

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

**AVALIAÇÃO ADRENOCORTICAL, TIREOIDEANA E DO
ESTRESSE OXIDATIVO DE CÃES NATURALMENTE
INFECTADOS POR *Ehrlichia canis***

**Mariana Cristina Hoepner Rondelli
Médica Veterinária**

2015

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

**AVALIAÇÃO ADRENOCORTICAL, TIREOIDEANA E DO
ESTRESSE OXIDATIVO DE CÃES NATURALMENTE
INFECTADOS POR *Ehrlichia canis***

Mariana Cristina Hoepner Rondelli

Orientadora: Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para
a obtenção do título de Doutor em Medicina
Veterinária, área: Clínica Médica Veterinária.**

2015

R771a Rondelli, Mariana Cristina Hoepner
Avaliação adrenocortical, tireoideana e do estresse oxidativo de
cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis*. / Mariana Cristina
Hoepner Rondelli. -- Jaboticabal, 2015
xix, 111 p. : il ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015
Orientador: Mirela Tinucci Costa
Banca examinadora: Marcio Antonio Brunetto, Ana Silvia
Dagnone, Ângela Merice de Oliveira Leal, Marcos Rogério André
Bibliografia

1. Caninos. 2. Infecção. 3. Eriiquiose. I. Título. II. Jaboticabal-
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.98:636.6

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: AVALIAÇÃO ADRENOCORTICAL, TIREOIDEANA E DO ESTRESSE OXIDATIVO DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Ehrlichia canis*

AUTORA: MARIANA CRISTINA HOEPFNER RONDELLI

ORIENTADORA: Profa. Dra. MIRELA TINUCCI COSTA

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


Profa. Dra. MIRELA TINUCCI COSTA

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


Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ

Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. MARCIO ANTONIO BRUNETTO

Universidade de São Paulo / Pirassununga/SP


Profa. Dra. ÂNGELA MERICE DE OLIVEIRA LEAL

Universidade Federal de São Carlos / São Carlos/SP


Profa. Dra. ANA SILVIA DAGNONE

Centro Universitário Central Paulista / São Carlos/SP

Data da realização: 03 de novembro de 2015.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARIANA CRISTINA HOEPPNER RONDELLI - nascida em 10 de outubro de 1984, em Araguaína, Tocantins, é a terceira filha dos cinco descendentes do casal Julio Raphael Pero Rondelli e Maria Christina Rocha Hoepner Rondelli. É Médica veterinária formada pela Universidade Federal do Tocantins em 2007. Foi residente em Clínica Médica de Pequenos Animais no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/Unesp, Câmpus de Jaboticabal, de 2008 a 2010, sob a orientação da Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa. Nesta época, fez estágio de residência em Medicina Interna de Pequenos Animais e Dermatologia Veterinária no Hospital Veterinário da Universidade do Tennessee, em agosto e setembro de 2009. Em março de 2010, iniciou o curso de Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Clínica Médica Veterinária, pela FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal, sob a orientação da Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa, defendendo a dissertação sobre alterações hormonais adrenocorticais de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* em fevereiro de 2012. Durante o mestrado, foi bolsista pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP. Ingressou no curso de Doutorado em março de 2012, na mesma instituição, também sob a orientação da Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa. Nesta ocasião, recebeu bolsa de doutorado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, por alguns meses, sendo posteriormente contemplada com bolsa de doutorado pela FAPESP, abdicando então da primeira. Prestou serviço em atendimento clínico voluntário no Serviço de Dermatologia Veterinária do Hospital Veterinário da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal, chefiado pela Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa, de 2010 a 2014. Atualmente, é Professora Assistente I, em regime de contrato temporário, na Pontifícia Universidade Católica (PUC) Minas, em Poços de Caldas, das disciplinas de Clínica de Pequenos Animais, Doenças de Pequenos Animais e Estágio II.

Aos meus pais, que me indicaram os caminhos da educação, e que nunca me disseram “fique”, mas sempre me disseram “vá”.

AGRADECIMENTOS

Porque nesta vida, o que mais temos a fazer é agradecer!

Agradeço a Deus, por me guiar, pois sem os desígnios divinos, não conseguiria dar um passo sequer.

Obrigada à minha família, em especial aos meus pais, pela dedicação e compreensão. Juntos, aprendemos que a distância é apenas um detalhe, e que ainda bem que existe o tal do avião, como diz a minha mãe.

Obrigada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, pela oportunidade de fazer parte de um dos melhores programas de Pós-graduação deste País.

Muito tenho a agradecer aos docentes, pós-graduandos, residentes e funcionários do Hospital Veterinário da FCAV/Unesp, Jaboticabal, pelos sete anos de convivência. Considero que tornei-me a profissional de hoje graças ao que me foi ensinado neste local, do qual me recordarei sempre com muito carinho.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico– CNPq, pela bolsa de Doutorado concedida (Processo 141498/2012-9) no início do curso. Igualmente, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela bolsa de Doutorado (Processo 2012/10207-9) cuja reserva técnica foi essencial para a execução do projeto de pesquisa.

Obrigada aos docentes que ajudaram na execução deste projeto: Prof. Áureo Evangelista Santana, por autorizar a realização da avaliação hematológica no Laboratório de Patologia Clínica da FCAV/Unesp, Jaboticabal; Profa. Rosangela Zacarias Machado, por auxiliar na condução dos testes ELISA no Laboratório de Imunoparasitologia Veterinária da FCAV/Unesp, Jaboticabal; Prof. Gener Tadeu Pereira, do Departamento de Ciências Exatas da mesma instituição, pela imensa ajuda na análise estatística dos dados; Prof. Luis Antônio Mathias, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da FCAV/Unesp, Jaboticabal, por realizar a detecção de anticorpos anti-*Leptospira* spp.; Prof. João Pessoa Araújo Junior, do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Unesp, Botucatu pela realização das provas diagnósticas moleculares; Prof. Aleksandro S. da Silva, do Laboratório de Pesquisa

em Parasitologia Animal, do Departamento de Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina, Chapecó, pela realização das avaliações do estresse oxidativo.

Agradeço também ao BET Laboratories, pela parceria e condução das análises hormonais, e ao Laboratório Agener União, na figura da Médica veterinária Jaqueline Fiochi, por nos conceder as apresentações de hiclato de doxiciclina utilizadas no tratamento dos cães doentes incluídos nesta pesquisa.

Obrigada aos professores que estiveram presentes no exame de qualificação e que enormemente contribuíram para a confecção deste exemplar: Prof. e amigo Thiago Demarchi Munhoz, Prof. Marcos Rogério André, Profa. Annelise Carla Camplesi dos Santos e Prof. Aparecido Antonio Camacho. Do mesmo modo, agradeço aos professores que compuseram a banca de defesa: Profa. Ana Silvia Dagnone, Profa. Ângela Merice de Oliveira Leal, Prof. Marcio Antonio Brunetto e Prof. Marcos Rogério André. Obrigada pelas valiosas dicas!

Meu agradecimento especial à minha orientadora de longa data, Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa, presente na maioria das etapas da minha formação, que me incentivou a permanecer firme no propósito da docência e me forneceu subsídios para tal.

Obrigada à República Aeee que me recebeu com muito carinho e que faz parte da minha família: Marcy Pereira, Tathiana Motheo, Sofia Borin-Crivellenti, Leandro Crivellenti, Paula Andressa Savi, Isa Marcela Braga, Fabrícia Filgueira e Cristiane Melo.

Agradeço ao Reinaldo Palacios Junior, meu amigo e companheiro, pela paciência e ajuda na vida, seja profissional ou pessoal. Você é muito importante para mim.

Obrigada à Pontifícia Universidade Católica (PUC) Minas, de Poços de Caldas, por me apoiar na reta final do doutorado.

Porque nesta vida, o que mais temos a fazer é agradecer!

SUMÁRIO

	Página
Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
LISTA DE TABELAS.....	xv
LISTA DE FIGURAS.....	xvii
1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1 Erliquiose monocítica canina.....	22
2.2 Hormônios adrenocorticais.....	26
2.3 Hormônios tireoideanos.....	30
2.4 Estresse oxidativo.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 Amostras controle.....	35
3.2 Animais experimentais.....	36
3.3 Tratamento dos animais infectados.....	37
3.4 Avaliações e tempos experimentais.....	38
3.4.1 Tempos experimentais.....	38
3.4.2 Hemograma e pesquisa de mórulas.....	38
3.4.3 “Dot-ELISA” para detecção de anticorpos anti- <i>E. canis</i>	40
3.4.4 Diagnósticos moleculares.....	40
3.4.5 Detecção de anticorpos anti- <i>Leptospira</i> spp.....	41
3.5 Avaliações hormonais.....	41
3.5.1 Teste de estimulação com ACTH.....	41
3.5.2 Dosagens hormonais (cortisol, TSH, T4 total, T4 livre por diálise e DHEA-S) e de anticorpos anti-tireoglobulina.....	42
3.6 Avaliação do estresse oxidativo.....	43
3.7 Análises estatísticas dos resultados.....	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44

4.1 Diagnóstico da erliquiose monocítica canina e exclusão de coinfeções.....	44
4.2 Parâmetros hematológicos.....	47
4.2.1 Hemácias.....	49
4.2.2 Hemoglobina.....	49
4.2.3 Hematócrito.....	50
4.2.4 Leucócitos.....	51
4.2.5 Plaquetas.....	52
4.3 Parâmetros adrenais.....	55
4.3.1 Cortisol.....	57
4.3.2 DHEA-S.....	59
4.4 Parâmetros tireoideanos.....	61
4.4.1 T4 livre por diálise.....	62
4.4.2 T4 total.....	62
4.4.3 TSH.....	65
4.4.4 TgAA.....	65
4.5 Parâmetros de estresse oxidativo.....	68
4.5.1 NOx (óxido nítrico).....	69
4.5.2 AOPP (produto proteico de oxidação avançada).....	70
4.5.3 FRAP (poder redutor de íons ferro).....	70
4.6 Correlações.....	70
4.7 Resultados da análise das variáveis entre os cães saudáveis e os doentes, independentemente da dose de doxiciclina utilizada.....	71
4.7.1 Parâmetros hematológicos.....	71
4.7.2 Parâmetros adrenais.....	78
4.7.3 Parâmetros tireoideanos.....	81
4.7.4 Parâmetros do estresse oxidativo.....	83
5 CONCLUSÕES.....	87
6 REFERÊNCIAS.....	89
APÊNDICE.....	102



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

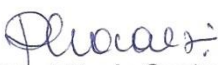


CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 023938/14 do trabalho de pesquisa intitulado "**Avaliação adrenocortical, tireoideana e do estresse oxidativo de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis***", sob a responsabilidade da Prof^a Dr^a Mirela Tinucci Costa está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 01 de dezembro de 2014.

Jaboticabal, 01 de dezembro de 2014.


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

AValiação Adrenocortical, Tireoideana e do Estresse Oxidativo de Cães Naturalmente Infectados por *Ehrlichia canis*

RESUMO – A erliquiose em cães, causada pela bactéria *Ehrlichia canis*, é uma hemoparasitose com distribuição mundial, de natureza multissistêmica e com reflexos clínico-hematológicos diversos e importantes, que pode causar o óbito, tanto por suas alterações hematológicas quanto por possíveis alterações imuno-inflamatórias, oxidativas e hormonais consequentes. Tendo em vista a importância da manutenção do equilíbrio dos mecanismos hormonais e oxidativos na saúde animal, é de interesse clínico conhecer o comportamento dos eixos hipotálamo-hipófise-adrenocortical e hipotálamo-hipófise-tireoide em doenças multissistêmicas, como é o caso da infecção naturalmente adquirida por *E. canis* em cães, assim como da possibilidade do estresse oxidativo contribuir para a gravidade dos sinais clínicos. Assim, foram conduzidas avaliações das concentrações séricas de cortisol e de sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-S) pré e pós-estimulação com hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) sintético; do hormônio estimulador da tireoide (TSH), de T4 total (tetraiodotironina), T4 livre e de autoanticorpos anti-tireoglobulina séricos; do óxido nítrico (NOx), produto proteico de oxidação avançada (AOPP) e poder redutor de íons ferro (FRAP). As avaliações foram realizadas em soro de cães com infecção naturalmente adquirida por *Ehrlichia canis* no momento do diagnóstico e após o tratamento com hclato de doxiciclina [5mg/kg (grupo II; n=6) e 10mg/kg (grupo III; n=6) a cada 12 horas, por 30 dias]. Amostras de soro obtidas de cães (n=6) saudáveis, provenientes do canil do Hospital Veterinário da FCAV/Unesp, Jaboticabal, foram utilizadas como controle (grupo I). A análise de variância de medidas repetidas foi utilizada para avaliar as respostas e a comparação de médias aos pares foi feita usando o teste de Tukey entre os grupos I, II e III, e pelo teste T-Student com correção de Welch entre o grupo I e os grupos II e III, em conjunto. O nível de significância adotado foi de 5%. Cães naturalmente infectados por *E. canis* mostraram adequada capacidade de secretar cortisol frente ao estímulo do ACTH e apresentaram maiores concentrações de DHEA-S que os cães saudáveis no tempo inicial do estudo. Os cães com erliquiose apresentaram maiores concentrações de anticorpos anti-tireoglobulina que os cães saudáveis, embora não manifestassem a síndrome do eutireoidismo doente. Os grupos de cães doentes apresentaram maiores concentrações de NOx, AOPP e do FRAP que o grupo de cães saudáveis no início do estudo. Os tratamentos instituídos promoveram redução das concentrações de DHEA-S, anticorpos anti-tireoglobulina, óxido nítrico e produto proteico de oxidação avançada nos cães doentes, porém, sem efeito dose-dependente evidenciado.

Palavras-chave: caninos, infecção, erliquiose, hormônios, oxidação

ADRENOCORTICAL, THYROID AND OXIDATIVE STRESS EVALUATION IN DOGS NATURALLY INFECTED WITH *Ehrlichia canis*

ABSTRACT – Canine ehrlichiosis, caused by the bacterium *Ehrlichia canis*, is a disease with worldwide distribution with important hematological and clinical aspects, that may lead to death, both for its hematological disturbances and for possible consequent immune and inflammatory, oxidative and hormonal changes. Considering the importance in maintaining the balance of hormonal and oxidative mechanisms for animal health, it may be important to assess the hormonal behavior of hypothalamic-pituitary-adrenal and hypothalamic-pituitary-thyroid axis in multissystemic disorders, as naturally acquired infection by *E. canis*, as well as the possibility of oxidative stress improves the severity of the clinical signs. Thus, cortisol and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) pre and post-synthetic adrenocorticotrophic hormone (ACTH) levels; thyroid-stimulating hormone (TSH), total T4 (tetraiodothyronine), free T4 and antithyroglobulin antibody; nitric oxide (NOx), advanced oxidation protein product (AOPP) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) were measured. The assessments were performed from sera of dogs naturally infected with *E. canis* at baseline and after treatment with doxycycline hyclate [5mg/kg (group II; n=6) and 10mg/kg (group III; n=6) every 12 hours, for 30 days]. Serum samples of healthy dogs (n=6) from the kennel of the Veterinary Teaching Hospital of FCAV/Unesp, Jaboticabal, were used as control (group I). Repeated measures analysis of variance of was used in order to evaluate responses, and mean comparison was performed with Tukey's test between groups I, II and III. T-Student test followed by Welch's correction was used to compare group I with groups II and III. P value was set at 5%. Dogs naturally infected with *E. canis* have shown adequate capacity in secreting cortisol before ACTH stimulation, and have presented greater DHEA-S levels than healthy dogs at baseline moment of the study. Dogs with ehrlichiosis have shown greater levels of antithyroglobulin antibodies than healthy dogs, although euthyroid sick syndrome has not been identified in those dogs. Both groups of sick dogs have presented higher levels of NOx, AOPP and FRAP than control group at baseline. The treatments with doxycycline hyclate caused reduction in DHEA-S, antithyroglobulin antibody, NOx and AOPP levels of sick dogs, however, without evidence of dose-dependent effect.

Keywords: canine, infection, ehrlichiosis, hormones, oxidation

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH – hormônio adrenocorticotrópico
AOPP – produto proteico de oxidação avançada
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
CRH – hormônio estimulador de corticotropina
CYP17 – 17- α -hidroxilase
D0 – dia zero
D-1 – dia menos um
D15 – dia quinze
D40 – dia quarenta
DHEA – dehidroepiandrosterona
DHEA-S – sulfato de dehidroepiandrosterona
DNA – ácido desoxirribonucleico
Dot-ELISA – Teste Imunoenzimático de Absorbância - Dot
ELISA - Teste Imunoenzimático de Absorbância
FCAV – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
FRAP – poder redutor de íons ferro
HV – Hospital Veterinário
IFN – interferon
IL – interleucina
NOx – óxido nítrico
P450 – citocromo P450
PCR – Reação em Cadeia pela Polimerase
SAM – soroaglutinação microscópica
T3 – triiodotironina
T4 – tetraiodotironina
TgAA – anticorpo anti-tireoglobulina
TGF – fator de transformação do crescimento
Th – T helper
TSH – hormônio estimulador da tireoide
Unesp – Universidade Estadual Paulista

LISTA DE TABELAS

	Página	
Tabela 1	Peso corporal dos cães naturalmente infectados por <i>E. canis</i> e as doses de hiclato de doxiciclina totais (mg) e individuais recebidas (mg/kg) pelos mesmos cães (Grupos II e III). Jaboticabal, 2015.....	38
Tabela 2	Protocolo experimental adotado para a avaliação dos eixos hormonais (adrenocortical e tireoideano), e do estresse oxidativo de cães naturalmente infectados por <i>Ehrlichia canis</i> . Jaboticabal, 2015.....	39
Tabela 3	Títulos de anticorpos anti- <i>Ehrlichia canis</i> e anti- <i>Leptospira</i> spp. e resultados da PCR em tempo real para <i>E. canis</i> , da semi-nested PCR para <i>Babesia canis vogeli</i> e da PCR em tempo real para <i>Anaplasma platys</i> de cães saudáveis (Grupo I) e de cães naturalmente infectados por <i>E. canis</i> (Grupos II e III). Jaboticabal, 2015.....	45
Tabela 4	Média \pm erro padrão da média das contagens de hemácias, concentração de hemoglobina, hematócrito, contagem de leucócitos e de plaquetas dos grupos I, II e III, nos tempos experimentais D0, D15 e D40. Jaboticabal, 2015.....	48
Tabela 5	Média \pm erro padrão da média das concentrações de cortisol e de sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-S) dos grupos I, II e III, nos tempos experimentais D0 e D40, nos momentos pré e pós a administração de ACTH. Jaboticabal, 2015.....	56
Tabela 6	Média \pm erro padrão da média das concentrações de T4 livre por diálise, T4 total, TSH e de TgAA dos grupos I, II e III, nos tempos experimentais D0 e D40. Jaboticabal, 2015.....	63

Tabela 7	Média \pm erro padrão da média da concentração de óxido nítrico (NOx), produto proteico de oxidação avançada (AOPP) e do poder redutor de íons ferro (FRAP) dos grupos I, II e III, nos tempos experimentais D0 e D40. Jaboticabal, 2015.....	68
Tabela 8	Média \pm erro padrão da média das contagens de hemácias, concentração de hemoglobina, hematócrito, contagem de leucócitos e de plaquetas dos grupos controle e doente nos tempos experimentais D0, D15 e D40. Jaboticabal, 2015.....	72
Tabela 9	Média \pm erro padrão da média das concentrações de cortisol e de sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-S) dos grupos controle e doente nos tempos experimentais D0 e D40, nos momentos pré e pós a administração de ACTH. Jaboticabal, 2015.....	79
Tabela 10	Média \pm erro padrão da média das concentrações de T4 livre por diálise, T4 total, TSH e de TgAA dos grupos controle e doente nos tempos experimentais D0 e D40. Jaboticabal, 2015.....	81
Tabela 11	Média \pm erro padrão da média da concentração de óxido nítrico (NOx), produto proteico de oxidação avançada (AOPP) e do poder redutor de íons ferro (FRAP) dos grupos controle e doente nos tempos experimentais D0 e D40. Jaboticabal, 2015.....	83

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Resumo da síntese do DHEA-S (adaptado de RABIN; McKENNA, 1982; KROBOTH et al., 1999; FELDMAN; NELSON, 2004 e BOONSTRA et al., 2008) e extraído de RONDELLI, 2012.....	28
Figura 2	Representação gráfica das contagens médias de hemácias dos grupos I, II e III nos tempos D0, D15 e D40. Jaboticabal, 2015.....	49
Figura 3	Representação gráfica das concentrações médias de hemoglobina dos grupos I, II e III nos tempos D0, D15 e D40. Jaboticabal, 2015.....	50
Figura 4	Representação gráfica das médias do hematócrito dos grupos I, II e III nos tempos D0, D15 e D40. Jaboticabal, 2015.....	50
Figura 5	Representação gráfica das contagens médias de leucócitos dos grupos I, II e III nos tempos D0, D15 e D40. Jaboticabal, 2015.....	52
Figura 6	Representação gráfica das contagens médias de plaquetas dos grupos I, II e III nos tempos D0, D15 e D40. *Diferença significativa entre os grupos, na variável tempo de avaliação ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.....	53
Figura 7	Representação gráfica das contagens médias de plaquetas dos grupos I, II e III nos tempos D0, D15 e D40. Jaboticabal, 2015.....	53
Figura 8	Representação gráfica das concentrações médias de cortisol dos grupos I, II e III nos tempos D0 e D40, antes e após a administração de ACTH. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). *Diferença significativa entre grupos na variável tempo ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.....	57

Figura 9	Representação gráfica das concentrações médias de DHEA-S dos grupos I, II e III nos tempos D0 e D40, antes e após a administração de ACTH. *Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015..	60
Figura 10	Representação gráfica das concentrações médias de TgAA dos grupos I, II e III nos tempos D0 e D40. *Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.....	66
Figura 11	Representação gráfica das concentrações médias de TgAA dos grupos I, II e III nos tempos D0 e D40. Jaboticabal, 2015.....	66
Figura 12	Representação gráfica das concentrações médias de NOx dos grupos I, II e III nos tempos D0 e D40. Jaboticabal, 2015.....	69
Figura 13	Representação gráfica da correlação entre as concentrações médias de DHEA-S e das contagens médias de plaquetas do grupo II no tempo D40. Jaboticabal, 2015.....	71
Figura 14	Representação gráfica da contagem de hemácias do grupo controle e do grupo doente no tempo D0 de avaliação. *Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.....	73
Figura 15	Representação gráfica da concentração de hemoglobina do grupo controle e do grupo doente no tempo D0 de avaliação. *Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.....	74
Figura 16	Representação gráfica do hematócrito médio do grupo controle e do grupo doente nos tempos D0 de avaliação (A) e D15 (B) *Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.....	75

Figura 17	Representação gráfica da contagem de plaquetas do grupo controle e do grupo doente no tempo D0 de avaliação. *Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.....	77
Figura 18	Representação gráfica da concentração de cortisol pré-ACTH do grupo controle e do grupo doente no tempo D40 de avaliação. *Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.....	80
Figura 19	Representação gráfica da concentração de T4 livre por diálise do grupo controle e do grupo doente no tempo D40 de avaliação. *Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.....	82
Figura 20	Representação gráfica da concentração de NOx do grupo controle e do grupo doente no tempo D0 de avaliação. *Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.....	84
Figura 21	Representação gráfica da concentração de AOPP do grupo controle e do grupo doente no tempo D0 de avaliação. *Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.....	85
Figura 22	Representação gráfica da concentração de FRAP do grupo controle e do grupo doente nos tempos D0 de avaliação (A) e D40 (B). *Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.....	86

1 INTRODUÇÃO

O estado de doença pode promover várias alterações metabólicas no indivíduo, com o intuito de restabelecer a homeostase. Neste âmbito, os hormônios mostram-se essenciais para a adaptação do organismo às alterações ambientais internas e externas. Portanto, alterações hormonais podem ser esperadas em diferentes enfermidades de natureza não endócrina. Logo, a imprecisão na identificação destas alterações hormonais que acompanham o estado de doença pode culminar no diagnóstico inadequado de endocrinopatias primárias, assim como na instituição terapêutica inadequada.

Na Medicina, estas alterações são estudadas há aproximadamente meio século, desde os primeiros trabalhos sobre este assunto, como as revisões de Kass e Finland (1953) sobre os hormônios adrenocorticais e suas influências na imunidade. Anos mais tarde, Semple (1986) abordou as alterações hormonais em doenças não endócrinas. Possíveis interferências de diferentes doenças no perfil endócrino em humanos são conhecidas, especialmente quanto aos hormônios tireoideanos, adrenocorticais, insulina e hormônio do crescimento. Já na Medicina Veterinária, os trabalhos desta natureza são escassos, e muitas dúvidas ainda permanecem sobre as alterações hormonais advindas de desordens não endócrinas nas espécies animais.

A erliquiose monocítica canina é uma doença mundialmente diagnosticada e representa um importante problema na saúde dos cães. Na fase aguda, promove alterações clínicas tais como hiporexia ou anorexia, febre, uveíte, esplenomegalia, perda de peso, dor articular e prostração; na fase subclínica, o cão, na maioria das vezes é assintomático; já na fase crônica, pode haver prostração e alterações do apetite. É considerada por Varshney, Varshney e Hoque (2003) como uma doença catabólica. Contudo, alterações hormonais podem ser esperadas, como mostram alguns estudos com delineamentos experimentais diferentes (KUMAR; VARSHNEY; VARSHNEY, 2006; RONDELLI et al., 2015a e b).

Neste sentido, o estudo em tela pretendeu contribuir nesta área do conhecimento, investigando aspectos sobre os mecanismos endócrinos envolvidos na erliquiose canina e respondendo algumas questões de cunho clínico, como: “É confiável avaliar os hormônios adrenocorticais ou tireoideanos de cães com erliquiose e suspeitos de endocrinopatias?”; “O quão confiáveis seriam esses resultados?”; “Deveríamos tratar a hemoparasitose inicialmente e posteriormente avaliá-los por meio das dosagens hormonais?”. Questões clínicas como estas são frequentemente formuladas, especialmente pelo fato de a erliquiose ser uma doença infecciosa de alta prevalência na rotina clínica da nossa região e, por muitas vezes, apresentar-se como comorbidade em pacientes endocrinopatas.

