

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CAMPUS DE BOTUCATU

**ESTUDO CITOLÓGICO DA MEDULA ÓSSEA DE CÃES PORTADORES DE
EHRlichiose MONOCÍTICA CANINA NA FASE AGUDA**

MARÍLIA SALGADO CAXITO

Botucatu – SP

Fevereiro, 2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CAMPUS DE BOTUCATU

**ESTUDO CITOLÓGICO DA MEDULA ÓSSEA DE CÃES PORTADORES DE
EHRlichiose monocítica canina na fase aguda**

MARÍLIA SALGADO CAXITO

Dissertação apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
na FMVZ – UNESP para obtenção do título
de Mestre.

Orientador: Prof. Adj. Antônio Carlos Paes

Coorientadora: Prof. Adj. Regina Kiomi Takahira

Botucatu – SP

Fevereiro, 2017

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

Caxito, Marília Salgado.

Estudo citológico da medula óssea de cães portadores de Ehrlichiose Monocítica Canina / Marília Salgado Caxito. - Botucatu, 2017

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

Orientador: Antônio Carlos Paes

Coorientador: Regina Kiomi

Takahira Capes: 50502034

1. Cães - Doenças. 2. Erliquiose. 3. Medula óssea - Doenças - Diagnóstico citológico. 4. Mielograma. 5. Hematopoiese.

Palavras-chave: Células precursoras; Ehrlichia canis; Hematopoiese; Mielograma; Resposta humoral.

Nome do Autor: Marília Salgado Caxito

Título: ESTUDO CITOLÓGICO DA MEDULA ÓSSEA DE CÃES PORTADORES
DE EHRLICHIOSE MONOCÍTICA CANINA NA FASE AGUDA.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Adj. Antônio Carlos Paes
Presidente e Orientador
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Adj. Márcio Garcia Ribeiro
Membro
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Rogério Giuffrida
Membro
UNOESTE – Presidente Prudente

Prof^a. Tit. Jane Megid

Suplente

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Adj. Daniel Moura de Aguiar

Suplente

Departamento de Clínica Veterinária

FAMEVZ – UFMT – Cuiabá

Data: 17 de fevereiro de 2017.

*Àquela que sempre acreditou em mim mais do que eu mesma.
Que segurava a minha mão até que eu dormisse
e, 27 anos depois, ainda não soltou!
À mulher que sempre me falou que eu poderia ser quem eu quisesse,
sem saber que eu só queria ser como ela.*

Dedico este trabalho à minha mãezinha!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e Nossa Senhora das Graças por mais uma vitória conquistada! “Pra quem não acredita, provas nunca serão suficientes. Mas, pra quem acredita, provas nunca serão necessárias”.

Mãezinha, sempre nos disseram que não podíamos ser “melhores amigas” porque já éramos “mãe e filha”. Obrigada por me ajudar a provar que estavam errados!

À Tia Gêra, por ser tão presente e ocupar um lugar especial no meu coração. À toda Família Salgado, meu alicerce, graças a vocês eu tenho meu lugar preferido no mundo: minha querida São Romão (porque 1200Km não são nada pra quem sente saudades)!

Professor Paes, antes de orientador, meu amigo querido. Que me ensinou a ter confiança em mim mesma. Apesar de pegar tanto no meu pé durante a residência (não adianta negar) e de me tirar do sério algumas vezes, sempre esteve disposto a me ajudar a resolver os problemas [acadêmicos ou não]. Obrigada por me fazer ser cada dia mais apaixonada pelas Doenças Infecciosas.

Agradeço ao Professor Daniel e a todos do Laboratório de Virologia e Rickettsioses, UFMT. Mesmo sem me conhecerem, sempre estiveram prontos a me ajudar.

Professora Regina, obrigada por me deixar invadir a sua sala sempre que eu tinha alguma dúvida! Espero poder aprender sempre mais com você.

Aos meus queridos amigos Residentes do MI! Obrigada por me acolherem sempre e me fazerem ainda me sentir parte da família MI: Joyce (Bigols), Mariana (Ródo), Luciana (Mini), André (Dedézinho), Fábio (Boçô), Bruna (Trans) e Carol (Xupa).

À minha Residente do MI preferida (que deve estar com taquicardia porque ainda não leu o nome dela, mas fiz de propósito): Lucieny (Lucylene, Lucycreide, Lucy, Kval ou apenas Lu)! Obrigada por ser a melhor irmã que eu poderia escolher (e que ainda por cima é parecida comigo!). Obrigada por todos os “breaks” pra procurar novas músicas latinas ou pra assistir Mulheres Ricas!

À todos os Residentes do Laboratório Clínico, em especial, à Fernanda que foi minha parceira nesses dois anos. Era pra ser só trabalho, mas você colocou diversão e boas risadas, mesmo quando queria acordar os cães da anestesia!

Professor Márcio, obrigada por estar sempre à disposição para me ajudar, mesmo não sendo sua orientada. Agradeço pelas conversas e conselhos, mas principalmente pela amizade.

Professora Jane, obrigada por todos esses anos de amizade e pelos momentos de risada e descontração (mesmo que rapidinho na hora do café!). Agradeço todo o carinho que demonstra ter por mim!

Ao Professor Rogério Giuffrida por aceitar prontamente a participar da minha banca avaliadora para engrandecer mais ainda este trabalho com suas contribuições.

Júlio, obrigada por ser uma das pessoas mais incríveis que eu já conheci. Obrigada por todos os dias de companheirismo, mesmo com o Atlântico entre nós. Por aguentar meus dias de mau humor e me ajudar quando eu pensei em desistir! Espero um dia poder retribuir tudo o que faz por mim.

Aos amigos da PG: Carol Lechinski, companheira de residência, pós-graduação, festas ou maquiagens, por sempre me ajudar nos meus momentos de desespero! Camila “cachórros” (e à Dona Mari), por me acompanhar mesmo que seja pra ir aonde “Vai-quem-quer”! Shayra, pelas conversas na porta de casa e “selfies” pós-espetáculo! Mayra (Gralha), pelas viagens e visitas de porta em porta em busca do n=18! Vivian, por me ajudar a entender como funciona o sistema! Maurício (Errante), pelas músicas “desconhecidas” durante as escritas intermináveis!

À minha República [Shakira] TNT, por TODOS os momentos “de leve” e por me acompanharem nessa trajetória, compreendendo a minha ausência, mas fazendo questão da minha presença! Mulheres maduras: Fernanda (Kaga), Angélica (Moskita) e Arlene (Gertrudes), vocês são as melhores em tudo!

Agradeço à FMVZ – UNESP/Botucatu e a todos os professores que fizeram e fazem parte da minha formação. Por formarem não apenas Médicos Veterinários, mas pessoas que se preocupam com o mundo em que vivem. Sou muito feliz por ser aqui, a minha casa!

A todos que de alguma forma contribuíram pra que eu pudesse realizar esse sonho e por me incentivarem a chegar cada vez mais longe!

*“Não basta saber, é preciso aplicar. Não
basta querer, é preciso também agir”*

Johann Goethe

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Achados citomorfológicos em esfregaços sanguíneos de cães com Ehrlichiose Monocítica Canina aguda expressos em porcentagem (%). Botucatu, SP, 2016. 33

Tabela 2- Resultados moleculares e microbiológicos das amostras de sangue e medula óssea de cães com Ehrlichiose Monocítica Canina aguda. Botucatu, SP, 2016. 36

Tabela 3- Títulos de anticorpos anti-*E. canis* de cães com Ehrlichiose Monocítica Canina aguda. Botucatu, SP, 2016..... 40

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Avaliação citológica da medula óssea de cães com Ehrlichiose Monocítica Canina aguda. Botucatu, SP, 2016.....	35
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Colheita de medula por punção aspirativa. A: punção da extremidade proximal do úmero. B: aspiração do material medular por pressão negativa com seringa descartável de bico liso lateral (<i>luer slip</i>) de 20 mL. Botucatu, SP, 2016.....	24
Figura 2- Material utilizado para punção aspirativa de medula óssea e preparo de lâminas. Botucatu, SP, 2016.	24
Figura 3- Processo de isolamento de leucócitos utilizando Histopaque 1083 (Sigma Diagnostics, St. Luis, Mo) para posterior inoculação em monocamadas de células DH82. Cuiabá, MT, 2016.	27
Figura 4- Alterações clínicas de cães com Ehrlichiose Monocítica Canina aguda. Botucatu, SP, 2016.....	31
Figura 5- Distribuição dos valores plaquetários em cães com Ehrlichiose Monocítica Canina aguda. Botucatu, SP, 2016.....	32
Figura 6- A: Hiperplasia eritróide na medula óssea de cães com Ehrlichiose Monocítica Canina aguda. B: Hiperplasia megacariocítica na medula óssea de cães com Ehrlichiose Monocítica Canina aguda. Botucatu, SP, 2016. Coloração panótico (aumento de 100x).	34

Figura 7- Amostras de medula óssea de cães com Ehrlichiose Monocítica Canina aguda apresentando (setas): Eritrofagocitose (A e B) e Mórula de *E. canis* (C) Botucatu, SP, 2016. Coloração panótico (aumento de 100x). 34

Figura 8- Comparação entre cães com medula óssea positiva e negativa em relação a alterações sanguíneas frequentes na Ehrlichiose Monocítica Canina aguda. Botucatu, SP, 2016. 37

Figura 9- Comparação entre indicadores de anemia e a positividade da medula óssea em cães com Ehrlichiose Monocítica Canina. Botucatu, SP, 2016. 37

Figura 10- Relação entre aumento ou diminuição da série eritróide e da relação M:E em relação à positividade da medula óssea na PCR. Botucatu, SP, 2016. 38

Figura 11- Relação entre alterações medulares e positividade da medula óssea na PCR. Botucatu, SP, 2016. 39

Figura 12- Comparação entre título sorológico e parâmetros sanguíneos em cães com Ehrlichiose Monocítica Canina. Botucatu, SP, 2016. 41

Figura 13- Relação entre títulos sorológicos e alterações medulares em cães com Ehrlichiose Monocítica Canina aguda. Botucatu, SP, 2016. 42

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUÇÃO.....	4
2. REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1. Etiopatogenia.....	6
2.2. Manifestações clínicas e hematológicas.....	7
2.2.1. Fase aguda.....	8
2.2.2. Fase assintomática (subclínica)	8
2.2.3. Fase crônica	8
2.2.4. Patogenia da trombocitopenia na fase aguda.....	9
2.3. Alterações medulares na EMC aguda	10
2.4. Alterações medulares na EMC crônica	12
2.5. Diagnóstico da EMC	13
3. HIPÓTESES DE ESTUDO.....	17
4. OBJETIVOS.....	19
4.1. Geral.....	19
4.2. Específicos	19
5. MATERIAL e MÉTODOS	21
5.1. Delineamento experimental	21
5.2. Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	21
5.3. Animais	21
5.4. Análises laboratoriais	22
5.4.1. Hemograma e bioquímica sérica.....	22
5.4.2. Mielograma.....	23

5.4.3.	Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)	25
5.4.4.	Cultivo celular.....	26
5.4.5.	Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	28
5.5.	Análise estatística.....	28
6.	RESULTADOS	31
6.1.	Avaliação clínica dos cães amostrados	31
6.2.	Alterações hematológicas e bioquímicas de cães com EMC aguda	32
6.3.	Alterações medulares observadas nos cães com EMC aguda	33
6.4.	Presença de <i>E. canis</i> na medula óssea de cães com EMC aguda.....	36
6.5.	Relação entre a presença de <i>E. canis</i> em amostras de medula óssea e parâmetros sanguíneos e medulares	37
6.6.	Relação entre o título de anti- <i>E. canis</i> em cães naturalmente infectados e parâmetros sanguíneos e medulares	39
7.	DISCUSSÃO	44
8.	LIMITAÇÕES.....	52
9.	CONCLUSÕES	55
10.	AGRADECIMENTOS	56
11.	REFERÊNCIAS.....	58
	ANEXOS	65

CAXITO, M. S. **ESTUDO CITOLÓGICO DA MEDULA ÓSSEA DE CÃES PORTADORES DE EHRLICHIOSE MONOCÍTICA CANINA NA FASE AGUDA**. Botucatu, 2016. 85 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

A Ehrlichiose Monocítica Canina (EMC), causada por *Ehrlichia canis*, destaca-se dentre as hemoparasitoses de cães. A EMC causa doença multissistêmica e pode ser classificada em fase aguda, subclínica ou crônica. A fase crônica caracteriza-se por hipoplasia/aplasia medular e muitos cães vêm a óbito por falência medular, embora as causas da supressão medular ainda sejam indefinidas. Neste estudo, foi investigado se a fase crônica resulta de alterações medulares iniciadas na fase aguda. Em particular, verificar se, durante a fase aguda, células precursoras podem ser parasitadas por *E. canis* e se processos imunomediados podem ser responsáveis por alterações hematológicas durante o curso da doença. Dezoito cães com EMC na fase aguda foram submetidos a exames hematológicos (hemograma, bioquímica sérica e mielograma) e sorológicos. A presença de *E. canis* foi confirmada mediante PCR e cultivo celular. A citologia de medula óssea revelou alterações principalmente na série eritróide que comumente estão associadas a doenças imunomediadas, inclusive em animais não anêmicos. Também confirmou-se a presença de *E. canis* na medula óssea de 11/18 cães e certa tendência entre a positividade das amostras medulares e a série eritróide, embora sem significância estatística. Os títulos sorológicos de 2560 em 9/18 e 10240 nos demais confirmou a resposta humoral exacerbada descrita pela literatura, contudo também sem relação significativa com a presença de *E. canis* na medula e algumas variáveis medulares. Este estudo evidenciou a importância do mielograma na EMC, inclusive para prever alterações hematológicas em cães com hemograma normal.

Palavras-chave: *Ehrlichia canis*, mielograma, resposta humoral, hematopoiese, células precursoras, processo imunomediado.

CAXITO, M. S. **CYTOLOGICAL STUDY OF BONE MARROW IN DOGS INFECTED WITH CANINE MONOCYTIC EHRLICHIOSIS DURING THE ACUTE PHASE**. Botucatu, 2016. 85 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

ABSTRACT

The Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME), caused by *Ehrlichia canis*, one of the most frequent hemoparasites dogs. CME causes multisystemic disease and includes a acute, subclinical or chronic phase. The chronic phase is characterized by medullary hypoplasia/aplasia and many dogs die from bone marrow failure. However, the causes of medullary suppression remain unknown. In this study, we investigated whether the chronic phase can result from marrow changes initiated during the acute phase. In particular, we evaluated if precursor cells can be parasitized by *E. canis* during the acute phase and whether immune-mediated processes are responsible for hematological changes during the course of the disease. Eighteen dogs with CME in the acute phase were submitted to hematological (hemogram, serum biochemistry and myelogram) and serological tests. The presence of *E. canis* was confirmed by PCR and cell culture. Bone marrow cytology analyses mainly revealed changes in the erythroid series that are usually associated with immune-mediated diseases, including in non-anemic animals. This study confirmed the presence of *E. canis* in the bone marrow of the 11/18 dogs and a potential positive relation between the positivity of the marrow samples and the erythroid series was observed, although without statistical significance. The serological titers of 2560 in 9/18 and 10240 in the others confirmed an exacerbated humoral response to CME described in the literature, but they were not associated with the presence of *E. canis* in the bone marrow and medullary alterations. This study evidenced the importance of the myelogram, as well predicting hematological alterations in dogs with normal hemogram.

Keywords: *Ehrlichia canis*, myelogram, humoral response, hematopoiesis, precursor cells, immune-mediated process.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A Ehrlichiose Monocítica Canina (EMC) é considerada uma das hemoparasitoses mais frequentes na rotina de Médicos Veterinários (VIEIRA et al., 2011). A EMC é altamente endêmica no Brasil e no mundo todo (com exceção da Austrália). No Brasil, estima-se que cerca de 20% dos cães atendidos em clínicas e hospitais veterinários apresentam a doença (LABARTHE et al., 2003). Atualmente, inquéritos soroepidemiológicos exibem valores que variam entre 35 e 50% a ocorrência de cães sororreagentes para *Ehrlichia* spp (VIEIRA et al., 2011; SANTARÉM e AGUIAR, 2016).

A maioria dos clínicos veterinários foca apenas nos achados hematológicos para o diagnóstico da enfermidade. Contudo, o processo imunológico da EMC permanece desconhecido e resulta em alterações além das observadas nos exames hematológicos. Por exemplo, ampla gama de eventos patológicos está relacionada, não só com a presença de antígenos, mas também com a deposição de imunocomplexos e processos imunomeditados anormais (HARRUS et al., 1996). Outra característica importante da EMC é se apresentar em três fases classificadas em aguda, subclínica (assintomática) e crônica (SANTARÉM e AGUIAR, 2016). A duração da fase crônica é variável e muitos cães acometidos nessa fase evoluem para morte mesmo depois do tratamento recomendado. Até o momento, os processos responsáveis pela evolução para a fase crônica não estão esclarecidos, por isso, é indispensável identificar os mecanismos e processos imunológicos da doença.

Embora ainda não esteja totalmente elucidado, existem fortes indícios de que alterações patológicas encontradas nos cães acometidos pela doença crônica possam ser consequências de lesões na fase aguda da enfermidade. Este trabalho tem o intuito de identificar alterações medulares na fase aguda para melhor compreensão da patogenia da supressão e/ou destruição da medula óssea na fase crônica. Além disso, pretende-se esclarecer fatores que levam à hipoplasia/aplasia medular nos cães. Entender a etiologia das lesões observadas na fase crônica pode melhorar as taxas de cura dos tratamentos e, por conseguinte, o prognóstico dos animais gravemente acometidos.

***REVISÃO DE
LITERATURA***

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Etiopatogenia

Descrita pela primeira vez em 1935 por Donatien e Lestoquard, *Ehrlichia canis* (*E. canis*) foi primeiramente nomeada como *Rickettsia canis*. Somente na década de 1960 recebeu maior atenção da comunidade científica quando aproximadamente 300 cães militares do Exército Americano foram a óbito na guerra do Vietnã em razão de uma enfermidade desconhecida que cursava com síndrome hemorrágica fatal (HUXSOLL et al., 1970, 1976; BUHLES Jr et al., 1975; HARRUS et al., 2015; SANTARÉM e AGUIAR, 2016).

A EMC é causada por bactérias gram-negativas e pleomórficas. Por ser um parasita intracelular obrigatório é considerada uma α -proteobactéria, organismo intermediário entre vírus e bactérias e, portanto, não se multiplica fora de células. O agente etiológico invade células do sistema fagocítico mononuclear e, após multiplicar-se por fissão binária, se dissemina pelo organismo do hospedeiro. A infecção do agente nas células mononucleares esplênicas pode durar de meses a anos. Evidências suportam maior persistência de organismos vivos em macrófagos de baço do que em monócitos do sangue. O baço é o último órgão de eliminação de *E. canis* durante a recuperação devido a habilidade da bactéria de se ocultar em macrófagos esplênicos, evadindo-se da resposta imune. A presença prolongada do agente no baço durante o tratamento pode refletir a presença de maior número de micro-organismos quando comparado ao sangue periférico (HARRUS et al., 1998, 2004, 2015; WANER e HARRUS, 2013; SANTARÉM e AGUIAR, 2016).

A transmissão do patógeno ocorre pela picada do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* ao realizar o repasto sanguíneo em cães acometidos e, posteriormente, em animais hígidos. O vetor não necessita de muito tempo para transmitir a infecção. Estudos recentes comprovaram que apenas três horas de fixação são suficientes para os animais parasitados se tornarem infectados. Embora a infecção em áreas rurais esteja presente, cães que residem em ambiente urbanizado são os mais acometidos posto que, populações do carrapato vetor são mais abundantes nessas regiões (AGUIAR et al., 2007; UENO et al., 2009; SAINZ et al., 2015).

O sistema imune do hospedeiro está relacionado com a patogenia da EMC, contudo ainda não é bem elucidado as alterações imunológicas contra o agente. Durante a fase aguda da doença há atividade hiperplásica dos linfócitos T e, de forma exagerada, dos linfócitos B. Os títulos médios de anticorpos permanecem elevados por meses a anos mesmo após a eliminação total do organismo. As células B se diferenciam em plasmócitos que segregam γ -globulinas e o acúmulo de células linfóides e plasmocitose generalizada são alterações comumente observadas nos cães infectados. A hipergamaglobulinemia é um achado comum em cães portadores de EMC na fase aguda e indica resposta humoral exacerbada associada à patogênese da enfermidade (IQBAL et al., 1994; HARRUS et. al, 1998, 2004; WANER e HARRUS, 2013).

