	Boxer

GD	Perola	11 m	Fêmea	SRD
GD	Xulica	12 m	Fêmea	Boxer
GD	Tila	10 m	Fêmea	Rottweiler
GD	Natasha	10 m	Fêmea	SRD
GD	Jully	2 a	Fêmea	Poodle
GD	Pedrita	12 m	Fêmea	SRD
GD	Lupi	18 m	Macho	SRD
GD	Mimi	6 m	Fêmea	Poodle
GD	Pretinho	7 m	Fêmea	SRD

APÊNDICE D. Soluções empregadas na eletroforese (SDS-PAGE)

TRIZ HCL – 2,0 M – Ph 8,9 (GEL DE CORRIDA)

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

Completar para 500 mL com água deionizada

Acertar para pH 8,9

Filtrar a solução e guardar em geladeira

TRIZ HCL 0,617 M (GEL EMPILHADOR)

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

Completar para 100 mL com água deionizada

Acertar pH 6,8

Filtrar solução e guardar em geladeira

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

Acrilamida para eletroforese Sigma (PM: 71,08).....73,00g
 N,N-metileno-bis-acrilamida para eletroforese Sigma.....2,00g
 Completar para 250 mL com água deionizada (aquecer se necessário)

EDTA 0,5M

(Etilenodinitrilo) ácido tetracético tetrassódico(PM: 380,20).....19,01g
 Completar para 100 mL com água deionizada
 Acertar pH 8,3

LAURIL SULFATO DE SÓDIO (SDS) 10%

Lauril sulfato de sódio Sigma (PM: 288,4).....10,00g
 Completar para 100 mL com água deionizada

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

Metanol.....500mL
 Ácido acético.....100mL
 Água bidestilada.....400mL
 Comassie blue (Brilliant blue R).....2g
 Deixar em repouso durante 2 horas e filtrar

GEL MIX (TAMPÃO DA AMOSTRA PARA PROTEÍNAS DESNATURADAS)

Lauril sulfato de sódio 10%.....10,0mL
 EDTA 0,5M.....4,0mL
 Triz-fosfato 0,617 M, pH 6,8.....5,0mL
 Mercaptoetanol.....3,0mL
 Glicerol.....10,0mL
 Água deionizada.....18,0mL
 Azul de bromofenol (Bromphenol Blue).....5,0mg

Separar em frações de uso (450 ou 900 μL) – manter no freezer até o momento do uso

PERSULFATO DE AMÔNIA 10%

Persulfato de amônia.....0,1g

Água deionizada.....1,0mL

Preparar no momento da confecção do gel

PREPARAÇÃO DAS ALÍQUOTAS DO MARKER E DAS PROTEÍNAS PURIFICADAS

8 μL de marker

2 μL de gel mix

Congelar até o momento do fracionamento (ou preparar na hora do uso)

PBS – CÁLCIO FREE (TAMPÃO FOSFATO SALINA)

NaCl.....2,0g

KCl.....0,0625g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$0,2875g

KH_2PO_40,050g

Completar para 250 mL com água deionizada

Ajustar pH para 7,2 – conservar em geladeira

DESCORANTE

Metanol.....250,0mL

Ácido acético.....100,0mL

Completar para 1000 mL com água destilada

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

TAMPÃO DE CORRIDA CONCENTRADO (10x)

Trizma Base.....63,2g

Glicina.....39,9g

SDS.....10g

Completar para 1000 mL com água destilada

Obs: para uso na corrida usar tampão de corrida diluído

TAMPÃO DE CORRIDA DILUÍDO (tampão de uso na cuba)

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