Estudos recentes do nosso grupo de pesquisa identificaram o comprometimento hormonal adrenocortical em cães com infecção natural por *E. canis*, evidenciado pelo aumento da concentração do hormônio DHEA-S em cães doentes. Em contrapartida, o cortisol sérico desses mesmos cães doentes não diferiu dos cães saudáveis, quando comparamos as concentrações do hormônio antes e após a estimulação com ACTH. Outro estudo conduzido pelo mesmo grupo mostrou que cães com erliquiose monocítica, natural ou experimentalmente induzida, apresentam maior concentração do DHEA-S, quando comparados a cães saudáveis.

Os radicais livres e outras espécies reativas do oxigênio desempenham importante função no dano tecidual em vários processos patológicos (NOHL; ESTERBAUER; RICE-EVANS, 1996), resultando no aumento da peroxidação lipídica, oxidação proteica e quebra do DNA (HALLIWELL, 1994; WITKO-SARSAT et al., 1998). Em algumas doenças parasitárias, tais como a babesiose e a rangeliiose caninas, o dano oxidativo provocado pode contribuir com o agravamento do quadro clínico (CHAUDHURI; VARSHNEY; PATRA, 2008; FRANÇA et al., 2012). Ademais, estudos sobre o efeito do estresse oxidativo na fisiopatogenia da erliquiose canina são escassos e os poucos são discordantes.

Sendo assim, o presente estudo teve como propósito avaliar os eixos hormonais hipotálamo-hipófise-adrenocortical e hipotálamo-hipófise-tireoide,

além de verificar a integridade dos mecanismos de defesa pelo balanço de moléculas oxidantes e antioxidantes em cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis*, antes e após o tratamento com hclato de doxiciclina. Especificamente, pretendeu-se avaliar as concentrações séricas de cortisol e de sulfato de dehidroepiandrosterona pré e pós-estimulação com ACTH (hormônio adrenocorticotrópico) sintético, de TSH, T4 total, T4 livre por diálise e de anticorpos anti-tireoglobulina, óxido nítrico (NOx), do produto proteico de oxidação avançada (AOPP) e do poder redutor de íons ferro (FRAP) em cães naturalmente infectados por *E. canis*, no momento do diagnóstico e após os tratamentos com hclato de doxiciclina, utilizando-se as doses aproximadas de 5mg/kg (Grupo II) e 10mg/kg (Grupo III) a cada 12 horas por 30 dias. Ainda, objetivou-se avaliar se o efeito dose do hclato de doxiciclina pode interferir nas respostas hormonais e no estresse oxidativo, comparando-se as variáveis analisadas nos cães tratados com as diferentes doses do fármaco e, ademais, avaliar se o tratamento com hclato de doxiciclina, independente da dose, pode interferir nos parâmetros estudados, quando comparadas as variáveis dos cães doentes com as do grupo controle.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Erliquiose monocítica canina

A erliquiose monocítica canina é uma doença multissistêmica provocada pela bactéria gram-negativa *Ehrlichia canis*. A descrição pioneira da infecção de cães por *E. canis* data de 1935, de autoria de Donatien e Lestoquard, identificada em um cão da raça pastor alemão, na Argélia (DONATIEN; LESTOQUARD, 1937). Posteriormente, durante a guerra do Vietnã (1955 - 1975), centenas de cães do exército americano infectados por *E. canis* desenvolveram quadro clínico semelhante, marcado por hemorragia, prostração, anemia e leucopenia, chamada na época de pancitopenia tropical canina (HUXSOLL et al., 1970).

No Brasil, o primeiro registro de infecção por *E. canis* ocorreu em Belo Horizonte-MG, por Costa et al. (1973); o segundo em 1978, por Maregatti em Jaboticabal-SP (MACHADO, 2004). Acredita-se que a bactéria chegou a terras brasileiras por meio da aquisição de cães da raça pastor alemão, possivelmente infectados, advindos dos Estados Unidos da América, ao se observar a coincidência das datas citadas no histórico anteriormente descrito (CAMACHO, 2015¹). Nos dias atuais, a doença é mundialmente distribuída e representa um problema importante de saúde canina (LAPPIN, 2006).

Ehrlichia canis é um parasita intracelular obrigatório que tem tropismo por monócitos, linfócitos e trombócitos, apresentando-se na forma de *cluster* intracitoplasmático, denominado mórula (NEER; HARRUS, 2006). O carrapato marrom do cão (*Rhipicephalus sanguineus*) é o vetor da doença, por meio da inoculação do parasita pela secreção da saliva infectada (MOREIRA et al., 2003; BULLA et al., 2004; DAGNONE, et al., 2009). Moraes-Filho et al. (2013) sugerem que a linhagem tropical do *R. sanguineus*, encontrada em grande parte do Brasil, apresenta competência vetorial superior à linhagem temperada, presente no sul do Brasil e da América Latina. Tal fato explicaria a frequência reduzida de cães infectados por *E. canis* no sul do país, em contraste com as demais regiões.

O período de incubação natural da doença é de oito a 20 dias, quando os parasitas multiplicam-se nos macrófagos e espalham-se pelo organismo (NEER; HARRUS, 2006). O curso subsequente da erliquiose canina se subdivide nas fases aguda, subclínica e crônica, embora estes estádios sejam mais apropriadamente observados na infecção experimental (CASTRO et al., 2004; HARRUS et al., 2004; MUNHOZ et al., 2009; FARIA et al., 2011).

Na fase aguda, que perdura de duas a quatro semanas, o animal pode apresentar sinais clínicos de febre, secreção óculo-nasal serosa ou purulenta, hiporexia a anorexia, emaciação, linfadenomegalia, uveíte, prostração, tendência a hemorragias, e a infestação por carrapatos geralmente é reportada pelo proprietário (CASTRO et al., 2004; LAPPIN, 2006; MUNHOZ et al., 2009; FARIA et al., 2011). Cegueira e sinais neurológicos devido à meningite são

¹ CAMACHO, A. A. (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Júlio de Mesquita Filho – Câmpus de Jaboticabal). Comunicação pessoal, 2015.

descritos na literatura (HARRUS; WANER, 2011). Pode haver, ainda, esplenomegalia, trombocitopenia, leucopenia e anemia (NEER; HARRUS, 2006).

A fase subclínica, por sua vez, inicia-se de seis a nove semanas após a infecção e pode se manifestar em até meses ou anos (LAPPIN, 2006). Nesta fase, o cão é assintomático, apresenta trombocitopenia leve a moderada (NEER; HARRUS, 2006; HARRUS; WANER, 2011), e títulos de anticorpos anti-*E. canis* variados, atribuídos, por alguns pesquisadores, à permanência da bactéria no baço do animal (HARRUS et al., 2004).

A fase crônica se estabelece quando as demais fases são ultrapassadas e manifesta-se por sinais semelhantes aos da fase aguda (HARRUS; WANER, 2011), que culmina em hipoplasia ou aplasia da medula óssea (NEER; HARRUS, 2006). Todavia, estudos de diferentes pesquisadores (TAJIMA; RIKIHISA, 2005; UNVER; HUANG; RIKIHISA, 2006; MUNHOZ et al., 2009; FARIA et al., 2011) claramente demonstraram que os sinais clínicos diferem, em ordem de manifestação e importância, entre os cães infectados por diferentes amostras de *E. canis*. A doença não apresenta predileção por idade, sexo ou raça, embora pareça que cães da raça pastor alemão apresentem a forma mais grave da doença, com elevadas morbidade e mortalidade, quando comparada a outras raças (NYINDO et al., 1980; HARRUS; WANER, 2011).

O diagnóstico da erliquiose canina pode ser baseado nos sinais clínicos manifestados e nos resultados dos testes laboratoriais, de modo que a contagem de plaquetas e a sorologia são adequadas na triagem. Entretanto, as técnicas de PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase) são os testes confirmatórios da positividade ao agente (HARRUS; WANER, 2011). A identificação de mórulas no sangue periférico (LAPPIN, 2006; NEER; HARRUS, 2006; FARIA et al., 2010) ou em aspirados esplênicos do animal suspeito (FARIA et al., 2011) caracterizam a fase aguda da doença. Esta técnica que apresenta especificidade e sensibilidade reduzidas, pelo fato de que a percentagem de células infectadas circulantes é menor que 1% (CADMAN et al., 1994). A sensibilidade desta técnica aumenta quando são

utilizadas para a pesquisa de leucócitos de sangue periférico ou aspirados esplênicos como amostras para a pesquisa de mórulas (FARIA et al., 2010).

As técnicas sorológicas são amplamente empregadas no diagnóstico da erliquiose. A Reação de Imunofluorescência Indireta é considerada o “padrão-ouro” sorológico. Outra técnica também utilizada é o Dot-ELISA, disponível em *kits* comerciais rápidos, a qual apresenta sensibilidade e especificidade semelhantes às da Imunofluorescência Indireta (OLIVEIRA et al., 2000; HARRUS; WANER, 2011). Uma limitação do uso das técnicas sorológicas é que os títulos de anticorpos anti-*E. canis* permanecem elevados por tempo ainda não bem definido e, posteriormente, reduzem, mas persistem por meses ou anos (LAPPIN, 2006), de modo que a sorologia positiva não deve ser interpretada isoladamente no diagnóstico da erliquiose (HARRUS; WANER, 2011).

A PCR é um método sensível na detecção de DNA de *E. canis*, que pode ser detectado de quatro a dez dias pós-infecção, período que precede a soroconversão (IQBAL; CHAICHANASIRIWITHAYA; RIKIHISA, 1994). A positividade confirma a doença (NEER; HARRUS, 2006; NAKAGHI et al., 2010), embora resultados negativos não excluam que a amostra analisada seja livre de DNA do parasita (HARRUS; WANER, 2011). Quando comparadas, as amostras de aspirado esplênico se mostram mais sensíveis que as de sangue periférico (HARRUS et al., 2004; BANETH et al., 2009). Ainda, segundo Baneth et al. (2009), a PCR em tempo real é mais sensível que a PCR convencional, além de ser menos suscetível às contaminações externas.

As tetraciclinas são os fármacos de escolha no tratamento da erliquiose canina, sendo a doxiciclina e a minociclina as empregadas com maior frequência (NEER et al., 2002; NEER; HARRUS, 2006). Estes antimicrobianos são bacteriostáticos lipossolúveis, prontamente absorvidos e que atingem concentrações séricas e intracelulares satisfatórias, fatores importantes na eliminação do parasita intracelular (SPINOSA, 2002). Em casos não complicados, a melhora clínica ocorre de 24 a 48 horas após o início do tratamento com tetraciclinas (NEER et al., 2002). O Grupo de Estudos em Doenças Infecciosas do Colégio Americano de Medicina Veterinária sugeriu,

em um consenso em erliquiose, a dose de doxiciclina de 10mg/kg, via oral, a cada 24 horas, por 28 dias para o tratamento da erliquiose monocítica canina (NEER et al., 2002). Todavia, um estudo sugere que a *E. canis* possa persistir em cães que desenvolveram a doença experimental e foram tratados com doxiciclina na dose sugerida pelo consenso. Carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* livres de patógenos que se alimentaram nesses cães após o tratamento apresentaram-se positivos na PCR para a *E. canis* (McCLURE et al., 2010).

Em nossa rotina clínica, o protocolo terapêutico adotado por anos foi adaptado de Troy e Forrester (1990) e utilizado por Munhoz et al. (2012) no tratamento de cães infectados experimentalmente por *E. canis*, amostra Jaboticabal. Neste protocolo, a prescrição é de 5mg/kg de doxiciclina, via oral, a cada 12 horas por 28 dias. Entretanto, observamos na rotina clínica que as mais rápidas recuperações dos cães infectados são conseguidas quando se emprega doxiciclina na dose de 10mg/kg a cada 12 horas, por 30 dias (TINUCCI-COSTA, 2014²).

2.2 Hormônios adrenocorticais

O córtex adrenal é composto por três camadas secretoras: as zonas fasciculada e reticulada, que sintetizam hormônios sexuais e cortisol, e a zona glomerulosa, que sintetiza e secreta aldosterona (HERRTAGE, 2009). A zona fasciculada atua em conjunto com a zona reticulada, de modo que apenas as células destas camadas possuem a enzima 17- α -hidroxilase (renomeada como CYP17) e podem sintetizar 17-hidroxipregnenolona e 17-hidroxiprogesterona, precursores do cortisol e dos andrógenos adrenais. A zona glomerulosa, por sua vez, é deficiente da atividade da enzima 17- α -hidroxilase (CYP17), o que rende a esta camada a incapacidade de sintetizar cortisol ou andrógenos. Em contraste, apenas as células da zona glomerulosa possuem as enzimas

² TINUCCI-COSTA, M. (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Júlio de Mesquita Filho – Câmpus de Jaboticabal). Comunicação pessoal, 2014.

necessárias para a desidrogenação da 18-hidroxicorticosterona e síntese da aldosterona (FELDMAN & NELSON, 2004).

A síntese dos esteroides se inicia com a ação de enzimas catalisadoras do citocromo P450 sobre o colesterol. Lipoproteínas plasmáticas são as principais fontes de colesterol adrenal, embora a síntese a partir de acetato também ocorra. Um pequeno estoque de colesterol livre está disponível para as adrenais, para que haja resposta rápida quando houver estímulo. Quando este estímulo ocorre, há aumento na hidrólise de ésteres do colesterol, convertendo-o a colesterol livre, além do aumento do uso das lipoproteínas plasmáticas e aumento da síntese de colesterol adrenal (ENGELKING, 2010).

A produção de cortisol pelas adrenais é regulada pelo CRH (hormônio estimulador de corticotropina) hipotalâmico e pelo ACTH (hormônio adrenocorticotrópico) hipofisário (SCOTT-MONCRIEFF, 2007). As zonas fasciculada e reticulada respondem ao ACTH e são estimuladas à rápida síntese e secreção de cortisol, de modo que a concentração plasmática deste hormônio aumenta minutos após a liberação do ACTH (FELDMAN; NELSON, 2004; ENGELKING, 2010). As propriedades de estimulação do ACTH na secreção adrenocortical dos mineralocorticoides e dos esteroides androgênicos são menos importantes (FELDMAN; NELSON, 2004).

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

O sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-S), um metabólito da dehidroepiandrosterona (DHEA), é um precursor esteroide sintetizado a partir do colesterol e secretado pela zona reticulada adrenocortical. Há também pequena síntese deste hormônio pelas gônadas e pelo cérebro (BOONSTRA et al., 2008). O colesterol é transformado, por meio de ações enzimáticas, em pregnenolona e posteriormente em 17-hidroxipregnenolona para, então, originar a DHEA e o DHEA-S. O DHEA-S é dissociado a dehidroepiandrosterona, previamente à sua conversão a andrógenos

(androstenediona e testosterona) e estrógenos (estradiol) (RABIN; McKENNA, 1982) (Figura 1).

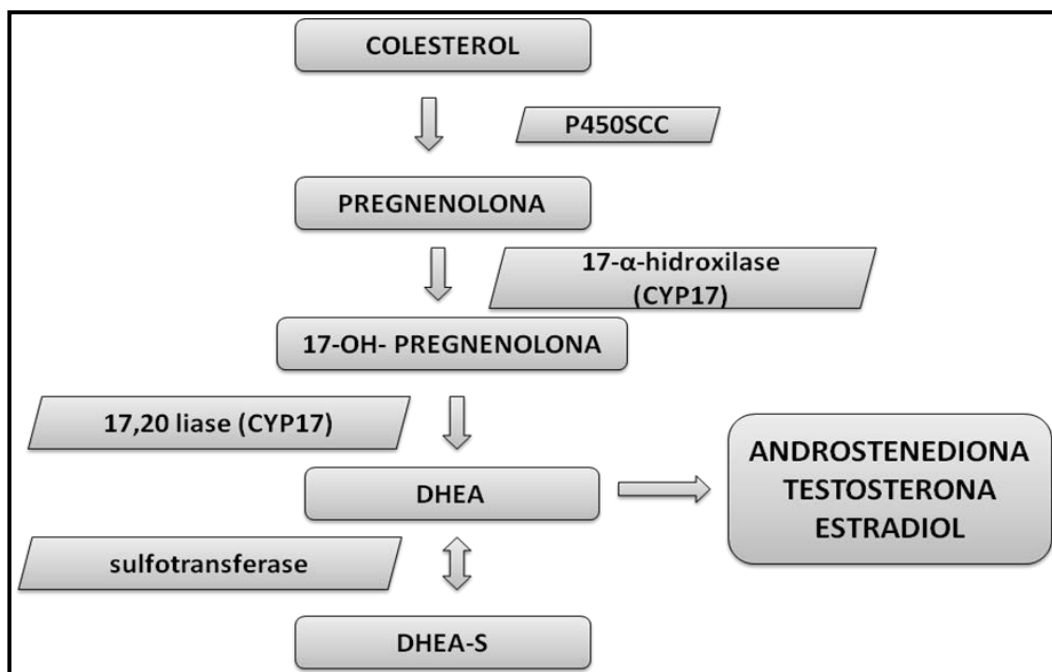


Figura 1. Resumo da síntese do DHEA-S (adaptado de RABIN; McKENNA, 1982; KROBOTH et al., 1999; FELDMAN; NELSON, 2004 e BOONSTRA et al., 2008) e extraído de RONDELLI, 2012.

A secreção de DHEA em resposta ao ACTH exógeno foi demonstrada em humanos (PARKER, 1991; KROBOTH et al., 1999; BURKHARDT et al., 2013), hamsters (PIEPER; LOBOCKI, 2000) e esquilos (BOONSTRA et al., 2008). Entretanto, em humanos, a síntese de DHEA-S ocorre, ao menos parcialmente, em resposta ao ACTH (PARKER, 1991). Nesta espécie, a meia vida do DHEA é de aproximadamente 1 a 3 horas, enquanto que a do DHEA-S é de 10 a 20 horas, o que faz da forma sulfatada a menos passível de apresentar flutuações diárias (ROSENFELD et al., 1975).

Existem divergências quanto ao pico de concentração do DHEA-S, em resposta ao estímulo do ACTH, em cães. Frank et al. (2003) verificaram aumento do DHEA-S uma hora após a administração de ACTH em cães saudáveis, tanto em machos castrados, quanto em fêmeas inteiras e castradas. Um estudo mais recente, envolvendo um grupo de cães saudáveis e outro de cães com erliquiose naturalmente adquirida, seguindo metodologia semelhante

à de Frank et al. (2003), demonstrou que o pico do DHEA-S, em caninos machos e fêmeas, não ocorreu no tempo final do teste, que se deu uma hora após a administração do hormônio (RONDELLI et al., 2015a).

DHEA-S é considerado um hormônio imunomodulador, pois atua na estimulação de linfócitos T auxiliares e na produção de citocinas (LEAL et al., 2003; BOONSTRA et al., 2008; MORGAN et al., 2009). Existem evidências de que o DHEA-S e o cortisol manifestam efeitos imunomoduladores contrários; enquanto o cortisol suprime, o DHEA-S estimula a função do sistema imune (MITCHELL et al., 2002). O comportamento do DHEA-S varia sensivelmente frente a diferentes doenças.

Em seres humanos com hiperadrenocorticismos espontâneos, o DHEA-S apresentou concentração nos limites de referência, enquanto que em pacientes com insuficiência cardíaca crônica e outras doenças que levam o paciente ao estado crítico, tais como queimaduras severas, houve aumento do cortisol e redução do DHEA-S (KROBOTH et al., 1999). Segundo Leal et al. (2003), esta dissociação entre o cortisol e o DHEA-S é mais possível de ser observada em doenças crônicas, embora os mecanismos exatos sejam pouco conhecidos. Uma sugestão é que nestes quadros crônicos há prioridade na síntese de cortisol e a consequente redução da secreção dos andrógenos sexuais adrenais, a exemplo do que pode ocorrer com a secreção de DHEA-S (WADE et al., 1988).

Alterações hormonais adrenocorticais podem ocorrer devido a algumas condições patológicas, que tanto podem culminar no excesso de produção como na supressão de secreção hormonal. Menores concentrações séricas de DHEA-S foram identificadas em humanos com paracoccidioidomicose, causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (LEAL et al., 2003) e também em pessoas portadores da síndrome do intestino irritável (SUGAYA et al., 2012). Em contraste, Libonati et al. (2006) demonstraram o aumento da secreção de cortisol e de DHEA em pacientes com malária, infectados por *Plasmodium falciparum*, assim como Lima Verde et al. (2011) verificaram maiores concentrações de ACTH e cortisol séricos em humanos com leishmaniose visceral, infectados com *Leishmania infantum chagasi*.

Em cães infectados com *Babesia canis rossi* foram observadas hipoglicemia e maiores concentrações de cortisol pré e pós-ACTH simultaneamente em pacientes gravemente doentes (SCHOEMAN; HERRTAGE, 2007; SCHOEMAN; HERRTAGE, 2008). Na mesma linha de pesquisa, cães com diarreia por parvovírus que foram à óbito em até 48 horas após a hospitalização apresentaram maiores concentrações séricas de cortisol do que os cães portadores da mesma enfermidade que sobreviveram após a hospitalização (SCHOEMAN; GODDARD; HERRTAGE, 2007). Um estudo com cães acometidos por erliquiose na fase crônica revelou não haver alterações nas concentrações basais de cortisol (KUMAR; VARSHNEY; VARSHNEY, 2006). Entretanto, maiores concentrações de DHEA-S foram relatadas em um estudo do nosso grupo de pesquisa com cães com erliquiose nas fases aguda ou subclínica, quando comparados com cães saudáveis (RONDELLI et al., 2015a).

Em contrapartida, a ocorrência da síndrome da insuficiência adrenal relativa é descrita em humanos, marcada por hipocortisolemia relativa nos pacientes em sepse que apresentam hipotensão, hipoglicemia, recuperação anestésica insatisfatória, fraqueza e desorientação, e estes respondem ao tratamento com corticosteróides, tais como a dexametasona ou a hidrocortisona (RAI; COHEN; VENKATECH, 2004). Burkitt et al. (2007) descreveram a possibilidade da ocorrência desta síndrome em cães com sepse, embora Holford et al. (2008) relatem que faltam estudos mais precisos para determinar sua veracidade em cães.

2.3 Hormônios tireoideanos

A secreção dos hormônios tireoideanos é regulada por retroalimentação negativa do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide e há, ainda, algum controle autorregulador intratireoideano (FELDMAN; NELSON, 2004). No cão, as concentrações circulantes de T4 e T3 apresentam a proporção de 20:1, de modo que o T4 (tetraiodotironina) encontra-se ligado às proteínas plasmáticas,

e o T3 (triiodotironina) alcança maiores concentrações intracelulares (ENGELKING, 2010).

Os hormônios tireoideanos exercem ações diretas sobre o metabolismo basal, devido às suas funções calorigênicas, por meio da estimulação do consumo de oxigênio celular, atuam na regulação da temperatura corpórea, regulam a síntese proteica, além de regular o metabolismo de carboidratos e lipídios (FELDMAN; NELSON, 2004; ENGELKING, 2010).

A avaliação dos hormônios tireoideanos não é simples. Primeiro, pelo fato dos testes laboratoriais se apresentarem pouco sensíveis e pouco específicos e, segundo, devido à influência de fármacos e de doenças sistêmicas na síntese, secreção, transporte e/ou no metabolismo dos hormônios tireoideanos ou, ainda, por inibirem diretamente o eixo hipotálamo-hipófise-tireoide (DAMINET; FERGUSON, 2003; DIXON, 2009). Todavia, não foram encontradas informações acerca da influência da doxiciclina sobre os eixos hormonais, em especial, o tireoideano, na literatura consultada.

Para tornar a avaliação tireoideana mais precisa, empregam-se as dosagens combinadas de T4 total que é, de certo modo, sensível para a identificação de hipotireoidismo em cães. Entretanto, o hormônio T4 pode se alterar durante o dia, estar reduzido em algumas raças e em cães idosos, assim como sofrer influência de fármacos, como dos corticosteroides, antimicrobianos, anticonvulsivantes e quimioterápicos.

A dosagem de T4 livre por diálise, por sua vez, é menos influenciada por fármacos e por outras condições individuais, o que faz com que o resultado seja mais confiável. Já a dosagem de TSH visa diferenciar o hipotireoidismo de outras causas não relacionadas e auxiliar na interpretação de concentrações reduzidas de T4, embora não deva ser interpretado isoladamente. A avaliação dos anticorpos anti-tireoglobulina mostra-se importante nos casos onde haja discordância dos valores de T4 e TSH, pois o resultado positivo pode indicar doença tireoideana (KANTROWITZ et al., 2001; FELDMAN; NELSON, 2004; DIXON, 2009).

Para Feldman e Nelson (2004), a detecção de TgAA sugere a ocorrência de doença tireoideana, embora não seja capaz de precisar a gravidade ou

mesmo a progressão da inflamação que envolve as tireoides. Os mesmos autores recomendam que esta prova diagnóstica seja utilizada no contexto da suspeita clínica e nunca como um único critério para diagnóstico de hipotireoidismo.

Diversas doenças têm a capacidade de promover a redução das concentrações séricas dos hormônios tireoideanos, entre elas, as nefropatias, hepatopatias, insuficiência cardíaca congestiva, assim como as infecções graves, distúrbios imunomediados (a exemplo, a anemia hemolítica imunomediada), diabetes mellitus, hiperadrenocorticismos e febre (FELDMAN; NELSON, 2004). Alguns autores acreditam que esta alteração seria um mecanismo adaptativo e fisiológico do organismo com o propósito de diminuir o metabolismo celular durante o período de doença. Entretanto, estas alterações não caracterizariam o hipotireoidismo *per se* (KANTROWITZ et al., 2001; FELDMAN; NELSON, 2004; WAJNER; MAIA, 2012), muito embora as alterações das concentrações séricas de hormônios tireoideanos reflitam o prognóstico da doença (KANTROWITZ et al., 2001; WAJNER; MAIA, 2012).

A condição anteriormente descrita, denominada síndrome do eutireoideo doente, é manifestada quando doenças não tireoideanas promovem a redução dos hormônios T4 total e T4 livre, durante o curso de doenças agudas ou crônicas. Em humanos, a fisiopatogenia desta síndrome se inicia com a redução do hormônio T3, de modo que alterações no T4 ocorram, porém, mais tardiamente e, em geral, em estágios terminais de doenças mais graves (WAJNER; MAIA, 2012). Ao se considerar a menor importância diagnóstica do hormônio T3 para os caninos, entende-se porque esta síndrome é mais frequentemente caracterizada em seres humanos que em cães. As citocinas contribuem para a ocorrência da síndrome do eutireoideo doente, de modo que há correlação inversa em humanos entre a citocina IL-6 e a concentração de T3 (FRIBERG et al., 2002). Ademais, a secreção aumentada de citocinas pró-inflamatórias, a exemplo da IL-6, culmina na geração do estresse oxidativo e contribui na patogenia da supressão hormonal tireoideana (WAJNER; MAIA, 2012).