O efeito deletério da resposta imunomediada da doença é observado em estudo que comparou os efeitos da infecção experimental por *E. canis* em cães esplenectomizados com animais que não sofreram a remoção cirúrgica do baço. A esplenomegalia na fase aguda é não-congestiva e há proliferação de linfócitos e plasmócitos nas polpas branca e vermelha. Apesar de todos os animais desenvolverem títulos de anticorpos na mesma intensidade e mesmo espaço de tempo, cães esplenectomizados apresentam alterações clínicas discretas, provavelmente devido à remoção de um dos principais órgãos de colonização do patógeno (HARRUS et al., 1998, 2004; WANER, 2008; WANER e HARRUS, 2013).

2.2. Manifestações clínicas e hematológicas

Os principais sinais clínicos observados nos canídeos acometidos por *E. canis* são inespecíficos e a intensidade das alterações varia entre animais, além de estar relacionada com a fase da doença que pode ser classificada em aguda, subclínica (assintomática) ou crônica (HARRUS et al., 1996, 1998, 2015; SANTARÉM e AGUIAR, 2016). O diagnóstico precoce com a identificação correta da fase da infecção e rápida instituição do tratamento são fundamentais para evitar alta letalidade nos cães.

2.2.1. Fase aguda

Apatia, anorexia, linfadenomegalia, evidente hepatoesplenomegalia, perda de peso, descargas nasais e oculares, além de febre são alterações comumente observadas na fase aguda da infecção. As alterações no sangue periférico são observadas entre 5 e 18 dias pós-infecção (PI) e exames complementares como o hemograma são indispensáveis para a correta identificação da EMC. Em média, 10 dias PI já são suficientes para o estabelecimento de trombocitopenia moderada a intensa (HARRUS et al., 1996, 2004, 2015; CASTRO et al., 2004; HESS et al., 2006; WANER e HARRUS, 2013; SANTARÉM e AGUIAR, 2016).

2.2.2. Fase assintomática (subclínica)

Cães não tratados ou tratados de maneira inadequada tendem a evoluir para a fase assintomática. As alterações hematológicas nessa fase geralmente se manifestam de forma branda com trombocitopenia e leucopenia discretas. A fase subclínica também merece destaque na epidemiologia. Estudos com cães experimentalmente infectados apresentando a enfermidade na fase subclínica demonstraram que o sangue desses animais é infectante. Portanto, os casos de infecção subclínica não devem ser negligenciados e o tratamento também precisa ser rapidamente instituído nesta fase (HUXSOLL, 1976; HARRUS et. al, 1998, 2004, 2015; MYLONAKIS et al., 2010; SANTARÉM e AGUIAR, 2016).

2.2.3. Fase crônica

Muitos cães na fase subclínica da EMC podem evoluir para a fase crônica da doença. As condições que levam ao desenvolvimento desta fase não estão totalmente esclarecidas e provavelmente estejam relacionadas com raça, coinfeções com outros micro-organismos, situações de estresse, reinfecções, estado imunológico, entre outros. Também conhecida como pancitopenia tropical canina, a doença na fase crônica é caracterizada por síndrome hemorrágica fatal. Os cães que evoluem para a doença crônica também podem apresentar, além dos sinais supracitados, distúrbios hemorrágicos na pele e mucosas (petéquias, equimoses e epistaxe), dispneia, opacidade

de córnea, uveíte, hifema, hematúria, hematótese e melena. No hemograma, se observa grave pancitopenia (marcada trombocitopenia, anemia arregenerativa e leucopenia intensa). A alta mortalidade nesta fase é resultante da síndrome hemorrágica e/ou infecções secundárias (BUHLES Jr et al., 1975; HUXSOLL, 1976; SOUSA et al., 2004; MOREIRA et al., 2005; UENO et al., 2009; MYLONAKIS et al., 2010; HARRUS et al., 2015; SANTARÉM e AGUIAR, 2016).

A presença de anemia arregenerativa independe da fase da infecção e está relacionada com a anemia da doença crônica ou anemia da inflamação. A diminuição da meia-vida eritrocitária ainda não está totalmente esclarecida, embora já se reconheça lesão oxidativa nas suas membranas celulares e ligação de moléculas de imunoglobulina, que aceleram a hemocaterese. A supressão da atividade eritropoiética resulta da atividade de citocinas inflamatórias (IL-1, INF- γ e TNF- α) liberadas pelas células infectadas. A deficiência de ferro, notada pela redução de hemossiderina na medula óssea de animais cronicamente acometidos, também pode estar relacionada com a redução da eritropoiese, porém a suplementação é desnecessária uma vez que IL-1, IL-6, INF- γ e TNF- α alteram a cinética do ferro e a disponibilidade desse íon para síntese de hemoglobina é prejudicada (BUHLES Jr et al., 1975; HARVEY, 2001; MYLONAKIS et al., 2010; HARVEY, 2012; STOCKHAM e SCOTT, 2011; COUTO, 2015; HARRUS et al., 2015).

2.2.4. Patogenia da trombocitopenia na fase aguda

Harrus et al. (1996) associaram a trombocitopenia à EMC ao realizar a infecção experimental com *E. canis* em cães da raça Beagle. Esses resultados concordaram com outros estudos, que indicaram trombocitopenia como principal achado hematológico na enfermidade. No mesmo estudo, a trombocitopenia foi caracterizada pela presença de macroplaquetas, evidenciadas pelos valores do volume plaquetário médio (VPM) que aumentaram gradativamente com a evolução da doença e atingiram valores máximos quando houve trombocitopenia intensa, achado característico na fase aguda da EMC (HARRUS et al., 1996, 1998, 2004, 2015; UENO et al., 2009; MORAES e TAKAHIRA, 2010; SANTARÉM e AGUIAR, 2016).

Na manifestação aguda, a trombocitopenia pode ser explicada por vários mecanismos, como o aumento do consumo plaquetário e a diminuição do tempo de meia-vida das plaquetas, que resultam no sequestro esplênico. O Fator de Inibição de Migração Plaquetária (PMIF, do inglês *Platelet Migration-Inhibition Factor*), citocina produzida por linfócitos quando expostos a monócitos infectados, também é responsável pela baixa contagem plaquetária, visto que os níveis séricos são inversamente proporcionais ao número total de plaquetas em sangue periférico (HARRUS et al., 2015; SANTARÉM e AGUIAR, 2016).

Outro fator que contribui para essa diminuição é a destruição mediada por células do sistema imune do hospedeiro. Em infecções agudas, naturais e experimentais, os anticorpos ligados a plaquetas e anticorpos antiplaquetários têm demonstrado papel importante na patogenia da doença. Harrus et al. (1998) observaram aumento progressivo nos títulos sorológicos em testes de imunofluorescência indireta durante os primeiros cinco meses após a infecção, sugerindo estimulação antigênica contínua (HARRUS et al., 1996, 2015; CASTRO et al., 2004; MYLONAKIS et al., 2010; SANTARÉM e AGUIAR, 2016).

2.3. Alterações medulares na EMC aguda

A avaliação de medula óssea é indicada nos casos de bicitopenias ou pancitopenias persistentes, anemias arregenerativas, desordens mieloproliferativas, febre de origem desconhecida ou a combinação de dois ou mais dos fatores citados. Considerado como importante método de diagnóstico nas doenças infecciosas, o mielograma auxilia também no prognóstico da EMC, uma vez que além de diferenciar outras causas de pancitopenia possibilita, também, diagnosticar desordens hematológicas primárias, verificar possíveis áreas de hematopoiese ativas e avaliar os precursores eritróides, mielóides e megacariocíticos (MOREIRA et al., 2005; UENO et al., 2009; MORAES e TAKAHIRA, 2010; HARRUS et al., 2015).

Acredita-se que as alterações medulares podem ser causadas pela supressão hematopoiética secundária à infecção por *Ehrlichia* sp. Mórulas de *E. canis* podem ser encontradas em sangue periférico e em aspirados medulares a partir de 15 dias PI. Embora as alterações em sangue periférico sejam observadas em qualquer fase da

enfermidade, as alterações medulares são bem distintas. A intensidade da supressão e/ou destruição da medula óssea está associada à produção deficiente de um ou mais elementos sanguíneos, dependendo da fase da doença. O comprometimento medular indica agressão não só ao estroma vascular, mas também às células precursoras. Uma hipótese seria de que as células-tronco sejam infectadas por *E. canis* resultando na falha do metabolismo dessas células e, conseqüentemente, na proliferação celular (MOREIRA et al., 2005; WANER, 2008; WANER e HARRUS, 2013).

Estudos citológicos de medula óssea em cães experimentalmente infectados apresentando EMC na fase aguda revelaram aumento inicial na proporção mielóide:eritróide (M:E) e na concentração média de megacariócitos a partir de 1 dia até 2 meses PI. Nota-se que na fase da aguda da enfermidade, a destruição celular é principalmente de origem periférica. Para corrigir as citopenias periféricas a medula óssea aumenta sua atividade de replicação celular e, portanto, a hiperplasia medular é facilmente compreendida (BUHLES Jr et al., 1975; HUXSOLL, 1976; WANER, 2008; MYLONAKIS et al., 2010; WANER e HARRUS, 2013; HARRUS et al, 2015).

Até o momento, não está comprovado que anticorpos antiplaquetários também exerçam ação sobre os megacariócitos, uma vez que o curto período de vida das plaquetas na circulação sinaliza a disfunção medular. Contudo, o aumento do VPM resulta da presença de macroplaquetas no sangue periférico e é interpretado como resposta megacariocítica adequada (BUHLES Jr et al., 1975; WANER, 2008; MYLONAKIS et al., 2010; WANER e HARRUS, 2013; HARRUS et al., 2015; SANTARÉM e AGUIAR, 2016).

Novos estudos têm investigado a ação das citocinas na patogênese da supressão medular. Pertencentes a uma família especializada de citocinas, as quimiocinas são proteínas pequenas que atuam como potentes mediadores da inflamação e quimiotaxia de subpopulações específicas de leucócitos. As quimiocinas são essenciais para promover a resposta do hospedeiro diante da infecção e estão subdivididas em subfamílias: CXC (atuam sobre neutrófilos), CC (agem sobre eosinófilos, células *natural killer*, linfócitos e monócitos), C e CX3C, das quais as duas últimas classes são descritas com menos frequência (WANER, 2008).

A secreção de quimiocinas pode estar relacionada à presença de inclusões intracitoplasmáticas de *Ehrlichia*. Estudos *in vitro* com células medulares infectadas

com *Anaplasma phagocytophilum* (agente infeccioso intimamente relacionado com *E. canis*) mostraram aumentos significativos na produção de quimiocinas da subfamília CC: Proteína Inflamatória de Macrófagos (MIP-1 α ou CCL3 e MIP-1 β ou CCL4), Proteína Quimiotática Monocítica (MCP-1 ou CCL2) e RANTES (CCL5) e da subfamília CXC: IL-8 (CXCL8). Baixas concentrações de MIP-1 α e IL-8 agem sinergicamente regulando a hematopoiese, porém altas concentrações de MIP-1 α , IL-8 e MCP-1 suprimem a proliferação de células precursoras. Incapaz de compensar as anemias arregenerativas discretas na doença aguda, a medula óssea demonstra eritropoiese ineficiente em cães portadores de EMC (WANER, 2008; RIKIHISA, 2011).

2.4. Alterações medulares na EMC crônica

Alguns cães convalescentes da doença crônica podem apresentar normocelularidade no mielograma sugerindo supressão medular moderada. Entretanto, a fase crônica caracteriza-se por hipocelularidade medular acentuada dos três tipos celulares (eritróide, mielóide e megacariocítica), não raro evoluindo para falência medular. Animais acometidos pela doença crônica grave e que evoluem para óbito, mesmo depois de instituído o tratamento, comumente apresentam aplasia medular persistente observada após a hipergamaglobulinemia. A terapia imunossupressora instituída quando a contagem de anticorpos atinge altos títulos, associada ao tratamento específico da EMC, tem demonstrado resultados satisfatórios sugerindo base imunomediada da doença (BUHLES et al., 1975; HUXSOLL, 1976; WANER, 2008; MORAES e TAKAHIRA, 2010; MYLONAKIS et al., 2010; HARRUS et al., 2015; SANTARÉM e AGUIAR, 2016).

A patogenia da hipoplasia na erliquiose crônica ainda é desconhecida, mas presume-se que a resposta imunológica do organismo suprima a hematopoiese. A hipoplasia/aplasia de medula em infecções por *E. canis* em cães pode estar relacionada aos casos de mielonecrose, tanto por danos diretos às células hematopoiéticas quanto por danos na microcirculação das artérias nutritivas (HARRUS et al., 1996; MORAES e TAKAHIRA, 2010; HARRUS et al., 2015; SANTARÉM e AGUIAR, 2016).

O processo inflamatório, danos vasculares e necrose, ou secundários à anemia imunomediada, são fatores que podem levar a quadros de mielofitose como consequência da proliferação de fibroblastos. O tecido fibroso que invade a medula óssea compete com as células hematopoiéticas pelo espaço e nutrientes afetando todos os tipos celulares. Citocinas inflamatórias produzidas em doenças imunomediadas primárias ou secundárias a enfermidades infecciosas podem desencadear síndrome hemofagocítica caracterizada por esquizócitos e monócitos ativados no sangue periférico e pelo aumento de macrófagos fagocitando células precursoras sanguíneas na medula óssea e em outros órgãos linfóides como fígado, linfonodos e/ou baço (ROBBINS e COTRAN, 2005; MORAES e TAKAHIRA, 2010).

As alterações citomorfológicas da medula são mais facilmente observadas na fase crônica do que na fase aguda, porém, independente da fase da enfermidade, os achados hematológicos observados nos cães portadores de EMC sinalizam os efeitos periféricos e medulares sofridos pelo organismo. A falha da medula óssea nos animais com o curso avançado da doença é resultado das lesões causadas direta e/ou indiretamente pelo agente (HARVEY, 2001, 2012; HARRUS et al., 2004; ROBBINS e COTRAN, 2005; MORAES e TAKAHIRA, 2010; STOCKHAM e SCOTT, 2011; WANER e HARRUS, 2013).

2.5.Diagnóstico da EMC

A diminuição da contagem plaquetária ocorre em todas as fases da doença e é utilizado como indicador clínico de suspeita de EMC. Entretanto, o diagnóstico definitivo é firmado pela visualização de agrupamentos intracitoplasmáticos (mórulas) nos monócitos circulantes em esfregaços sanguíneos, presença de altos títulos de anticorpos para *E. canis*, detecção do DNA da bactéria pela PCR ou, ainda, pelo isolamento do agente em cultivos celulares (HARRUS et al., 1998, 2004, 2015; UENO et al., 2009; SOUZA et al., 2013; SANTARÉM e AGUIAR, 2016).

A avaliação microscópica de esfregaços obtidos a partir de sangue, aspirados medulares e esplênicos é uma técnica pouco sensível para o diagnóstico de EMC. Ainda, o número de parasitas na amostra avaliada pode ser insuficiente para ser

observado por exame microscópico. Assim, a não visualização de mórulas não exclui a presença do patógeno (HARRUS et al., 1998, 2004).

O diagnóstico sorológico é realizado pelo teste de imunofluorescência indireta (IFA, do inglês *Indirect Immunofluorescent Antibody*) com antígeno de *E. canis*. Deve ser levada em consideração a resposta cruzada de *E. canis* com outras espécies de *Ehrlichia* como *E. chaffensis*, *E. ewingii*, *E. muris*, em razão da semelhança genotípica de 98% entre as espécies do gênero. Apesar de não ser suficiente para o diagnóstico definitivo da EMC, o teste sorológico possui grande importância na fase subclínica da doença. Títulos médios podem permanecer elevados por quase um ano e o declínio pode representar a fase de recuperação da enfermidade nos cães (IQBAL et al., 1994; HARRUS et al. 1996, 1998, 2015; SANTARÉM e AGUIAR, 2016).

A técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) detecta o material genético da bactéria logo nos primeiros dias PI e, por isso, tem sido utilizada frequentemente não só no diagnóstico da doença, mas também para confirmar a total eliminação de *E. canis* do organismo do hospedeiro. Em razão da alta sensibilidade e especificidade, a PCR é capaz de identificar um único fragmento de DNA de materiais como sangue periférico, fluidos corporais, além de materiais obtidos por punção, como da medula óssea (WEN et. al., 1997; AGUIAR et al., 2007). Cães soronegativos ou que apresentam títulos inferiores a 20, em razão dos baixos níveis de anticorpos IgG (como acontece na fase inicial da infecção), apresentam positividade na *nested* PCR (técnica que emprega uma segunda etapa de amplificação com um par de *primers* internos aos utilizados na primeira etapa). Embora o diagnóstico molecular seja mais específico que o teste sorológico, a combinação de ambos possibilita diagnóstico mais fidedigno, pois resultados sorológicos negativos também são factíveis de representar a eliminação do parasita e a recuperação da doença (WEN et al., 1997; TANG et al., 1997; HARRUS et al., 1998, 2015; SOUZA et al., 2013; SANTARÉM e AGUIAR, 2016).

O cultivo celular é considerado sensível e específico para o diagnóstico definitivo da EMC. Entretanto os resultados são obtidos somente após 14 a 34 dias. Por ser um método extremamente laborioso e oneroso, o isolamento do agente em cultura celular se restringe a pesquisas científicas (IQBAL et al., 1994; AGUIAR et al., 2008; HARRUS et al., 2015; SANTARÉM e AGUIAR, 2016).

Apesar de normalmente não serem exames solicitados nos casos de suspeita de EMC, aspirados ou biópsias medulares podem auxiliar no diagnóstico e principalmente no prognóstico de cães acometidos pela EMC. O mielograma assiste na identificação de mórulas de *E. canis*, exclusão de outras causas de pancitopenia ou desordens hematológicas e avalia precursores hematopoiéticos. Além disso, a punção medular é necessária na determinação da fase da doença com o intuito de se eleger o melhor tratamento para os animais doentes.

Evidências sugerem que o processo inflamatório no início da infecção possa ser responsável por lesões patológicas observadas na fase crônica (MORAES e TAKAHIRA, 2010). Identificar alterações medulares na fase aguda pode esclarecer alterações presentes na fase crônica e elucidar melhor a patogenia da EMC.

HIPÓTESES DE ESTUDO

3. HIPÓTESES DE ESTUDO

Supõe-se que as alterações medulares observadas na fase crônica sejam consequências de lesões iniciadas na fase aguda. Uma hipótese é de que *E. canis* seja capaz de invadir a medula óssea. Uma hipótese alternativa é a de que o mecanismo imunomediado suprima a hematopoiese. Por último, ambos os processos poderiam acontecer simultaneamente.

Caso as hipóteses supracitadas sejam válidas, o mielograma poderá auxiliar no prognóstico da EMC visto que revela desordens hematológicas e áreas de hematopoiese ativas. Além disso, o uso da citologia aspirativa de medula óssea seria estimulado nos casos de EMC, possibilitando identificar as fases da infecção e esclarecer as causas da falha medular nos cães gravemente acometidos.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1. Geral

Este trabalho tem o propósito de investigar alterações celulares na medula óssea de cães portadores de Ehrlichiose Monocítica Canina na fase aguda.

4.2. Específicos

- 1- Comprovar a existência de alterações medulares em cães com EMC aguda;
- 2- Verificar a presença de *E. canis* na medula óssea mediante a PCR e cultivo celular;
- 3- Esclarecer a relação entre a presença de *E. canis* na medula óssea e parâmetros sanguíneos e medulares;
- 4- Esclarecer a relação entre o título de anti-*E. canis* nos cães naturalmente infectados com *E. canis* e parâmetros medulares incluindo o número de plasmócitos.

MATERIAL E MÉTODOS

5. MATERIAL e MÉTODOS

5.1. Delineamento experimental

Cães com diagnóstico confirmado de EMC foram submetidos à colheita de sangue periférico e punção de medula óssea. Amostras de sangue, soro e medula óssea foram submetidas a exames hematológicos (hemograma, bioquímica sérica e mielograma), sorologia e cultivo celular. Para serem incluídos no estudo, todos os animais apresentaram positividade na PCR de sangue e trombocitopenia (< 160.000 plaquetas / μL de sangue). Além disso, cães com alterações significativas no leucograma ou idade acima de 10 anos foram critérios de exclusão na participação deste estudo.

5.2. Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMVZ – UNESP/Botucatu, SP (protocolo: 137/2015) em atendimento à Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (Anexo 1).

5.3. Animais

Na seleção dos animais incluídos neste estudo não houve predileção por sexo, raça ou idade. Foram estudados 18 cães com sintomatologia clínica, alterações hematológicas compatíveis com a EMC e diagnóstico da doença confirmado por PCR de sangue. Os animais foram atendidos entre abril e novembro de 2016, no setor ambulatorial de Enfermidades Infecciosas dos Animais, pertencente ao Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), situada no município de Botucatu, SP. Todos os proprietários dos animais incluídos no estudo assinaram termo de consentimento (livre e esclarecido) (Anexo 2). Informações epidemiológicas foram obtidas no momento da anamnese (Anexo 3). Os

proprietários foram questionados sobre cuidados relacionados à posse responsável como alimentação, vermifugação, vacinação, acesso dos animais à rua e contactantes. Foram selecionados animais com leucograma normal ou próximo da normalidade para que não houvesse a possibilidade desses animais apresentarem hipoplasias/aplasias medulares, características comuns da fase crônica.

5.4. Análises laboratoriais

Os cães amostrados no estudo foram submetidos a exames hematológicos: hemograma, mielograma e bioquímica sérica para avaliação renal e hepática (alanina aminotransferase – ALT, fosfatase alcalina – FA, gama-glutamyltransferase – GGT, proteína total sérica e albumina), segundo Thrall et al. (2006). Todos os exames citados foram realizados no Laboratório Clínico Veterinário (LCV) da FMVZ – UNESP/Botucatu, SP, sob a responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Regina Kiomi Takahira.

Testes sorológicos, moleculares e cultivo celular de sangue e medula óssea foram realizados segundo Aguiar et al. (2007) e Aguiar et al. (2008), no Laboratório de Virologia e Rickettsioses (LVR) do Hospital Veterinário (HOVET) da Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Cuiabá, MT, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Daniel Moura de Aguiar. Todas as amostras foram enviadas pelo Serviço de Encomenda Expressa Nacional (SEDEX®) em caixas de isopor e gelo reciclável para manutenção da temperatura adequada.

Amostras de sangue total foram enviadas ao laboratório particular de biologia molecular VETDNA®, localizado no município de Botucatu, SP para confirmação do diagnóstico pela PCR, realizada segundo Wen et al. (1997).

5.4.1. Hemograma e bioquímica sérica

Realizou-se a venopunção da jugular de todos os cães após antissepsia com álcool, colhendo-se 6 mL de sangue destinados a exames laboratoriais (eritrograma, leucograma, ALT, FA, GGT, proteína total sérica e albumina). As amostras foram

processadas em até duas horas após a colheita, de acordo com Thrall et al. (2006) e Harvey (2001, 2012).

Ao hemograma destinou-se 3 mL de cada amostra conservadas em frascos contendo EDTA (ácido etilenodiaminotetracetato), mantidas sob homogeneização constante e processadas em analisador automatizado pocH – 100iV Diff juntamente com a contagem manual.

Os demais 3 mL respectivos de cada coleta foram acondicionados em tubos com ativador de coágulo e, após retração do coágulo, realizou-se a centrifugação. O soro obtido foi aliquoteado em microtubos de plástico de 2 mL e congelado até o momento da realização do exame. Parte do soro estocado foi destinada aos exames de bioquímica sérica utilizando-se o analisador automático Cobas Mira Plus®.

5.4.2. Mielograma

Previamente à punção aspirativa de medula óssea, todos os cães foram submetidos à medicação pré-anestésica com metadona (0,2-0,3 mg/Kg) seguida de anestesia dissociativa com midazolam (0,2-0,5 mg/Kg) e cetamina (5-10 mg/Kg). Todos os fármacos foram administrados por via intramuscular e os animais mantidos em fluidoterapia de manutenção durante todo o procedimento o retorno anestésico (Figura 1).

O material foi colhido por meio de punção da extremidade proximal do úmero, crista ilíaca ou esterno com auxílio de agulhas próprias destinadas à biópsia. O tamanho das agulhas ajustou-se ao tamanho do cão, respeitando a particularidade de cada animal. O conteúdo medular retirado foi imediatamente colocado em frascos contendo anticoagulante EDTA a 5% e posteriormente em placas para seleção do maior número de espículas com microcapilares de vidro (Figura 2). Em seguida, as lâminas foram preparadas e secas ao ar livre e posteriormente coradas com corante tipo Romanowsky. Foram visualizadas no mínimo 20 lâminas em cada mielograma realizado. A técnica utilizada foi descrita por Harvey (2001, 2012), Thrall et al. (2006) e Stockham e Scott (2011).



Figura 1- Colheita de medula por punção aspirativa. A: punção da extremidade proximal do úmero. B: aspiração do material medular por pressão negativa com seringa descartável de bico liso lateral (*luer slip*) de 20 mL. Botucatu, SP, 2016.



Figura 2- Material utilizado para punção aspirativa de medula óssea e preparo de lâminas. Botucatu, SP, 2016.

5.4.3. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Para confirmar o diagnóstico de EMC, amostras de sangue armazenadas em tubo com EDTA foram enviadas em até 12 horas pós-colheita ao laboratório particular de biologia molecular VETDNA® – Botucatu, SP e destinadas à realização da técnica de PCR segundo Wen et al. (1997).

O kit utilizado para extração do DNA foi o QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN® Inc., Chatsworth, Calif.), conforme orientações do fabricante. O DNA obtido permaneceu armazenado a -20°C até a realização da PCR. Foram realizadas duas etapas de amplificação (a PCR convencional e a *nested*-PCR, respectivamente) para detecção do gene *16S rRNA* de *E. canis*.

A primeira etapa de amplificação consistiu na mistura de 5 µL de PCR buffer 10 X (solução tampão da PCR), 5 µL de 50 mM de MgCl₂, 1 µL de 10 mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dTTP, dCTP, dGTP – Invitrogen®, EUA), 1,25 U de enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen®, EUA), 2 pmol de cada um dos oligonucleotídios iniciadores, ou *primers*, ECC (5'-AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC-3') e ECB (5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGGC-3') e água ultra-pura estéril em quantidade suficiente para reação com 50 µL de volume total. Em termociclador automático (Veriti® 96- Well Fast Thermal Cycler) a amplificação seguiu o seguinte protocolo: 94°C por cinco minutos e, em seguida, 40 ciclos de 94°C por um minuto, 60°C por um minuto e, por fim, 72°C por um minuto.

A identificação da espécie *E. canis* foi possível a partir de uma segunda etapa de amplificação, a *nested* PCR. Para a realização desta segunda reação, foram utilizados 1 µL do material amplificado e os *primers* espécie-específicos ECA (5'-CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGAA-3') e HE-3 (5'-TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT-3'). Soluções, sequência térmica e tempo de amplificação foram semelhantes a etapa anterior. Os amplificados foram visualizados em gel de agarose 1% corado com HydraGreen™ Safe DNA Dye.

As amostras refrigeradas e enviadas ao LVR (HOVET, FAMEVZ – UFMT/Cuiabá, MT) para cultivo celular também foram submetidas a PCR, porém para amplificação da espécie foi realizada a detecção do gene *dbp* em apenas uma reação. O

kit utilizado para extração do DNA do patógeno foi o GoTaq® Green Master Mix (PROMEGA).

Para o volume total de 25 µL contendo 12,5 µL (1X) de GoTaq® Green Master Mix 2X, 2,5 µL do molde de DNA e 8 µL de água *nuclease-free* foram adicionados 1 µL dos *primers*: Dsb-330 F (5'-GATGTCGATTATGAAACATGAAGAAAT-3') e Dsb-481 R (5'-GCTTAATTGAGTTGTCATGCT-3'). O material genético foi amplificado em termociclador automático nas seguintes condições: 5 minutos a 95°C, 35 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por um minuto e 72°C por um minuto, por fim, 5 minutos a 72°C e 4°C constante.

A PCR realizada seguiu a metodologia descrita por Labruna et al. (2007) modificando um dos *primers* utilizados. De acordo com dados ainda não publicados, este *primer* amplifica o fragmento de 176-bp do gene *dsb* de *E. canis* e garante sua especificidade.

5.4.4. Cultivo celular

Amostras de sangue (3 mL) e medula óssea (2 mL, no mínimo) foram colhidas após intensa assepsia do local de punção e rapidamente estocadas a vácuo em tubos com EDTA para manter a esterilidade das amostras após as colheitas. Após intensa homogeneização, os tubos foram refrigerados e enviados pelo SEDEX®, não ultrapassando o prazo máximo de 4 dias após a colheita, ao LVR (HOVET-UFMT/Cuiabá, MT).

Para o isolamento de *E. canis*, amostras estéreis de medula óssea foram inoculadas diretamente em monocamada de células DH82, enquanto os sangues foram processados para o isolamento de leucócitos conforme Aguiar et al. (2008) (Figuras 3). Os monócitos caninos quando isolados foram inoculados em monocamada de células DH82, mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's (Sigma Aldrich®) acrescido de 5% de soro de bezerro (Bovine Calf Serum – Hyclone®). O meio de cultura foi repostado a cada 2 dias, e após 14 dias, o sobrenadante foi monitorado por PCR para verificação do isolamento. Paralelamente, esfregaços citológicos da cultura eram realizados para observação de estruturas compatíveis com mórulas de *E. canis*.

Constatando-se a positividade, as culturas seriam semanalmente avaliadas quanto a taxa de infecção e ao atingirem 80-100% de infecção, 2 mL do sobrenadante deveria ser transferido para nova monocamada para estabelecimento do isolado. A partir da primeira passagem, os sobrenadantes seriam crio-preservados a -196°C negativos a fim de se estocar o isolado obtido.



Figura 3- Processo de isolamento de leucócitos utilizando Histopaque 1083 (Sigma Diagnostics, St. Luis, Mo) para posterior inoculação em monocamadas de células DH82 (Fotos cedidas pelo Prof. Adj. Daniel Moura de Aguiar - LVR, HOVET-UFMT/Cuiabá, MT, 2016).

5.4.5. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Microtubos de plástico de 2 mL contendo as alíquotas de soro congeladas também foram enviados pelo SEDEX® ao LVR do HOVET – UFMT/Cuiabá, MT em caixas de isopor com gelo reciclável para manter a temperatura adequada.

As amostras de soro destinadas a RIFI foram submetidas à diluição inicial de 1:40 em solução salina de fosfato tamponada (PBS - pH 7,2) acrescido de 1% de soroalbumina bovina e depositadas em lâminas contendo cepa São Paulo de *E. canis* juntamente com controles positivos e negativos previamente testados. Em seguida, as lâminas foram incubadas a 37°C em câmara úmida durante 30 minutos. Após esse período, as lâminas foram lavadas em PBS (pH 7,2), secas em temperatura ambiente e, em cada poço, foi adicionado (com diluição de 1:1000) conjugado de coelho anti-IgG canino (Sigma® Diagnostics, St. Louis, Mo) para novamente serem incubadas a 37°C por 30 minutos, lavadas em PBS (pH 7,2) e submetidas a secagem. Por fim, as lâminas foram devidamente examinadas em microscópio de epifluorescência e as amostras positivas foram diluídas sucessivamente na razão de dois para obtenção do título final. O teste sorológico descrito foi realizado de acordo com Aguiar et al. (2007).

5.5. Análise estatística

Análises descritivas foram realizadas mediante construção de histogramas e *boxplots*. Os histogramas possibilitam visualizar uma variável dentre os resultados obtidos para determinar os valores mais frequentes. O *boxplot* mostra a mediana, os quartis e os valores extremos da distribuição. Isso permite comparar visualmente duas distribuições da mesma variável segundo outro fator em questão (por exemplo: diferencia entre a distribuição de hematócritos entre animais com PCR de material medular positiva ou não). A significância estatística da comparação de duas variáveis contínuas foi realizada mediante o teste não paramétrico de Wilcoxon, já que o número limitado de amostras não é adequado para cumprir com a hipótese de normalidade das variáveis (BAUER, 1972; HOLLANDER e WOLFE, 1999). Por outro lado, a comparação de duas proporções foi realizada mediante o teste de Qui-quadrado de Pearson. Todas as análises foram realizadas com o programa R (R Development Core Team, 2015). A positividade da medula na PCR foi comparada com: alterações

medulares, trombocitopenia, presença ou não de anemia, o tipo de anemia observada (regenerativa ou arregenerativa), monócitos e achados citomorfológicos (macroplaquetas, linfócitos reativos, monócitos ativados e citofagocitose). Compararam-se também os títulos sorológicos com os mesmos parâmetros, além da globulina.

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1. Avaliação clínica dos cães amostrados

Dos 18 cães estudados, 11 foram machos e 7 fêmeas, com idades entre 4 e 109 meses (4 meses e 9 anos). Todos os animais apresentaram ixodidiose e viviam em habitat urbano. As anamnese de todos os cães revelaram sinais característicos de EMC: apatia, hiporexia/anorexia, perda de peso e alterações oculares. Todos os proprietários negaram a presença de sinais clínicos característicos de doença cardíaca. Ao exame físico os cães apresentaram bradicardia (2/18), taquipneia (7/18), hipertermia (10/18) e tempo de preenchimento capilar (TPC) maior que 2 segundos (5/18) (Figura 4). Além disso, puderam ser observadas alterações como mucosas hipocoradas (6/18), desidratação (6/18), linfadenomegalia (8/18), organomegalia (5/18) e abdominalgia (10/18). Dois cães foram diagnosticados com pneumonia. Detalhes dos parâmetros fisiológicos e dados de anamnese encontram-se em anexo nas Tabelas A1, A2 e A3 (Anexo 4).

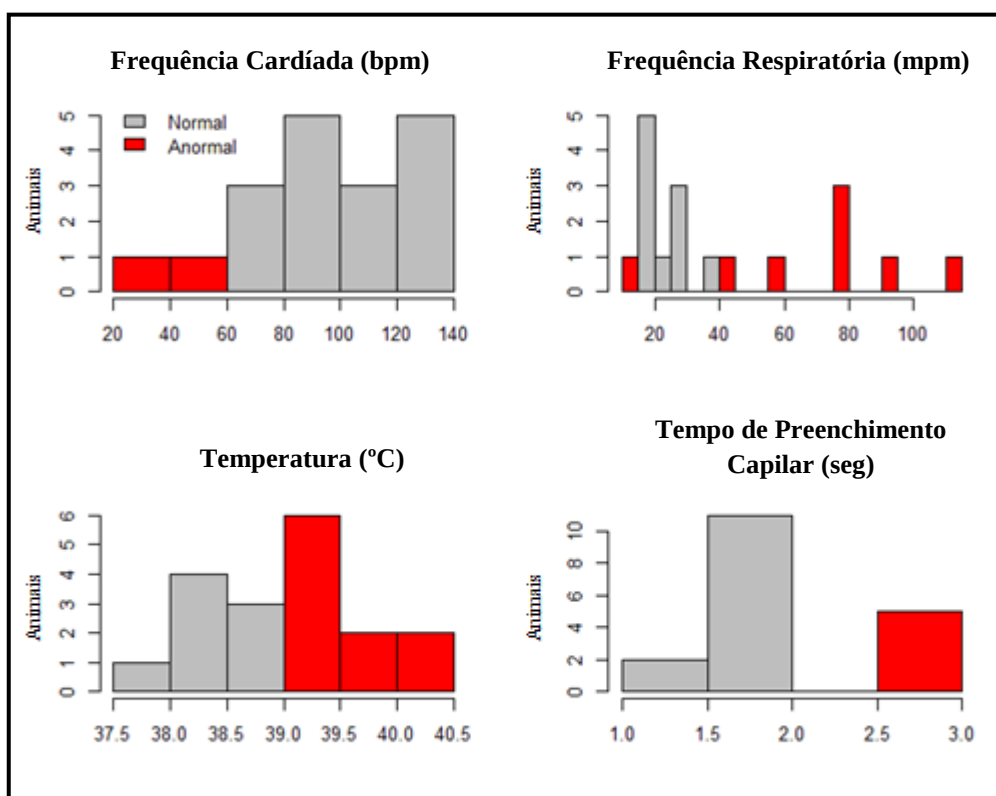


Figura 4- Alterações clínicas de cães com Ehrlichiose Monocítica Canina aguda. Botucatu, SP, 2016.

6.2. Alterações hematológicas e bioquímicas de cães com EMC aguda

A maioria dos animais apresentou trombocitopenia intensa (< 50.000 plaquetas / μL de sangue) (figura 5).

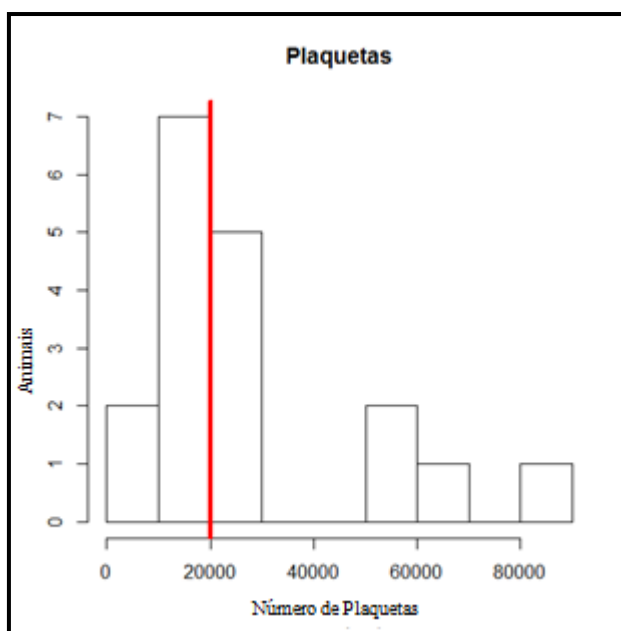


Figura 5- Distribuição dos valores plaquetários em cães com Ehrlichiose Monocítica Canina aguda. A linha corresponde à mediana. Botucatu, SP, 2016.

A anemia foi observada em 11 animais, que apresentaram valores de volume globular (hematócrito), hemoglobina e/ou total de hemácias inferiores aos valores de referência. Os valores de volume corpuscular médio e a concentração de hemoglobina corpuscular média permaneceram dentro ou bem próximos dos valores de referência para a espécie. Metarrubríctos estavam presentes nos hemogramas de 3/18 animais e valores aumentados de RDW em 4/18 cães. Apenas 1/18 apresentou leucopenia discreta e 1/18 mostrava leucocitose no hemograma. Os esfregaços sanguíneos mostraram diversos achados citomorfológicos que indicam atividade medular e resposta humoral, além da presença de *E. canis*. Entre as mais comuns, foram observadas anisocitose e policromasia, seguidas de macroplaquetas, monócitos ativados e mórulas (Tabela 1). A hiperproteinemia foi observada em 2/18 cães e valores abaixo dos valores de referência

para a espécie foram encontrados em 4/18 cães. Os resultados hematológicos estão sumarizados em anexo no Quadro A1 e na Tabela A4 (Anexo 4).

Tabela 1- Achados citomorfológicos em esfregaços sanguíneos de cães com Ehrlichiose Monocítica Canina aguda expressos em porcentagem (%). Botucatu, SP, 2016.

Achados citomorfológicos	N	%
Anisocitose	6	33
Policromasia	3	18
Macroplaquetas	3	17
Monócitos ativados	3	17
Mórulas	2	11
Linfócitos reativos	1	6
Citofagocitose	1	6
Rouleaux	1	6

N: número de animais em cada categoria; %: porcentagem de animais em cada categoria.