Em um trabalho recente, Zygnier et al. (2015) descreveram a síndrome do eutireoideo doente em cães infectados por *Babesia canis canis*, por meio da demonstração de concentrações séricas reduzidas de T3, aos moldes do que ocorre em seres humanos com malária (KRAUSE et al., 2007). Outro estudo que antecede este citado mostrou que cães naturalmente infectados por *Babesia canis rossi* apresentaram concentrações de T4 total e de T4 livre reduzidas, de modo que os cães que foram hospitalizados e não sobreviveram apresentavam menores concentrações destes hormônios (SCHOEMAN; REES; HERRTAGE, 2007). Com isto, os autores associaram o risco de mortalidade às concentrações reduzidas dos hormônios tireoideanos estudados. Interessantemente, o mecanismo da redução da secreção de hormônios tireoideanos foi sugerido em um relato de cães acometidos por leishmaniose, que apresentavam infiltração da tireoide por macrófagos infectados por *Leishmania infantum chagasi* (CORTESE et al., 1999), situação que pode predispor ao hipotireoidismo clínico ou subclínico, porém reversível, devido à inflamação concorrente (RANIERI et al., 2005).

Alguns pesquisadores propuseram que a erliquiose monocítica canina é capaz de alterar o perfil endócrino tireoideano de cães doentes (KUMAR; VARSHNEY; VARSHNEY, 2006). Esses autores avaliaram os hormônios tireoideanos de cães com erliquiose de ocorrência natural por meio das dosagens de T3 e T4 total e observaram concentrações aquém dos valores de referência e julgaram a condição como a de eutireoidismo doente. Embora este resultado seja interessante, DIXON (2009) recomenda que a avaliação do perfil tireoideano canino seja realizada por dosagens conjuntas de, ao menos, T4 total, TSH, T4 livre e de anticorpos anti-tireoglobulinas.

2.4 Estresse oxidativo

Os radicais livres e outras espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio participam de vários processos fisiológicos, como da fagocitose de agentes agressores, quando essas espécies reativas são produzidas (VASCONCELOS et al., 2007). Desempenham importante função no dano tecidual em vários

processos patológicos (NOHL; ESTERBAUER; RICE-EVANS, 1996), por resultar no aumento da peroxidação lipídica, oxidação proteica e quebra do DNA (HALLIWELL, 1994; WITKO-SARSAT et al., 1998). Quando as espécies reativas são produzidas em demasia, um sistema eficiente antioxidante é ativado, a fim de restabelecer o equilíbrio. Logo, o estresse oxidativo resulta do desequilíbrio dos sistemas pró e antioxidante, e os oxidantes predominam, que geram danos (SCHAFER; BUETTNER, 2001; VASCONCELOS et al., 2007).

Na tentativa de driblar o dano oxidativo durante os processos infecciosos, há a ativação de um sistema de defesa multissistêmico, que inclui os sistemas de reparo do DNA, a remoção de substratos e as enzimas antioxidantes (como a superóxido dismutase, catalase e glutatona) (CALLAHAN; CROUCH; JAMES, 1988; GATÉ et al., 1999). O óxido nítrico (NO) reage com espécies do oxigênio e moléculas biológicas, como dióxigênio, ânion superóxido e oxihemoglobina para formar uma variedade de produtos, incluindo nitritos e nitratos que, em concentrações elevadas, podem ser tóxicos para as células e, assim, figurar como um indicador do estresse oxidativo (BECKMAN; KOPPENOL, 1996).

Em associação à inflamação, há o aumento na formação de radicais livres e espécies reativas do oxigênio, que além de serem nocivos aos tecidos, podem ainda, contribuir com o agravamento da inflamação (KHANDUJA et al., 2006). O óxido nítrico, produzido pelos macrófagos devido aos efeitos tóxicos do metabólito peroxinitrito, pode contribuir para o dano tecidual, frequentemente presente no processo inflamatório (LIMA; ABDALLA, 2001).

O poder redutor de íons ferro (FRAP) é um biomarcador antioxidante que testa a força redutora do plasma, via avaliação da redução do complexo ferritripiridiltriazina a ferroso-tripiridiltriazina, em pH ácido (VASCONCELOS et al., 2007). O produto proteico de oxidação avançada (AOPP), por sua vez, é um marcador de oxidação de proteínas, que ocorre devido ao aumento da produção de mieloperoxidase por fagócitos ativados (HANASAND et al., 2012).

A interferência do estresse oxidativo na fisiopatogenia de algumas doenças foi descrita em humanos com neoplasias, doenças autoimunes, cardiopatias e doenças pulmonares, fato que suscitou o interesse nos

marcadores de dano oxidativo e das substâncias oxidantes (VASCONCELOS et al., 2007). Assim, neste contexto, alguns estudos foram desenvolvidos em cães com hepatozoonose (KIRAL et al., 2005), babesiose (CHAUDHURI et al., 2008), rangeliose (FRANÇA et al., 2012), erliquiose (KUMAR, VARSHNEY; PATRA, 2006; DA SILVA et al., 2013) e neoplasia mamária (MACHADO et al., 2015).

O dano oxidativo pode contribuir para o agravamento do quadro clínico em várias doenças infecciosas, como na babesiose (CHAUDHURI; VARSHNEY; PATRA, 2008) e na rangeliose caninas (FRANÇA et al., 2012). Já quanto à erliquiose em cães, os resultados são contraditórios. Em um estudo com soro de cães naturalmente infectados por *E. canis*, não foram evidenciadas alterações de peroxidação lipídica (KUMAR; VARSHNEY; PATRA, 2006). Já em outro estudo do nosso grupo, com amostras de cães infectados experimentalmente por *E. canis*, amostra Jaboticabal (DA SILVA et al., 2013), observou-se aumento nas concentrações de óxido nítrico, peroxidação lipídica, oxidação proteica e ativação da enzima glutathione redutase, que sugere a ocorrência de estresse oxidativo na erliquiose. Todavia, deve-se considerar que um dos estudos foi conduzido com material de cães com infecção natural e o outro com experimental.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp, Câmpus de Jaboticabal-SP, sob o protocolo n° 023938/14.

3.1 Amostras controle

Cães saudáveis (n=6) provenientes do canil do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal – SP, compuseram o Grupo I (Grupo Controle) (Apêndice B) e foram submetidos às

mesmas avaliações dos demais grupos, porém, em um único momento (D0), e foram utilizados em todos os tempos do estudo para fins de comparação. Estes cães eram hígidos, apresentavam hemograma nos padrões de referência para a espécie (Apêndices A e C1), e eram negativos na detecção de anticorpos anti-*E. canis* (Dot-ELISA), na PCR em tempo real para *E. canis* (BANETH et al., 2009), assim como na semi-nested PCR para *B. canis vogeli* (BIRKENHEUER; LEVY; BREITSCHWERDT, 2003), na PCR em tempo real para *Anaplasma platys* (GAUNT et al., 2010) e na pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira* spp. (soroaglutinação microscópica; SANTA ROSA et al., 1980).

3.2 Animais experimentais

Os cães deste estudo foram selecionados da casuística clínica do Hospital Veterinário da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal – SP, após a concordância e assinatura do termo de livre e esclarecido consentimento pelos responsáveis. A seleção dos cães ocorreu de abril a dezembro de 2014. Foram incluídos apenas cães adultos, com idade entre um e 8 anos, independente do sexo e da definição racial, com trombocitopenia e sorologia positiva (Dot-ELISA) para *E. canis* (momento D-1).

Foram considerados fatores de inclusão um ou mais itens da história clínica compatível com erliquiose, como a presença de carrapatos, uveíte, esplénomegalia, febre e trombocitopenia, coexistindo ou não leucopenia, e a identificação de mórulas em sangue periférico ou em aspirado esplênico. Além dos sinais clínicos sugestivos, todos deveriam ser soropositivos (títulos iguais ou maiores que 1:80 no teste Dot-ELISA) e/ou apresentar PCR em tempo real positiva para *E. canis* (BANETH et al., 2009), assim como serem negativos na semi-nested PCR para *B. canis* (BIRKENHEUER; LEVY; BREITSCHWERDT, 2003), na PCR em tempo real para *A. platys* (GAUNT et al., 2010) e na pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira* spp. (soroaglutinação microscópica; SANTA ROSA et al., 1980).

Os fatores de exclusão compreenderam cães já diagnosticados e tratados para erliquiose em algum momento prévio, ou aqueles com erliquiose em tratamento, cadelas em estro, cães que apresentavam doenças conhecidas pré-existentes (endocrinopatias, outras doenças infecciosas, neoplasias, nefropatias, ou hepatopatias), e aqueles que receberam corticoterapia sistêmica ou tópica em até 60 dias que antecederam o diagnóstico de erliquiose. A pesquisa das coinfeções por *B. canis vogeli*, *A. platys* e por *Leptospira* spp., frequentes na rotina clínica do Hospital Veterinário onde o estudo foi desenvolvido, visou a exclusão de algumas comorbidades.

Após a realização das análises de PCR para agentes da família Anaplasmataceae e piroplasmas, e sorologia anti-*Leptospira* spp., o material biológico coletado foi incluído ou excluído do estudo.

A partir destas etapas cumpridas, os cães naturalmente infectados com *E. canis* foram aleatoriamente distribuídos para compor os grupos II (que receberam 5mg/kg via oral de hiclato de doxiciclina a cada 12 horas, por 30 dias) ou III (que receberam 10mg/kg via oral de hiclato de doxiciclina a cada 12 horas, por 30 dias).

3.3 Tratamento dos animais infectados

O tratamento dos cães foi realizado com hiclato de doxiciclina (Doxitrat® 80mg ou 200mg, Agener União, Embu Guaçu-SP, Brasil), em domicílio, sob os cuidados do proprietário ou responsável, durante 30 dias consecutivos, seguindo a prescrição veterinária. O grupo II recebeu aproximadamente 5mg/kg via oral a cada 12 horas e o grupo III aproximadamente 10mg/kg via oral a cada 12 horas (Tabela 1). A medicação necessária para o tratamento foi fornecida aos proprietários, a fim de assegurar que o tratamento fosse realizado.

3.4 Avaliações e tempos experimentais

3.4.1 Tempos experimentais

A Tabela 2 resume os tempos experimentais e as avaliações realizadas. Após a confirmação do diagnóstico e exclusão de enfermidades comuns para a espécie canina (D-1), seguiu-se o tempo D0 imediatamente antes do início do tratamento; o D15, decorridos 15 dias de tratamento; e o D40, a avaliação final aos dez dias após o término do tratamento com hiclato de doxiciclina.

Tabela 1. Peso corporal dos cães naturalmente infectados por *E. canis* e as doses de hiclato de doxiciclina totais (mg) e individuais recebidas (mg/kg) pelos mesmos cães (Grupos II e III). Jaboticabal, 2015.

Grupo	Cão	Peso (kg)	Peso metabólico (kg) ^{0,75}	Dose total de doxiciclina (mg) [†]	Dose de doxiciclina (mg/kg) [†]	Dose de doxiciclina/ (kg) ^{0,75}
II	1	23,35	10,62	120	5,14	11,30
	2	12,6	6,69	80	6,35	11,96
	3	15,7	7,89	80	5,09	10,14
	4	6,45	4,05	40	6,20	9,88
	5	19,5	9,28	100	5,13	10,78
	6	7,2	4,40	40	5,56	9,10
Média ± desvio padrão	-----	14,14 ± 6,7	7,15 ± 2,62	76,67 ± 32,04	5,58 ± 0,56	10,53 ± 1,03
III	1	9,3	5,33	100	10,76	18,78
	2	14	7,24	150	10,72	20,73
	3	8,2	4,85	80	9,76	16,51
	4	12	6,45	120	10	18,61
	5	9	5,20	90	10	17,32
	6	5,35	3,52	50	9,35	14,21
Média ± desvio padrão	-----	9,65 ± 3,1	5,43 ± 1,29	98,34 ± 34,3	10,09 ± 0,55	17,69 ± 2,23

[†]A cada 12 horas por 30 dias.

3.4.2 Hemograma e pesquisa de mórulas

As coletas de sangue para a realização de hemograma foram feitas nos dias D-1, D0, D15 e D40. As contagens globais de eritrócitos, leucócitos,

plaquetas, determinação do volume globular e da concentração de hemoglobina foram realizadas com auxílio de um contador automático (ABC Vet[®], HORIBA ABX), e a contagem diferencial dos leucócitos e a pesquisa de mórulas em sangue periférico ou de aspirado esplênico pela leitura de esfregaços sanguíneos corados com uma solução de May-Grunwald (1g), Giemsa (1,5g), Wright (0,5g) e Metanol (1L) (CAMPOS FILHO, 2011³), sob microscopia de luz, com aumento de 1000x, no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da FCAV/Unesp/Jaboticabal-SP.

Tabela 2. Protocolo experimental adotado para a avaliação dos eixos hormonais (adrenocortical e tireoideano), e do estresse oxidativo de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis*. Jaboticabal, 2015.

Tempo	Avaliações
Dia -1 (D-1) (seleção dos cães doentes)	Exame físico Hemograma Dot-ELISA para <i>E. canis</i> PCR em tempo real para <i>E. canis</i> Semi-nested PCR para <i>B. canis vogeli</i> PCR em tempo real para <i>A. platys</i> Sorologia anti- <i>Leptospira</i> spp. Pesquisa de mórulas em sangue periférico e aspirado esplênico
Dia 0 (D0) (após confirmação da doença e imediatamente antes do início do tratamento)	Exame físico Hemograma Armazenamento de soro pré estimulação com ACTH (para dosagens de cortisol, DHEA-S, T4 livre, T4 total, TSH e TgAA, NOX, FRAP e AOPP) Estimulação com ACTH Armazenamento de soro pós-estimulação com ACTH (para dosagens de cortisol e DHEA-S)
Dia 15 (D15) (acompanhamento do tratamento)	Exame físico Hemograma
Dia 40 (D40) (10 dias após tratamento)	Exame físico Hemograma Armazenamento de soro pré estimulação com ACTH (para dosagens de cortisol, DHEA-S, T4 livre, T4 total, TSH e TgAA, NOX, FRAP e AOPP) Estimulação com ACTH Armazenamento de soro pós-estimulação com ACTH (para dosagens de cortisol e DHEA-S)

³ CAMPOS FILHO, E. (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Júlio de Mesquita Filho – Câmpus de Jaboticabal). Comunicação pessoal, 2011.

Com a perspectiva de aumentar as chances de detecção de mórulas, foram adotados os procedimentos de coletas de sangue capilar de ponta de orelha, empregando-se agulha de calibre 25x5,5mm, como também punção aspirativa esplênica com agulha fina guiada por ultrassonografia (FARIA et al., 2010). A seguir, foram confeccionados esfregaços dos materiais coletados em lâminas de microscopia, depois de secos ao ar, corados (como descrito anteriormente) e lidos sob microscopia de luz, com aumento de 1000x, para pesquisa das mórulas de *E. canis*. Estas amostras foram coletadas no momento D-1.

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

Para a detecção de anticorpos anti-*E. canis* da classe IgG foi utilizado o *kit* Immunocomb[®] *Ehrlichia canis* (Biogal, Israel). A metodologia empregada foi a descrita pelo fabricante, que considera títulos positivos (reagentes) iguais ou superiores a 1:80 e foi realizada no Laboratório de Imuno-histoquímica do Hospital Veterinário da FCAV/Unesp/Jaboticabal-SP.

3.4.4 Diagnósticos moleculares

A detecção de DNA de *E. canis* (PCR em tempo real; gene alvo 16S rRNA; limite mínimo de detecção de 3 cópias/ μ L), de *B. canis vogeli* (semi-nested PCR; gene alvo 18S rRNA; limite mínimo de detecção de 50 organismos/mL) e de *A. platys* (PCR em tempo real; gene alvo polinucleotídeo p44 do DNA genômico; limite mínimo de detecção de 10 cópias/ μ L) foi conduzida no Laboratório de Biologia Molecular, no Departamento de Microbiologia e Imunologia da Unesp, Câmpus de Botucatu – SP, com a colaboração do Prof. Dr. João Pessoa Araújo Junior, de acordo com as técnicas descritas por Baneth et al. (2009), Birkenheuer, Levy e Breitschwerdt (2003) e Gaunt et al. (2010), respectivamente. A sensibilidade da técnica

3.4.5 Detecção de anticorpos anti-*Leptospira* spp.

A sorologia para pesquisa de sorovares de *Leptospira* spp. foi realizada no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal – SP, por meio da técnica de soroaglutinação microscópica (SAM), segundo a técnica descrita por Santa Rosa et al. (1980). Os sorovares pesquisados foram: *Andamana*, *Icterohaemorrhagiae*, *Grippotyphosa*, *Pomona*, *Panama*, *Autumnalis*, *Shermani*, *Copenhageni*, *Patoc*, *Castellonis*, *Pyrogenes*, *Tarassovi*, *Whiticombi*, *Australis*, *Hebdomadis*, *Butembo*, *Wolffi*, *Hardjo*, *Sentot*, *Canicola*, *Bratislava*, *Bataveae*, *Cynopteri* e *Javanica*. Títulos menores ou iguais a 1:100 foram considerados negativos.

3.5 Avaliações hormonais

As avaliações hormonais foram realizadas no dia do diagnóstico (D0) e no dia 40 (D40). Estes tempos foram semelhantes aos adotados em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa (MUNHOZ et al., 2009; FARIA et al., 2011), com variações quanto à duração do tratamento que, de 28 dias, foi adaptado para 30 dias (TINUCCI-COSTA, 2014⁴).

3.5.1 Teste de estimulação com ACTH

Os animais selecionados foram submetidos ao teste de estimulação com ACTH nos tempos D0 e D40, mediante jejum alimentar prévio de 12 horas. O teste foi realizado nas dependências do Hospital Veterinário da FCAV/Unesp, Jaboticabal.

Para a realização do teste, procedeu-se da seguinte forma: inicialmente, sangue foi coletado por venopunção jugular (10mL) (momento pré-ACTH) para obtenção de soro e, a seguir, foram administrados 5µg/kg de ACTH sintético (Synacthen® 0,25mg/mL, Biofutura Pharma, Itália) por via intravenosa,

⁴ TINUCCI-COSTA, M. (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Júlio de Mesquita Filho – Câmpus de Jaboticabal). Comunicação pessoal, 2014.

priorizando-se a veia cefálica cranial. Após uma hora foi realizada nova venopunção jugular para coleta de sangue e obtenção de uma segunda amostra de soro (5mL) (momento pós-ACTH). A metodologia empregada foi a descrita por Feldman e Nelson (2004), Frank, Davis e Oliver (2004) e utilizada por Rondelli et al. (2015a e b) na avaliação adrenocortical de cães naturalmente infectados por *E. canis*.

As amostras de soro foram criopreservadas a -80°C para a posterior dosagem de cortisol e DHEA-S nos momentos pré e pós-ACTH, antes e após os tratamentos com hiclato de doxiciclina. Da amostra basal (momento pré-ACTH), foram também dosados TSH, T4 total, T4 livre por diálise e anticorpos anti-tireoglobulina.

3.5.2 Dosagens hormonais (cortisol, TSH, T4 total, T4 livre por diálise e DHEA-S) e de anticorpos anti-tireoglobulina

As amostras de soro foram enviadas a um laboratório terceirizado (BET Laboratories, Rio de Janeiro – RJ – Brasil) para dosagens de cortisol sérico basal e pós-estimulação com ACTH (por radioimunoensaio, *kit* MP Diagnostics Cortisol[®], Estados Unidos), assim como de TSH (por quimioluminescência, *kit* Immulite Siemens[®], Alemanha), T4 total (por radioimunoensaio, *kit* Antech Diagnostics[®], Estados Unidos), T4 livre por diálise (por radioimunoensaio, *kit* Vet Total T4 IVD Technologies[®], Estados Unidos) e anticorpos anti-tireoglobulina basais (amostra pré-ACTH) (por ensaio imunoenzimático, *kits* VT 10, VT11 e VT12, Oxford Laboratories[®], Estados Unidos). Os valores de referência para a espécie foram aqueles adotados pelo laboratório (Apêndice A).

O DHEA-S foi dosado por *kit* comercial ELISA (Human GmbH/In Vitro[®], Alemanha, n. 55060), seguindo-se as orientações do fabricante. As amostras de soro foram processadas no Laboratório de Imunoparasitologia Veterinária no Departamento de Patologia da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal – SP. Para a mensuração da absorvância das amostras do teste foi empregado o espectrofotômetro ELISA Dynex Revelation[®], Dynex Technologies.

3.6 Avaliação do estresse oxidativo

As análises foram realizadas das amostras de soro coletadas nos dias D0 e D40 e realizadas no Laboratório de Pesquisa em Parasitologia Animal, do Departamento de Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina, Chapecó, com a colaboração do Prof. Dr. Aleksandro S. da Silva. As concentrações de óxido nítrico foram avaliadas indiretamente pela quantificação de nitrito/nitrato (NOx), de acordo com a técnica descrita por Tatsch et al. (2011) (limite mínimo de quantificação de 2,0 $\mu\text{mol/L}$) e utilizada por Da Silva et al. (2013) na avaliação de cães com infecção experimentalmente induzida por *E. canis* (Amostra Jaboticabal). Já a oxidação proteica foi avaliada por meio da mensuração da concentração do produto proteico de oxidação avançada (AOPP), pela técnica previamente descrita por Hanasand et al. (2012) (limite mínimo de quantificação de 2,56 $\mu\text{mol/L}$), enquanto que a concentração sérica do poder redutor de íons ferro (FRAP) foi mensurada pela técnica descrita por Benzie e Strain (1996) (limite mínimo de quantificação de 2,0 $\mu\text{mol/L}$).

3.7 Análises estatísticas dos resultados

As análises estatísticas foram executadas no programa computacional SAS versão 9.3 ("*Statistical Analysis System*", 2011). Foi empregada a análise de variância de medidas repetidas para avaliar as respostas e a comparação de médias aos pares foi feita usando o teste de Tukey. As variáveis óxido nítrico (NOx), produto proteico de oxidação avançada (AOPP), poder redutor de íons ferro (FRAP) e cortisol foram transformadas em log (observação), enquanto que a variável DHEA-S foi transformada em log (observação +1) para a análise estatística. As correlações foram avaliadas pelo teste de Pearson utilizando-se o programa GraphPad Prism 6.0. O mesmo programa computacional foi empregado na análise das variáveis entre os cães do grupo I

e os dos grupos II e III, em conjunto, pelo teste T-Student com correção de Welch. O nível de significância adotado foi de 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Diagnóstico da erliquiose monocítica canina e exclusão de coinfeções

O diagnóstico de erliquiose foi estabelecido pela positividade nos testes dot-ELISA e/ou PCR, além da resposta terapêutica, por meio da correção das alterações hematológicas apresentadas no tempo D0, principalmente pela normalização do número de trombócitos. No estudo em tela, não foram encontradas mórulas no esfregaço sanguíneo de sangue periférico (ponta de orelha), ou em aspirado esplênico em nenhum dos cães. A identificação de mórulas no sangue periférico confirma a parasitemia e sugere a fase aguda da erliquiose (LAPPIN, 2006; NEER; HARRUS, 2006). Entretanto, segundo a literatura consultada, a detecção de mórulas em esfregaços sanguíneos varia de 5,71% (FARIA et al., 2010) a 60% (MUNHOZ et al., 2009). Embora este tenha sido um dos critérios de inclusão considerados, a detecção de inclusões em casos da doença natural não é comum (HARRUS; WANER, 2011). Sendo assim, foi adotado o diagnóstico de positividade baseado na pesquisa de anticorpos anti-*E. canis* para a seleção dos cães naturalmente doentes, posteriormente confirmada por PCR em tempo real na maioria dos cães dos grupos II e III.

A Tabela 3 apresenta os resultados dos testes utilizados para a inclusão dos cães em seus respectivos grupos, além das comorbidades infecciosas investigadas neste estudo. Assim, foi possível excluir tais agentes infecciosos para não interferirem nas variáveis estudadas. Ademais, foi importante que o grupo I fosse composto por cães hígidos que atendessem os requisitos de inclusão deste estudo, o que permitiu uma comparação mais segura entre os

grupos, visto que a maioria dos animais deste experimento eram advindos da rotina clínica hospitalar.

Tabela 3. Títulos de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* e anti-*Leptospira* spp. e resultados da PCR em tempo real para *E. canis*, da semi-nested PCR para *Babesia canis vogeli* e da PCR em tempo real para *Anaplasma platys* de cães saudáveis (Grupo I) e de cães naturalmente infectados por *E. canis* (Grupos II e III). Jaboticabal, 2015.

Grupo	Cão	Títulos de anticorpos anti- <i>E. canis</i>	Títulos de anticorpos anti- <i>Leptospira</i> spp.	PCR <i>E. canis</i> em tempo real†	Semi nested PCR <i>B. canis vogeli</i> ††	PCR <i>Anaplasma platys</i> em tempo real†††
I	1	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-
II	1	1:320	-	-	-	-
	2	1:320	-	+	-	-
	3	1:160	-	+	-	-
	4	1:80	-	-	-	-
	5	1:80	-	+	-	-
	6	1:80	-	-	-	-
III	1	1:320	-	-	-	-
	2	1:80	-	+	-	-
	3	1:320	-	+	-	-
	4	1:80	-	+	-	-
	5	1:320	-	+	-	-
	6	1:320	-	+	-	-

+ positivo; - negativo.

† gene alvo 16S rRNA; †† gene alvo 18S rRNA; ††† gene alvo polinucleotídeo p44 do DNA genômico.

Dos quatro cães com PCR em tempo real negativa para *E. canis*, dois apresentaram titulação de 1:80 (Grupo II) e dois, titulação de 1:320 para *E. canis* (um cão do Grupo II e um do Grupo III). Esses resultados sugerem que estes cães poderiam estar na fase subclínica da infecção, pois o título de anticorpos na fase subclínica é variável e o encontro de mórulas é praticamente nulo. Nesta fase da doença, a PCR pode ser negativa, embora a sorologia seja

positiva (HARRUS et al., 1998). Todavia, é difícil precisar a fase da doença quando cães com infecção naturalmente adquirida são estudados (HARRUS et al., 2004; FARIA et al., 2011; MUNHOZ et al., 2012). A fase crônica tem o seu reconhecimento mais facilitado, já que ocorre mielossupressão, com consequente pancitopenia (MYLONAKIS et al., 2011). Os cuidados na seleção dos cães deste estudo, entretanto, asseguraram a exclusão de cães com pancitopenia.

Alguns agentes causadores de trombocitopenia podem ser o *A. platys*, devido ao parasitismo dos trombócitos (FRENCH; HARVEY, 1983), a *B. canis vogeli*, por mecanismos imunomediados de remoção de plaquetas (BROWN et al., 2006) e a *Leptospira* spp., por destruição imunomediada e/ou consumo de plaquetas (SYKES et al., 2011). Portanto, foi essencial incluir neste estudo cães que fossem negativos para os demais agentes infecciosos mencionados, pois as coinfeções poderiam influenciar as análises clínicas (HARRUS; WANER, 2011). Ademais, segundo French e Harvey (1983), a reação sorológica cruzada entre *E. canis* e *A. platys* praticamente inexistente, o que nos permite afirmar que os cães com sorologia positiva para *E. canis*, mas PCR negativa, não eram portadores de outros agentes causadores de trombocitopenia.

Para Harrus e Waner (2011), o diagnóstico da erliquiose monocítica canina deve se basear nos sinais clínicos apresentados e nos resultados dos testes laboratoriais, de modo que a contagem de plaquetas e a sorologia são adequadas na triagem, embora as técnicas de PCR sejam os testes confirmatórios da positividade ao agente. Os mesmos autores sugerem, ainda, que os resultados negativos à luz da PCR devem ser interpretados com cautela, visto que não se pode excluir completamente a presença de DNA na amostra.

Reconhecemos como uma limitação deste estudo a não realização da PCR para identificação de DNA de *E. canis* das amostras de aspirado esplênico que, de acordo com Harrus et al. (1998), tem sensibilidade superior à mesma técnica feita com a amostra de sangue periférico na fase subclínica da doença. Contudo, em trabalho anterior de nosso grupo de pesquisa, a

detecção de DNA de *E. canis* em cães naturalmente infectados não mostrou diferença significativa entre as amostras de baço e de sangue periférico (FARIA et al., 2010).

4.2 Parâmetros hematológicos

A análise dos parâmetros hematológicos mostrou interação entre grupo e tempo apenas quanto à variável plaquetas ($p < 0,0001$). Entretanto, quando o valor de p foi fixado em 0,25, foi possível verificar interação entre grupo e tempo entre os valores médios de hemácias, hemoglobina, hematócrito, leucócitos e plaquetas. Os valores médios e os respectivos erros padrão da média das contagens de hemácias, concentração de hemoglobina, hematócrito, contagem de leucócitos e de plaquetas dos grupos I, II e III, nos tempos experimentais D0, D15 e D40 estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Média \pm erro padrão da média das contagens de hemácias, concentração de hemoglobina, hematócrito, contagem de leucócitos e de plaquetas dos grupos I, II e III, nos tempos experimentais D0, D15 e D40. Jaboticabal, 2015.

Parâmetro	Grupo	D0	D15	D40	Média \pm erro padrão
Hemácias ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	GI	7.115,00 \pm 218,30 ^{Aa}	7.115,00 \pm 218,30 ^{Aa}	7.115,00 \pm 218,30 ^{Aa}	7.115,00 \pm 218,02 ^A
	GII	6.355,00 \pm 218,30 ^{ABb}	6.913,33 \pm 218,30 ^{Aab}	7.401,67 \pm 218,30 ^{Aa}	6.890,00 \pm 218,02 ^{AB}
	GIII	5.648,33 \pm 218,30 ^{Bb}	6.343,33 \pm 218,30 ^{Aab}	6.910,00 \pm 218,30 ^{Aa}	6.300,56 \pm 218,02 ^B
		6.372,78 \pm 126,02 ^b	6.790,56 \pm 126,02 ^{ab}	7.142,22 \pm 126,02 ^a	
Hemoglobina (g/dL)	GI	17,10 \pm 0,48 ^{Aa}	17,10 \pm 0,48 ^{Aa}	17,10 \pm 0,48 ^{Aa}	17,10 \pm 0,61 ^A
	GII	15,11 \pm 0,48 ^{ABa}	16,36 \pm 0,48 ^{ABa}	17,23 \pm 0,48 ^{Aa}	16,23 \pm 0,61 ^{AB}
	GIII	12,85 \pm 0,48 ^{Bb}	14,58 \pm 0,48 ^{Bab}	15,71 \pm 0,48 ^{Aa}	14,38 \pm 0,61 ^B
		15,02 \pm 0,28 ^b	16,01 \pm 0,28 ^{ab}	16,68 \pm 0,28 ^a	
Hematócrito (%)	GI	49,33 \pm 1,55 ^{Aa}	49,33 \pm 1,55 ^{Aa}	49,33 \pm 1,55 ^{Aa}	49,33 \pm 1,63 ^A
	GII	43,33 \pm 1,55 ^{ABa}	46,10 \pm 1,55 ^{Aa}	50,18 \pm 1,55 ^{Aa}	46,53 \pm 1,63 ^{AB}
	GIII	38,98 \pm 1,55 ^{Ba}	42,61 \pm 1,55 ^{Aa}	45,88 \pm 1,55 ^{Aa}	42,29 \pm 1,63 ^B
		43,88 \pm 0,89 ^b	46,01 \pm 0,89 ^{ab}	48,46 \pm 0,89 ^a	
Leucócitos ($/\mu\text{L}$)	GI	8.133,33 \pm 538,6 ^{Aa}	8.133,33 \pm 538,6 ^{Aa}	8.133,33 \pm 538,6 ^{Aa}	8.133,33 \pm 1.190,09 ^A
	GII	7.016,67 \pm 538,6 ^{Aa}	8.183,33 \pm 538,6 ^{Aa}	9.100,00 \pm 538,6 ^{Aa}	8.100,00 \pm 1.190,09 ^A
	GIII	4.400,00 \pm 538,6 ^{Bb}	6.633,33 \pm 538,6 ^{Aab}	7.383,33 \pm 538,6 ^{Aa}	6.138,89 \pm 1.190,09 ^A
		6.516,67 \pm 310,9 ^b	7.650 \pm 310,9 ^a	8.205,56 \pm 310,9 ^a	
Plaquetas ($/\mu\text{L}$)	GI	260.833 \pm 18.487 ^{Aa}	260.833 \pm 18.487 ^{Aa}	260.833 \pm 18.487 ^{Aa}	260.833 \pm 24.581 ^A
	GII	96.000 \pm 18.487 ^{Bb}	284.333 \pm 18.487 ^{Aa}	280.166 \pm 18.487 ^{Aa}	220.166 \pm 24.581 ^{AB}
	GIII	89.333 \pm 18.487 ^{Bb}	154.000 \pm 18.487 ^{Bb}	255.666 \pm 18.487 ^{Aa}	166.333 \pm 24.581 ^B
		148.722 \pm 10.673 ^b	233.055 \pm 10.673 ^a	265.555 \pm 10.673 ^a	

GI: grupo I; GII: grupo II; GIII: grupo III; D0: dia zero de avaliação; D15: dia quinze de avaliação; D40: dia quarenta de avaliação.

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre grupos ($p < 0,05$ para a variável plaquetas; $p < 0,25$ para todas as variáveis).

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre tempos ($p < 0,05$ para a variável plaquetas; $p < 0,25$ para todas as variáveis).

4.2.1 Hemácias

No tempo D0 de avaliação, os valores médios de hemácias do grupo I diferiram do grupo III ($p=0,0014$), que apresentou médias menores, mas não diferiu do grupo II. Ainda, não houve diferença entre os grupos II e III neste momento, como também entre os grupos estudados nos demais tempos de avaliação (Figura 2).

A média do grupo III foi menor que a dos demais grupos, mas no intervalo de referências para a espécie (Apêndice A).

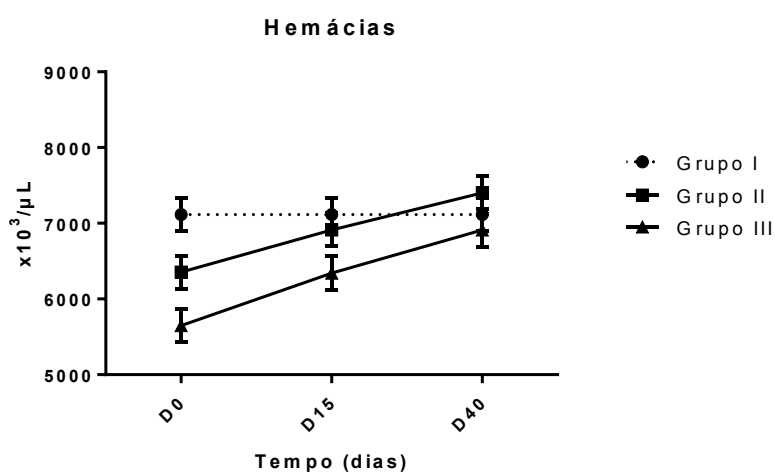


Figura 2. Representação gráfica das contagens médias de hemácias dos grupos I, II e III nos tempos D0, D15 e D40. Jaboticabal, 2015.

4.2.2 Hemoglobina

As concentrações médias de hemoglobina diferiram entre os grupos I e III, nos tempos D0 ($p<0,0001$) e D15 ($p=0,02$) e não diferiram entre os grupos no tempo D40 (Figura 3).

É interessante salientar que a distribuição dos cães doentes nos grupos II e III foi aleatória, portanto, os valores menores de hemoglobina no grupo III devem-se ao acaso.

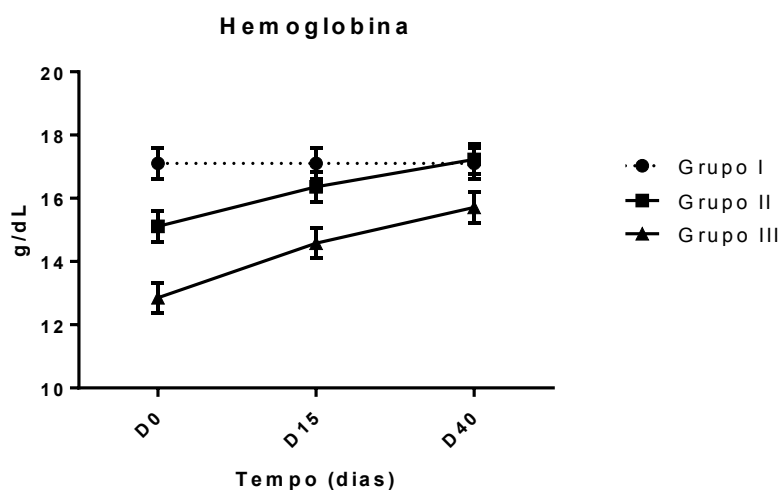


Figura 3. Representação gráfica das concentrações médias de hemoglobina dos grupos I, II e III nos tempos D0, D15 e D40. Jaboticabal, 2015.

4.2.3 Hematócrito

Como esperado, o padrão de comportamento do hematócrito seguiu o descrito para as hemácias. Houve diferença entre os grupos I e III no tempo D0 ($p=0,0014$), apenas, que não foi observada entre os grupos nos demais tempos avaliados (Figura 4).

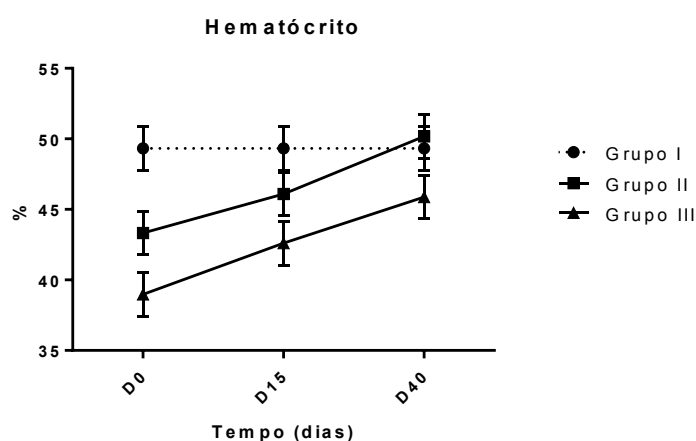


Figura 4. Representação gráfica das médias do hematócrito dos grupos I, II e III nos tempos D0, D15 e D40. Jaboticabal, 2015.

Apesar das médias da contagem de hemácias, da concentração de hemoglobina e do hematócrito dos grupos estudados não se situarem na classificação de anemia (Apêndices A e C1), já que esta condição era um dos fatores de exclusão na seleção dos animais, a fim de reduzir as possibilidades de inclusão de cães coinfectados por *Babesia canis vogeli*, posteriormente investigada por semi-nested PCR, percebeu-se que o hiclato de doxiciclina empregado em ambos os grupos de cães naturalmente infectados contribuiu para o aumento gradativo destas variáveis ao longo dos tempos avaliados, dada pela ausência de diferença entre os grupos nos tempos D15 e D40.

4.2.4 Leucócitos

A média de leucócitos do grupo III diferiu da do grupo I ($p=0,0009$) e do grupo II ($p=0,03$) no tempo D0 de avaliação, de modo que a média do grupo III foi menor que dos demais grupos e, clinicamente, pode ser caracterizada como leucopenia (Figura 5). Três cães do grupo II e cinco cães do grupo III apresentavam-se leucopênicos no tempo D0 (Apêndices A e C1).

Outrora, Oliveira et al. (2000) selecionaram 52 cães com sintomatologia sugestiva de erliquiose a partir da rotina clínica do mesmo hospital veterinário em que o presente trabalho foi desenvolvido. Destes, 92,3% apresentaram positividade na sorologia Dot-ELISA para *E. canis* e apenas 32,69% manifestaram leucopenia. A redução do número de leucócitos totais é esperada em cães com erliquiose, devido ao parasitismo da bactéria em células desta linhagem, tais como os monócitos, embora não evidenciada em todos os cães incluídos nos grupos II e III. Aos 15 dias de tratamento, a leucopenia não estava mais presente e assim permaneceu até o término do acompanhamento (D40) no grupo III, confirmando que o hiclato de doxiciclina é eficiente para restabelecer o número de leucócitos em cães com erliquiose, independente da dose terapêutica empregada.

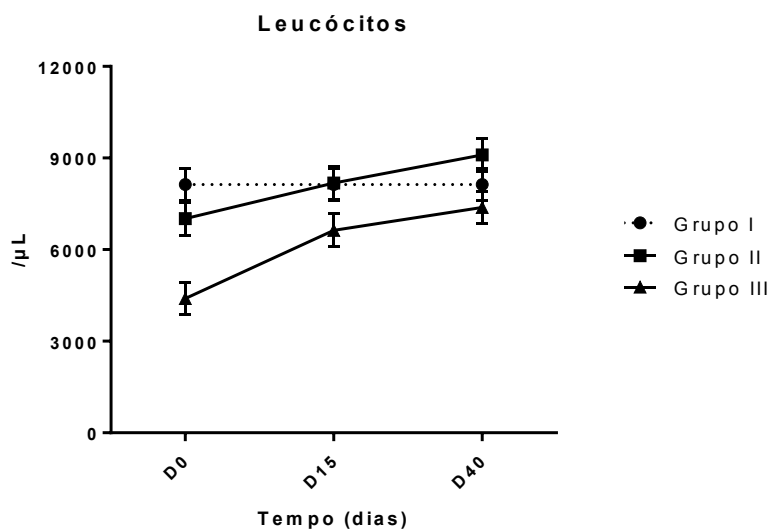


Figura 5. Representação gráfica das contagens médias de leucócitos dos grupos I, II e III nos tempos D0, D15 e D40. Jaboticabal, 2015.

4.2.5 Plaquetas

Trombocitopenia foi o primeiro fator de inclusão dos animais para este estudo. Desta forma, era esperado que houvesse diferença significativa entre o grupo I e os grupos II ($p < 0,0001$) e III ($p < 0,0001$) no tempo D0. Ademais, não houve diferença entre a média das contagens de plaquetas entre os grupos II e III no tempo D0 de avaliação.

No tempo D15, observou-se que a média do grupo III foi menor que do grupo I ($p = 0,008$) e do grupo II ($p = 0,0007$), por ainda persistir a trombocitopenia, já ausente no grupo II. No tempo D40, não houve diferença entre os grupos (Figuras 6 e 7). Isto mostra que no grupo II, que recebeu 5mg/kg de hiclato de doxiciclina, via oral, a cada 12 horas, os trombócitos já se apresentavam no intervalo de referência para a espécie aos 15 dias de tratamento (Apêndice A), enquanto que tal fato só foi notado no grupo III (que recebeu 10mg/kg de hiclato de doxiciclina, via oral, a cada 12 horas, por 30 dias), no tempo final de avaliação deste estudo.

Analisando os resultados, em conjunto, mais uma vez a eficácia do fármaco na melhora hematológica pôde ser evidenciada, apesar das diferentes doses empregadas para os tratamentos dos cães com *E. canis*.

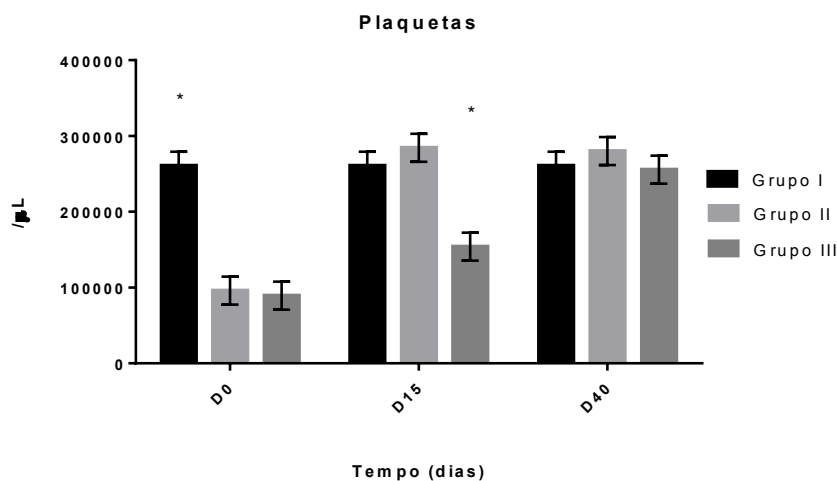


Figura 6. Representação gráfica das contagens médias de plaquetas dos grupos I, II e III nos tempos D0, D15 e D40. *Diferença significativa entre os grupos, na variável tempo de avaliação ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.

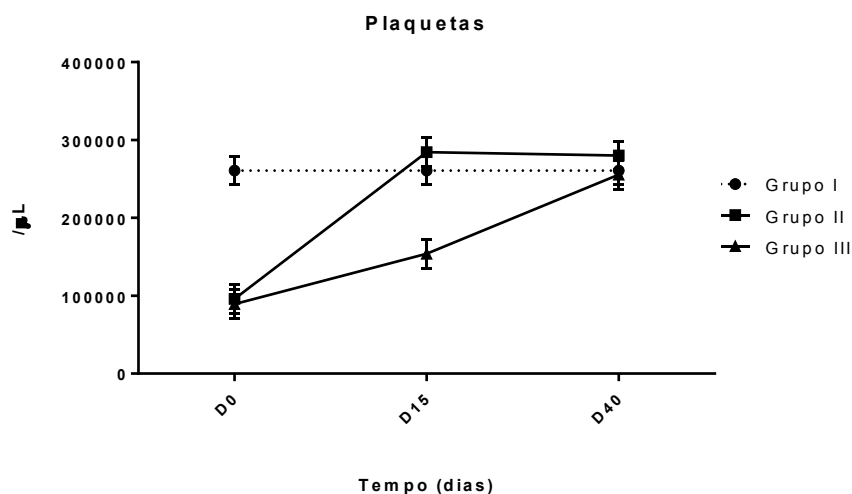


Figura 7. Representação gráfica das contagens médias de plaquetas dos grupos I, II e III nos tempos D0, D15 e D40. Jaboticabal, 2015.

Individualmente, dois cães do grupo III apresentaram persistência da trombocitopenia aos 40 dias de avaliação. Nestes, foi realizada punção de medula óssea para avaliação da representatividade de precursores mieloides, das séries eritroide, mieloide e megacariocítica, a fim de se excluir a hipoplasia ou aplasia de

medula óssea, eventos frequentes nos cães com erliquiose (HARRUS; WANER; BARK, 1997). Nos dois casos, o mielograma revelou ausência de alterações, o que sugeria a ocorrência de desordem imunomediada. Os cães foram então submetidos à imunossupressão com prednisona (2mg/kg via oral a cada 12 horas, por 30 dias), com controle do quadro em um deles. No outro caso, a resposta foi pobre, o que motivou a introdução de ciclosporina (5mg/kg via oral a cada 24 horas) por 30 dias, sem melhora. O paciente foi, então, submetido à esplenectomia, com correção do problema.

Os dois casos anteriormente descritos foram indicativos de que os cães desenvolveram a trombocitopenia de causa imunomediada. Nesta condição, anticorpos se ligam à superfície de trombócitos, em geral os da classe IgG, e promovem a remoção destes por meio da ação dos macrófagos do sistema fagocítico mononuclear (LEWIS; MEYERS, 1996). A destruição imunomediada de plaquetas ocorre secundariamente a diversas condições, tais como processos inflamatórios (pancreatite, hepatite e doença intestinal inflamatória), neoplásicos (sarcoma, linfoma e carcinoma), autoimunes (lúpus eritematoso sistêmico) e infecciosos (leptospirose, babesiose, anaplasiose, borreliose, leishmaniose e erliquiose) (DIRCKS, SCHUBERTH e MISCHKE, 2009). As doenças infecciosas corresponderam a 31% das causas de trombocitopenia imunomediada secundária no estudo de Dircks, Schuberth e Mischke (2009), sendo que a erliquiose figurou como causa de trombocitopenia imunomediada em seis dos 86 cães avaliados.

A ocorrência de trombocitopenia imunomediada em dois cães do grupo III deve ser avaliada com cuidado e não pode ser atribuída ao tratamento da erliquiose com a dose de 10mg/kg do fármaco, pois essa dose é rotineiramente empregada no Hospital Veterinário da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, no tratamento de cães com erliquiose, sem a manifestação desse efeito adverso. A trombocitopenia imunomediada é uma consequência frequente em cães com erliquiose que pode ocorrer em cães com a doença de curso agudo ou subclínico e tratados com doxiciclina, com ambas as doses empregadas neste estudo. Sendo assim, este evento requer investigação adicional.

4.3 Parâmetros adrenais

As concentrações médias e os erros padrão das concentrações de cortisol e de DHEA-S dos grupos I, II e III, nos tempos experimentais D0 e D40, nos momentos pré e pós a administração de ACTH estão apresentados na Tabela 5. Quanto aos parâmetros adrenais estudados, o nível de significância considerado foi o de 5%.

Tabela 5. Média \pm erro padrão da média das concentrações de cortisol e de sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-S) dos grupos I, II e III, nos tempos experimentais D0 e D40, nos momentos pré e pós a administração de ACTH. Jaboticabal, 2015.

Parâmetro	Grupo	D0		D40		Média \pm erro padrão	
		Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
Cortisol [†] (ng/mL)	GI	12,31 \pm 8,55 ^{Aa}	114,18 \pm 8,55 ^{Ab}	12,31 \pm 8,55 ^{Ba}	114,18 \pm 8,55 ^{Ab}	12,31 \pm 8,55 ^{Aa}	114,18 \pm 7,46 ^{Ab}
	GII	37,78 \pm 8,55 ^{Aa}	140,65 \pm 8,55 ^{Ab}	41,20 \pm 8,55 ^{Aa}	124,31 \pm 8,55 ^{Ab}	39,49 \pm 8,55 ^{Aa}	132,48 \pm 7,46 ^{Ab}
	GIII	24,88 \pm 8,55 ^{Aa}	133,10 \pm 8,55 ^{Ab}	17,38 \pm 8,55 ^{ABa}	128,93 \pm 8,55 ^{Ab}	21,13 \pm 8,55 ^{Aa}	131,01 \pm 7,46 ^{Ab}
		24,99 \pm 4,94 ^a	129,31 \pm 4,94 ^b	23,63 \pm 4,94 ^a	122,47 \pm 4,94 ^b		
DHEA-S ^{††} (μ g/mL)	GI	0,033 \pm 0,005 ^{Aa}	0,022 \pm 0,005 ^{Ba}	0,033 \pm 0,005 ^{Aa}	0,022 \pm 0,005 ^{Aa}	0,033 \pm 0,005 ^{Aa}	0,022 \pm 0,007 ^{Aa}
	GII	0,032 \pm 0,005 ^{Aab}	0,058 \pm 0,005 ^{Aa}	0,020 \pm 0,005 ^{Abc}	0,018 \pm 0,005 ^{Abc}	0,026 \pm 0,005 ^{Aa}	0,038 \pm 0,007 ^{Aa}
	GIII	0,017 \pm 0,005 ^{Aa}	0,028 \pm 0,005 ^{ABa}	0,026 \pm 0,005 ^{Aa}	0,019 \pm 0,005 ^{Aa}	0,021 \pm 0,005 ^{Aa}	0,024 \pm 0,007 ^{Aa}
		0,027 \pm 0,003 ^a	0,036 \pm 0,003 ^a	0,026 \pm 0,003 ^a	0,020 \pm 0,003 ^a		

[†] Variável transformada em log (observação).

^{††} Variável transformada em log (observação + 1).

GI: grupo I; GII: grupo II; GIII: grupo III; D0: dia zero de avaliação; D40: dia quarenta de avaliação.

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre grupos ($p < 0,05$).

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre tempos ($p < 0,05$).

4.3.1 Cortisol

Observou-se diferença nas concentrações de cortisol entre todos os momentos (pré e pós-ACTH), independentemente do grupo e do tempo ($p < 0,0001$) (Figura 8). Este resultado mostra que os cães com erliquiose de ocorrência natural mantêm a capacidade de secretar cortisol em resposta ao teste de estimulação com ACTH, no qual apresentaram concentrações séricas de cortisol pós-ACTH maiores que as pré-ACTH.