Foram realizados exames de bioquímica sérica para avaliação da função hepática e renal (Figura 6). Os valores proteínas totais variaram entre 2,8 a 10,2, estando a albumina diminuída em 7/18 cães, globulina abaixo dos valores de referência em 3/18 e hiperglobulinemia em 3/18. Valores elevados de GGT, ALT e FA foram observados em 3/18, 4/18 e 3/18 cães, respectivamente. Três cães apresentaram elevação dos valores de ureia, porém todos os cães apresentaram dosagens de creatinina dentro dos valores normais. Os resultados de cada cão se encontram em anexo (Quadro A2).

6.3. Alterações medulares observadas nos cães com EMC aguda

Todos os animais apresentaram pelo menos uma alteração no exame citológico de medula óssea (Quadro 1). A alteração mais frequente foi hiperplasia eritróide (12/18) e, conseqüentemente, diminuição da relação M:E em 10/18 cães (Figura 6A). A

hipoplasia eritróide e aumento da relação M:E foi observada em 3/18 animais. Cinco mielogramas apresentaram normalidade na proporção M:E, dentre eles, porém, dois apresentaram aumento em ambas séries. A hiperplasia mielóide estava presente em 3/18 e foi observado aumento de células jovens em 3/18, dos quais apenas um concomitante com o aumento da série mielóide. O aumento de plasmócitos foi observado em 10/18 animais e a hiperplasia linfóide em 3/18. Foi observada hiperplasia megacariocítica em 6/18 cães e a celularidade aumentada em 8/17 animais (não foi possível estimar a celularidade de um cão devido ausência de espículas) (Figura 6B).

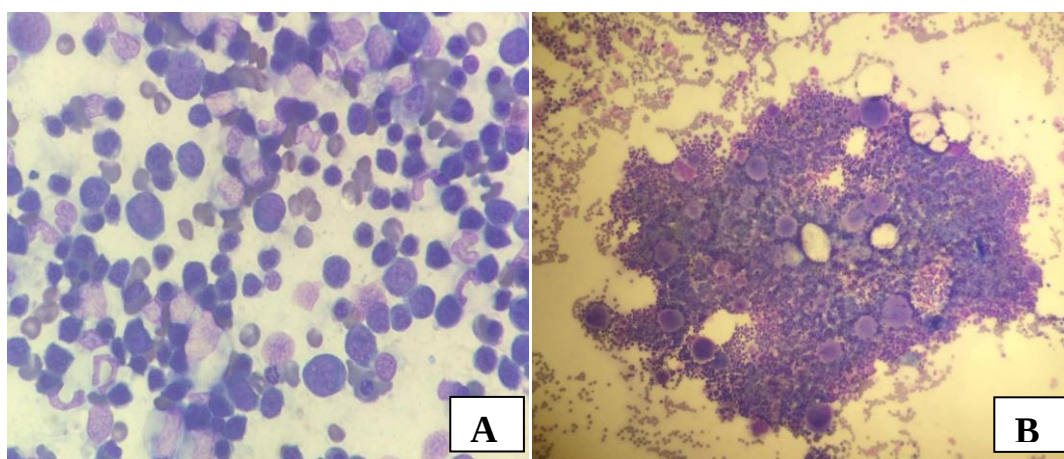


Figura 6- A: Hiperplasia eritróide na medula óssea de cães com Ehrlichiose Monocítica Canina aguda. B: Hiperplasia megacariocítica na medula óssea de cães com Ehrlichiose Monocítica Canina aguda. Botucatu, SP, 2016. Coloração panótico (aumento de 100x).

Anisocitose e policromasia foram observadas em 10/18 cães. Eritrofagocitose e presença de mórula foram observadas em 2/18 e 1/18, respectivamente (Figura7). Apenas um animal apresentou discreto aumento dos estoques de ferro.

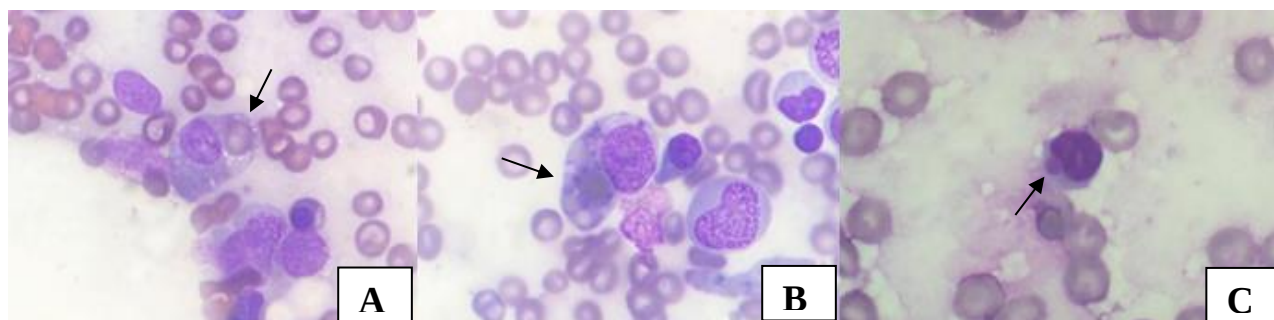


Figura 7- Amostras de medula óssea de cães com Ehrlichiose Monocítica Canina aguda apresentando (setas): Eritrofagocitose (A e B) e Mórula de *E. canis* (C) Botucatu, SP, 2016. Coloração panótico (aumento de 100x).

A citologia de medula óssea auxiliou na classificação dos tipos de anemia de forma mais eficiente que os índices hematimétricos (VCM, CHCM e RDW). Dentre os 11 cães anêmicos, 4/18 apresentaram anemia arregenerativa e 7/18 anemia regenerativa. Além disso, em 7/18 cães a medula foi considerada hematopoieticamente ativa (com alterações, porém discretas) e foi observada redução de formas eritróides maduras em 8 dos 18 cães estudados, sendo que dois não possuíam anemia. A contagem diferencial das células da medula óssea dos cães estudados encontra-se no Quadro A3 (Anexo 4).

Quadro 1- Avaliação citológica da medula óssea de cães com Ehrlichiose Monocítica Canina aguda. Botucatu, SP, 2016.

Animal	Tipo de anemia	Plasmócitos	Relação M:E	Celularidade	Série Megacariocítica	Série Eritróide	Maturação Eritróide	Série Mielóide	Maturação Mielóide	Série Linfóide	Estoque de Ferro	Anisocitose e Policromasia	Mórula	Eritrofagocitose	Mitose	Medula Hematopoieticamente ativa
1	Ar	A	N	N	A	N	Redução EM	N	N	N	N	-	+	-	+	+
2	-	A	N	N	A	N	Redução EM	N	Aumento MI	N	A	-	-	+	+	+
3	R	A	N	A	N	A	N	A	Aumento MI	A	N	-	-	-	-	-
4	-	A	A	N	N	D	N	N	Aumento MI	N	N	-	-	-	+	-
5	-	A	N	N	N	N	Redução EM	N	N	N	N	+	-	-	+	+
6	R	D	D	N	N	A	Redução EM	N	N	N	N	+	-	-	+	+
7	R	A	D	A	A	A	N	N	N	N	N	+	-	-	-	-
8	R	D	D	*	N	A	N	N	N	N	N	+	-	-	-	-
9	R	N	D	A	A	A	N	N	N	N	N	+	-	-	-	-
10	-	N	D	N	N	A	N	N	N	N	N	-	-	-	+	+
11	R	N	D	A	N	A	N	N	N	N	A	+	-	-	-	-
12	-	N	D	N	N	A	N	N	N	N	N	+	-	-	-	+
13	-	A	D	A	A	A	N	N	N	A	N	+	-	-	-	+
14	Ar	N	A	N	N	D	Redução EM	A	N	N	N	+	-	-	-	-
15	Ar	N	D	A	A	A	Redução EM	N	N	A	N	-	-	-	-	-
16	Ar	A	N	A	N	A	Redução EM	A	N	N	A	-	-	+	+	-
17	R	N	D	A	N	A	Redução EM	N	N	N	N	+	-	-	-	-
18	-	N	A	N	N	D	N	N	N	N	N	-	-	-	-	-

Ar: arregenerativa; R: regenerativa; N: normal; A: aumentado (a); D: diminuído (a); EM: eritróide maduro, MI: mielóide imaturo; (+): presença; (-): ausência; *não realizado.

6.4. Presença de *E. canis* na medula óssea de cães com EMC aguda

Diagnóstico molecular

Todos os animais do presente estudo apresentaram positividade nas técnicas de PCR realizadas nas amostras de sangue periférico, que foi um dos critérios de inclusão para o estudo. Das 18 amostras de medula óssea colhidas, 11 apresentaram positividade na PCR (Tabela 2).

Diagnóstico celular

Apenas 7/18 amostras puderam ser cultivadas devido hemólise causada pelo transporte inviabilizando o cultivo celular nas demais amostras. A monitoração do cultivo celular por PCR indicou a presença do patógeno na cultura após 28 dias de incubação, entretanto, as 7 amostras foram consideradas negativas, pois não houve multiplicação de *E. canis*.

Tabela 2- Resultados moleculares e microbiológicos das amostras de sangue e medula óssea de cães com Ehrlichiose Monocítica Canina aguda. Botucatu, SP, 2016.

N	PCR sangue	PCR medula	PCR cultivo sangue (28º dia)	PCR cultivo medula (28º dia)	Cultivo sangue	Cultivo medula
1	+	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-
3	+	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	-	-
5	+	-	+	-	-	-
6	+	+	-	-	-	-
7	+	-	*	*	*	*
8	+	+	*	*	*	*
9	+	+	*	*	*	*
10	+	+	*	*	*	*
11	+	+	*	*	*	*
12	+	+	*	*	*	*
13	+	+	*	*	*	*
14	+	-	*	*	*	*
15	+	+	*	*	*	-
16	+	+	*	*	*	*
17	+	-	*	*	*	*
18	+	+	*	*	*	*

(-): negativo; (+): positivo; (*): não cultivado.

6.5. Relação entre a presença de *E. canis* em amostras de medula óssea e parâmetros sanguíneos e medulares

Hemograma

Nenhum animal apresentou correlação entre alterações de hemograma e presença de *E. canis* na medula óssea (Figura 8). A presença de anemia, intensidade de trombocitopenia, e número de monócitos circulantes não tiveram relação significativa com a positividade da PCR em amostras medulares. Em animais anêmicos, a intensidade e o tipo da anemia também não apresentaram relação com medula óssea positiva (Figura 9).

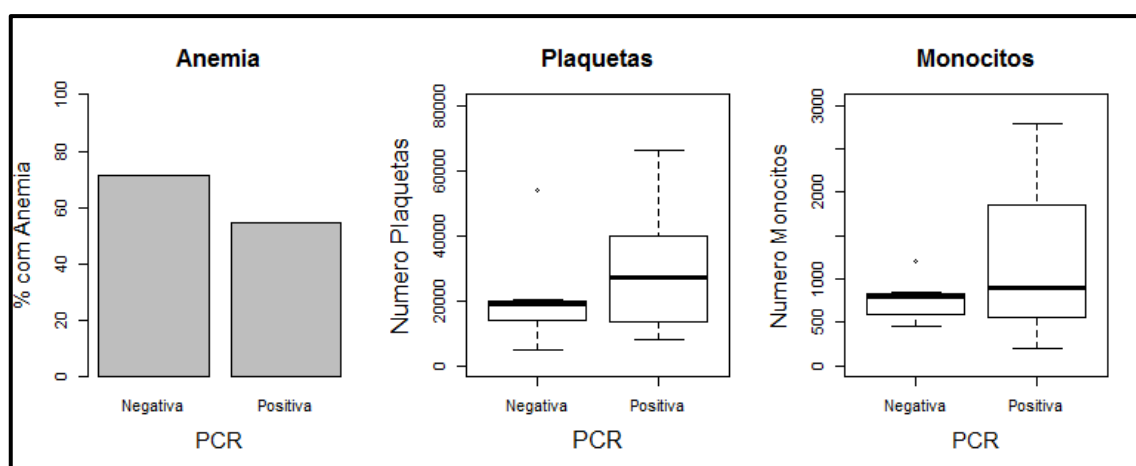


Figura 8- Comparação entre cães com medula óssea positiva e negativa em relação a alterações sanguíneas frequentes na Ehrlichiose Monocítica Canina aguda. Botucatu, SP, 2016.

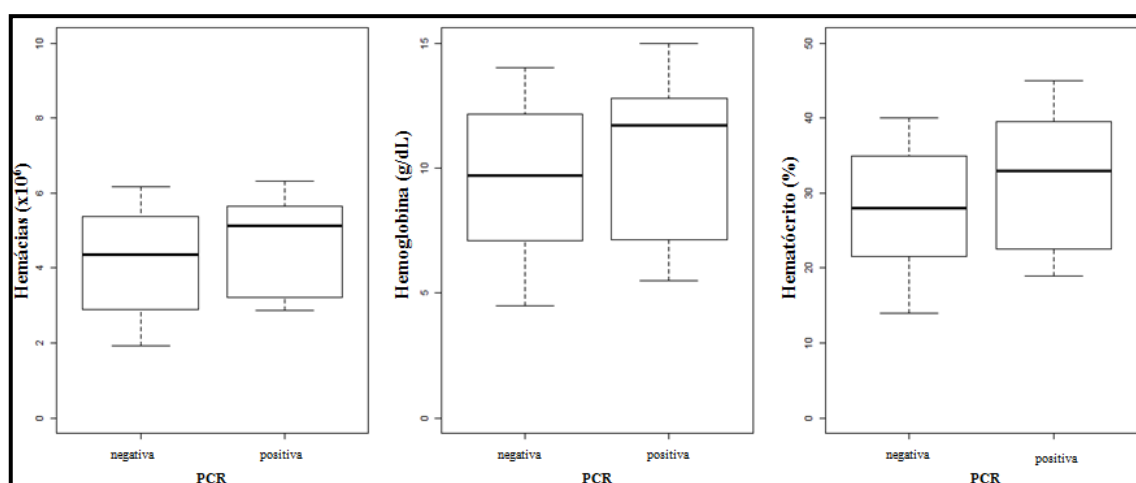


Figura 9- Comparação entre indicadores de anemia e a positividade da medula óssea em cães com Ehrlichiose Monocítica Canina aguda. Botucatu, SP, 2016.

Medula Óssea

A presença de *E. canis* em amostras medulares demonstrou correlação estatística com as alterações em medula óssea. Entretanto, animais com PCR positiva apresentaram mais alterações da série eritróide e, conseqüentemente da relação M:E, porém não foram estatisticamente significativas quando comparados os animais com PCR de medula óssea negativa (Qui-quadrado de Pearson, p-value=0.08) (Figura 10). Demais índices medulares não foram influenciados pela presença do agente (Figura 11).

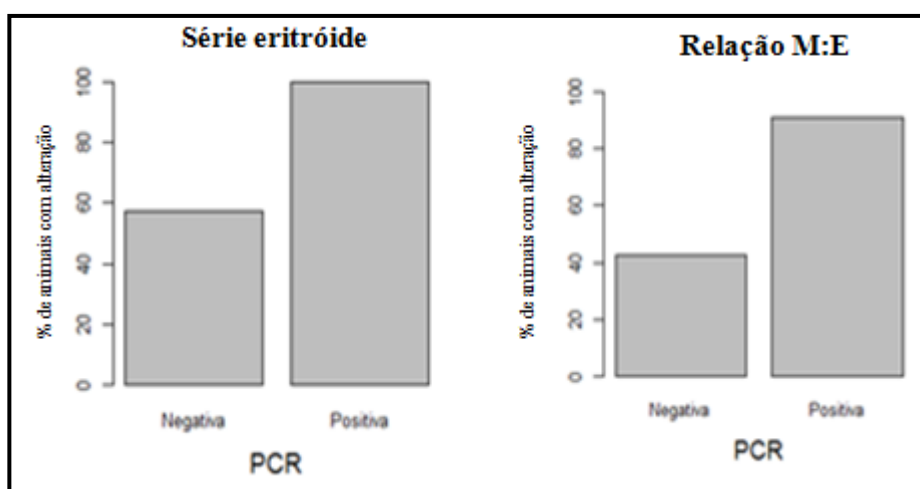


Figura 10- Relação entre aumento ou diminuição da série eritróide e da relação M:E em relação à positividade da medula óssea na PCR. Botucatu, SP, 2016.

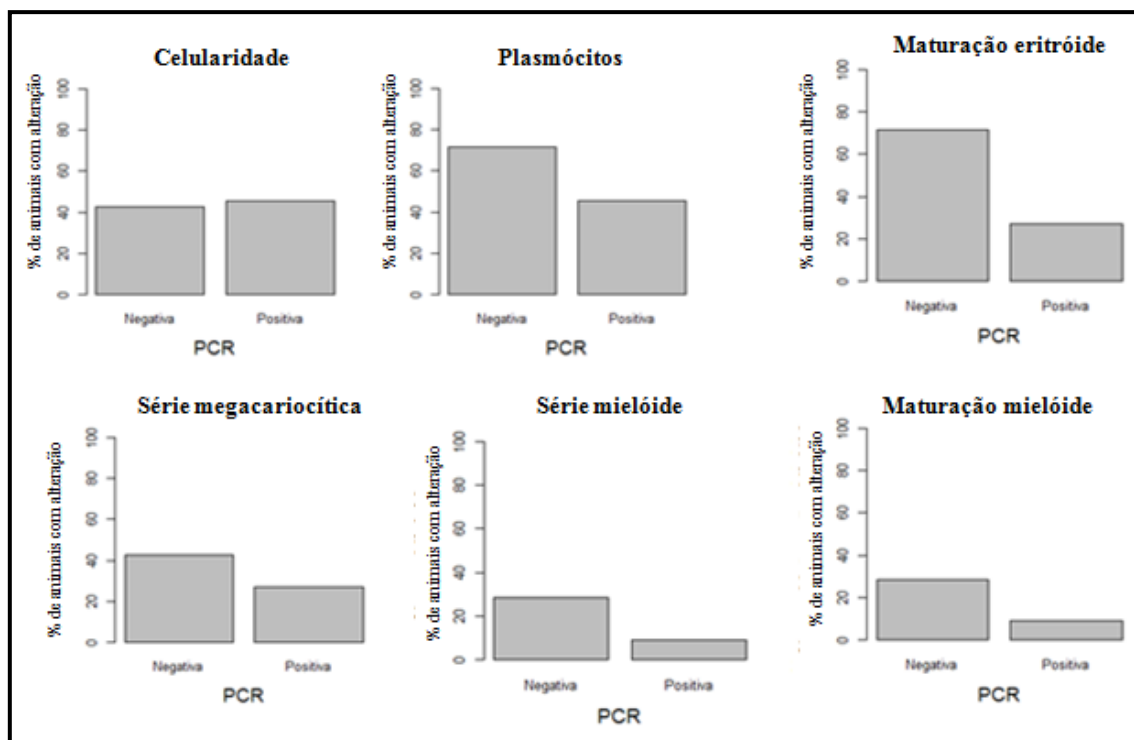


Figura 11- Relação entre alterações medulares e positividade da medula óssea na PCR. Botucatu, SP, 2016

6.6. Relação entre o título de anti-*E. canis* em cães naturalmente infectados e parâmetros sanguíneos e medulares

Diagnóstico sorológico

O diagnóstico sorológico foi realizado em todos os cães antes do tratamento ser iniciado. Títulos acima de 40 foram considerados positivos. Os títulos sorológicos de 2560 em 9/18 e 10240 nos outros 9/18 cães mostraram que a produção de anticorpos anti-*E. canis* é elevada logo no início da infecção e, por isso, no presente estudo os títulos sorológicos foram classificados em menor e maior, respectivamente (Tabela 3). Não houve correlação estatisticamente significativa entre a resposta humoral com as variáveis sanguíneas e medulares.

Tabela 3- Títulos de anticorpos anti-*E. canis* de cães com Ehrlichiose Monocítica Canina aguda. Botucatu, SP, 2016.

N	Título de anti- <i>E. canis</i>
1	10240
2	2560
3	10240
4	10240
5	2560
6	2560
7	10240
8	2560
9	10240
10	10240
11	2560
12	2560
13	10240
14	10240
15	2560
16	2560
17	10240
18	2560

Hemograma e Bioquímica sérica

A presença de anemia, intensidade de trombocitopenia e aumento de monócitos circulantes não apresentaram relação significativa com o título de anticorpos anti-*E. canis* (Figura 12). Os valores de globulina não apresentaram relação estatisticamente significativa com os títulos sorológicos (Wilcoxon rank test, p-value = 0.07), embora haja uma tendência dos animais com títulos mais altos apresentarem hiperglobulinemia. Os resultados de bioquímica sérica também não apresentaram relação significativa com os títulos sorológicos (Wilcoxon rank test, p >0.05). Dentre os animais anêmicos, a intensidade e o tipo da anemia também não apresentaram relação entre com a intensidade da resposta sorológica. O Quadro A2 apresenta os valores de bioquímicos detalhados (Anexo 4).

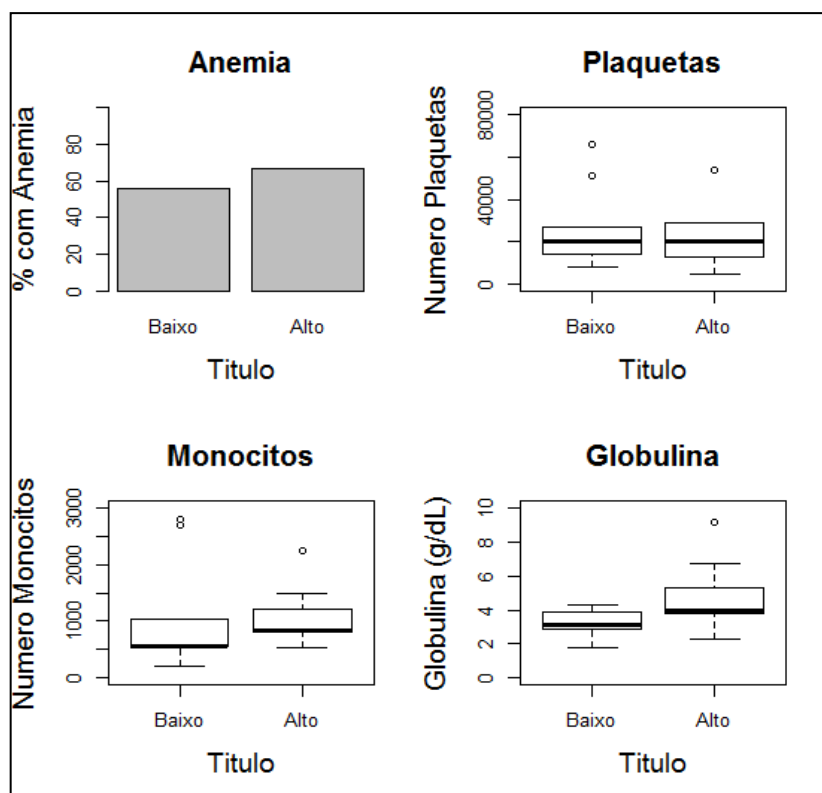


Figura 12- Comparação entre título sorológico e parâmetros sanguíneos em cães com Ehrlichiose Monocítica Canina. Botucatu, SP, 2016.

Medula Óssea

A intensidade da resposta humoral pareceu atuar na resposta hematopoiética quando o título da sorologia foi maior, embora não tenham sido estatisticamente significantes. Dentre a comparação entre títulos sorológicos maiores e parâmetros medulares, destacam-se: celularidade, relação M:E (devidos as séries eritróide e mielóide), aumento de células mielóides jovens e hiperplasia megacariocítica. Os demais índices não foram influenciados pelos títulos de anti-*E. canis*. A Figura 13 resume a relação entre títulos sorológicos menores e maiores com a presença de alterações medulares.

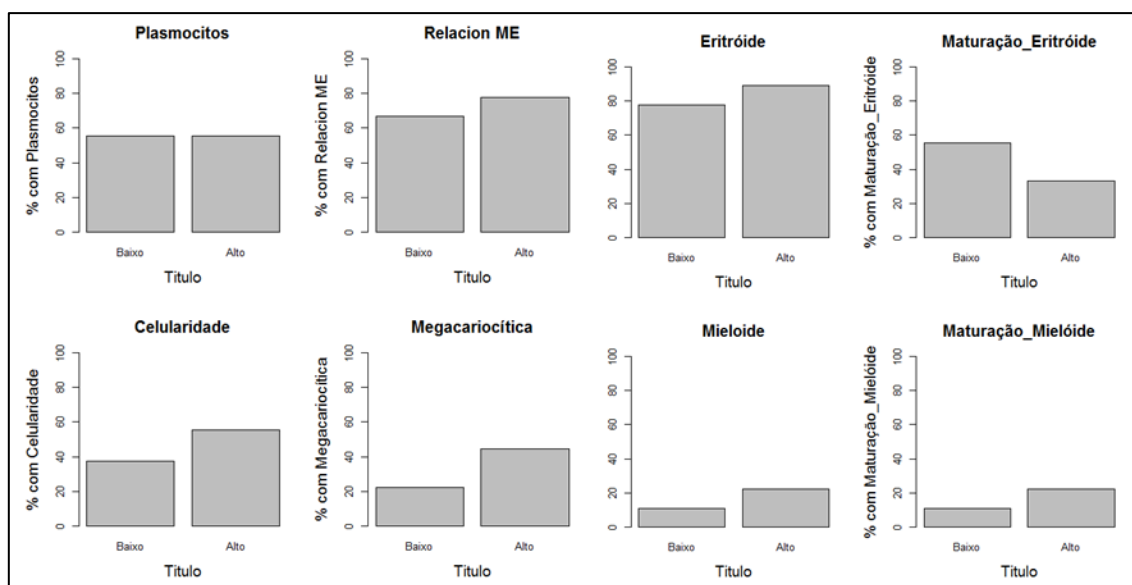


Figura 13- Relação entre títulos sorológicos e alterações medulares em cães com Ehrlichiose Monocítica Canina aguda. Botucatu, SP, 2016.

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

Este estudo confirmou a hipótese de alterações medulares e presença de *E. canis* na medula óssea em cães com EMC na fase aguda. Contudo, ainda que tenham sido observadas múltiplas anomalias, não houve correlação significativa entre a presença do agente na medula óssea e as variáveis sanguíneas e medulares. Assim como também não houve correlação entre os títulos sorológicos e os mesmos parâmetros. A presença de *E. canis*, evidenciada pelas análises realizadas, poderia resultar nas consequências observadas na fase crônica. Esses resultados sugerem, portanto, a necessidade de incluir o mielograma nos exames complementares para acompanhamento e prognóstico da EMC. Por outro lado, a falta de relação entre a positividade da PCR de amostras medulares ou o título de anticorpos anti-*E.canis* e parâmetros sanguíneos e medulares evidencia que a compreensão dos mecanismos fisiopatogênicos da EMC permanecem sem esclarecimento, sem descartar a possibilidade de que o número limitado de cães estudados possa diminuir a possibilidade de encontrar relações significativas.

Alterações medulares observadas nos cães com EMC aguda

O aumento da celularidade e o aumento de células mielóides jovens, mesmo em cães com celularidade normal, indicam granulopoiese em cães com EMC nas fases iniciais da infecção. Entretanto, a interpretação do mielograma foi realizada associando informações dos hemogramas que apresentaram anemia e trombocitopenia intensa como principais alterações, resultados muito semelhantes aos observados por Harrus et al. (1996), Waner e Harrus (2012), Harrus et al. (2015) e Santarém e Aguiar (2016). Dentre os 11/18 animais anêmicos, 10 apresentaram sinais que sugerem anemia hemolítica imunomediada (regenerativa ou arregenerativa). A presença de hiperplasia eritróide e sinais de regeneração em 5/11, assim como a presença de granulopoiese, podem indicar resposta medular frente a uma série de fatores dentre eles destruição celular periférica causada pela resposta imune, que foi observada pela presença de citofagocitose (cão número 11) e monócitos ativados (cães número 7, 11 e 18). Em 3/10 animais a anemia arregenerativa acusou eritropoiese ineficiente e que também pode ter base imunomediada. Os animais número 3 e 7, apesar de apresentarem anemia regenerativa, também evidenciaram resposta eritróide inadequada, pois os hemogramas revelaram apenas discreta anisocitose como sinal de regeneração. A anisocitose e policromasia na

medula óssea do animal 7 podem ser consequência de diseritropoiese, que justificaria hemácias de tamanhos variáveis (HARVEY, 2001, 2012).

Apenas 1/11 cão apresentou indícios de anemia da inflamação, ao contrário do observado por Buhles Jr. et al. (1975) e Harrus et al. (2015) que descreveram essa anemia arregenerativa de causa inflamatória como achado hematológico comum na EMC. O processo inflamatório causa redução discreta a moderada da série vermelha devido a mediadores inflamatórios livres na circulação, responsáveis pela inibição da eritropoiese, danos à membrana da hemácia e, conseqüentemente, diminuição da meia-vida eritrocitária, além da diminuição do ferro sérico (HARVEY, 2001, 2012; HARRUS et al., 2015). Entretanto, este mesmo cão também apresentou redução de formas eritróides maduras, o que pode indicar interrupção na maturação de eritróides jovens.

Outro indício de que o sistema imune pode influenciar na atividade medular está presente nas avaliações citológicas dos outros 7 cães que não estavam anêmicos. Mesmo sem o estímulo de hipóxia, a medula óssea de 5/7 cães demonstrou atividade hematopoiética com o aumento da série eritróide e, em alguns casos, acompanhado de aumento dos estoques de ferro. Estas alterações são comumente observadas em quadros de anemia hemolítica imunomediada. Assim, a presença de rouleaux no animal 13 poderia ser justificada pelo aumento de proteínas plasmáticas totais o que sugere hipergamaglobulinemia como consequência de estimulação antigênica dos linfócitos B. Além disso, foi observada hipoplasia eritróide em 2/7 cães que pode ser sugestiva de futura anemia da inflamação. A redução de formas eritróides maduras também pode ser consequência de processos imunomediados ainda não conhecidos e direcionados a metarrubríctos e/ou reticulócitos, evidenciados pela presença de eritrofagocitose de metarrubríctos em 2 dos 18 cães estudados, dos quais apenas um estava anêmico. Neste cenário, o uso de imunossupressores na EMC poderia ser instituído complementarmente ao tratamento antimicrobiano não apenas na trombocitopenia imunomediada e na fase crônica, como é recomendado por Harrus et. al. (2015) e Santarém e Aguiar (2016), mas também para antecipar alterações da serie eritróide.

O presente estudo identificou alterações sanguíneas e medulares em cães com EMC na fase aguda similares aos descritos na literatura. A trombocitopenia foi o principal achado e, de acordo com Harrus et al. (2015) é a principal alteração

hematológica utilizada para diferenciar cães pré-infectados (animais no PI) e portadores da fase subclínica da doença já que ambos não apresentam sintomatologia clínica. Considera-se a trombocitopenia como intensa quando a contagem plaquetária é menor que 50.000 / μ L de sangue (GOGGS et al.; 2008; MORAES e TAKAHIRA, 2013). Portanto, de modo similar ao observado nos animais inclusos neste estudo, pode-se afirmar que nas fases iniciais da infecção a trombocitopenia costuma ser intensa. Macroplaquetas no sangue periférico e aumento da série megacariocítica foram observados em 3/18 e 6/18 cães, respectivamente. O aumento do VPM é extremamente comum em cães portadores de EMC sendo o mecanismo imunomediado um dos principais responsáveis por quadros de trombocitopenia nos cães acometidos (HARRUS et al., 1996, 2015). A hiperplasia megacariocítica é observada, dentre outras causas, quando há destruição periférica e necessidade de reposição plaquetária pelo organismo (STOCKHAM e SCOTT, 2011). A resposta megacariocítica observada nos mielogramas analisados, portanto, corrobora com os descritos na literatura.

A EMC também apresenta alterações na bioquímica sérica. Estudos realizados anteriormente constatarem infiltração plasmocitária em todos os órgãos de cães, principalmente fígado e rins (HARRUS et al., 1996; HESS, et al., 2003; SANCHES, 2015). Tais autores observaram intenso comprometimento renal e hepático nos animais portadores de EMC associado à deposição de imunocomplexos. As médias obtidas dos resultados da bioquímica sérica dos cães amostrados mostram discreto aumento de ALT e de FA corroborando com diversos estudos similares (SANTARÉM et al., 2008; WANER e HARRUS, 2013). Isto sugere lesão hepática aguda em cães, uma vez que, em casos crônicos, como cirrose, hepatite crônica ou neoplasias, tais enzimas apresentam valores normais ou diminuídos. As médias e medianas dos valores de albumina e globulina estavam dentro dos valores de referência. Entretanto, alguns animais apresentaram hipoalbuminemia e hiperglobulinemia, corroborando com a literatura que descrevem hipoalbuminemia, hiperglobulinemia e hipergamaglobulinemia como achados comuns na doença (HARRUS et al., 2015; SANTARÉM e AGUIAR, 2016). O presente estudo não revelou elevação nos valores de creatinina e apenas 3/18 cães apresentaram valores de ureia superiores ao considerado normal para a espécie. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Santarém et al. (2008) que demonstraram valores séricos de ALT e ureia mais elevados na fase aguda e de creatinina quando a doença já estava cronificada. Valores elevados de ureia

provavelmente estão associados ao metabolismo de nitrogênio proveniente do catabolismo muscular que aumenta em resposta às infecções ou possíveis hemorragias gastroentéricas, que podem ocorrer em animais que apresentam trombocitopenia intensa.

Presença de *E. canis* na medula óssea de cães com EMC aguda

O presente estudo confirmou a presença de *E. canis* na medula óssea de cães com EMC na fase aguda. Amostras medulares de 11/18 cães apresentaram positividade na PCR. As culturas realizadas neste estudo não apresentaram positividade após 28 dias, embora tenha sido identificado DNA do patógeno em 1 das 7 amostras cultivadas. A interpretação dos resultados negativos neste caso deve ser analisada com cautela. A presença do patógeno foi confirmada por técnicas moleculares, porém o mesmo não se adaptou ao meio de cultura. O isolamento só pode ser considerado positivo caso o patógeno se multiplique de forma considerável durante o período de incubação. Mesmo seguindo exatamente a técnica de punção aspirativa descrita por Harvey (2012), não se exclui eventual contaminação das amostras com sangue periférico. Entretanto, somente a realização de eutanásia nos cães estudados evitaria tal contaminação, o que contraria questões éticas deste estudo. Além da confirmação por técnicas moleculares, mórula de *E. canis* foi visualizada em um dos mielogramas. Segundo Tenório et al. (2007), este é um achado raro tanto em esfregaços sanguíneos quanto em medula óssea. Existem evidências de que células precursoras possam também ser alvos do patógeno já que mórulas podem ser encontradas em aspirados medulares em até 2 semanas PI (HARRUS et al., 1996, 2015; WANER e HARRUS, 2013). Moreira et al. (2005) observaram inclusões de *E. canis* em monoblastos em cães experimentalmente infectados. Embora não sejam suficientes para elucidar mecanismos ainda desconhecidos, os resultados positivos das amostras medulares neste estudo são promissores e incentivam futuros estudos sobre a patogenicidade da EMC em relação às alterações medulares que poderiam explicar que forma os mecanismos imunológicos do hospedeiro estão relacionados à EMC.

Estudos recentes têm identificado infiltração plasmocitária e linfoplasmocitária em muitos órgãos e tecidos de cães infectados por *E. canis*, inclusive na medula óssea (HARRUS et al., 1996; HESS et al., 2003). Assim como o aumento no número de

plasmócitos indica estímulos antigênicos na EMC, a hiperplasia linfóide está associada a anemias hemolíticas imunomediadas (Harvey 2001,2012). Isso sugere que, embora não esteja totalmente esclarecido, o sistema imune do hospedeiro exerce importante papel na patogenia da doença. Sabe-se que infecção por *E. canis* pode interferir em células precursoras da medula óssea e que alterações no funcionamento da medula óssea podem possibilitar que linfócitos B auto-reativos não sejam eliminados durante a proliferação celular e alcancem a corrente sanguínea (KALLICK, 2011). Neste estudo, também foram observados linfócitos reativos (possuem grânulos citoplasmáticos – linfócitos B) em um cão e valores elevados na contagem total de linfócitos em dois cães, que consistiu em mais de 1/3 das células em ambos os animais. Segundo Harrus et al. (2015), cães com EMC que apresentam contagens de linfócitos granulares entre 5.200 a 17.200 / μ L de sangue, como observados neste estudo, podem ser erroneamente confundidos com leucemia linfocítica bem diferenciada, visto que linfocitose granular apresenta gamopatias monoclonais assim como alguns cães com EMC. Tais achados propõem que a EMC deveria ser incluída no diagnóstico diferencial de casos sugestivos de processos neoplásicos na medula óssea.

Relação entre a presença de E. canis em amostras de medula óssea e parâmetros sanguíneos e medulares

Existem evidências de que a presença de *E. canis* na medula poderia ser responsável pelas disfunções do sistema imune observadas neste estudo. Isto justificaria, por exemplo, a redução de eritrodes maduras que pode ser consequência de destruição ou interrupção da maturação dessas células. Além disso, a hiperplasia eritróide foi mais frequente nos animais em que *E. canis* estava presente na medula óssea mesmo em animais não anêmicos, embora sem significância estatística. Pesquisas sobre a sobrevivência de *Ehrlichia chaffensis* demonstrou que o DNA da célula hospedeira pode ser alterado durante sua divisão facilitando sua permanência uma vez que pode suprimir a apoptose e desregular o sistema imunológico (KALLICK, 2011; KALLICK et al., 2015). Outro estudo realizado por Rikihisa (2011) com *Anaplasma phagocytophilum* resultou em alterações características de leucemia depois de inoculado em células imunológicas humanas. Os tratamentos dessas neoplasias de células medulares contam com uma infinidade de fármacos responsáveis pela modulação do

sistema imune, o que muitas vezes resulta na diminuição dos sinais (KALLICK, 2011; KALLICK et al., 2015). Tais estudos podem sugerir que a persistência do parasita pode acarretar patologias graves que normalmente não são associadas à hemoparasitoses.

Existem evidências que suportam a hipótese de que a presença de *E. canis* na medula possa comprometer a hematopoiese. Segundo Borjesson et al. (2009), organismos da família Anaplasmataceae são capazes de induzir alterações significativas na diferenciação, proliferação e/ou mobilização de células-tronco. Allen et al. (2014) relataram pela primeira vez inclusões de *E. ewingii* em células precursoras causando comprometimento da medula óssea de paciente humano. Outra evidência de que *E. canis* pode resultar em lesões mais graves comprometendo as células precursoras foi observada em pacientes diagnosticados com *E. chaffensis* que desenvolveram leucemia e apresentaram melhora significativa nos exames hematológicos após associação de antibióticos ao tratamento quimioterápico (KALLICK, 2011; KALLICK et al., 2015). O presente estudo não evidenciou a infecção de células precursoras, sem confirmar os achados anteriores.

Relação entre o título de anti-*E. canis* em cães naturalmente infectados e parâmetros sanguíneos e medulares

Em relação ao diagnóstico sorológico, todos os cães deste estudo apresentaram títulos de anti-*E. canis* elevados, demonstrando a resposta humoral exacerbada, assim como descrito em estudos realizados na infecção experimental de cães com diferentes cepas de *E. canis* (HARRUS et al., 2003; HESS et al., 2006). Ao contrário do observado neste estudo, Harrus et al. (1996) detectaram aumento de anticorpos anti-*E. canis* IgG a partir de 15 dias PI e somente após 2 meses PI títulos acima de 5120. Embora não seja possível determinar o momento exato da infecção, a probabilidade de que os cães deste estudo permaneceram mais de um mês infectados é baixa, pois todos apresentaram sinais de EMC na fase aguda e o período de incubação de *E. canis* costuma variar de 8 a 20 dias (HARRUS et al., 1998). Pode-se inferir que as diferenças entre a infecção experimental e natural podem estar relacionadas à virulência de *E. canis* utilizada nas infecções experimentais. Assim, estudos para identificação das cepas circulantes na região estudada seriam interessantes para responder tais questões.