Não foi evidenciada interação quando se analisou grupo, tempo e momento. Entretanto, houve interação entre grupo e tempo ($p = 0,02$), sendo que no tempo D40, a concentração média de cortisol pré-ACTH do grupo II foi maior que a do cortisol pré-ACTH do grupo I, mas não se repetiu no grupo III. Apesar da diferença ser significativa, ela não é clinicamente importante, pois todas as concentrações médias de cortisol, sejam pré ou pós-ACTH, estão dentro do intervalo de referência para a espécie (Apêndice A).

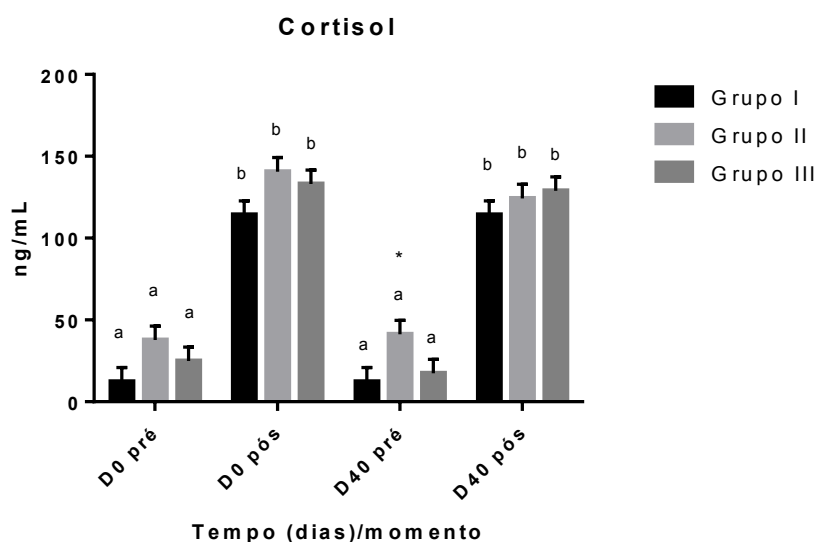


Figura 8. Representação gráfica das concentrações médias de cortisol dos grupos I, II e III nos tempos D0 e D40, antes e após a administração de ACTH. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). *Diferença significativa entre grupos na variável tempo ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.

Neste estudo, duas hipóteses foram consideradas: a primeira seria que cães acometidos por erliquiose poderiam apresentar maiores concentrações de cortisol sérico em consequência ao processo inflamatório que sabidamente ocorre nesta infecção (TAJIMA; RIKIHISA, 2005; UNVER; HUANG; RIKIHISA, 2006; FARIA et al., 2011). Uma segunda hipótese, contrária à primeira, seria a de que cães com erliquiose pudessem manifestar hipofunção adrenocortical, também conhecida como hipocortisolismo transitório ou síndrome da insuficiência adrenal relativa, caracterizada por secreção de cortisol inadequada mediante um estado crítico de doença (MARTIN; GROMAN, 2004). Neste âmbito, a mensuração do cortisol sérico antes e após a estimulação com ACTH sintético permite avaliar a reserva adrenocortical, isto é, a capacidade secretória das glândulas adrenocorticais mediante um evento estressante (LEAL et al., 2003; SCHOEMAN; HERRTAGE, 2008). Outrossim, a mensuração de cortisol em resposta ao estímulo adrenocorticotrópico minimiza os efeitos de flutuações hormonais, quando comparada à avaliação basal deste hormônio (GILOR; GRAVES, 2011; RONDELLI et al., 2015b).

Individualmente, observou-se que dois cães do Grupo II (cães 4 e 5) e um cão do grupo III (cão 4) apresentaram concentrações tanto pré quanto pós-ACTH acima dos limites de referência (Apêndices A e C4) no momento D0 do estudo, mas nas concentrações de referência no momento D40. Sendo assim, as concentrações mais elevadas no momento de doença não permitem inferir que são devidas ao estado de doença em si, pois estes cães já apresentavam cortisol basal elevado. Logo, era de se esperar que o cortisol pós-ACTH também estivesse em concentrações maiores, quando comparados à dosagem pré-ACTH. No momento D40 do estudo, um cão do grupo II (cão 5) apresentou cortisol basal também além da referência, mas não o pós-ACTH, enquanto que um cão do grupo III (cão 1) manifestou o contrário: cortisol pré-ACTH normal e pós-ACTH além das referências para a espécie. Entretanto, consideramos estas alterações individuais e não as relacionamos com o estado de doença e tampouco com o efeito dos tratamentos utilizados neste estudo. Assim, os resultados mostram que os cães infectados por *E. canis* envolvidos nesta pesquisa apresentaram resposta adequada ao teste de estimulação com ACTH, que pode ser compreendida como reserva adrenocortical preservada, assim como foi observado

por nosso grupo em trabalho anterior, envolvendo cães com erliquiose nas fases aguda e subclínica da doença, por meio das dosagens de cortisol após o estímulo com ACTH (RONDELLI et al., 2015b). Ademais, ao estudarmos os cães tratados com hiclato de doxiciclina, observamos que os tratamentos não interferiram na secreção de cortisol.

4.3.2 DHEA-S

Quanto aos resultados da avaliação do DHEA-S, houve interação entre tempo e momento ($p=0,02$), e entre grupo e momento ($p=0,03$), mas não houve interação entre grupo, tempo e momento, simultaneamente.

Contrariamente ao observado com a variável cortisol, não se observou diferença nas concentrações de DHEA-S entre os momentos pré e pós-ACTH, o que não permitiu avaliar a reserva andrógena adrenocortical, ou seja, a diferença de DHEA-S entre o momento pós-ACTH e pré-ACTH (AGBAHT; GULLU, 2014). Esta observação nos indica que o DHEA-S não respondeu ao estímulo do hormônio adrenocorticotrópico, quando avaliado aos 60 minutos pós-ACTH.

Frank et al. (2003) verificaram aumento do DHEA-S 60 minutos após a estimulação com ACTH em caninos machos castrados, em fêmeas inteiras e castradas saudáveis. Todavia, um estudo do nosso grupo de pesquisa com cães saudáveis e cães naturalmente infectados por *E. canis*, seguindo metodologia semelhante a de Frank et al. (2003), o pico do DHEA-S não ocorreu no tempo final do teste, que se deu 60 minutos após a administração do hormônio (RONDELLI et al., 2015a). Uma limitação do estudo em tela é que o DHEA-S foi avaliado pré e 60 minutos pós-ACTH e poderia ter sido avaliado em tempos menores e maiores, visando ampliar o número de mensurações, como sugerido por outros autores (FELDMAN; NELSON, 2004; FRANK; DAVIS; OLIVER, 2004). A explicação pode estar no fato da secreção da DHEA ser responsiva ao estímulo do ACTH, como descrito em seres humanos (PARKER, 1991; KROBOTH et al., 1999), hamsters (PIEPER; LOBOCKI, 2000) e esquilos (BOONSTRA et al., 2008). Em contrapartida, o DHEA-S, por apresentar meia-vida mais longa que a da DHEA (10 horas e 25 minutos, respectivamente) (BURKHARDT et al., 2013) é mensurado nas amostras

basais como marcador de atividade adrenocortical androgênica em seres humanos (LEAL et al., 2003; FISCHLI et al., 2008; BURKHARDT et al., 2013).

É possível perceber que os cães doentes do grupo II apresentaram concentração média do hormônio no momento pós-ACTH maior que os cães saudáveis no tempo D0 ($p=0,007$), e semelhante a dos cães doentes do grupo III ($p>0,05$) (Figura 9).

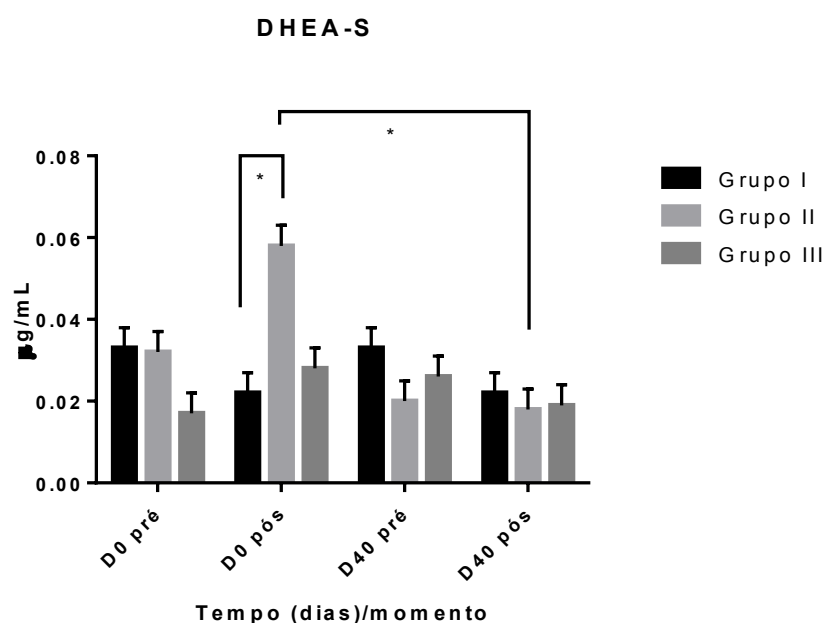


Figura 9. Representação gráfica das concentrações médias de DHEA-S dos grupos I, II e III nos tempos D0 e D40, antes e após a administração de ACTH. *Diferença significativa entre os grupos ($p<0,05$). Jaboticabal, 2015.

Os cães do grupo II apresentaram concentração sérica média de DHEA-S maior no momento pós-ACTH no tempo D0 que nos momentos pré-ACTH ($p=0,003$) e pós-ACTH ($p=0,0014$) no tempo D40. O mesmo não foi observado no grupo III. Aparentemente, o tratamento com hiclato de doxiciclina não alterou as concentrações de DHEA-S no grupo III, mas promoveu redução na concentração deste hormônio no grupo II.

É possível observar que o grupo II apresentou comportamento diferente quanto às variações das concentrações de DHEA-S antes e após o tratamento com hiclato de doxiciclina não observado no grupo III. Uma vez que os cães doentes foram aleatoriamente distribuídos nos grupos II e III, entendemos que as maiores

concentrações deste hormônio encontradas nos cães doentes do grupo II ocorreram ao acaso, e não se relacionam à dose utilizada do fármaco, visto que as concentrações de DHEA-S no momento do diagnóstico já eram significativamente maiores nesse grupo que as dos cães do grupo III.

Os estudos que avaliaram a concentração do DHEA-S em cães são escassos, tanto nos caninos acometidos por hiperadrenocorticismo quanto na avaliação do envolvimento deste hormônio em processos de doenças de origem não-endócrina. Um dos poucos estudos foi realizado por nosso grupo de pesquisa, o qual envolveu cães com erliquiose naturalmente adquirida nas fases aguda e subclínica da doença e demonstrou que estes cães apresentam concentrações de DHEA-S maiores do que os cães saudáveis (RONDELLI et al., 2015a). No estudo em tela, a metodologia foi semelhante àquela empregada no estudo anterior (RONDELLI et al., 2015a), sendo acrescida a avaliação pós-tratamento com hiclato de doxiciclina. Assim, o esperado era encontrar o mesmo comportamento desta variável hormonal, entretanto, apenas as concentrações de DHEA-S dos cães do grupo II, no momento de doença, assemelharam-se ao encontrado por Rondelli et al. (2015a), enquanto que a concentração média de DHEA-S do grupo III foi similar ao do grupo controle.

As concentrações de DHEA-S do grupo II após o tratamento com hiclato de doxiciclina foram significativamente menores que as dos mesmos cães, antes da instituição do tratamento. Tal observação permite especular que o tratamento realizado pode ser eficaz no restabelecimento da secreção adrenocortical de DHEA-S em cães com erliquiose. Todavia, este resultado merece ser melhor estudado, envolvendo grupos compostos por um número maior de cães doentes, a fim de verificar sua veracidade.

4.4 Parâmetros tireoideanos

Dentre os parâmetros tireoideanos estudados (TSH, T4 total, T4 livre por diálise e TgAA), houve interação entre grupo e tempo ao nível de significância de 5% com os anticorpos anti-tireoglobulina (TgAA). Ademais, quando o valor de p foi fixado em 0,25, foi possível verificar interação entre grupo e tempo também entre os

valores médios de T4 livre por diálise e de TgAA. As concentrações médias e os respectivos erros padrão das concentrações de T4 livre por diálise, T4 total, TSH e de TgAA dos grupos I, II e III, nos tempos experimentais D0 e D40 estão apresentados na Tabela 6.

4.4.1 T4 livre por diálise

No tempo D40, a concentração média de T4 livre por diálise do grupo I foi significativamente menor que do grupo II ($p=0,03$), muito embora as médias das dosagens dos grupos nos tempos estudados estejam dentro dos valores de referência para a espécie.

Quanto aos demais grupos, não houve diferença entre os tempos avaliados ($p>0,05$), o que demonstra que os cães naturalmente infectados por *E. canis* não apresentaram modificações quanto a este hormônio ao longo dos tempos avaliados.

O hormônio T4 livre é biologicamente ativo e exerce os mecanismos de retroalimentação negativa sobre a secreção hipofisária, além de atuar nas células de todo o organismo (FELDMAN; NELSON, 2004).

Assim, o T4 livre é preferencialmente mensurado pela técnica de diálise de equilíbrio, quando se anseia avaliar a competência funcional tireoideana, por representar, para a espécie canina, aquele que menor sofre influências de fármacos ou de doenças não-endócrinas, apresentando sensibilidade de 80% e especificidade diagnóstica superior a 90% (MOONEY; PETERSON, 2009). Neste sentido, nossos resultados sugerem que cães acometidos por erliquiose de ocorrência natural podem não apresentar supressão de secreção hormonal tireoideana. Outra observação é que os tratamentos com hiclato de doxiciclina não influenciaram as concentrações deste hormônio aos 40 dias de avaliação.

4.4.2 T4 total

Não foram observadas diferenças significativas nas concentrações médias de T4 total entre os grupos nos tempos avaliados.

É interessante que os resultados encontrados neste estudo divergem daqueles descritos por Kumar, Varshney e Varshney (2006). Estes autores observaram menores concentrações séricas de T4 total tanto em cães infectados exclusivamente por *E. canis* quanto nos coinfectados com *Babesia gibsoni*, quando comparados a cães saudáveis. Os autores julgaram esta condição como de cães eutireoideos doentes, por representar um evento adaptativo do organismo, cujo objetivo seria o de reduzir o metabolismo celular durante o período de infecção. O número de cães doentes utilizados em ambos os estudos foi semelhante: seis neste e oito no trabalho de Kumar, Varshney e Varshney (2006), enquanto que o número de cães saudáveis que serviram como controle foi o mesmo nos dois estudos (n=6), o que nos sugere que o número de amostras parece não influenciar nos resultados.

Tabela 6. Média \pm erro padrão da média das concentrações de T4 livre por diálise, T4 total, TSH e de TgAA dos grupos I, II e III, nos tempos experimentais D0 e D40. Jaboticabal, 2015.

Parâmetro	Grupo	D0	D40	Média \pm erro padrão
T4 livre por diálise (ng/mL)	GI	1,09 \pm 0,08 ^{Aa}	1,09 \pm 0,08 ^{Ba}	1,09 \pm 0,08 ^A
	GII	1,19 \pm 0,08 ^{Aa}	1,47 \pm 0,08 ^{Aa}	1,33 \pm 0,08 ^A
	GIII	1,20 \pm 0,08 ^{Aa}	1,31 \pm 0,08 ^{ABa}	1,25 \pm 0,08 ^A
		1,16 \pm 0,05 ^a	1,29 \pm 0,05 ^a	
T4 total (ng/mL)	GI	24,05 \pm 1,76	24,05 \pm 1,76	24,05 \pm 2,50
	GII	21,80 \pm 1,76	23,31 \pm 1,76	22,55 \pm 2,50
	GIII	16,41 \pm 1,76	20,83 \pm 1,76	18,62 \pm 2,50
		20,75 \pm 1,02	22,73 \pm 1,02	
TSH (ng/mL)	GI	0,15 \pm 0,013	0,15 \pm 0,013	0,15 \pm 0,043
	GII	0,05 \pm 0,013	0,07 \pm 0,013	0,06 \pm 0,043
	GIII	0,14 \pm 0,013	0,13 \pm 0,013	0,13 \pm 0,043
		0,11 \pm 0,007	0,11 \pm 0,007	
TgAA (%)	GI	9,53 \pm 1,86 ^{Ba}	9,53 \pm 1,86 ^{Aa}	9,53 \pm 1,93 ^B
	GII	22,66 \pm 1,86 ^{Aa}	11,66 \pm 1,86 ^{Ab}	17,16 \pm 1,93 ^A
	GIII	13,33 \pm 1,86 ^{ABa}	9,50 \pm 1,86 ^{Aa}	11,41 \pm 1,93 ^{AB}
		15,17 \pm 1,07 ^a	10,23 \pm 1,07 ^b	

T4: tetraiodotironina; TgAA: anticorpos anti-tireoglobulina; GI: grupo I; GII: grupo II; GIII: grupo III; D0: dia zero de avaliação; D40: dia quarenta de avaliação.

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre grupos ($p < 0,05$ para a variável TgAA; $p < 0,25$ para todas as variáveis).

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre tempos ($p < 0,05$ para a variável TgAA; $p < 0,25$ para todas as variáveis).

A tetraiodotironina total corresponde a 99% do que é secretado pelas tireoides e circula ligada a proteínas plasmáticas (FELDMAN; NELSON, 2004). Ademais, segundo Mooney e Peterson (2009), esta dosagem apresenta especificidade diagnóstica inferior a 70%, embora sua sensibilidade seja de aproximadamente 95%, pois apresenta variações induzidas por doenças não-endócrinas e por fármacos, tais como anti-inflamatórios e anticonvulsivantes. Com vistas a isto, incluímos neste trabalho cães com erliquiose que não recebiam outros tratamentos, entretanto, esta informação não foi fornecida no artigo dos pesquisadores que descreveram as alterações nas concentrações séricas de T4 total em cães com erliquiose. Ademais, este grupo de pesquisadores não avaliou as concentrações séricas de T4 livre e de TSH dos cães envolvidos no estudo, a fim de avaliar mais precisamente este estado de eutireoidismo doente verificado.

Um fato interessante do estudo anteriormente descrito é que os autores identificaram menores concentrações de triiodotironina (T3) em cães com erliquiose coinfectados por *B. gibsoni*, mas não em cães exclusivamente com erliquiose. Neste mesmo contexto, Zygner et al. (2015) relataram que cães infectados por *B. canis canis* manifestaram menores concentrações de T3, T4 total, T4 livre e de TSH, e sugeriram, então, a ocorrência da síndrome do eutireoidismo doente naqueles cães, de acordo com a definição da condição em seres humanos, que a caracteriza como síndrome da triiodotironina reduzida, verificada durante o curso de muitas doenças agudas e crônicas (WAJNER; MAIA, 2012).

No estudo em tela, a condição de inclusão dos cães selecionados era de que fossem livres de coinfeções, a fim de evitar alguma influência sobre as análises avaliadas. Outro fato a se comentar, foi a não inclusão da dosagem de T3 dos cães com erliquiose naturalmente adquirida. Esta opção foi devida à pouca precisão diagnóstica da mensuração de T3 em relação aos demais hormônios tireoideanos, pois aproximadamente metade da fração circulante é secretada diretamente pela tireoide, sendo o restante produzido pela desiodação do T4 nos tecidos periféricos. Ademais, esse processo é frequentemente inibido pela influência de doenças não-endócrinas (MOONEY; PETERSON, 2009). Ademais, Zygner et al. (2015) demonstraram que os cães com babesiose apresentavam elevadas concentrações

de IL-6, uma citocina inflamatória, que pode exercer função na supressão da secreção tiroideana.

4.4.3 TSH

De forma semelhante, não foram observadas diferenças significativas nas concentrações médias de TSH entre os grupos nos tempos avaliados, condizente com os resultados obtidos para os hormônios T4 livre e T4 total. Assim, pode-se sugerir que não foram identificadas alterações hormonais tireoideanas que indicassem a ocorrência da síndrome do eutireoidismo doente em cães naturalmente infectados por *E. canis*.

4.4.4 TgAA

Ao se considerar as médias de TgAA dos grupos nos tempos D0 e D40, a concentração de TgAA no tempo D0 foi significativamente maior que no tempo D40 ($p=0,005$), embora as médias estejam nos intervalos de referência para a espécie (Apêndice A). As médias do grupo II pareceram contribuir para esta diferença, pois no tempo D0, a concentração média de TgAA deste grupo foi maior do que do grupo I ($p=0,0019$). Ainda, houve redução significativa da concentração de TgAA entre os tempos D0 e D40 do grupo II ($p=0,008$) (Figuras 10 e 11).

Nos grupos I e III, não houve diferença entre os tempos e, no tempo D40, não houve diferença entre os grupos.

Todos os cães dos grupos I e III foram negativos na mensuração de anticorpos anti-tireoglobulina e nenhum cão deste estudo apresentou positividade neste exame. Particularmente quanto ao grupo II, clinicamente, de acordo com as referências utilizadas neste estudo (Apêndice A), os valores médios de TgAA do grupo II no tempo D0 podem ser classificados como inconclusivos, enquanto que no D40, como negativos na identificação de anticorpos anti-tireoglobulinas. Apesar deste detalhe de classificação clínica, a diferença entre as concentrações de TgAA iniciais e finais neste grupo foi evidenciada ($p=0,008$).

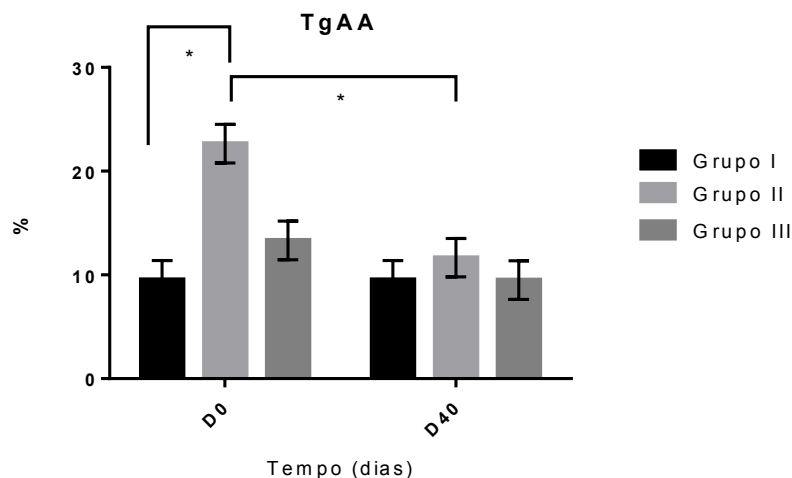


Figura 10. Representação gráfica das concentrações médias de TgAA dos grupos I, II e III nos tempos D0 e D40. *Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.

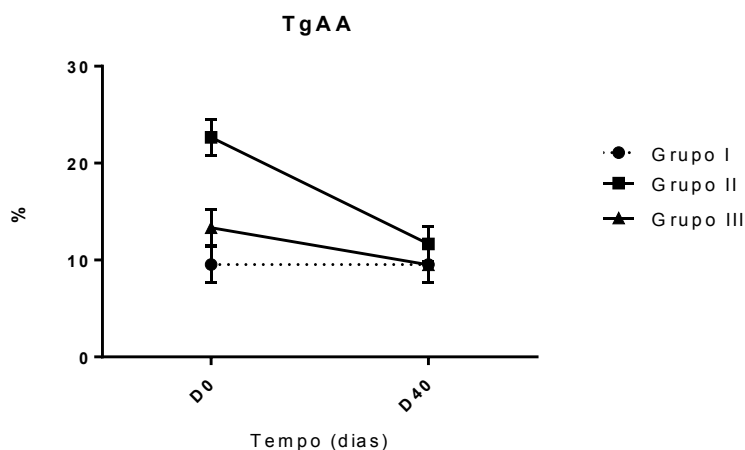


Figura 11. Representação gráfica das concentrações médias de TgAA dos grupos I, II e III nos tempos D0 e D40. Jaboticabal, 2015.

O desenvolvimento espontâneo de anticorpos contra o tecido tireoideano normal é uma constatação frequente em cães com tireoidite linfocítica, causada pela inflamação e consequentes destruição do tecido tireoideano e exposição de seus componentes antigênicos (MOONEY; PETERSON, 2009). Estudos *in vitro* mostraram citocinas envolvidas no processo inicial e de perpetuação da tireoidite linfocítica (CHOI et al., 2006). Pesquisadores relataram em um estudo envolvendo o

modelo canino de tireoidite autoimune (cães imunizados com tiroglobulina bovina), que as citocinas Th1 (IFN- γ , IL-18 e IL-15) estavam em concentração aumentada durante o desenvolvimento da tireoidite linfocítica, a do tipo Th2 (IL-6) apresentou-se pouco alterada, enquanto que as citocinas T-supressoras (IL-10 e TGF- β) estavam aumentadas na presença da estimulação antigênica. Tais resultados mostraram a participação sistêmica de citocinas, embora o processo de tireoidite linfocítica seja uma condição inflamatória restrita às glândulas tireoideanas. Apesar de não termos estudado as citocinas envolvidas no processo da infecção por *E. canis*, há ampla disponibilidade de informações na literatura neste contexto (TAJIMA; RIKIHISA, 2005; UNVER; HUANG; RIKIHISA, 2006; FARIA et al., 2011), portanto, aventa-se a possibilidade de que o processo inflamatório induzido pela infecção possa direcionar anticorpos contra o tecido tireoideano. Outrossim, esta informação merece ser estudada com mais detalhes.

O estudo das concentrações de TgAA em cães portadores de doenças não-hormonais é pouco descrito na literatura e, na erliquiose especificamente, não há informações disponíveis. Dixon e Mooney (1999), avaliaram as concentrações de TgAA em cães com hipotireoidismo, em cães saudáveis e naqueles com doenças não-endócrinas (dermatopatias, cardiopatias e neuropatias), de modo que verificaram maiores concentrações dos anticorpos apenas em cães hipotireoideos.