Não foram observadas correlações estatisticamente significativas entre títulos sorológicos (menor e maior) e parâmetros medulares e hematológicos. Entretanto, foi observada certa tendência que necessitaria maior número de cães para confirmar sua relevância. Por exemplo, cães com títulos maiores apresentaram mais alterações nas séries mielóide, eritróide (e, portanto, na relação M:E) e megacariocítica, além de aumento de células mielóides jovens e da celularidade. A participação da resposta humoral na patogenia da EMC ainda não é bem definida e a literatura sobre a influência dos anticorpos anti-*E. canis* nas células medulares é escassa. Futuros estudos poderiam auxiliar a esclarecer se as tendências observadas neste estudo possuem algum mecanismo imunitário relevante para o entendimento da participação da imunidade humoral na fisiopatogenia da EMC.

Os dados obtidos no diagnóstico sorológico realizado nos animais amostrados não parecem estar relacionados com os valores de proteínas totais, em especial globulinas, o que concorda com Harrus et al. (2015). Todavia, é conhecido que a saliva do carrapato possui componentes que inibem Th1 e estimulam Th2 e, além disso, *E. canis* é capaz de reduzir significativamente a expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal de classe II (MHC-II) (HARRUS et al., 2003; HESS et al., 2006). Existe ainda a possibilidade da resposta imunomediada estar relacionada com a cronicidade da doença. Por exemplo, ratos com deficiência de células T ou apresentando deficiência de MHC-II infectados com *E. chaffensis* permaneceram cronicamente infectados, porém foram protegidos da letalidade da doença após administração de soro imune (HESS et al., 2006). Mais estudos relacionando a cronicidade da doença à resposta celular e imunomediada são fundamentais para o desenvolvimento de novas condutas terapêuticas que possam diminuir a mortalidade dos animais na fase crônica e que, não raro, evoluem para falência medular e óbito.

Cães com EMC permanecem com os títulos séricos altos por meses a anos (HARRUS et al., 1998, 2004). Dentre os animais que puderam ser acompanhados por pelo menos três semanas, 5/5 permaneceram com altos títulos sorológicos indicando que a produção de anticorpos continua sendo estimulada mesmo após antibioticoterapia. Harrus et al. (1998, 2015) e Santarém e Aguiar (2016) afirmaram ser comum a cicatriz imunológica em animais pré-infectados e/ou anteriormente acometidos pela EMC, principalmente na fase aguda da enfermidade. Harrus et al. (1996) referiram que os títulos de anticorpos aumentam em todas as fases da doença, porém, na fase crônica, a

elevação tende a ser menor devido à leucopenia pronunciada dos cães gravemente acometidos. Tal achado pode ser creditado à secreção ineficiente de citocinas por linfócitos Th e células apresentadoras de antígenos (necessárias para a ativação, divisão e diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos) resultando em produção ineficaz de anticorpos. Contudo, a queda de anticorpos na fase crônica pode ser considerada benéfica já que os anticorpos produzidos não são capazes de eliminar o agente e podem causar uma infinidade de sinais clínicos comuns da EMC atribuída à deposição de imunocomplexos. A produção de altos títulos de IgM e IgG, identificados em outros estudos, podem ativar o Sistema Complemento (SC) e causar reação de hipersensibilidade do tipo III (CASTRO et al., 2004). Outro indicativo de que a resposta humoral pode estar relacionada na patogenia da EMC foi referido por Hess et al. (2006) que compararam animais infectados com reinfetados e observaram que os do segundo grupo apresentaram menos sinais clínicos e com menor intensidade demonstrando que a infecção primária modula o curso de uma segunda infecção. O uso de imunossupressores simultaneamente à terapia convencional da EMC parece ser uma opção válida para reduzir as consequências da infecção.

Achados adicionais do estudo

Além de responder os objetivos específicos, este trabalho também mostrou que todos os cães apresentaram sinais clínicos compatíveis com EMC, similares aos descritos em estudos realizados por Harrus et al. (1996) e Harrus et al. (2004). A taquipneia e aumento do TPC foram atribuídos à estresse, pois os cães encontravam-se fora do ambiente habitual resultando em medo e/ou desconforto com a situação. Os dois cães diagnosticados com pneumonia permaneceram internados para o tratamento concomitante à EMC com ceftiofur (7,5 mg/Kg a cada 24 horas durante 14 dias). A doxiciclina é o antibiótico de eleição no tratamento da EMC. Entretanto, possui ação limitada frente a outras bactérias patogênicas que podem acometer os animais, durante o curso da doença. Assim, de acordo com Santarém e Aguiar (2016), indica-se associar ao tratamento específico outros antibióticos de amplo espectro quando o cão apresenta infecções secundárias, tais como o cloranfenicol (também indicada no tratamento específico da EMC), ceftiofur, ceftriaxona, ciprofloxacino ou ainda, em casos mais graves, levofloxacino.

Os resultados deste estudo também mostraram o comportamento dos proprietários dos cães estudados que poderiam facilitar a transmissão de diversas enfermidades infecciosas incluindo EMC. Os cães participantes do estudo tinham acesso irrestrito à rua e conviviam com outros animais. Além disso, a maioria dos proprietários não adota medidas de prevenção (vacinação ética e vermifugação) e tampouco fornecem aos cães alimentação equilibrada (menos da metade era alimentada exclusivamente com ração). A partir da anamnese realizada no momento da consulta constatou-se que todos os animais incluídos no presente estudo viviam em habitat urbano e apresentavam ixodidiose. Esses achados concordam com estudos realizados por Labruna et al. (2004) e também por Aguiar et al. (2013), que descreveram o hábito essencialmente nidícola de *R. sanguineus* que, apesar de também ser encontrado em zonas rurais, apresenta maior ocorrência em áreas urbanas nos locais de repouso do hospedeiro garantindo o ciclo biológico do vetor. Os mesmos autores afirmam que apenas 5% da população do carrapato parasita os cães e os outros 95% permanecem no ambiente. A profilaxia da EMC, portanto, baseia-se fundamentalmente no uso de ectoparasiticidas e, principalmente, no controle ambiental.

8. LIMITAÇÕES

As análises que não apresentaram significância podem representar de fato os efeitos de *E. canis* na medula óssea ou do título de anti-*E. canis*. Alternativamente, podem estar relacionadas com baixo poder estatístico, consequência de número reduzido de cães. Com efeito, a insegurança dos proprietários em relação a procedimentos anestésicos e o receio da punção aspirativa causar dor ou prejuízos à saúde dos cães, fez com que os proprietários não aceitassem participar do estudo, ainda que esclarecidos sobre a minimização dos riscos e curto tempo do procedimento.

A maioria das amostras positivas na PCR não pode ser cultivada. O envio de amostras pelo correio (SEDEX®) resultou em hemólise das amostras e impossibilitou o cultivo. Esta limitação é difícil de resolver, devido à distância entre o local de estudo e os laboratórios que realizam cultivo celular.

A presença de mórula em células precursoras seria o diagnóstico que confirmaria os resultados positivos da PCR de *E. canis* na medula. Neste estudo, não foram

encontrados blastos com inclusões do agente, o que poderia questionar os resultados positivos da PCR. Entretanto, o diagnóstico direto tem baixa sensibilidade e, por isso, resultados negativos não excluem a ocorrência de infecção em células precursoras.

CONCLUSÕES

9. CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que a EMC possui caráter multissistêmico e progressivo e não deve ser negligenciada mesmo nos casos em que o animal não apresenta sinais clínicos e alterações hematológicas graves. Além disso, deve-se considerar o uso de imunossuppressores complementarmente ao tratamento da EMC a fim de reduzir o processo imunomediado que pode gerar consequências graves nos cães acometidos.

O mielograma é um importante exame complementar na EMC, inclusive na fase aguda. A avaliação da medula óssea pode indicar possíveis distúrbios hematológicos e adiantar-se às alterações em sangue periférico. Outrossim, o mielograma revelou sua importância na determinação da fase da infecção e do prognóstico da doença.

Os resultados apresentados poderão contribuir na compreensão de mecanismos não totalmente esclarecidos na fisiopatogenia da doença bem como avaliar a colheita de medula como método alternativo de diagnóstico e prognóstico da doença utilizando o cultivo celular e PCR.

10. AGRADECIMENTOS

À Capes pelo auxílio financeiro, na forma de bolsa de estudo durante o mestrado, para realização deste projeto.

REFERÊNCIAS

11. REFERÊNCIAS

AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; PINTER, A.; GENNARI, S. M.; CAMARGO, L. M., LABRUNA, M.B. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 44, n. 1, p.126-132, 2007.

AGUIAR, D. M.; HAGIWARA, M. K.; LABRUNA, M. B.; In vitro isolation and molecular characterization of an *Ehrlichia canis* strain from São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 489–493, 2008.

AGUIAR, C. L. G.; PINTO, D. M.; PAPPEN, F. G.; FILHO, N. A. C.; SANTOS, T. R. B.; FARIAS, N. A. R. Parâmetros da fase de vida livre de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): adaptado ao clima subtropical. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.80, n.4, p. 375-380, 2013.

ALLEN, M. B.; PRITT, B. S.; SLOAN, L. M.; PADDOCK, C. D.; MUSHAM, C. K.; RAMOS, J. M.; CETIN, N.; ROSENBAUM, E. R. First reported case of *Ehrlichia ewingii* involving human bone marrow. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 11, p. 4102-4104, 2014.

BAUER, D. F. Constructing confidence sets using rank statistics. **Journal of the American Statistical Association**, v. 67, p. 687-690, 1972.

BORJESSON, D.; MACNAMARA, K.; JOHNS, J.; WINSLOW, G. *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia muris* induce cytopenias and global defects in hematopoiesis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. 2, p. 66-67, 2009.

BUHLES Jr, W. C.; HUXSOLL, D. L.; HILDEBRANDT, P. K. Tropical canine pancytopenia: role of aplastic anemia in the pathogenesis of severe disease. **Journal of Comparative Pathology**, Washington, v. 85, p. 511-521, 1975.

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

COUTO, C. G. Hematologia. In: NELSON, R. W. & COUTO, C. G. (Org.) **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 5ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1201-1282, 2015.

FEITOSA, F. L. F. Exame Físico Geral ou de Rotina. In: FEITOSA, F. L. F. (Org.). **Semiologia Veterinária - A Arte do Diagnóstico**. 3ª edição. Roca, p. 77-102, 2014.

GOGGS, R; CHAN, D. L. Concurrent immune-mediated haemolytic anaemia and severe thrombocytopenia in 21 dogs. **The Veterinary Record**, v. 163, p. 323-327, 2008.

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

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

HARRUS, S.; KENNY, M.; MIARA, L.; AIZENBERG, I.; WANER, T.; SHAW, S. Comparison of Simultaneous Splenic Sample PCR with Blood Sample PCR for Diagnosis and Treatment of Experimental *Ehrlichia canis* Infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 11, p. 4488–4490, 2004.

HARRUS, S.; WANER, T.; NEER, T. M. *Ehrlichia canis* infection. In: GREENE, C. E. (Org.). **Infectious diseases of the dog and cat**. 4th edition. Georgia: Elsevier, p. 227-256, 2015.

HARVEY, J. W. **Atlas of veterinary hematology: blood and bone marrow of domestic animals**. Philadelphia: Elsevier, 228 p., 2001.

HARVEY, J. W. **Veterinary hematology: a diagnostic guide and color atlas**. Missouri: Elsevier, 360 p., 2012.

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**, v. 109, p.117-125, 2006.

HOLLANDER, M.; WOLFE, D. A. **Nonparametric Statistical Methods**. 2th edition. New York: John Wiley & Sons, p. 27-33 (one-sample), 68-75 (two-sample), 1999.

HUXSOLL, D. L.; HILDEBRANDT, P. K.; NIMS, R. M.; WALKER, J. S. Tropical Canine Pancytopenia. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 157, n. 11, p. 1627-1632, 1970.

HUXSOLL, D. L. Canine ehrlichioses (tropical canine pancytopenia): a review. **Veterinary Parasitology**, v. 2, p. 49-60, 1976.

IQBAL, Z.; CHAICHANASIRIWITHAYA, W.; RIKIHISA, Y. Comparison of PCR with Other Tests for Early Diagnosis of Canine Ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 7, p. 1658-1662, 1994.

JAIN, N. C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.

KALLICK, C. A. *Ehrlichia* and bone marrow cells: could ehrlichial infection explain the unsuspected etiology of some diseases of the immune system? **Medical Hypotheses**, v. 77, n. 3, p 374-379, 2011.

KALLICK, C. A.; FRIEDMAN, D. A.; NYINDO, M. B. A. Could ehrlichial infection cause some of the changes associated with leukemia, myelodysplastic diseases and autoimmune disorders, and offer antibiotic treatment options? **Medical Hypotheses**, v. 85, n. 6, p. 891-893, 2015.

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

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M. C.; BOUYER, D. H.; MCBRIDE, J. W.; PINTER, A.; POPOV, V.; GENNARI, S. M. WALKER, D. H. Rickettsia Species Infecting *Amblyomma cooperi* Ticks from an Area in the State of São Paulo, Brazil, Where Brazilian Spotted Fever Is Endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 90–98, 2004.

MORAES, L. F.; TAKAHIRA, R. K. Aplasia medular em cães. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 9, n. 1, p. 99-108, 2010.

MORAES, L. F.; TAKAHIRA, R. K. Avaliação dos distúrbios hemostáticos e dos diferentes marcadores prognósticos clínico-laboratoriais em cães com anemia hemolítica imuno-mediada. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. 1, p. 10-19, 2013.

MOREIRA, S. M.; MACHADO, R.; PASSOS, L. F. Detection of *Ehrlichia canis* in bone marrow aspirates of experimentally infected dogs. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, p. 958-960, 2005.

MYLONAKIS, M. E.; DAY, M. J.; SIARKOU, V. VERNAU, W.; KOUTINAS, A. F. Absence of myelofibrosis in dogs with myelosuppression induced by *Ehrlichia canis* infection. **Journal of Comparative Pathology**, California, v. 142, p. 328-331, 2010.

R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2015. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2015.

RIKIHISA, Y. Mechanisms of obligatory intracellular infection with *Anaplasma phagocytophilum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 3, p. 469-489, 2011.

ROBBINS, S. L; COTRAN, R. S. **Pathologic basis of disease**. Philadelphia: Elsevier, 1448 p., 2005.

SANCHES, C. D. C. **Estudo histopatológico das lesões viscerais da Ehrliquiose Monocítica Canina na fase crônica**. 60 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2015.

SANTARÉM, V. A.; AGUIAR, D. M. Erliquiose canina. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C.(Org.). **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia**. 1ª edição. Rio de Janeiro: Roca, p. 95-111, 2016.

SAINZ, A.; ROURA, X.; MIRÓ, G.; ESTRADA-PEÑA, A.; KOHN, B.; HARRUS, S. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. **Parasites & Vectors**, 2015.

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

SOUZA, D. R. D.; MELO, A. L. T.; MURARO, L. S.; AGUIAR, D. M.; ALBUQUERQUE, D. Levamisol enhances global and differential leukocyte numbers in peripheral blood of dogs with ehrlichiosis. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 37, n. 6, p. 647-652, 2013.

STOCKHAM, S. L; SCOTT, M. A. **Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

TENÓRIO, A. P. M. et al. *Ehrlichia canis* em mielócito de cão – Relato de caso. **Medicina Veterinária**, Recife, v. 1, n. 1, p. 62-65, 2007.

UENO, T. E. H.; AGUIAR, D. M.; PACHECO, R. C.; RICHTZENHAIN, L. J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C.; MEGID, J.; LABRUNA, M. B. *Ehrlichia canis* in dogs attended in a veterinary hospital from Botucatu, São Paulo State, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, Jaboticabal, v. 18, n. 3, p. 57-61, 2009.

VIEIRA, R. F. C.; BIONDO, A. W.; GUIMARÃES, A. M. S.; SANTOS, A. P.; DUTRA, L. H.; DINIZ, P. P. V. P.; MORAIS, H. A.; MESSICK, J. B.; LABRUNA, M. B.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, 2011.

WANER, T. Hematopathological changes in dogs infected with *Ehrlichia canis*. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, v. 63, n. 1, 2008.

WANER, T.; HARRUS, S. Canine monocytic ehrlichiosis – from pathology to clinical manifestations. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, v. 68, n. 1, 2013.

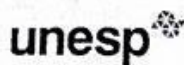
TANG, Y. W.; PROCOP, G. W.; PERSING, D. H. Molecular diagnostics of infectious diseases– review. **Clinical Chemistry**, v. 43, n. 11, p. 2021–2038, 1997.

THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPBELL, T. W.; DENICOLA, D.; FETTMAN, M. J.; LASSEN, E. D.; REBAR, A.; WEISER, G.; FAGLIARI, J. J. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. São Paulo: Roca, 582 p., 2006.

WEN, B.; RIKIHISA, Y.; MOTT, J. M.; GREENE, J. M.; KIM, H. Y.; ZHI, N.; BARTSCH, R. Comparison of Nested PCR with Immunofluorescent-Antibody Assay for Detection of *Ehrlichia canis* Infection in Dogs Treated with Doxycycline. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 7, p. 1852–1855, 1997.

ANEXOS

ANEXO 1 - CEUA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
JULIO DE MESQUITA FILHO



fmvz - unesp

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Campus de Botucatu

A T E S T A D O

Atesto que o Projeto de Pesquisa "Envolvimento do processo imunomediato na patogenia da trombocitopenia em cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis*" **Protocolo CEUA 137/2015**, aprovado em 06/11/2015, a ser conduzido por **Marília Salgato Caxito**, para fins de pesquisa científica; teve o título alterado para: "Estudo citológico da medula óssea de cães portadores de Ehrlichiose Monocítica Canina na fase aguda", e encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

Vigência do projeto	11/11/2015 a 03/02/2017
Finalidade	Pesquisa Científica
Espécie/Linhagem	Canina/ <i>Canis lupus familiaris</i>
Nº de animais	Variável
Peso/Idade	Variável/Variável
Sexo	Variável
Origem	FMVZ-Unesp-Botucatu

Botucatu, 05 de setembro de 2016

Profª. Ass. Drª. Ibiara Correia de Lima Almeida Paz

Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica
Rua Prof. Dr. Walter Maurício Corrêa, s/n
UNESP - Campus de Botucatu/SP - Cep 18618-681
(14) 3880-2176 - patrizia@fmvz.unesp.br - www.fmvz.unesp.br

ANEXO 2

**fmvz - unesp**

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA - CAMPUS DE BOTUCATU
DEPARTAMENTO DE HIGIENE VETERINÁRIA E SAÚDE PÚBLICA

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Declaro, para os devidos fins, que estou ciente e autorizo a realização do procedimento: Colheita de sangue periférico e punção medular, referente ao Projeto de Pesquisa intitulado: “Estudo citológico da Medula Óssea de cães portadores de Ehrlichiose Monocítica Canina na fase aguda”, de responsabilidade de Marília Salgado Caxito.

Nome do animal: _____

Nome do Responsável: _____

RG: _____ CPF: _____

Assinatura: _____

Data: ____ / ____ / ____

RG ANIMAL: 213.280

RG Animal	Nome	Espécie	Raça	Idade Meses	Peso	Sexo
213.280	GALEGUINHO	CANINA	SHI-TZU	21,0	9,150	
Proprietário				Cidade	UF	

A.	B.	C.	D.	E.	F.	G.	H.	I.	J.	K.
Queixa Principal PROP RELATA QUE HÁ 4 DIAS ANIMAL APRESENTA HIPOREXIA E HÁ 2 DIAS ANOREXIA, SE APRESENTANDO MAIS APATICO. PROP NEGA ÊMESA, DIARRÉIA. PROP RELATA QUE URINA ESTAVA ALARANJADA, COM MENOR QUANTIDADE E FREQUENCIA, AS FEZES ESTÃO EM MENOR QUANTIDADE NÃO FAZENDO ALGUNS DIAS.										
Aparência Geral APATIA.										
Peso atual 9,150										

-Acesso Rápido... Imprimir Finalizar Gravar Fechar

RG ANIMAL: 213.280

RG Animal	Nome	Espécie	Raça	Idade Meses	Peso	Sexo
213.280	GALEGUINHO	CANINA	SHI-TZU	21,0	9,150	
Proprietário				Cidade	UF	

A.	B.	C.	D.	E.	F.	G.	H.	I.	J.	K.
Olhos, Orelhas, Nariz PROP RELATA SECREÇÃO NO OLHO AMARELADA HÁ DOIS DIAS, NEGA SECREÇÃO OTOLÓGICA E NASAL.										
Ósteo-Muscular PROP RELATA TER DIFICULDADE NOS MEMBROS POSTERIORES, ANDAR CAMBALEANTE.										
Neurológico PROP RELATA ANDAR CAMBALEANTE, NEGA CONVULSÃO, HEAD TILT, HEAD PRESS, ALTERAÇÃO DE COMPORTAMENTO.										
Cardio-Vascular POSSÍVEL TOSSE, NEGA CIANOSE, SÍNCOPE, RELATA CANSAÇO FÁCIL ESSA SEMANA.										

-Acesso Rápido... Imprimir Finalizar Gravar Fechar

RG ANIMAL: 213.280

RG Animal	Nome	Espécie	Raça	Idade Meses	Peso	Sexo
213.280	GALEGUINHO	CANINA	SHI-TZU	21,0	9,150	
Proprietário				Cidade	UF	

A.	B.	C.	D.	E.	F.	G.	H.	I.	J.	K.
Respiratório PROP RELATA TOSSE NESSES 4 DIAS, NEGA SECREÇÃO NASAL, ESPIRRO E PROP RELATA QUE ESTÁ BEM OFEGANTE (POSSÍVEL DIFICULDADE PARA RESPIRAR).										
Gêrito-Urinário PROP RELATA QUE O ANIMAL É INTEIRO, A URINA HÁ 4 DIAS ESTÁ ALARANJADA, EM MENOR FREQUENCIA E QUANTIDADE.										
Gastro-Intestinal PROP NEGA ÊMESE, DIARRÉIA, RELATA ANOREXIA HÁ 2 DIAS E HALITOSE.										
Outros (Pele, Medicações) PRO NEGA DAR MEDICAÇÃO E ALTERAÇÕES EM PELE.										

-Acesso Rápido... Imprimir Finalizar Gravar Fechar

RG ANIMAL: 213.280

RG Animal	Nome	Espécie	Raça	Idade Meses	Peso	Sexo
213.280	GALEGUINHO	CANINA	SHI-TZU	21,0	9,150	
Proprietário				Cidade	UF	

A.	B.	C.	D.	E.	F.	G.	H.	I.	J.	K.
Alimentação ☒ Ração ☐ Comida Caseira										
Vacinação Descrição: V10 E RÁBICA EM DIA										
Vermifugação ☒ Sim - Descrever: EM DIA (FEVEREIRO)										
Ambiente ☐ Rural ☒ Urbano ☒ Acesso à Rua										
Presença de ☒ Pulgas ☒ Carrapatos ☐ Roedores										
Contactantes SIM, SEM SINTOMAS.										
Doenças Anteriores ESTAVA SOB TRATAMENTO DA DOENÇA DO CARRAPATO.										

-Acesso Rápido... Imprimir Finalizar Gravar Fechar

ANEXO 4

Tabela A1- Dados clínicos e parâmetros físicos de cães com Ehrlichiose Monocítica Canina aguda. Botucatu, SP, 2016.

	SEXO	IDADE (meses)	FC (bpm)	FR (mpm)	TR (°C)	TPC (seg)
Valores de referência			60-160	18-36	37,5-39,2	1-2
Animal						
1	M	18	84	56	39,3	2
2	M	16	80	16	40,2	2
3	M	30	120	20	37,7	3
4	F	32	110	76	39,8	3
5	M	17	92	80	39,3	1
6	M	12	138	42	39,3	2
7	M	24	90	30	38,4	2
8	F	4	132	112	39,0	2
9	M	10	140	28	39,5	3
10	M	36	84	28	38,1	2
11	M	30	68	20	39,0	3
12	M	48	88	20	38,4	3
13	F	24	80	24	38,7	2
14	M	72	104	36	39,3	1
15	F	106	124	20	38,3	2
16	F	73	44	92	39,4	2
17	F	109	29	14	39,6	2
18	F	24	130	80	40,2	2

FC: Frequência Cardíaca; FR: Frequência Respiratória, TPC: Tempo de Preenchimento Capilar. Valores de Referência: Feitosa, 2014.

Tabela A2- Informações epidemiológicas de cães com EMC aguda. Botucatu, SP, 2016.

ANAMNESE	N	%
Habitat		
Urbano	18	100
Rural	0	0
Acesso à rua		
Sim	13	72,2
Não	5	27,8
Ectoparasitas		
Ausência	0	0
Presença	18	100
Alimentação		
Ração	7	38,9
Comida caseira	1	5,6
Ambos	10	55,6
Contactantes		
Não	5	27,7
Assintomáticos	12	66,7
Sintomáticos	1	5,6
Vermifugação		
Não	10	55,6
Sim	8	44,4
Vacinação - V10		
Não vacinado	13	72,2
Não ética	2	11,1
Ética	3	16,7
Vacinação – AR		
Não vacinado	11	61,1
Não ética	4	22,2
Ética	3	16,7
Contactantes		
Não	5	27,7
Assintomáticos	12	66,7
Sintomáticos	1	5,6

N: número de animais em cada categoria; %: porcentagem de animais em cada categoria.

Tabela A3- Informações epidemiológicas de cães com Ehrlichiose Monocítica Canina aguda. Botucatu, SP, 2016.

SINAIS CLÍNICOS		N	%
Atitude	Normal	4	22,2
	Apático	14	77,8
Apetite	Normal	10	55,6
	Hiporexia	4	22,2
	Anorexia	4	22,2
Ecc	Normal	11	61,1
	Magreza	7	38,9
	Caquexia	0	0
Mucosas	Normocorada	11	61,1
	Congesta	1	5,6
	Hipocorada	6	33,3
Desidratação	Ausente	12	66,7
	Leve	4	22,2
	Moderada	2	11,1
Linfoadenomegalia	Ausência	10	55,6
	Presença	8	44,4
Hepatomegalia	Ausência	13	72,2
	Presença	5	27,8
Esplenomegalia	Ausência	13	72,2
	Presença	5	27,8
Abdominalgia	Ausência	8	44,4
	Presença	10	55,6
Alterações oculares	Ausência	12	66,7
	Secreções	1	5,6
	Uveíte	1	5,6
	Conjuntivite	4	22,1
	Hifema	0	0
Alterações nasais	Ausência	17	94,4
	Secreções	1	5,6
	Epistaxe	0	0
Alterações pulmonares	Ausência	16	88,9
	Presença	2	11,1
Alterações cardíacas	Ausência	18	100
	Presença	0	0

N: número de animais em cada categoria; %: porcentagem de animais em cada categoria; Total de animais = 18.

Quadro A1- Hemograma de cães com EMC aguda. Botucatu, SP, 2016.

Valores de Referência (mín-máx) Animal	Hemácias (x10 ⁶)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	VCM (fL)	CHCM (%)	PPT (g/dL)	RDW (%)	Plaquetas (µL)	Metarrubríctos (/100)	Leucócitos	Segmentados		Linfócitos		Eosinófilos		Basófilos		Monócitos	
	5,5-8,5	12-18	37-55	60-77	32-36	6-8	12-15	160.000-430.000	0	6.000-17.000	(%)	3.000-11.500	(%)	1.000-4.800	(%)	100-1250	(%)	0-100	(%)	150-1350
1	4,64	10,4	31	66,8	33,5	5,2	12,1	17000	0	6700	81	5430	9	600	1	70	1	70	8	540
2	6,09	14	39	64	35,9	6,8	9,9	19000	0	6500	81	5270	12	780	0	0	0	0	7	460
3	2,06	4,5	14	68,8	32,1	12	20,7	20200	0	9200	87	8000	4	370	0	0	0	0	9	830
4	6,3	14	41	64,2	34,1	7	9,9	23000	0	6700	71	4760	19	1270	1	70	0	0	9	600
5	6,18	13,9	40	64,7	34,8	7,4	9,9	20000	0	7100	71	5040	17	1210	3	210	0	0	9	640
6	3,26	6,4	22	67,5	29,1	4,9	17,1	27000	0	7800	90	7020	3	230	0	0	0	0	7	550
7	4,35	9,7	28	64,4	34,6	7,6	13,9	5050	0	14000	48	6720	40	5600	6	840	0	0	6	840
8	3,2	7,5	23	71,9	32,6	6,6	19,4	10100	4	9300	43	4000	23	2140	0	0	0	0	24	2230
9	5,14	11,7	33	64,2	35,5	5,8	13,9	85850	1	6440	65	4190	19	1220	0	0	0	0	16	1030
10	5,41	12,3	40	73,9	30,8	7	13,4	13000	0	14900	83	12370	3	450	4	600	0	0	10	1490
11	2,87	5,5	19	66,2	28,9	6,2	18,2	51000	0	7100	77	5470	6	430	0	0	0	0	14	2790
12	5,91	12,8	37	62,6	34,6	7,6	11,3	27000	0	19900	85	16920	1	200	9	640	0	0	8	570
13	6,32	15	45	71,2	33,3	9,4	10,3	29000	0	11300	41	4630	46	5200	5	570	0	0	8	900
14	3,73	9,2	28	75,1	32,9	7,0	14,8	54000	0	24200	85	20570	7	1690	3	730	0	0	5	1210
15	2,87	6,8	21	73,2	32,4	2,6	13,7	8000	0	5000	81	4050	8	400	0	0	0	0	11	550
16	3,93	9,2	28	71,2	32,9	6,6	12,2	66000	0	14400	75	10800	4	600	2	300	0	0	19	2700
17	1,94	5	15	77,3	33,3	7	16,4	11000	13	6810	73	5000	15	1000	0	0	0	0	12	800
18	5,34	12,8	39	73	32,8	6	10,7	14000	0	6000	88	5300	9	500	0	0	0	0	3	200
Média	4,42	10,04	30,17	68,90	33,01	6,82	13,77	27788,89	1,00	10186,11	73,61	7530,00	13,61	1327,22	1,89	223,89	0,06	3,89	10,28	1051,67
Mediana	4,50	10,05	29,50	68,15	33,10	6,90	13,55	20100,00	0,00	7450,00	79,00	5365,00	9,00	690,00	0,50	35,00	0,00	0,00	9,00	815,00
Desvio Padrão	1,49	3,45	9,62	4,53	1,92	1,90	3,40	22105,06	3,14	22105,06	15,19	5317,87	12,49	1572,73	2,63	304,34	0,24	16,50	5,18	765,86

VCM: volume corpuscular médio; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média, PPT: proteínas plasmáticas totais; Valores de referência: Jain, 1993.

Tabela A4- Achados citomorfológicos em esfregaços sanguíneos de cães com EMC aguda descritos individualmente. Botucatu, SP, 2016.

Animal	Anis	Polic	Macrop	Linf Reativos	Mon Ativados	Mórula	Citof	Rouleaux
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	+	-	-	-	-	-
3	+	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-
6	+	+	-	-	-	-	-	-
7	+	-	-	+	+	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-
9	+	+	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-
11	+	+	-	-	+	-	+	-
12	-	-	-	-	-	+	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	+
14	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	+	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-
17	+	-	-	-	-	+	-	-
18	-	-	+	-	+	-	-	-

Anis: anisocitose; Polic: policromasia; Macrop: macroplaquetas; Linf reativos: linfócitos reativos; Mon ativados: monócitos ativados; Citof: citofagocitose; (-): ausente; (+): presente.

Quadro A2- Exames de bioquímica sérica para avaliação hepática e renal dos animais portadores de EMC na fase aguda. Botucatu, 2016.

	PT	Albumina	Globulina	GGT	FA	ALT	Creatinina	Uréia
Valores de Referência (mín-máx)	5,4-7,8	2,1-3,3	2,6-5,1	1,3-5,1	25-93	21-73	0,8-1,8	42,8-64,2
Animal								
1	4	1,7	2,3	0,8	129	136	0,54	41,2
2	5,5	2,6	2,9	0,7	129	383	0,66	27,9
3	10,2	1,1	9,1	0,8	58	15	1,19	86,8
4	6,4	2,2	4,2	0,8	70	30	0,86	19,6
5	5,9	2,8	3,1	0,8	36	60	0,7	24,2
6	5	2,6	2,4	3	75	32	0,63	33,3
7	8,1	2,8	5,3	2	28	54	0,86	62,9
8	6,5	2,2	4,3	2,5	112	73	0,8	42
9	5,3	1,7	3,6	7	490	68	0,57	68
10	6,4	2,4	4	4	52	21	0,8	39,1
11	5,6	1,7	3,9	4	266	66	0,48	41,5
12	7,1	2,9	4,2	5	70	44	1,07	38,9
13	8,8	2,1	6,7	0,8	7	40	0,48	30,8
14	5,7	1,9	3,8	3	35	41	1,1	34,6
15	2,8	1	1,8	2	45	61	0,62	25
16	5,7	2,1	3,6	9	451	298	0,7	23
17	5,5	1,5	4	13	997	199	0,7	80
18	5,4	2,3	3,1	2	100	32	0,7	22
Média	6,11	2,09	4,02	3,40	175,00	91,83	0,75	41,16
Mediana	5,70	2,15	3,85	2,25	72,50	57,00	0,70	36,75
Desvio Padrão	1,69	0,56	1,69	3,32	247,30	101,51	0,21	20,14

PT: proteínas totais; GGT: gama-glutamil transferase; FA: fosfatase alcalina; ALT: alanina aminotransferase.

Valores de referência: Jain, 1993.

Quadro A3- Contagem diferencial das células da medula óssea de cães com Ehrlichiose Monocítica Canina aguda expressos em porcentagem (%). Botucatu, SP, 2016.

Animal	Eritróides Maduros	Eritróides Imaturos	Mielóides Maduros	Mielóides Imaturos	Monócitos/Macrófagos	Eosinófilos	Linfócitos	Plasmócitos	Relação M:E	Celularidade
1	39,5	2	44,8	2	0,6	3,7	3,8	3,6	1,12	70
2	40,5	2,57	42	2,16	1,5	4,57	1,28	5,42	1,02	50
3	38,7	2,8	39,1	4,6	0,9	1,3	7,9	4,4	1,05	75
4	21,2	2,3	58,1	5,1	2	3,5	2,2	5,6	2,68	60
5	34,2	2,25	47,14	2,81	1,4	6,5	1,5	4,2	1,37	50
6	64,47	4,21	29	1	0,33	0,44	0,22	0,33	0,43	50
7	54,6	1,3	23,7	3,8	0,8	7,3	4,6	3,9	0,49	85
8	68,83	1,33	40,5	2,66	0,16	0	3,16	0	0,61	*
9	77,16	2,6	13,3	1,2	0,6	0,3	3,6	1,2	0,18	85
10	47,25	2	34,75	2,75	1,14	6,12	4,87	1,12	0,76	50
11	62,22	2,6	29,86	1,44	1	0,11	1,44	1,33	0,44	90
12	50,33	1,75	40,85	1,5	0,25	1,08	2,91	1,33	0,81	60
13	45,27	2,72	30,27	1,72	0,27	5,81	9,09	4,81	0,66	70
14	25	2,4	59,51	1,1	0,56	6,62	2,83	1,97	2,21	60
15	54,5	5,87	30,25	2	0,87	0,25	5,75	0,62	0,53	75
16	44,8	3,3	39,90	3,8	0,9	1,4	1,7	4,2	0,9	85
17	79,2	3,2	15	0,8	0,2	0,3	0,4	0,9	0,19	60
18	22,5	1,5	68	2,5	0,75	2,25	1,5	1	2,93	50

Ar: arregenerativa; R: regenerativa; *não realizado.

TRABALHO CIENTÍFICO

O artigo será submetido à revista **VETERINÁRIA e ZOOTECNINA**, de acordo com as normas da revista.

Diretrizes para Autores

Artigos Científicos

Devem ser estruturados de acordo com os seguintes itens:

1. Página de rosto, com:

Título do trabalho em português, em inglês e em espanhol, fonte Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento simples, em negrito e centralizado, em letra maiúscula. Quando necessário, indicar a entidade financiadora da pesquisa, como primeira chamada de rodapé;

Em caso de envolvimento de seres humanos ou animais de experimentação, encaminhar o parecer da Comissão de Ética ou equivalente, assinalando, no trabalho, antes das referências, a data de aprovação.

2. Página com resumo, abstract e resumen

Tanto o resumo, como o abstract e o resumen devem ser seguidos do título do trabalho, no respectivo idioma, e conter no máximo 400 palavras cada um, com informações referentes à introdução, metodologia, resultados e conclusões. O texto deve ser justificado e digitado em parágrafo único e espaço simples, começando por RESUMO. O abstract, e o resumen devem ser tradução fiel do resumo. Independente da língua em que o artigo for apresentado, deverá conter o resumo em português, inglês e espanhol.

Devem conter, no máximo, cinco palavras-chave, keywords, e palabras clave que identifiquem o conteúdo do texto.

3. A estrutura do artigo deverá conter:

Introdução: Deve ser clara, objetiva e relacionada ao problema investigado e à literatura pertinente, bem como aos objetivos da pesquisa. A introdução estabelece os objetivos do trabalho.

Material e Métodos: Deve oferecer informações de reprodutibilidade da pesquisa, de forma clara e concisa, como variáveis, população, amostra, equipamentos e métodos utilizados, inclusive os estatísticos.

Resultados: Apresentação dos resultados obtidos, que devem ser descritos sem interpretações e comparações. Poderá ser sob a **forma de tabelas**, no máximo de cinco, ordenadas em algarismos arábicos e encabeçadas pelo título, de acordo com as normas de apresentação tabular da ABNT/NBR 6023/2000 da Associação Brasileira de Normas Técnicas, identificadas no texto como Tabela; sob a **forma de figuras**, nos casos de gráficos, fotografias, desenhos, mapas, etc., ordenadas em algarismos arábicos, até no máximo de seis, e citadas no texto como Figura.

Discussão: Deve ser entendida como a interpretação dos resultados, confrontando com a literatura pertinente, apresentada na introdução. Se julgar conveniente, os resultados e a discussão poderão ser apresentados conjuntamente.

Conclusões: É a síntese final, fundamentada nos resultados e na discussão.

Referências: Devem ser apresentadas de acordo com as normas Vancouver (<http://www.icmje.org/>).

Deverão ser editorados em Microsoft Word for Windows, para edição de textos, Excel (qualquer versão) para gráficos, formato JPEG ou GIF (imagem) para fotografias, desenhos e mapas, formato A4 (21,0 x 29,7 cm), em espaço simples, mantendo margens de 2,5 cm, nas laterais, no topo e pé de cada página, fonte Times New Roman, tamanho 12 e numeração consecutiva das páginas em algarismos arábicos, a partir da folha de identificação. Deverão também apresentar numeração nas linhas, reiniciando a contagem a cada nova página. Ilustrações e legendas devem ser apresentadas no decorrer do texto. Não serão fornecidas separatas. Os artigos estarão disponíveis no formato PDF no endereço eletrônico da revista. Para as demais seções da revista são válidas as normas anteriores. Não devem exceder a 15 páginas. Abreviaturas não usuais devem ser empregadas após escritas por extenso na primeira utilização.

Artigos de Revisão Bibliográfica

Os artigos de revisão bibliográfica serão publicados nas línguas portuguesa, inglesa e espanhola, quando o autor apresentar contribuição científica, relevante na área específica do assunto abordado, a convite dos editores.

Deverão conter: Título (português, inglês e espanhol), resumo com palavras-chave, abstract com keywords e resumen com palabras claves, introdução, desenvolvimento do assunto, conclusão e referências. Deverão conter no máximo 20 páginas e 60 referências.

Relato de Caso

Não devem ser estruturados, como os artigos. Devem apresentar o título em português, em inglês e espanhol, resumo com palavras-chave, abstract com keywords, resumen com palabras claves e referências. Devem conter no máximo cinco páginas, três tabelas ou figuras e 15 referências.

Comunicações Curtas

São relatos contendo dados inéditos e relevantes de estudos originais, como, por exemplo, resultados preliminares de uma pesquisa. Devem ser apresentadas com, no máximo, cinco páginas, uma tabela e 10 referências. A estrutura deve respeitar as normas para relatos de caso.

Referências e Citações

As referências devem ser numeradas consecutivamente e listadas na ordem em que são mencionadas no texto. As referências devem ser identificadas no texto, nas tabelas e legendas com números arábicos, entre parênteses, seguindo a mesma sequência. Os títulos das revistas devem ser abreviados de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus* disponível em: <http://www.nlm.nih.gov>.