Nossos resultados sugerem que a infecção naturalmente adquirida por *E. canis* pode induzir a produção de anticorpos anti-tiroglobulina, porém, sem causar supressão na secreção dos hormônios tireoideanos, como descrito nos subitens anteriores. Ademais, com relação aos cães doentes do grupo II, foi possível observar que após o tratamento com hiclato de doxiciclina, as concentrações dos anticorpos TgAA foram menores no tempo D40 em relação ao tempo D0, e que passaram do intervalo de inconclusivas para negativas após o tratamento. Assim, sugerimos que o tratamento da erliquiose com hiclato de doxiciclina parece ter influenciado na concentração final de TgAA. Outro ponto a ser considerado diz respeito à fase da doença. Os cães deste estudo se encontravam na fase aguda ou subclínica, fases nas quais os sinais clínicos são menos graves do que aqueles encontrados na fase crônica. Neste sentido, é possível que se tivéssemos incluído cães em fase crônica, os resultados poderiam diferir destes, visto o tempo de

doença e a gravidade do quadro clínico que o cão enfrenta, podem culminar em sua morte (NEER; HARRUS, 2006; HARRUS; WANER, 2011), e os reflexos sistêmicos poderiam ser, portanto, muito mais severos.

4.5 Parâmetros de estresse oxidativo

Quanto aos parâmetros avaliados de estresse oxidativo, houve diferença significativa entre os tempos, independentemente dos grupos, apenas para a variável NOx, ao nível de significância de 5%. Os valores médios e os respectivos erros padrão de NOx, AOPP e FRAP dos grupos I, II e III, nos tempos experimentais D0 e D40 estão na Tabela 7.

Tabela 7. Média \pm erro padrão da média da concentração de óxido nítrico (NOx), produto proteico de oxidação avançada (AOPP) e do poder redutor de íons ferro (FRAP) dos grupos I, II e III, nos tempos experimentais D0 e D40. Jaboticabal, 2015.

Parâmetro	Grupo	D0	D40	Média \pm erro padrão
NOx [†] (μ mol/L)	GI	28,86 \pm 9,79 ^{Aa}	28,86 \pm 9,79 ^{Aa}	28,86 \pm 6,29 ^A
	GII	59,06 \pm 9,79 ^{Aa}	30,23 \pm 9,79 ^{Aa}	44,65 \pm 6,29 ^A
	GIII	60,82 \pm 9,79 ^{Aa}	29,98 \pm 9,79 ^{Aa}	45,4 \pm 6,89 ^A
		49,58 \pm 6,01 ^a	29,69 \pm 5,65 ^b	
AOPP [†] (μ mol/L)	GI	57,81 \pm 6,96	57,81 \pm 6,96	57,81 \pm 7,14
	GII	96,44 \pm 8,29	55,59 \pm 8,29	76,01 \pm 8,24
	GIII	71,93 \pm 9,45	72,96 \pm 9,45	72,45 \pm 9,25
		75,39 \pm 4,79	62,12 \pm 4,79	
FRAP [†] (μ mol/L)	GI	437,33 \pm 72,23	437,33 \pm 72,23	437,33 \pm 57,16
	GII	788,22 \pm 104,96	717,55 \pm 86,82	752,88 \pm 71,30
	GIII	620,47 \pm 96,91	764,20 \pm 79,13	692,33 \pm 70,01
		615,34 \pm 53,36	639,69 \pm 45,96	

[†] Variável transformada em log(observação).

GI: grupo I; GII: grupo II; GIII: grupo III; D0: dia zero de avaliação; D40: dia quarenta de avaliação.

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre grupos ($p < 0,05$).

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre tempos ($p < 0,05$).

4.5.1 NOx (óxido nítrico)

A concentração média de NOx no tempo D0 foi significativamente maior que no tempo D40, independentemente dos grupos estudados ($p=0,007$). Observou-se, também, que o tratamento com hclato de doxiciclina contribuiu para a redução das concentrações de NOx igualmente em ambos os grupos de cães doentes (Figura 12).

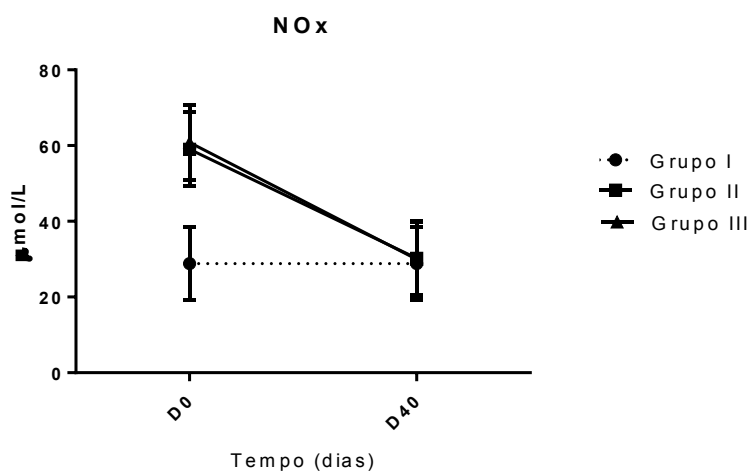


Figura 12. Representação gráfica das concentrações médias de NOx dos grupos I, II e III nos tempos D0 e D40. Jaboticabal, 2015.

O aumento nas concentrações de NOx em cães na fase aguda da erliquiose experimentalmente induzida (Amostra Jaboticabal) foi descrita por Da Silva et al. (2013). Os autores sugerem que as elevadas concentrações de NOx nesta fase ocorrem em função da resposta imunomediada e do estresse oxidativo, que objetivam a eliminação do parasita. Entretanto, a citotoxicidade do NOx, que ocorre devido a sua habilidade de gerar peroxinitrito, iniciando diversas reações oxidativas, pode gerar dano tecidual (KEITA et al., 2000), o que poderia explicar o agravamento dos achados clínico-patológicos manifestados na erliquiose (DA SILVA et al., 2013). Apesar das elevadas concentrações de NOx objetivarem a eliminação do parasita, este mecanismo de proteção parece ser ineficaz e, ainda, promove piora do estado clínico dos cães doentes. Por sua vez, menores concentrações de NOx em D40 nos grupos de cães doentes podem ser atribuídas ao efeito do hclato de doxiciclina na

eliminação da bactéria, independentemente das doses empregadas. Consequentemente, o tratamento com hiclato de doxiciclina parece auxiliar no restabelecimento de equilíbrio do balanço oxidativo.

4.5.2 AOPP (produto proteico de oxidação avançada)

Não foram observadas diferenças significativas nas concentrações médias de AOPP entre os grupos nos tempos avaliados, o que diverge do estudo de Da Silva et al. (2013), que identificaram maiores concentrações de AOPP no 30º dia de infecção experimental por *E. canis* (Amostra Jaboticabal) em cães. Ademais, os tratamentos com doxiciclina, quando avaliados separadamente, não influenciaram nas concentrações de AOPP dos cães doentes do presente estudo.

4.5.3 FRAP (poder redutor de íons ferro)

Não foram observadas diferenças significativas nas concentrações médias de FRAP entre os grupos nos tempos avaliados. As concentrações de FRAP foram similares entre os grupos e os tempos do estudo, o que não nos permite concluir acerca do perfil antioxidante em cães com erliquiose naturalmente adquirida.

4.6 Correlações

O estudo das correlações foi feito entre as variáveis plaquetas, anticorpos anti-tireoglobulina, óxido nítrico (NOx), DHEA-S e cortisol. Entretanto, não houve correlação significativa em nenhuma das combinações.

Uma das combinações, ilustrada a seguir, entre a concentração de DHEA-S e da contagem de plaquetas do grupo II no momento D40 de avaliação, embora não significativa ($p=0,057$), mostra que o aumento no número de plaquetas parece ser acompanhado pelo aumento nas concentrações de DHEA-S (Figura 13). Esta observação, portanto, requer mais estudos.

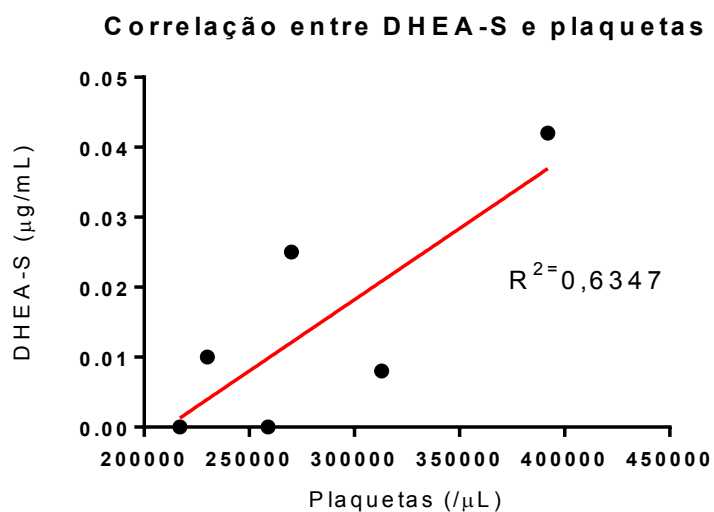


Figura 13. Representação gráfica da correlação entre as concentrações médias de DHEA-S e das contagens médias de plaquetas do grupo II no tempo D40. Jaboticabal, 2015.

4.7 Resultados da análise das variáveis entre os cães saudáveis e os doentes, independentemente da dose de doxiciclina utilizada

4.7.1 Parâmetros hematológicos

Os valores médios (\pm erro padrão da média) das contagens de hemácias, concentração de hemoglobina, hematócrito, contagem de leucócitos e de plaquetas dos grupos controle e doente nos tempos experimentais D0, D15 e D40 estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Média \pm erro padrão da média das contagens de hemácias, concentração de hemoglobina, hematócrito, contagem de leucócitos e de plaquetas dos grupos controle e doente nos tempos experimentais D0, D15 e D40. Jaboticabal, 2015.

Parâmetro	Grupo	D0	D15	D40
Hemácias ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Controle	7.115,0 \pm 178,2 ^{Aa}	7.115,0 \pm 178,2 ^{Aa}	7.115,0 \pm 178,2 ^{Aa}
	Doente	6.002,0 \pm 298,4 ^{Bb}	6.629,0 \pm 214,3 ^{Ab}	7.156,0 \pm 172,5 ^{Aa}
Hemoglobina (g/dL)	Controle	17,10 \pm 0,49 ^{Aa}	17,10 \pm 0,49 ^{Aa}	17,10 \pm 0,49 ^{Aa}
	Doente	13,98 \pm 0,82 ^{Bb}	15,40 \pm 0,58 ^{Aa}	16,50 \pm 0,38 ^{Aa}
Hematócrito (%)	Controle	49,33 \pm 1,20 ^{Aa}	49,33 \pm 1,20 ^{Aa}	49,33 \pm 1,20 ^{Aa}
	Doente	41,16 \pm 2,21 ^{Bb}	44,36 \pm 1,60 ^{Bb}	48,00 \pm 1,18 ^{Aa}
Leucócitos (μL)	Controle	8.133,3 \pm 1484,9 ^{Aa}	8.133,3 \pm 1484,9 ^{Aa}	8.133,3 \pm 1484,9 ^{Aa}
	Doente	5.708,3 \pm 919,4 ^{Ab}	7.408,3 \pm 569,7 ^{Aab}	8.241,7 \pm 946,8 ^{Aa}
Plaquetas (μL)	Controle	260.833 \pm 34.769 ^{Aa}	260.833 \pm 34.769 ^{Aa}	260.833 \pm 34.769 ^{Aa}
	Doente	92.667 \pm 10.660 ^{Bb}	219.166 \pm 30.488 ^{Aa}	267.916 \pm 15.340 ^{Aa}

D0: dia zero de avaliação; D15: dia quinze de avaliação; D40: dia quarenta de avaliação.

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre grupos ($p < 0,05$).

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre tempos ($p < 0,05$).

Hemácias

Houve diferença significativa na contagem de hemácias entre os grupos controle e doente apenas no tempo D0 de avaliação ($p=0,005$) (Figura 14). Com relação ao grupo doente, a média de hemácias foi maior no tempo D40, diferindo dos tempos D0 ($p=0,001$) e D15 ($p=0,03$). Não foram observadas diferenças nos demais tempos avaliados.

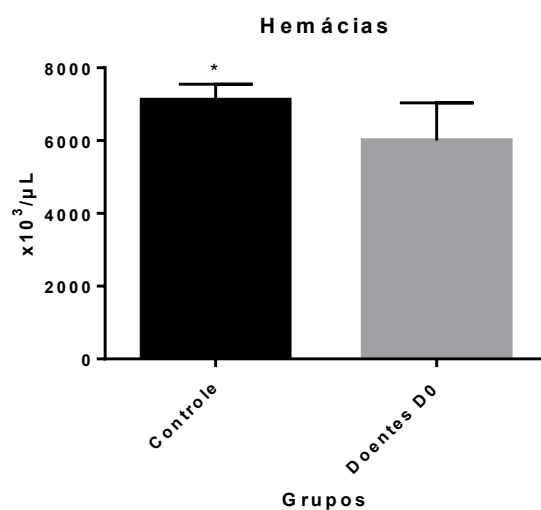


Figura 14. Representação gráfica da contagem de hemácias do grupo controle e do grupo doente no tempo D0 de avaliação. *Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.

Hemoglobina

Aos moldes do que ocorreu com a contagem de hemácias, observou-se concentração média de hemoglobina menor no grupo doente que no grupo controle no tempo D0 do estudo ($p = 0,0052$) (Figura 15). Quanto ao grupo doente, a concentração média de hemoglobina foi menor no tempo D0 que nos tempos D15 ($p = 0,02$) e D40 ($p = 0,007$). Não foram verificadas diferenças nos demais tempos avaliados.

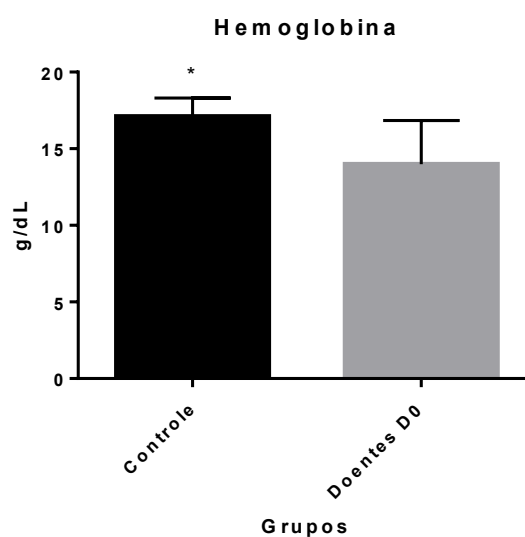


Figura 15. Representação gráfica da concentração de hemoglobina do grupo controle e do grupo doente no tempo D0 de avaliação. *Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.

Hematócrito

O hematócrito médio dos cães doentes foi menor que dos cães saudáveis tanto no tempo inicial (D0) ($p=0,0053$) (Figura 16A) quanto no D15 de avaliação ($p=0,02$) (Figura 16B), e não diferiram no tempo D40. O hematócrito médio dos cães doentes foi maior no tempo D40, em relação ao tempo D0 ($p=0,007$) e D15 ($0,03$) do mesmo grupo.

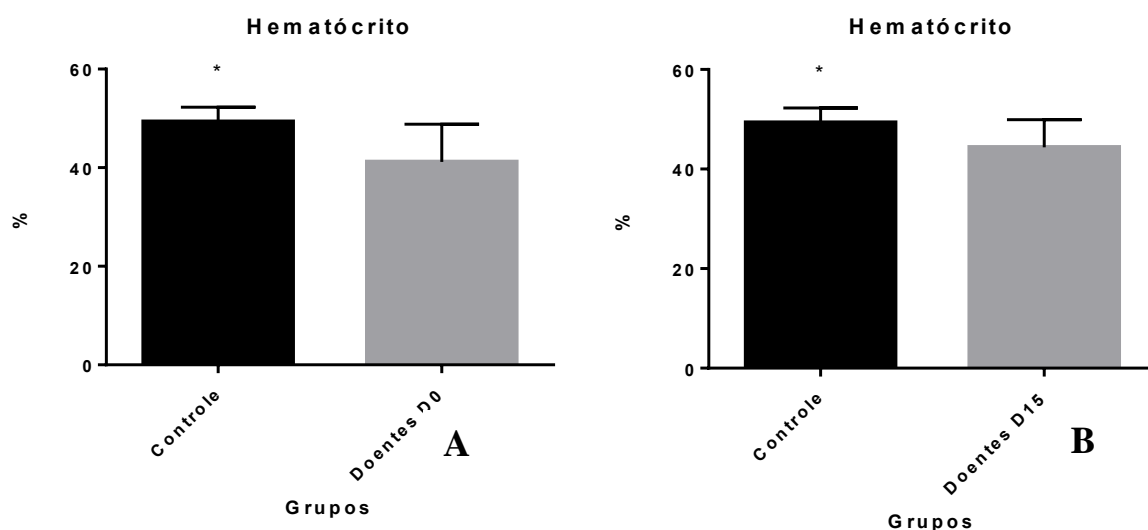


Figura 16. Representação gráfica do hematócrito médio do grupo controle e do grupo doente nos tempos D0 de avaliação (A) e D15 (B) *Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.

Apesar de se observarem médias menores da contagem de hemácias, da concentração de hemoglobina e do hematócrito no grupo composto por cães doentes, no início do estudo, os parâmetros avaliados estavam no intervalo de referência para a espécie (Apêndice A). Munhoz et al. (2009) também observaram menores valores nas contagens de hemácias, na concentração de hemoglobina e no hematócrito na infecção experimental de cães com *E. canis* (Amostra Jaboticabal) nos dias 18 e 30 pós-inoculação, sendo que nestes momentos, os cães apresentavam anemia. Em nosso estudo, apesar das diferenças destas variáveis entre os cães doentes e os do grupo controle no momento D0, os cães não apresentavam anemia, pois este era um dos critérios de exclusão para evitar a babesiose, principal coinfeção em nossa rotina. Aos moldes do observado por Munhoz et al. (2009), o tratamento com doxiciclina foi capaz de promover aumento nas contagens de hemácias, na concentração de hemoglobina e no hematócrito, verificada aos 76 dias pós-inoculação no estudo com a doença na forma experimental, e no momento D40 em nosso trabalho. A saber, a dose de hiclato de

doxiciclina utilizada por Munhoz et al. (2009) no tratamento dos cães doentes foi 5mg/kg a cada 12 horas, por 21 dias.

Em um estudo recente, Villaescusa et al. (2015) avaliaram os efeitos da doxiciclina sobre os parâmetros hematológicos de cães com erliquiose monocítica espontânea tratados com 10mg/kg a cada 24 horas, por 28 dias, e acompanhados por um período de seis meses. Para fins comparativos, um grupo de cães saudáveis foi submetido ao mesmo tratamento. Houve aumento progressivo da contagem de hemácias e concentração de hemoglobina no grupo de cães com erliquiose, mas não no grupo controle, e isto foi atribuído ao efeito antimicrobiano do fármaco. Os nossos resultados, assim como os de Munhoz et al. (2009) e de Villaescusa et al. (2015) demonstram que os tratamentos com doxiciclina, independente da dose empregada, promovem aumento nas contagens de hemácias, na concentração de hemoglobina e do hematócrito dos cães doentes.

Leucócitos

Não foram observadas diferenças entre os grupos nos tempos avaliados quanto aos valores de leucócitos. Todavia, no grupo de cães doentes, a média de leucócitos em D0 diferiu, apenas, de D40 ($p=0,03$), mostrando-se menor no momento inicial de avaliação. Apesar desta diferença, as médias de leucócitos do grupo de cães doentes nos três tempos avaliados não caracterizavam leucopenia.

No estudo de Munhoz et al. (2009) com cães experimentalmente infectados por *E. canis* (Amostra Jaboticabal), leucopenia foi identificada aos 18 dias de infecção e adequadamente corrigida após o tratamento com 5mg/kg de hiclato de doxiciclina, a cada 12 horas por 21 dias. Esta informação é concordante com o observado neste estudo, de modo que, independente da dose utilizada do fármaco, o hiclato de doxiciclina é capaz de aumentar o número de leucócitos dos cães com erliquiose.

Plaquetas

Como esperado, já que trombocitopenia era o principal fator de inclusão dos cães doentes, no tempo D0 houve diferença entre os grupos controle e doente ($p=0,0037$) (Figura 17). A contagem de plaquetas foi menor no grupo doente no tempo D0, diferindo dos tempos D15 ($p=0,0007$) e D40 ($p=0,0007$), e não houve diferença nos demais tempos do estudo. O tratamento com doxiciclina contribuiu para o aumento da contagem de plaquetas a partir do tempo D15 ($p=0,38$), perpetuando-se em D40 ($p=0,85$), independentemente da dose utilizada.

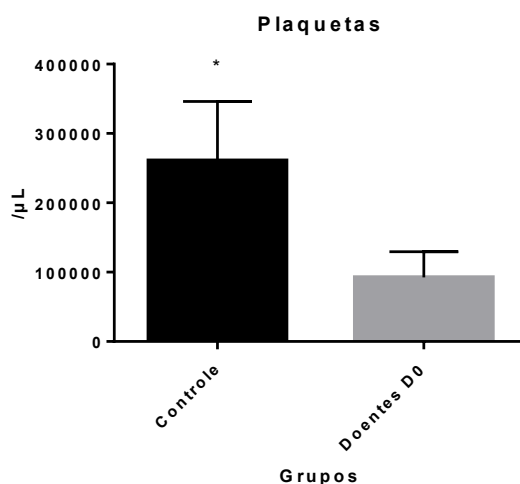


Figura 17. Representação gráfica da contagem de plaquetas do grupo controle e do grupo doente no tempo D0 de avaliação. *Diferença significativa entre os grupos ($p<0,05$). Jaboticabal, 2015.

Munhoz et al. (2009) identificaram trombocitopenia a partir do sexto dia de infecção experimental por *E. canis* (Amostra Jaboticabal), apresentando seu pico aos 18 dias de infecção, e corrigida aos 76 dias pós-infecção (que correspondiam a 25 dias após o fim do tratamento com 5mg/kg de hiclato de doxiciclina, a cada 12 horas por 21 dias). Este estudo foi desenvolvido na mesma região do Estado de São Paulo que o trabalho dos pesquisadores anteriormente citados, portanto, as mesmas variações hematológicas eram esperadas, por se tratar, possivelmente, de infecção pela mesma amostra de *E. canis*, embora por metodologia diferentes: infecção

experimental no estudo de Munhoz et al. (2009) e infecção de ocorrência natural no estudo em tela.

Adicionalmente, o estudo de Villaescusa et al. (2015) no qual os efeitos da doxiciclina sobre os parâmetros hematológicos de cães com erliquiose espontânea e em cães saudáveis tratados com 10mg/kg a cada 24 horas, por 28 dias foram avaliados, houve aumento da contagem de plaquetas em ambos os grupos, o que os permitiu sugerir que a doxiciclina pode exercer algum efeito sobre a produção de plaquetas sem, contudo, fornecer maiores detalhes. Por fim, os autores consideraram uma limitação do estudo a ausência de um grupo placebo, assim como a possibilidade dos cães selecionados apresentarem comorbidades adjacentes, apesar das exclusões sorológica e molecular de *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Neorickettsia* spp. e *Leishmania* spp., que pudessem justificar a influência do tratamento sobre o aumento da contagem de plaquetas nos cães selecionados como saudáveis. Reconhecemos que seria interessante a inclusão de grupos de cães não doentes, que recebessem as mesmas doses de 5 e de 10mg/kg de hclato de doxiciclina, tal como nos grupos II e III, a fim de excluir a possibilidade do aumento de trombócitos observado nos cães doentes ser ou não devido ao efeito do fármaco.

4.7.2 Parâmetros adrenais

As concentrações médias e os respectivos erros padrão das concentrações de cortisol e de DHEA-S dos grupos controle e doente nos tempos experimentais D0 e D40, nos momentos pré e pós a administração de ACTH estão expostos na Tabela 9.

Tabela 9. Média \pm erro padrão da média das concentrações de cortisol e de sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-S) dos grupos controle e doente nos tempos experimentais D0 e D40, nos momentos pré e pós a administração de ACTH. Jaboticabal, 2015.

Parâmetro	Grupo	D0		D40	
		Pré	Pós	Pré	Pós
Cortisol (ng/mL)	Controle	12,31 \pm 1,19 ^{Aa}	114,18 \pm 11,07 ^{Ab}	12,31 \pm 1,19 ^{Ba}	114,18 \pm 11,07 ^{Ab}
	Doente	31,34 \pm 9,18 ^{Aa}	136,90 \pm 10,55 ^{Ab}	29,29 \pm 6,00 ^{Aa}	126,62 \pm 6,41 ^{Ab}
DHEA-S (μ g/mL)	Controle	0,033 \pm 0,013 ^{Aa}	0,022 \pm 0,010 ^{Aa}	0,033 \pm 0,013 ^{Aa}	0,022 \pm 0,010 ^{Aa}
	Doente	0,025 \pm 0,012 ^{Aa}	0,043 \pm 0,017 ^{Aa}	0,023 \pm 0,011 ^{Aa}	0,018 \pm 0,009 ^{Aa}

D0: dia zero de avaliação; D40: dia quarenta de avaliação.

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre grupos ($p < 0,05$).

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre tempos ($p < 0,05$).

Cortisol

O cortisol pré-ACTH diferiu do pós, tanto no grupo controle quando doente, em ambos os tempos do estudo, demonstrando que a resposta ao estímulo hormonal ocorreu satisfatoriamente em ambos os grupos, de modo que as concentrações basais e pós-ACTH estão de acordo com as referências para a espécie (Apêndice A). Ademais, houve diferença quanto a variável cortisol apenas no momento pré-ACTH entre o grupo doente e controle ($p=0,01$) no tempo D40 (Figura 18). De acordo com as referências de cortisol basal apresentadas no Apêndice A, as concentrações médias de ambos os grupos, apesar de diferirem, não representam alterações para a espécie canina.

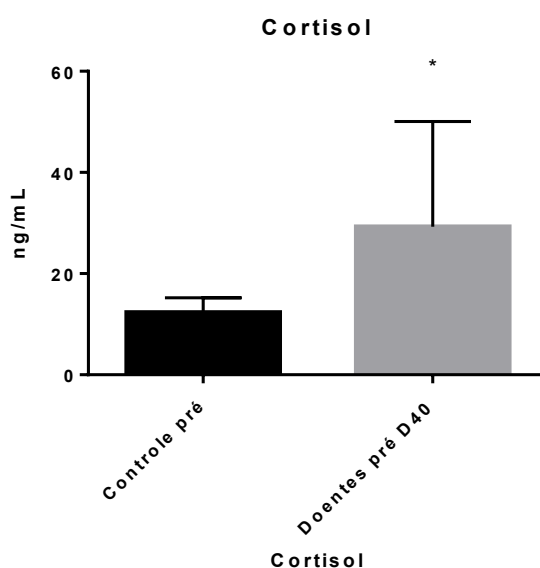


Figura 18. Representação gráfica da concentração de cortisol pré-ACTH do grupo controle e do grupo doente no tempo D40 de avaliação. *Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.

Assim como relatado anteriormente por nosso grupo de pesquisa, cães com erliquiose naturalmente adquirida apresentam adequada secreção de cortisol mediante estímulo do ACTH (RONDELLI et al. (2015b)). A informação adicional do estudo atual é que os tratamentos com a doxiciclina, de fato, não influenciaram nas concentrações de cortisol.

DHEA-S

Não foram observadas diferenças entre os grupos e os tempos estudados quanto a variável DHEA-S.

Agrupar os cães doentes foi capaz de promover alterações na análise estatística, não sendo mais observada diferença quanto às concentrações de DHEA-S com relação aos cães saudáveis. Este fato pode ser entendido se ressaltarmos que o grupo II foi o que apresentou diferenças entre grupos e momentos, enquanto que o grupo III se comportou semelhantemente ao grupo controle. Esta informação diverge do descrito por Rondelli et al. (2015a), quando observaram maiores concentrações séricas de DHEA-S em 21 cães naturalmente infectados por *E.canis*,

quando comparados a 10 cães saudáveis. Acreditamos que o número de cães envolvido nos estudos possa ter contribuído com esta diferença e não invalidamos a hipótese de que cães com erliquiose, de fato, secretam mais DHEA-S do que cães saudáveis, assim como observado no grupo II deste estudo.

4.7.3 Parâmetros tireoideanos

As médias (\pm erros padrão) das concentrações de T4 livre por diálise, T4 total, TSH e de TgAA dos grupos controle e doente nos tempos experimentais D0 e D40 estão apresentados na Tabela 10.

T4 livre por diálise

Não houve diferença entre as concentrações de T4 livre entre os grupos no tempo D0, entretanto, no tempo D40, a concentração média do grupo doente foi maior que do grupo controle ($p=0,01$) (Figura 19). No grupo de cães doentes, a concentração média de T4 livre foi menor no tempo D0 que em D40 ($p=0,04$). Não foram verificadas diferenças entre os grupos nos tempos avaliados quanto às variáveis T4 total e TSH.

Tabela 10. Média \pm erro padrão da média das concentrações de T4 livre por diálise, T4 total, TSH e de TgAA dos grupos controle e doente nos tempos experimentais D0 e D40. Jaboticabal, 2015.

Parâmetro	Grupo	D0	D40
T4 livre por diálise (ng/mL)	Controle	1,09 \pm 0,07 ^{Aa}	1,09 \pm 0,07 ^{Ba}
	Doente	1,19 \pm 0,07 ^{Ab}	1,39 \pm 0,08 ^{Aa}
T4 total (ng/mL)	Controle	24,05 \pm 3,45 ^{Aa}	24,05 \pm 3,45 ^{Aa}
	Doente	19,10 \pm 2,10 ^{Aa}	22,00 \pm 1,28 ^{Aa}
TSH (ng/mL)	Controle	0,15 \pm 0,05 ^{Aa}	0,15 \pm 0,05 ^{Aa}
	Doente	0,10 \pm 0,02 ^{Aa}	0,10 \pm 0,02 ^{Aa}
TgAA (%)	Controle	9,54 \pm 1,73 ^{Aa}	9,54 \pm 1,73 ^{Aa}
	Doente	18,00 \pm 2,67 ^{Aa}	10,60 \pm 1,04 ^{Ab}

T4: tetraiodotironina; TgAA: anticorpos anti-tireoglobulina; D0: dia zero de avaliação; D40: dia quarenta de avaliação.

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre grupos ($p<0,05$)
Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre tempos ($p<0,05$).

A média de T4 livre por diálise dos cães doentes aumentou no tempo final do estudo, diferindo do tempo inicial. Entretanto, este resultado deve ser analisado com cautela, uma vez que apenas dois cães doentes apresentaram T4 livre menor, ou muito próximo ao limite inferior de referência (0,72ng/mL e 0,84ng/mL) (Apêndices A e C2). De fato, após o tratamento com hiclato de doxiciclina, nenhum cão apresentou T4 livre incompatível com a referência para a espécie. Assim, estes resultados não podem ser classificados como eutireoidismo doente em cães com erliquiose naturalmente adquirida.

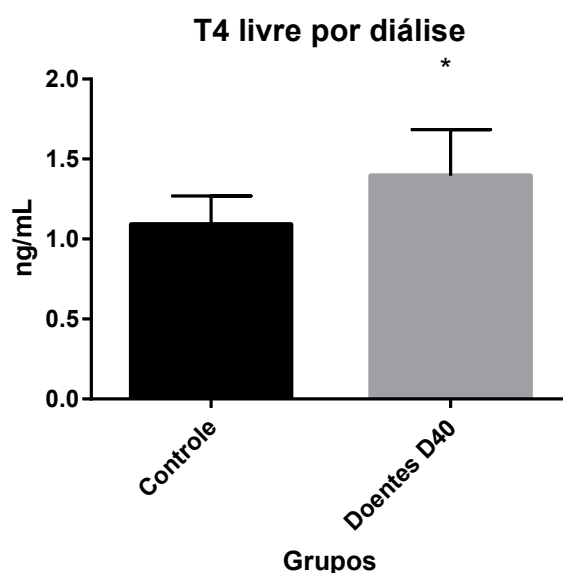


Figura 19. Representação gráfica da concentração de T4 livre por diálise do grupo controle e do grupo doente no tempo D40 de avaliação. *Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.

TgAA

Não foram observadas diferenças na concentração de anticorpos anti-tireoglobulina entre os grupos. Porém, no grupo doente, notaram-se maiores concentrações de TgAA no tempo D0 que no tempo D40 do estudo ($p = 0,01$), mostrando repetição dos resultados observados quando a análise foi feita de acordo com as doses de doxiciclina administradas, ou seja, maiores concentrações de

TgAA nos cães doentes e significativamente menores após os tratamentos como fármaco. Ainda, isto permite afirmar que as diferentes doses de doxiciclina utilizadas no tratamento da erliquiose promovem o mesmo efeito sobre a variável TgAA.

4.7.4 Parâmetros de estresse oxidativo

Os valores médios e os respectivos erros padrão da concentração de NOx, AOPP e FRAP estão expostos na Tabela 11.

Tabela 11. Média \pm erro padrão da média da concentração de óxido nítrico (NOx), produto proteico de oxidação avançada (AOPP) e do poder redutor de íons ferro (FRAP) dos grupos controle e doente nos tempos experimentais D0 e D40. Jaboticabal, 2015.

Parâmetro	Grupo	D0	D40
NOx ($\mu\text{mol/L}$)	Controle	28,87 \pm 2,08 ^{Ba}	28,87 \pm 2,08 ^{Aa}
	Doente	62,42 \pm 10,23 ^{Aa}	30,10 \pm 4,08 ^{Ab}
AOPP ($\mu\text{mol/L}$)	Controle	57,82 \pm 3,83 ^{Ba}	57,82 \pm 3,83 ^{Aa}
	Doente	92,86 \pm 6,31 ^{Aa}	56,61 \pm 4,44 ^{Ab}
FRAP ($\mu\text{mol/L}$)	Controle	437,30 \pm 38,00 ^{Ba}	437,30 \pm 38,00 ^{Ba}
	Doente	785,80 \pm 54,03 ^{Aa}	750,80 \pm 52,05 ^{Aa}

D0: dia zero de avaliação; D40: dia quarenta de avaliação.

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre grupos ($p < 0,05$)

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre tempos ($p < 0,05$).

NOx (óxido nítrico)

As concentrações médias de NOx do grupo doente foram maiores que as do grupo controle ($p=0,0075$) no tempo D0 (Figura 20), e não expressaram diferença no tempo D40 ($p=0,79$). Quanto ao grupo doente, a concentração média de NOx foi maior em D0, diferindo de D40 ($p=0,005$).

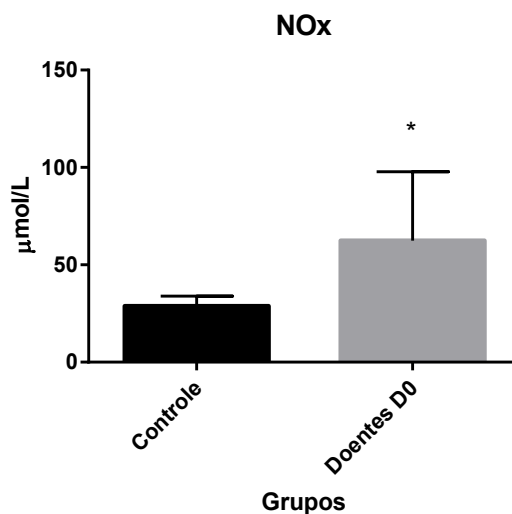


Figura 20. Representação gráfica da concentração de NOx do grupo controle e do grupo doente no tempo D0 de avaliação. *Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.

Assim como o observado individualmente nos grupos II e III, a análise dos cães doentes compondo um só grupo demonstrou que os cães com erliquiose apresentam maiores concentrações de NOx que os cães saudáveis, assim como o relatado por Da Silva et al. (2013), em cães experimentalmente infectados por *E. canis* (Amostra Jaboticabal). Ademais, ambos os tratamentos à base de doxiciclina empregados neste estudo promoveram a redução da concentração sérica de NOx dos cães doentes ao longo dos tempos avaliados.

AOPP (produto proteico de oxidação avançada)

Similar ao ocorrido com o NOx, a concentração de AOPP foi diferente entre os grupos doente e controle ($p = 0,0004$) no tempo D0 (Figura 21). No D40, não houve diferença entre os grupos, de modo que a concentração média do grupo doente foi semelhante a dos cães saudáveis ($p = 0,84$). No grupo de cães doentes, a concentração média de AOPP também foi maior em D0, diferindo de D40 ($p = 0,0001$).

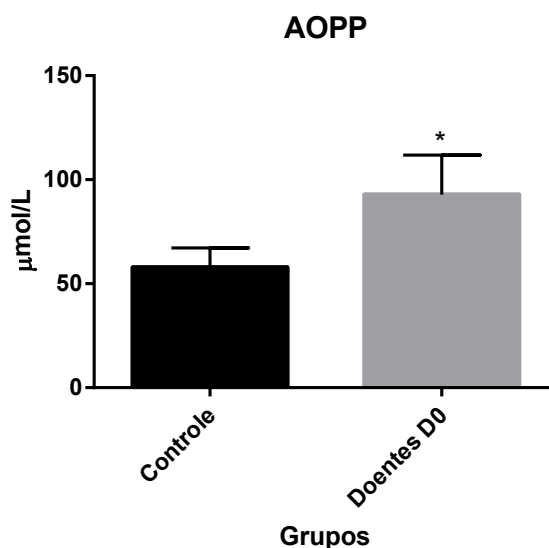


Figura 21. Representação gráfica da concentração de AOPP do grupo controle e do grupo doente no tempo D0 de avaliação. *Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.

Embora as concentrações de AOPP não tenham apresentado diferenças entre os cães doentes nos grupos individualizados (grupos II e III), observou-se diferença quando os grupos foram avaliados em conjunto, comparativamente ao grupo controle. Os cães com erliquiose apresentaram maiores concentrações séricas de AOPP no momento de doença, assim como foi descrito por Da Silva et al. (2013) nos cães experimentalmente infectados por *E. canis* (Amostra Jaboticabal), aos 30 dias pós-inoculação. Esta informação indica que cães com erliquiose apresentam oxidação proteica, avaliada pelas concentrações aumentadas de AOPP. Como esperado, os tratamentos com doxiciclina foram capazes de promover a redução significativa nas concentrações de AOPP dos cães doentes, de modo a contribuir para o restabelecimento do balanço oxidativo.

FRAP (poder redutor de íons ferro)

Foram observadas diferenças entre o grupo doente e o grupo controle ($p = 0,0002$) tanto no tempo D0 (Figura 22A) quanto no tempo D40 ($p = 0,0003$) (Figura 22B), sendo que as maiores concentrações foram observadas nos cães doentes. Individualizando o grupo de cães doentes, a concentração média de FRAP não diferiu entre os tempos D0 e D40 ($p = 0,32$).

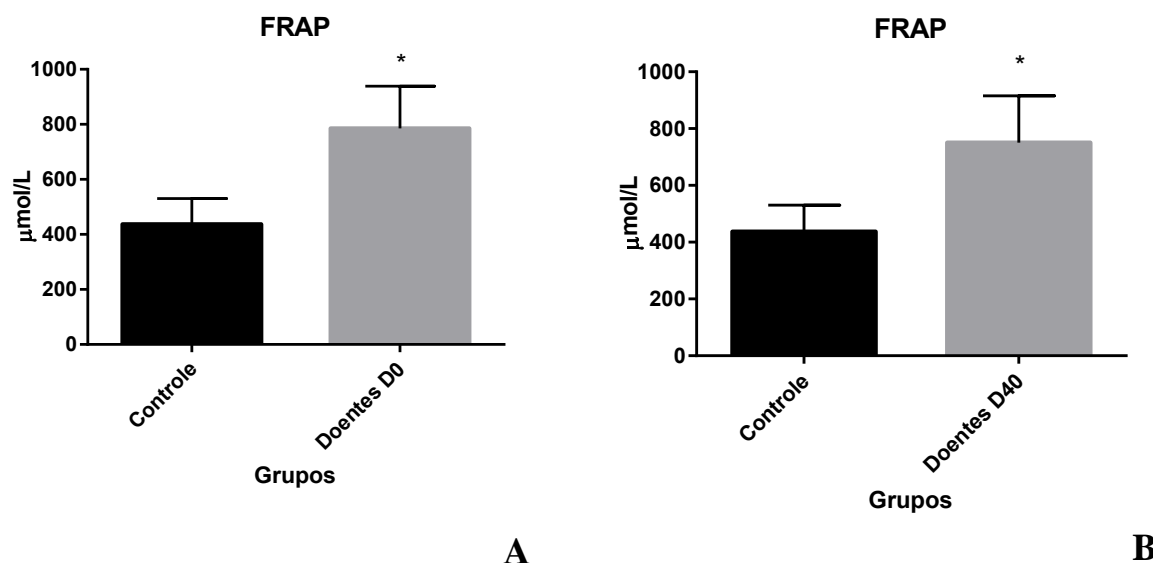


Figura 22. Representação gráfica da concentração de FRAP do grupo controle e do grupo doente nos tempos D0 de avaliação (A) e D40 (B). *Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Jaboticabal, 2015.

Dentre as variáveis estudadas que refletem o estresse oxidativo, o FRAP apresentou resultados muito interessantes. As concentrações de FRAP se mostraram maiores nos cães doentes, tanto antes quanto depois do tratamento com hiclato de doxiciclina. Enquanto as concentrações de NOx e AOPP apresentaram-se elevadas no momento de doença, seguidas de menores concentrações pós-tratamento farmacológico, as concentrações de FRAP mantiveram-se praticamente estáveis. Enquanto NOx e AOPP indicam a ocorrência de estresse celular, FRAP representa os mecanismos antioxidantes antagônicos, que visam manter o equilíbrio oxidativo (VASCONCELOS et al., 2007). De posse desta informação, entendemos que os mecanismos oxidantes envolvidos na erliquiose são influenciados pelo tratamento com hiclato com doxiciclina, embora o antioxidante permaneça inalterado. Analisando este resultado, acredita-se que os mecanismos protetores da oxidação permanecem ativados em cães com erliquiose, apesar do tratamento farmacológico. Esta hipótese merece ser estudada, por meio de avaliações das concentrações de FRAP, além dos 40 dias de seguimento deste estudo.

Comportamento semelhante foi observado em cães com linfoma multicêntrico, embora esta condição apresente a fisiopatogenia muito divergente da que ocorre na

erliquiose. Cães com linfoma multicêntrico apresentaram concentrações maiores de FRAP que os indivíduos controle, além de concentrações estáveis de FRAP antes e após o tratamento quimioterápico (BOTTARI et al., 2015). Neste mesmo sentido, cães com doenças cardiovasculares (endocardiose de mitral e cardiomiopatia dilatada) demonstraram maiores concentrações de FRAP que os cães saudáveis, ainda cães com quadro clínico mais avançado e com sugestões de ocorrência de hipóxia, por perfusão diminuída, apresentavam as maiores concentrações deste marcador antioxidante. Os dados descritos nos estudos anteriormente citados sugerem que este seja um mecanismo de defesa frente aos estímulos mencionados (HETYEY et al., 2007).

5 CONCLUSÕES

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

- O fármaco hiclato de doxiciclina, nas doses de 5mg/kg e 10mg/kg, administrado a cada 12 horas por 30 dias, é capaz de promover melhora nas variáveis hematológicas estudadas, por meio do aumento da contagem de hemácias, da concentração de hemoglobina, do hematócrito, e da contagem de leucócitos e plaquetas.
- Cães naturalmente infectados por *E. canis* mantêm adequada capacidade de secretar cortisol frente ao estímulo do ACTH, assim como a reserva adrenocortical preservada mesmo no estado de doença.
- A erliquiose monocítica canina de ocorrência natural é capaz de promover o aumento na secreção hormonal adrenocortical de DHEA-S.
- O fármaco hiclato de doxiciclina, nas doses de 5mg/kg e 10mg/kg, administrado a cada 12 horas por 30 dias, promove a redução da concentração sérica de DHEA-S pós-tratamento.
- Cães naturalmente infectados por *E. canis* apresentam maiores concentrações de anticorpos anti-tireoglobulinas, embora não manifestem a síndrome do eutireoidismo doente.

- O fármaco hiclato de doxiciclina, nas doses de 5mg/kg e 10mg/kg, administrado a cada 12 horas por 30 dias, promove a redução da concentração sérica dos anticorpos anti-tireoglobulinas pós-tratamento.
- Cães com erliquiose naturalmente adquirida apresentam maiores concentrações de óxido nítrico, produto proteico de oxidação avançada e do poder redutor de íons ferro.
- O fármaco hiclato de doxiciclina, nas doses de 5mg/kg e 10mg/kg, administrado a cada 12 horas por 30 dias, promove a redução da concentração sérica de óxido nítrico e produto proteico de oxidação avançada, mas não do poder redutor de íons ferro, avaliados dez dias após o tratamento.
- O efeito do hiclato de doxiciclina sobre as variáveis estudadas não foi dose-dependente.

6 REFERÊNCIAS*

AGBAHT, K.; GULLU, S. Adrenocortical reserves in hyperthyroidism. **Endocrine**, v. 45, p. 136-143, 2014. doi 10.1007/s12020-013-9933-y

BANETH, G.; HARRUS, S.; OHNONA, F. S.; SCHLESINGER, Y. Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection. **Veterinary Microbiology**, v. 136, p. 321-325, 2009.

BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite the good the bad and the ugly. **American Journal of Physiology**, n. 271, 1424-1437, 1996.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p.70-76, 1996.

BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Development and Evaluation of a Seminested PCR for Detection and Differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian Genotype) and *B. canis* DNA in Canine Blood Samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n.9, p. 4172 – 4177, 2003.

BOONSTRA, R.; LANE, J. E.; BOUTIN, S.; BRADLEY, A.; DESANTIS, L.; NEWMAN, A. E.; SOMA, K. K. Plasm DHEA levels in wild, territorial red squirrels: Seasonal variation and effect of ACTH. **General and Comparative Endocrinology**, v. 158, p. 61-67, 2008.

BOTTARI, N. B.; MUNHOZ, T. D.; TORBITZ, V. D.; TONIN, A. A.; ANAI, L. A.; SEMOLIN, L. M.; JARK, P. C.; BOLLIICK, Y. S.; MORESCO, R. N.; FRANÇA, R. T.; LOPES, S. T.; STEFANI, L. M.; TINUCCI-COSTA, M.; SILVA, A. S. Oxidative stress in dogs with multicentric lymphoma: Effect of chemotherapy on oxidative and antioxidant biomarkers. **Redox Report**, in press. 2015. doi 10.1179/1351000215Y.0000000037.

BROWN, G. K.; CANFIELD, P. J.; DUNSTAN, R. H.; ROBERTS, T. K.; MARTIN, A. R.; BROWN, C. S.; IRVING, R. Detection of *Anaplasma platys* and *Babesia canis vogeli* and their impact on platelet numbers in free-roaming dogs associated with remote Aboriginal communities in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 84, n. 9, p. 321-325, 2006.

* ABNT- NBR 6023/2002

BULLA, C.; KIOMI TAKAHIRA, R.; PESSOA ARAÚJO, J. JR.; APARECIDA TRINCA, L.; SOUZA LOPES, R.; WIEDMEYER, C. E. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Veterinary Research**, v. 35, n. 1, p. 141 - 146, 2004.

BURKHARDT, T.; SCHMIDT, N. O.; VETTORAZZI, E.; ABERLE, J.; MENGEL, M.; FLITSCH, J. DHEA(S)—a novel marker in Cushing's disease. **Acta Neurochirurgica**, v. 155, p. 479-484, 2013. doi: 10.1007/s00701-012-1596-6.

BURKITT, J. M.; HASKINS, S. C.; NELSON, R. W.; KASS, P. H. Relative adrenal insufficiency in dogs with sepsis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 2, p. 226-231, 2007.

CADMAN, H. F.; KELLY, P. J.; MATTHEWMAN, L. A., ZHOU, R., MASON, P. R. Comparison of the dot-blot enzyme linked immunoassay with immunofluorescence for detecting antibodies to *Ehrlichia canis*. **Veterinary Record**, v. 135, n. 15, p. 362, 1994.

CALLAHAN, H. L.; CROUCH, R. K.; JAMES, E. R. Helminth antioxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants. **Parasitology Today**, n. 4, p. 218-225, 1988.

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

CHAUDHURI, S.; VARSHNEY, J. P.; PATRA, R. C. Erythrocytic antioxidant defense, lipid peroxides level and blood iron, zinc and copper concentrations in dogs naturally infected with *Babesia gibsoni*. **Research in Veterinary Science**, n. 85, p. 120-124, 2008.

CHOI, E. W.; SHIN, I. S.; BHANG, D. H.; LEE, D. H.; BAE, B. K.; KANG, M. S.; KIM, D. Y.; HWANG, C. Y.; LEE, C. W.; YOUN, H. Y. Hormonal change and cytokine mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells during the development of canine autoimmune thyroiditis. **Clinical and Experimental Immunology**, n. 146, p. 101-108. doi:10.1111/j.1365-2249.2006.03187.x

CORTESE, L.; OLIVA, G.; CIARAMELLA, P.; PERSECHINO, A.; RESTUCCI, B. Primary hypothyroidism associated with leishmaniasis in a dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 35, p.487–492, 1999.

COSTA, J. O.; BATISTA, J. A. JR.; SILVA, M.; GUIMARAES, M.P. *Ehrlichia canis* infection in dog in Belo Horizonte-Brazil. **Arquivos da Escola Superior de Veterinária da UFMG**, Belo Horizonte, v. 25, n. 2, p.199-200,1973.

DA SILVA, A. S.; MUNHOZ, T. D.; FARIA, J. L.; VARGAS-HÉRNANDEZ, G.; MACHADO, R. Z.; ALMEIDA, T. C.; MORESCO, R. N.; STEFANI, L. M.; TINUCCI-COSTA, M. Increase nitric oxide and oxidative stress in dogs experimentally infected by *Ehrlichia canis*: Effect on the pathogenesis of the disease. **Veterinary Microbiology**, n. 164, p. 366-369, 2013.

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

DAMINET, S.; FERGUSON, D. C. Influence of drugs on thyroid function in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 17, p. 463-472, 2003.

DIRCKS, B. H.; SCHUBERTH, H. J.; MISCHKE, R. M. Underlying diseases and clinicopathologic variables of thrombocytopenic dogs with and without platelet-bound antibodies detected by use of a flow cytometric assay: 83 cases (2004–2006). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 235, n. 8, p. 960-966, 2009.

DIXON, R. M. Hipotireoidismo canino. In: ____ MOONEY, C.T.; PETERSON, M.E. **Manual de Endocrinologia Canina e Felina**. 3.ed. São Paulo: Roca, 2009. p. 91-114.

DIXON, R. M.; MOONEY, C. T. Canine serum thyroglobulin autoantibodies in health, hypothyroidism and non-thyroidal illness. **Research in Veterinary Science**, v. 66, p. 243-246, 1999.

DONATIEN, A.; LESTOQUARD, F. State of the present knowledge concerning rickettsiosis of animals. **Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie Institut Pasteur d'Algérie**, v. 15, p. 142–187, 1937.

ENGELKING, L. R. **Fisiologia Endócrina e Metabólica em Medicina Veterinária**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2010. 165 p.

FARIA, J. L. M.; DAGNONE, A. S.; MUNHOZ, T. D.; JOÃO, C. F.; PEREIRA, W. A. B.; MACHADO, R. Z.; TINUCCI-COSTA, M. *Ehrlichia canis* morulae and DNA detection in whole blood and spleen aspiration samples. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 2, p. 98-102, 2010.

FARIA, J. L. M.; MUNHOZ, T. D.; JOÃO, C. F.; VARGAS-HERNÁNDEZ, G.; ANDRÉ, M. R.; PEREIRA, W. A.; MACHADO, R. Z.; TINUCCI-COSTA, M. *Ehrlichia canis* (Jaboticabal strain) induces the expression of TNF- α in leukocytes and splenocytes of experimentally infected dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 71-74, 2011.

FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. **Canine and Feline Endocrinology and Reproduction**, 3.ed., St. Louis: Saunders, 2004. 1089 p.

FISCHLI, S.; JENNI, S.; ALLEMANN, S.; ZWAHLEN, M.; DIEM, P.; CHRIST, E. R.; STETTLER, C. Dehydroepiandrosterone Sulfate in the Assessment of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 93, p. 539-542, 2008.

FRANÇA, R. T.; DA SILVA, A. S.; COSTA, M. M.; PAIM, F. C.; PAIM, C. B.; THOMÉ, G. R.; WOLKMER, P.; PEREIRA, M. E.; SCHETINGER, M. R.; MORESCO, R. N.; MAZZANTI, C. M.; MONTEIRO, S. G.; LOPES, S. T. Relationship between oxidative stress and clinical-pathological aspects in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 3, p. 1309-1313, 2012.