ALTERAÇÕES DA MEDULA ÓSSEA E A IMPORTANCIA DO MIELOGRAMA NO DIAGNÓSTICO DA EHRlichIOSE MONOCÍTICA CANINA – REVISÃO

Marília Salgado Caxito¹

Fernanda Panseri Rodrigues²

Isis Indaiara Gonçalves Granjeiro Taques³

Daniel Moura de Aguiar⁴

Regina Kiomi Takahira⁵

Antônio Carlos Paes⁶¹

RESUMO

A Ehrlichiose Monocítica Canina (EMC) é uma doença multissistêmica e de alta incidência. Contudo, a patogenia da enfermidade ainda não está totalmente esclarecida. Infiltrações plasmocitárias e linfoplasmocitárias são observadas em grande parte dos órgãos de animais acometidos, inclusive na medula óssea. Esses infiltrados sugerem que a maioria das lesões patológicas identificadas na fase crônica pode ser consequência do processo inflamatório originado no início da infecção. Este trabalho tem por objetivo destacar a importância da avaliação medular de cães com EMC. A maior compreensão das alterações medulares na fase aguda poderia esclarecer a origem das alterações observadas na fase crônica. Estudos que verifiquem se a patogenia da EMC está relacionada apenas a processos imunomediados ou se também há agressões diretas de *Ehrlichia canis* à células precursoras. Elucidar os mecanismos fisiopatogênicos de *E. canis* poderia melhorar a terapêutica instituída como também o prognóstico de animais gravemente acometidos.

Palavras-chave: *Ehrlichia canis*, mielograma, hematopoiese, células precursoras, processo imunomediado.

BONE MARROW CHANGES AND THE IMPORTANCE OF THE MYELOGRAM IN DIAGNOSING CANINE MONOCYTICS EHRlichIOSIS – A REVIEW

ABSTRACT

Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME) is a multisystemic disease high incidence among dogs. However, its pathogenesis has not been fully elucidated. Plasma cells and lymphoplasmacytic infiltrates are observed in most organs of infected animals, including bone marrow. These infiltrates suggest that most of the pathological lesions

¹ Mestranda do programa de pós graduação em Medicina Veterinária, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ, UNESP – Botucatu, SP.

² Médica Veterinária Residente do Laboratório Clínico Veterinário, Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ, UNESP – Botucatu, SP.

³ Doutoranda do programa de pós graduação em Ciências Veterinárias, FAMEVZ, UFMT – Cuiabá, MT.

⁴ Docente, Departamento de Clínica Médica Veterinária, FAMEVZ, UFMT/Cuiabá, MT

⁵ Docente, Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ, UNESP – Botucatu, SP

⁶¹ Autor para correspondência. Docente, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ, UNESP – Botucatu, SP. E-mail: paesacmi@fmvz.unesp.br

identified in the chronic phase may be a consequence of the inflammatory process initiated at the beginning of the infection. This work aims to highlight the importance of the bone marrow evaluation of dogs with CME. A better understanding of the medullary changes in the acute phase could help clarifying the origin of clinical signs observed in the chronic phase. We conclude that studies are needed to verify whether the pathogenesis of CME is related to either the immune-mediated processes or the direct aggressions of *Ehrlichia canis* in precursor cells. Understanding the pathophysiological mechanisms of *E. canis* will improvement both current therapeutic strategies as well as the prognosis of severely affected animals.

Keywords: *Ehrlichia canis*, myelogram, hematopoiesis, precursor cells, immune mediated process.

ALTERACIONES EN LA MÉDULA ÓSEA Y LA IMPORTANCIA DEL MILOGRAMA EN EL DIAGNOSTICO DE EHRlichiosis MONOCITICA CANINA – REVISIÓN

RESUMÉN

La Ehrlichiosis Monocítica Canina (EMC) es una enfermedad multisistémica de alta incidencia. Sin embargo, su patogénesis de la enfermedad aún no ha sido elucidada. Las infiltraciones plasmocitarias y linfoplasmocitarias se observan en la mayoría de los órganos de animales afectados, incluyendo la médula ósea. Estas infiltraciones sugieren que la mayoría de las lesiones patológicas identificadas en la fase crónica son una posible consecuencia del proceso inflamatorio iniciado a comienzos de la infección. Este estudio propone destacar la importancia de evaluar la médula en perros afectados por EMC. Una mejor comprensión de los cambios medulares en la fase aguda podría aclarar el origen de los signos clínicos observados en la fase crónica. Este estudio concluye la necesidad de un mayor número de estudios para verificar si la patogénesis de EMC se relaciona únicamente con procesos autoinmunes o con ataques directos de *Ehrlichia canis* a las células precursoras. Una mejor comprensión de los mecanismos fisiopatológicos de *E. canis* podría permitir un mejoramiento tanto del enfoque terapéutico como del pronóstico de los animales gravemente afectados.

Palabras-clave: *Ehrlichia canis*, mielograma, hematopoyesis, células precursoras, proceso autoinmune.

INTRODUÇÃO

A Ehrlichiose Monocítica Canina (EMC) é causada por bactérias gram-negativas, pleomórficas pertencentes ao gênero *Ehrlichia*, das quais a *Ehrlichia canis* (*E. canis*) é a espécie que se destaca no Brasil (11). Estudos epidemiológicos em diversas regiões do país demonstraram que cerca de 20% dos cães apresentam a doença (6). Embora a infecção em áreas rurais esteja presente, cães que residem em ambiente urbanizado são os mais acometidos já que populações do carrapato vetor, *Rhipicephalus sanguineus*, são mais abundantes nessas regiões (1).

A doença nos cães pode ser aguda, subclínica ou crônica. Contudo, a fase crônica revela alta mortalidade mesmo com antibioticoterapia instituída. As razões para o desenvolvimento desta fase não é elucidado, contudo, nota-se forte influência do sistema imunológico. Hipergamaglobulinemia, acúmulo de células linfóides e plasmocitose generalizada são alterações comumente observadas nos cães infectados.

Estes achados comuns em cães portadores de EMC indica resposta humoral exacerbada associada à patogênese da enfermidade (13).

Alterações em sangue periférico podem ser observadas em qualquer fase da afecção e não são suficientes para determinar a fase da doença. A avaliação medular pode auxiliar não apenas na determinação correta da fase da infecção como avaliar melhor as desordens hematológicas e, em alguns casos, adiantar-se a essas alterações (7).

REVISÃO DE LITERATURA

Etiopatogenia e manifestações clínicas e hematológicas

Por ser um parasita intracelular obrigatório, o agente etiológico invade células do sistema fagocítico mononuclear e, após multiplicar-se em macrófagos por fissão binária, se dissemina pelo organismo do hospedeiro. O vetor necessita de pouco tempo para transmitir a infecção. Estudos recentes comprovaram que apenas 3 horas de fixação são suficientes para os animais parasitados se tornarem infectados (10).

Os principais sinais clínicos da EMC são inespecíficos, tais como apatia, anorexia, linfadenomegalia, evidente hepatoesplenomegalia, perda de peso, descargas nasais e oculares e febre. Alterações no sangue periférico podem ser observadas entre 5 e 18 dias pós-infecção (PI). Em média, 10 dias PI já são suficientes para o estabelecimento da trombocitopenia, que é a principal característica da EMC (13). Um dos fatores que contribui para essa diminuição plaquetária é a destruição mediada por células do sistema imune do hospedeiro. Em infecções agudas naturais e experimentais os anticorpos ligados a plaquetas e anticorpos antiplaquetários têm demonstrado papel importante na patogenia da doença (3). A anemia também é frequentemente observada na EMC e está relacionada à supressão da atividade eritropoiética. Citocinas inflamatórias (IL-1, INF- γ e TNF- α) são liberadas pelas células infectadas causando anemia da inflamação (4).

A intensidade das alterações varia de acordo com a fase da infecção (3). Contudo, cães que evoluem para forma crônica também podem apresentar, além dos sinais supracitados, diáteses hemorrágicas. No hemograma desses animais, se observa grave pancitopenia (marcada trombocitopenia, anemia arregenerativa e leucopenia intensa). A alta mortalidade nesta fase é resultante da síndrome hemorrágica e/ou infecções secundárias (13). O diagnóstico precoce com a identificação correta da fase da infecção e rápida instituição do tratamento são fundamentais para evitar alta letalidade nos cães.

A diminuição da contagem plaquetária ocorre em todas as fases da doença, utilizado como indicador clínico de suspeita de EMC. O diagnóstico definitivo é firmado pela visualização de agrupamentos intracitoplasmáticos (mórulas) nos monócitos circulantes em esfregaços sanguíneos, presença de altos títulos de anticorpos para *E. canis*, detecção do DNA da bactéria pela PCR ou, ainda, pelo isolamento do agente em cultivos celulares (3).

Apesar de normalmente não serem exames solicitados nos casos de EMC, aspirados ou biópsias medulares podem auxiliar no acompanhamento e principalmente no prognóstico de cães acometidos pela EMC. O mielograma assiste na identificação de mórulas de *E. canis*, exclusão de outras causas de pancitopenia ou desordens

hematológicas e avalia precursores hematopoiéticos. Além disso, a punção medular é necessária na determinação da fase da doença e com isso pode-se eleger o melhor tratamento para os animais doentes. Evidências sugerem que mecanismos iniciados no início da infecção podem ser responsáveis por muitas lesões patológicas observadas na fase crônica. Estudos para identificar alterações medulares da EMC, principalmente na fase aguda, pode esclarecer alterações irreversíveis da fase crônica e elucidar a patogenia da EMC.

Alterações medulares na EMC aguda

A avaliação de medula óssea é indicada nos casos de bicitopenias ou pancitopenias persistentes, anemias arregenerativas, desordens mieloproliferativas, febre de origem desconhecida ou a combinação de dois ou mais dos fatores citados (7). Considerado como importante método de diagnóstico nas doenças infecciosas, o mielograma auxilia também no prognóstico da EMC uma vez que além de diferenciar outras causas de pancitopenia possibilita, também, diagnosticar desordens hematológicas primárias, verificar possíveis áreas de hematopoiese ativas e avaliar os precursores eritróides, mielóides e megacariocíticos.

As alterações medulares de cães com EMC nas diferentes fases são bem distintas. Acredita-se que essas alterações podem ser causadas pela supressão hematopoiética secundária à infecção por *Ehrlichia* sp. A intensidade da supressão e/ou destruição da medula óssea está associada à produção deficiente de um ou mais elementos sanguíneos, dependendo da fase da doença. O comprometimento medular indica agressão não só ao estroma vascular, mas também às células precursoras. Como mórulas de *E. canis* podem ser encontradas em sangue periférico e em aspirados medulares a partir de 15 dias PI (12), uma hipótese seria de que as células-tronco sejam infectadas por *E. canis* resultando na falha do metabolismo dessas células e, conseqüentemente, na proliferação celular (8, 12, 13).

Estudos citológicos de medula óssea em cães experimentalmente infectados apresentando EMC na fase aguda revelaram aumento inicial na proporção mielóide:eritróide (M:E) e na concentração média de megacariócitos a partir de 1 dia até 2 meses PI. O aumento da relação M:E provavelmente está associado à hipoplasia eritróide, devido às citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6, INF- γ e TNF- α) que alteram a cinética do ferro e a disponibilidade desse íon para síntese de hemoglobina (5). Nota-se ainda que na fase da aguda da enfermidade, a destruição celular é principalmente de origem periférica. Para corrigir as citopenias periféricas a medula óssea aumenta sua atividade de replicação celular e, portanto, a hiperplasia medular é facilmente compreendida (13). Até o momento, não está comprovado que anticorpos antiplaquetários também exerçam ação sobre os megacariócitos, uma vez que o curto período de vida das plaquetas na circulação sinaliza a disfunção medular. Contudo, o aumento do volume plaquetário médio (VPM) resulta da presença de macroplaquetas no sangue periférico e é interpretado como resposta megacariocítica adequada (12).

Novos estudos têm investigado a ação das citocinas na patogênese da supressão medular. Pertencentes a uma família especializada de citocinas, as quimiocinas são proteínas pequenas que atuam como potentes mediadores da inflamação e quimiotaxia de subpopulações específicas de leucócitos. As quimiocinas são essenciais para promover a resposta do hospedeiro diante da infecção e estão subdivididas em subfamílias: CXC (atuam sobre neutrófilos), CC (agem sobre eosinófilos, células *natural killer*, linfócitos e monócitos), C e CX3C, das quais as duas últimas classes são

menos descritas (12). A secreção dessas quimiocinas está relacionada à presença de inclusões intracitoplasmáticas de *Ehrlichia*. Estudos *in vitro* com células medulares infectadas com *Anaplasma phagocytophilum* (agente infeccioso intimamente relacionado com *E. canis*) mostraram aumentos significativos na produção de quimiocinas da subfamília CC: Proteína Inflamatória de Macrófagos (MIP-1 α ou CCL3 e MIP-1 β ou CCL4), Proteína Quimiotática Monocítica (MCP-1 ou CCL2) e RANTES (CCL5) e da subfamília CXC: IL-8 (CXCL8) (9). Enquanto baixas concentrações de MIP-1 α e IL-8 agem sinergicamente regulando a hematopoiese, altas concentrações de MIP-1 α , IL-8 e MCP-1 suprimem a proliferação de células precursoras. Incapaz de compensar as anemias arregenerativas discretas na doença aguda, a medula óssea demonstra mau funcionamento da eritropoiese em cães portadores de EMC (9, 12).

Alterações medulares na EMC crônica

Alguns cães convalescentes da doença crônica podem apresentar normocelularidade no mielograma sugerindo supressão medular moderada. Entretanto, a fase crônica caracteriza-se por hipocelularidade medular acentuada dos três tipos celulares (eritróide, mielóide e megacariocítica), não raro evoluindo para falência medular (Figura 1). Animais acometidos pela doença crônica grave e que evoluem para óbito mesmo depois de instituído o tratamento comumente apresentam aplasia medular persistente observada após a hipergamaglobulinemia. A terapia imunossupressora instituída quando a contagem de anticorpos atinge altos títulos associada ao tratamento específico da EMC tem demonstrado resultados satisfatórios sugerindo base imunomediada da doença (12).

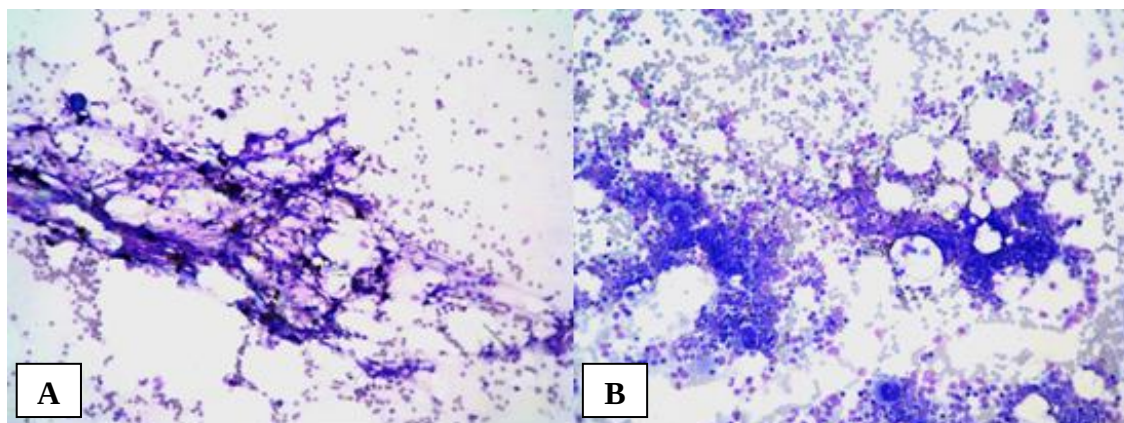


Figura 1- A: Aplasia medular de origem infecciosa (PCR positiva para *E. canis*) de um canino, SRD, fêmea de 3 anos. B: Medula hematopoieticamente ativa de um canino Poodle, fêmea de 5 anos. Fonte: Laboratório Clínico Veterinário da FMVZ – UNESP Botucatu-SP. Coloração panótico (aumento de 100x)

A patogenia da hipoplasia medular na erliquiose crônica ainda é desconhecida, mas presume-se que a resposta imunológica do organismo suprima a hematopoiese (2). A hipoplasia/aplasia de medula em infecções por *E. canis* em cães pode ainda estar relacionada aos casos de mielonecrose, tanto por danos diretos às células hematopoiéticas quanto por danos na microcirculação das artérias nutritivas (7). Além disso, o processo inflamatório, danos vasculares e necrose, ou secundários à anemia imunomediada, são fatores que podem levar a quadros de mielofitose como consequência da proliferação de fibroblastos. O tecido fibroso que invade a medula óssea compete com as células hematopoiéticas pelo espaço e nutrientes afetando todos os tipos celulares. Citocinas inflamatórias produzidas em doenças imunomediadas primárias ou secundárias a enfermidades infecciosas podem desencadear síndrome

hemofagocítica caracterizada por esquizócitos e monócitos ativados no sangue periférico e pelo aumento de macrófagos fagocitando células precursoras sanguíneas na medula óssea e em outros órgãos linfóides como fígado, linfonodos e/ou baço (7).

Considerações finais

As alterações citomorfológicas da medula óssea de cães com EMC são pouco estudadas. Contudo, o mielograma revela sua importância como exame complementar principalmente no prognóstico da EMC uma vez que, além de diferenciar outras causas de bicitopenias/pancitopenias, é possível a partir deste exame se obter informações sobre desordens hematológicas, verificar possíveis áreas de hematopoiese ativas e avaliar os precursores eritróides, mielóides, linfóides e megacariocíticos.

REFERÊNCIAS

- (1) AGUIAR CLG, PINTO DM, PAPPEN FG, FILHO NAC, SANTOS TRB, FARIAS NAR. Parâmetros da fase de vida livre de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): adaptado ao clima subtropical Arq Inst Biol. 2013; 80(4):375-80.
- (2) HARRUS S, WANER T, WEISS DJ, KEYSARY A, BARK H. Kinetics of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. Vet Immunol Immunopathol. 1996; 51:13-20.
- (3) HARRUS S, WANER T, AIZENBERG I, FOLEY JE, POLAND AM, BARK H. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. J Clin Microbiol. 1998; 36:73-6.
- (4) HARRUS S, WANER T, NEER TM. *Ehrlichia canis* infection. In: GREENE CE (Org.). Infectious diseases of the dog and cat. 4th edition (Elsevier). Georgia: Elsevier; 2015. p. 227-56.
- (5) HARVEY JW. Veterinary hematology: a diagnostic guide and color atlas. Missouri: Elsevier; 2012.
- (6) LABARTHE N, PEREIRA MC, BARBARINI O, MCKEE W, COIMBRA CA, HOSKINS J. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis* and *Borrelia burgdorferi* infection in Brazil. Vet Ther. 2003; 4:67-75.
- (7) MORAES LF, TAKAHIRA RK. Aplasia medular em cães. Rev Ciênc Agroveter. 2010; 9(1):99-108.
- (8) MOREIRA SM, MACHADO R, PASSOS LF. Detection of *Ehrlichia canis* in bone marrow aspirates of experimentally infected dogs. Cienc Rural. 2005; 35:958-60.
- (9) RIKIHISA Y. Mechanisms of obligatory intracellular infection with *Anaplasma phagocytophilum*. Clin Microbiol Rev. 2011; 24(3):469-89.
- (10) SAINZ A, ROURA X, MIRÓ G, ESTRADA-PEÑA A, KOHN B, HARRUS S. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. Parasit Vectors. 2015.
- (11) VIEIRA RFC, BIONDO AW, GUIMARÃES AMS, SANTOS AP, DUTRA LH, DINIZ PPVP, MORAIS HA, MESSICK JB, LABRUNA MB, VIDOTTO O. Ehrlichiosis in Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 2011; 20(1).
- (12) WANER T. Hematopathological changes in dogs infected with *Ehrlichia canis*. Isr J Vet Med. 2008; 63(1).
- (13) WANER T, HARRUS S. Canine monocytic ehrlichiosis – from pathology to clinical manifestations. Isr J Vet Med. 2013; 68(1).