FRANK, L. A.; ROHRBACH, B. W.; BAILEY, E. M.; WEST, J. R.; OLIVER, J. W. Steroid hormone concentration profiles in healthy intact and neutered dogs before and after cosyntropin administration. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 24, p. 43-57, 2003.

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

FRENCH, T. W.; HARVEY, J. W. Serologic diagnosis of infectious cyclic thrombocytopenia in dogs using an indirect fluorescent antibody test. **American Journal of Veterinary Research**, v. 44, p. 2407-2411, 1983.

FRIBERG, L.; WERNER, S.; EGGERTSEN, G.; AHNVE, S. Rapid downregulation of thyroid hormones in acute myocardial infarction: is it cardioprotective in patients with angina? **Archives of Internal Medicine**, v. 162, p. 1388-1394, 2002.

GATÉ, L.; PAUL, J.; BA, G. N.; TEW, K. D.; TAPIERO, H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. **Biomedical and Pharmacology Journal**, n. 53, p. 169-180, 1999.

GAUNT, S. D.; BEALL, M. J.; STILLMAN, B. A.; LORENTZEN, L.; DINIZ, P. P. V. P.; CHANDRASHEKAR, R.; BREITSCHWERDT, E. B. Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 33, p. 2-10, 2010.

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

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, n. 52, p. 253-265, 1994.

HANASAND, M.; OMDAL, R.; NORHEIM, K. B.; GØRANSSON, L. G.; BREDE, C.; JONSSON, G. Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. **Clinica Chimica Acta**, v. 413, p. 901-906, 2012.

HARRUS, S.; WANER, T.; BARK, H. Canine monocytic ehrlichiosis: an update. **Compendium for Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 19, p. 431-444, 1997.

HARRUS, S.; WANER, T.; AIZENBERG, I.; FOLEY, J. E.; POLAND, A. M.; BARK, H. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 1, 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. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. **The Veterinary Journal**, v.187, n.1, p. 292-296, 2011.

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

HETYEY, C. S.; MANCZUR, F.; DUDÁS-GYÖRKI, Z.; REICZIGEL, J; RIBICZEY, P.; VAJDOVICH, P.; VÖRÖS, K. Plasma Antioxidant Capacity in Dogs with Naturally Occurring Heart Diseases. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 54, p. 36-39, 2007.

HOLFORD, A. L.; TOBIAS, K. M.; BARTGES, J. W.; JOHNSON, B. M. Adrenal response to adrenocorticotrophic hormone in dogs before and after surgical attenuation of a single congenital portosystemic shunt. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, p. 832-838, 2008.

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.

IQBAL, Z.; CHAICHANASIRIWITHAYA, W.; RIKIHISA, Y. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 1658–1662, 1994.

KANTROWITZ, L. B.; PETERSON, M. E.; MELIÁN, C.; NICHOLS, R. Serum total thyroxine, total triiodothyronine, free-thyroxine, and thyrotropin concentrations in dogs with nonthyroidal illness. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, p. 765-769, 2001.

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

KEITA, M.; VINCENDEAU, P.; BUGUET, A.; CESPUGLIO, R.; VALLAT, J. M.; DUMAS, M.; BOUTEILLE, B. Inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in the central nervous system of mice chronically infected with *Trypanosoma brucei brucei*. **Experimental Parasitology**, v. 95, p. 19–27, 2000.

KHANDUJA, K. L.; SOHI, K. K.; PATHAK, C. M.; KAUSHIK, G. Nimesulide inhibits lipopolysaccharide-induced production of superoxide anions and nitric oxide and iNOS expression in alveolar macrophages. **Life Sciences**, v. 78, p. 1662-1669, 2006.

KIRAL, F., KARAGENC, T., PASA, S., YENISEY, C.; SEYREK, K. Dogs with Hepatozoon canis respond to the oxidative stress by increased production of glutathione and nitric oxide. **Veterinary Parasitology**, v. 131, p. 15–21, 2005.

KRAUSE, P. J.; DAILY, J.; TELFORD, S. R.; VANNIER, E.; LANTOS, P.; SPIELMAN, A. Shared features in the pathobiology of babesiosis and malaria. **Trends in Parasitology**, v. 23, p. 605–610, 2007.

KROBOTH, P. D.; SALEK, F. S.; PITTENGER, A. L.; FABIAN, T. J.; FRYE, R. F. DHEA and DHEA-S: a review. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 39, p. 327-348, 1999.

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

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

LEAL, A. M. O.; MAGALHÃES, P. K. R.; MARTINEZ, R.; MOREIRA, A. C. Adrenocortical hormones and interleukin patterns in paracoccidioidomycosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 187, p. 124-127, 2003.

LEWIS, D. C.; MEYERS, K. M. Canine idiopathic thrombocytopenic purpura. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 10, p. 207–218, 1996.

LIBONATI, R. M. F.; de MENDONÇA, B. B.; MAUÉS, J. A.; QUARESMA, J. A. S.; DE SOUZA, J. M. Some aspects of the behavior of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria: cortisol and dehydroepiandrosterone levels. **Acta Tropica**, v. 98, p. 270-276, 2006.

LIMA VERDE, F. A.; LIMA VERDE, F. A. A.; NETO, A. S.; ALMEIDA, P. C.; VERDE, E.M. Hormonal Disturbances in Visceral Leishmaniasis (Kala-Azar). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, p. 668 – 673, 2011.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliações em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

MACHADO, R. Z. Erliquiose canina. In: XIII CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA & I SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETISIOSES, Ouro Preto, 2004. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13 (Supl. 1), p. 53-57, 2004.

MACHADO, V. S.; CRIVELLENTI, L. Z.; BOTTARI, N. B.; TONIN, A. A.; PELINSON, L. P.; BORIN-CRIVELLENTI, S.; SANTANA, A. E.; TORBITZ, V. D.; MORESCO, R. N.; DUARTE, T.; DUARTE, M. M. M. F.; SCHETINGER, M. R. C.; MORSCH, V. M.; JAQUES, J. A.; TINUCCI-COSTA, M.; DA SILVA, A. S. Oxidative stress inflammatory response biomarkers in dogs with mammary carcinoma. **Pathology – Research and Practice**. In press. Disponível em < <http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2015.06.011>>, 2015.

MARTIN, L. G.; GROMAN, R. P. Relative adrenal insufficiency in critical illness. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 14, p. 149-157, 2004.

McCLURE, J. C.; CROTHERS, M. L.; SCHAEFER, J. J.; STANLEY, P. D.; NEEDHAM, G. R.; EWING, S. A.; STICH, R. W. Efficacy of a doxycycline treatment regimen initiated during three different phases of experimental ehrlichiosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 5012-5020, 2010.

MITCHELL, J. B.; DUGAS, J. P.; MCFARLIN, B. K.; NELSON, M. J. Effect of exercise, heat stress and hydration on immune cell number and function. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 34, p. 1941-1950, 2002.

MOONEY, C. T.; PETERSON, M. E. **Manual de Endocrinologia Canina e Felina**, 3. ed. São Paulo: Roca, 2009. 286 p.

MORAES-FILHO, J.; BORGES COSTA, F.; SZABÓ, M.; HORTA, M.; OGRZEWALSKA, M.; SOARES, J. F.; MARTINS, T. F.; SOUZA SOARES, H.; PONTES ALMEIDA, A.; NAVA, S.; LADO, P.; OTOMURA, F.; LABRUNA, M. B. Frequência de infecção por *Ehrlichia canis* em diferentes populações de *Rhipicephalus sanguineus* do Brasil, Argentina e Uruguai. In: IV SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ACAROLOGIA, 2013, Bento Gonçalves-RS. Anais do IV SIBAC, 2013. Disponível em <http://www.conicet.gob.ar/new_scp/detalle.php?keywords=&id=32188&congresos=yes&detalles=yes&congr_id=1658513>.

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

MORGAN, C. A.; RASMUSSEN, A.; PIETRZAK, R. H.; CORIC, V.; SOUTHWICK, S. M. Relationships among plasma dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate, cortisol, symptoms of dissociation, and objective performance in humans exposed to underwater navigation stress. **Biological Psychiatry**, p. 1-7, 2009.

MUNHOZ, T. D.; FARIA, J. L. M.; VARGAS-HERNANDES, G.; JOÃO, C. F.; PEREIRA, W. A. B.; ANDRÉ, M. R.; MACHADO, R. Z.; TINUCCI-COSTA, M. Mensuração da proteína C-reativa na infecção experimental por *Ehrlichia canis* (Amostra Jaboticabal) e após o tratamento com cloridrato de doxiciclina em cães. **Veterinária Notícias**, v. 15, n. 2, p. 65-79, 2009.

MUNHOZ, T. D.; FARIA, J. L. M.; VARGAS-HÉRNANDEZ, G.; FAGLIARI, J. J.; SANTANA, A. E.; MACHADO, R. Z.; TINUCCI-COSTA, M. Experimental *Ehrlichia canis* infection changes acute-phase proteins. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, p. 206-212, 2012.

MYLONAKIS, M. E.; CERON, J. J.; LEONTIDES, L.; SIARKOU, V. I.; MARTINEZ, S.; TVARIJONAVICIUTE, A.; KOUTINAS, A. F.; HARRUS, S. Serum acute phase proteins as clinical phase indicators and outcome predictors in naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25. p. 811-817, 2011.

NAKAGHI, A. C. H.; MACHADO, R. Z.; FERRO, J. A.; LABRUNA, M. B.; CHRYSSEAFIDIS, A. L.; ANDRÉ, M. R.; BALDANI, C. D. Sensitivity evaluation of a single-step PCR assay using *Ehrlichia canis* p28 gene as a target and its application in diagnosis of canine ehrlichiosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 2, p. 75 – 79, 2010.

NEER, T. M.; BREITSCHWERDT, E. B.; GREENE, R. T.; LAPPIN, M. R. Consensus Statement on Ehrlichial Disease of Small Animals from the Infectious Disease Study Group of the ACVIM. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, p. 309-315, 2002.

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

NOHL, H.; ESTERBAUER, H.; RICE-EVANS, C. Free radicals in the environment, medicine and toxicology: critical aspects and current highlights. **Free Radical Biology and Medicine**, n. 20, p. 765-766, 1996.

NYINDO, M.; HUXSOLL, D. L.; RISTIC, M.; KAKOMA, I.; BROWN, J. L.; CARSON, C. A.; STEPHENSON, E. H. Cell-mediated and humoral immune responses of German Shepherd Dogs and Beagles to experimental infection with *Ehrlichia canis*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, p. 250–254, 1980.

OLIVEIRA, D.; TIE NISHIMORI, C.; COSTA, M. T.; MACHADO, R. Z.; CASTRO, M. B. Anti-*Ehrlichia canis* antibodies detection by “Dot-ELISA” in naturally infected dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 9, n. 1, p. 1-5, 2000.

PARKER, L. N. Control of adrenal androgen secretion. **Endocrinology Metabolism Clinics of North America**, v. 20, p. 401-421, 1991.

PIEPER, D. R.; LOBOCKI, C. A. Characterization of serum dehydroepiandrosterone secretion in golden hamsters. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 224, p. 278-284, 2000.

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

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

RANIERI, R.; VERONELLI, A.; SANTAMBROGIO, C.; COLOMBO, L.; PONTIROLI, A.E. Subclinical hypothyroidism in a patient affected by advanced AIDS and visceral leishmaniasis. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 37, p. 935–937, 2005.

RONDELLI, M.C.H. **Avaliação hormonal adrenocortical em cães com infecção natural por *Ehrlichia canis***. 2012. 57 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2012.

RONDELLI, M. C. H.; MUNHOZ, T. D.; CATANDI, P. B.; FRESCHI, C. R.; PALACIOS JUNIOR, R. J. G.; MACHADO, R. Z.; TINUCCI-COSTA, M. Serum DHEA-S increases in dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*. **Research in Veterinary Science**, v. 100, p. 18-20, 2015. (a)

RONDELLI, M. C. H.; MUNHOZ, T. D.; CATANDI, P. B.; FRESCHI, C. R.; PALACIOS JUNIOR, R. J. G.; MACHADO, R. Z.; TINUCCI-COSTA, M. Acute and subclinical *Ehrlichia canis* infection and cortisol response to ACTH stimulation test. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 8, n. 2, p. 46-50, 2015. (b)

ROSENFELD, R. S.; ROSENBERG, B. J.; FUKUSHIMA, D. K.; HELLMAN, L. 24-Hour secretory pattern of dehydroisoandrosterone and dehydroisoandrosterone sulfate. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 40, p.850–855, 1975.

SANTA ROSA, C. A.; SULZER, C. R.; YANAGUITA, R. M.; SILVA, A. S. da. Leptospirosis in wildlife in Brazil: isolation of serovars Canicola, Pyrogenes and Grippotyphosa. **International Journal of Zoonosis**, Taipei, v. 7, p. 40-43, 1980.

SAS Institute Inc. SAS/STAT Software: Changes and Enhancements through Release 9.3 Cary, NC: SAS Institute Inc. 2011.

SCHAFFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 30, p. 1191-1212, 2001.

SCHOEMAN, J. P.; GODDARD, A.; HERRTAGE, M. E. Serum cortisol and thyroxine concentrations as predictors of death in critically ill puppies with parvoviral diarrhea. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 15, p. 1534-1539, 2007.

SCHOEMAN, J. P.; REES, P.; HERRTAGE, M. E. Endocrine predictors of mortality in canine babesiosis caused by *Babesia canis rossi*. **Veterinary Parasitology**, v. 148, p. 75-82, 2007.

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

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

SCOTT-MONCRIEFF, C. **Role of sex hormones in diagnosis of adrenal dysfunction**. North American Veterinary Conference. Orlando. 2007. Disponível em: www.ivis.org. Acesso em outubro 2014.

SEMPLE, C. G. Hormonal changes in non-endocrine disease. **British Medical Journal**, v. 293, p. 1049-1052, 1986.

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

SUGAYA, N.; IZAWA, S.; KIMURA, K.; OGAWA, N.; YAMADA, K. C.; SHIROTSUKI, K.; MIKAMI, I.; HIRATA, K.; NAGANO, Y.; NOMURA, S.; SHIMADA, H. Adrenal hormone response and psychophysiological correlates under psychosocial stress in individuals with irritable bowel syndrome. **International Journal of Psychophysiology**, v. 84, p. 39-44, 2012.

SYKES, J. E.; HARTMANN, K.; LUNN, K. F.; MOORE, G. E.; STODDARD, R. A.; GOLDSTEIN, R. E. 2010 ACVIM Small Animal Consensus Statement on Leptospirosis: Diagnosis, Epidemiology, Treatment, and Prevention. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, p. 1-13, 2011.

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

TATSCH, E.; BOCHI, G. V.; PEREIRA, R. da S.; KOBER, H.; AGERTT, V. A.; de CAMPOS, M. M.; GOMES, P.; DUARTE, M. M.; MORESCO, R. N. A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate. **Clinical Biochemistry**, v. 44, p. 348-350, 2011.

TROY, G. C.; FORRESTER, S. D. Canine ehrlichiosis. GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: Saunders, 1990: 404-418.

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

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

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. de F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. da S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VILLAESCUSA, A.; GARCÍA-SANCHO, M.; RODRÍGUEZ-FRANCO, F.; TESOURO, M.; SAINZ, Á. Effects of doxycycline on haematology, blood chemistry and peripheral blood lymphocyte subsets of healthy dogs and dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*. **The Veterinary Journal**, v. 204, p. 263-268, 2015.

WADE, C. E.; LINDBERG, J. S.; COCKRELL, J. L.; LAMIELL, J. M.; HUNT, M. M.; DUCEY, J.; JURNEY, T. H. Upon- admission adrenal steroidogenesis is adapted to the degree of illness in intensive care unit patients. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 67, p. 223- 227, 1988.

WAJNER, S. M.; MAIA, A. L. New Insights toward the acute non-thyroidal illness syndrome. **Frontiers in Endocrinology**, v. 3, p. 1-7, 2012. <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2012.00008>.

WITKO-SARSAT, V.; FRIEDLANDER, M.; NGUYEN KHOA, T.; CAPELLÈRE-BLANDIN, C.; NGUYEN, A. T.; CANTELOUP, S.; DAYER, J. M.; JUNGERS, P.; DRÜEKE, T.; DESCAMPS-LATSCHA, B. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in a chronic renal failure. **The Journal of Immunology**, n. 161, p. 2524-2532, 1998.

ZYGNER, W.; GÓJSKA-ZYGNER, O.; BASKA, P.; DŁUGOSZ, E. Low T3 syndrome in canine babesiosis associated with increased serum IL-6 concentration and azotaemia. **Veterinary Parasitology**, v. 211, p. 23-27, 2015.

APÊNDICE

APÊNDICE A. Valores de referência dos parâmetros hematológicos e hormonais utilizados neste estudo, para a espécie canina. Jaboticabal, 2015.

Hemácias[†]	5.500 – 8.500 x10 ³ /μL
Hemoglobina[†]	12 – 18 g/dL
Hematócrito[†]	37 – 55%
Leucócitos[†]	6.000 – 18.000/μL
Plaquetas[†]	180.000 – 400.000/μL
Cortisol pré-ACTH^{††}	5 – 60 ng/mL
Cortisol pós-ACTH^{††}	60 – 170 ng/mL
T4 livre por diálise^{††}	0,8 – 3,0 ng/mL
T4 total^{††}	15 – 30 ng/mL
TSH^{††}	0,05 – 0,50 ng/mL
TgAA^{††}	<20% negative 20 – 35% inconclusivo >35% positive

[†] Referências do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp/Jaboticabal.

^{††} Referências do BET Laboratories, Rio de Janeiro – RJ – Brasil.

ACTH: hormônio adrenocorticotrópico; T4: tetraiodotironina; TSH: hormônio estimulador da tireoide; TgAA: anticorpos anti-tireoglobulina.

APÊNDICE B. Apresentação de dados individuais (idade, sexo, sinais clínicos e sugestão de fase da doença) dos cães dos grupos I, II e III. Jaboticabal, 2015.

Grupo	Cão	Idade (anos)	Sexo	Sinais e achados clínicos	Sugestão de fase de doença
I	1	3	M	X	Hígido
	2	6	F	X	Hígido
	3	8	M	X	Hígido
	4	5	F	X	Hígido
	5	4	M	X	Hígido
	6	1,5	F	X	Hígido
II	1	5	M	X	Subclínica
	2	5	F	Ixodidiose, uveíte	Aguda
	3	6	M	Anorexia, êmese, ixodidiose, uveíte	Aguda
	4	5	M	Emaciação, êmese, febre, fezes pastosas, hiporexia	Aguda
	5	1	M	Apatia, febre, hiporexia	Aguda
	6	1,5	F	Esplenomegalia	Aguda
III	1	7	F	X	Subclínica
	2	1,5	F	Emaciação, esplenomegalia, hiporexia, ixodidiose, uveíte,	Aguda
	3	4	F	Emaciação; contactante em tratamento para erliquiose	Aguda
	4	6	F	Anorexia, apatia, esplenomegalia, fezes pastosas	Aguda
	5	5	M	Esplenomegalia	Aguda
	6	6	M	Apatia, hematoquezia, hiporexia, oligodipsia	Aguda

F: fêmea; M: macho; X: assintomáticos.

APÊNDICE C1. Valores das contagens de hemácias, concentração de hemoglobina, hematócrito, contagem de leucócitos e de plaquetas dos cães dos grupos I, II e III, nos tempos experimentais D0, D15 e D40. Jaboticabal, 2015.

Grupo	Cão	Hemácias ($\times 10^3/\mu\text{L}$)			Hemoglobina (g/dL)			Hematócrito (%)			Leucócitos ($/\mu\text{L}$)			Plaquetas ($/\mu\text{L}$)		
		D0	D15	D40	D0	D15	D40	D0	D15	D40	D0	D15	D40	D0	D15	D40
I	1	7.590	7.590	7.590	17,7	17,7	17,7	50,6	50,6	50,6	10.600	10.600	10.600	235.000	235.000	235.000
	2	7.240	7.240	7.240	18,3	18,3	18,3	53,2	53,2	53,2	4.500	4.500	4.500	212.000	212.000	212.000
	3	6.400	6.400	6.400	15,2	15,2	15,2	44,9	44,9	44,9	5.600	5.600	5.600	284.000	284.000	284.000
	4	7.440	7.440	7.440	17,8	17,8	17,8	51,1	51,1	51,1	10.800	10.800	10.800	171.000	171.000	171.000
	5	6.820	6.820	6.820	16	16	16	47,4	47,4	47,4	4.600	4.600	4.600	246.000	246.000	246.000
	6	7.200	7.200	7.200	17,6	17,6	17,6	48,8	48,8	48,8	12.700	12.700	12.700	417.000	417.000	417.000
II	1	7.080	7.550	7.700	18,1	18,3	18,5	51,7	52,5	53,4	13.200	12.800	15.500	125.000	186.000	230.000
	2	7.440	7.510	8.050	16,7	17,3	18,2	48,5	44,4	53,5	11.200	8.700	9.100	140.000	261.000	217.000
	3	5.080	6.440	6.650	11,3	15	15,8	32,3	42,3	43,9	3.200	6.500	6.400	113.000	408.000	259.000
	4	5.380	6.630	6.570	12,5	14,3	15,4	36	45,8	45,1	4.300	7.000	6.500	64.000	390.000	313.000
	5	6.490	7.080	7.390	15,3	17,2	18	45,3	48,8	50,7	4.300	8.900	11.000	74.000	300.000	392.000
	6	6.660	6.270	8.050	16,8	16,1	17,5	46,2	42,8	54,5	5.900	5.200	6.100	60.000	161.000	270.000
III	1	7.330	7.990	6.150 [†]	17,9	18,9	14,5 [†]	52,5	55,4	42,7 [†]	6.000	6.700	11.300 [†]	44.000	50.000	192.000 [†]
	2	5.060	6.260	7.460	11,4	14,1	16,9	34,8	42,4	49,3	4.300	6.900	9.900	59.000	131.000	270.000
	3	4.690	6.220	6.710	11,6	14,4	15,9	33,2	42,4	46,3	3.000	6.500	3.300	158.000	222.000	268.000
	4	6.100	6.160	6.990	13	13,8	15,3	43	40,5	46,2	4.500	6.400	5.600	71.000	211.000	318.000
	5	4.520	5.840	6.940 [†]	9,8	13	15,3 [†]	31,3	39,1	44,8 [†]	4.000	7.000	6.800 [†]	84.000	141.000	242.000 [†]
	6	6.190	5.590	7.210	13,4	13,3	16,4	39,1	35,9	46	4.600	6.300	7.400	120.000	169.000	244.000

[†] Parâmetros hematológicos obtidos aos 70 dias de avaliação (40 dias após tratamento); D0: dia zero de avaliação; D15: dia quinze de avaliação; D40: dia quarenta de avaliação.

APÊNDICE C2. Valores das concentrações de T4 livre por diálise, T4 total, TSH e TgAA dos cães dos grupos I, II e III, nos tempos experimentais D0 e D40. Jaboticabal, 2015.

Grupo	Cão	T4 livre por diálise (ng/mL)		T4 total (ng/mL)		TSH (ng/mL)		TgAA (%)	
		D0	D40	D0	D40	D0	D40	D0	D40
I	1	1,32	1,32	38,3	38,3	0,05	0,05	13	13
	2	0,83	0,83	26,3	26,3	0,03	0,03	8	8
	3	1,24	1,24	26,3	26,3	0,11	0,11	15,2	15,2
	4	1,09	1,09	17,9	17,9	0,41	0,41	5	5
	5	0,96	0,96	14	14	0,11	0,11	5	5
	6	1,1	1,1	21,5	21,5	0,19	0,19	11	11
II	1	1,08	1,44	28,9	19	0,08	0,1	17	13
	2	1,19	1,52	26	23,4	0,08	0,09	35	21
	3	0,72	1,54	8	24,4	0,03	0,03	28	9
	4	1,23	1,5	18,4	27,7	0,03	0,03	32	7
	5	1,37	0,96	19,6	16,5	0,09	0,16	18	11
	6	1,56	1,91	29,9	28,9	0,04	0,04	6	9
III	1	1,42	1,55	17	19	0,08	0,06	16	10
	2	1,03	1,05	11,8	20,4	0,11	0,09	19	9
	3	1,25	1,66	23,8	26	0,09	0,08	14	8
	4	0,84	1,28	9,3	20,8	0,03	0,16	9	10
	5	1,12	0,97	15	14,6	0,4	0,33	13	10
	6	1,54	1,37	21,6	24,2	0,14	0,06	9	10

D0: dia zero de avaliação; D40: dia quarenta de avaliação; T4: tetraiodotironina; TSH: hormônio estimulador da tireoide; TgAA: anticorpos anti-tireoglobulina.

APÊNDICE C3. Valores das concentrações de NOx, AOPP e FRAP dos cães dos grupos I, II e III, nos tempos experimentais D0 e D40. Jaboticabal, 2015.

Grupo	Cão	NOx ($\mu\text{mol/L}$)		AOPP ($\mu\text{mol/L}$)		FRAP ($\mu\text{mol/L}$)	
		D0	D40	D0	D40	D0	D40
I	1	35,8	35,8	67,2	67,2	563	563
	2	24,1	24,1	54,6	54,6	389	389
	3	32,9	32,9	59,3	59,3	456	456
	4	26,1	26,1	53,7	53,7	523	523
	5	31,0	31,0	68,6	68,6	324	324
	6	23,3	23,3	43,5	43,5	369	369
II	1	150,7	21,7	X	75,3	894	456
	2	47,6	23,0	102	45,2	963	902
	3	59,8	62,7	105,6	X	569	856
	4	40,5	21,8	95,3	43,8	X	589
	5	33,9	25,1	81	45,6	689	X
	6	21,9	27,1	78,6	58,9	X	884
III	1	62,3	24,8	56,7	45,6	695	569
	2	81,2	30,8	123,1	X	X	765
	3	94,1	33,6	93,1	56,9	783	741
	4	32,1	19,8	100,3	58,6	X	X
	5	79,6	16,6	X	79,6	691	784
	6	45,3	54,3	X	X	1002	962

X: análise não realizada; NOx: óxido nítrico; AOPP: produto proteico de oxidação avançada; FRAP: poder redutor dos íons ferro; D0: dia zero de avaliação; D40: dia quarenta de avaliação.

APÊNDICE C4. Valores das concentrações de cortisol e DHEA-S dos cães dos grupos I, II e III, nos tempos experimentais D0 e D40, nos momentos pré e pós a administração de ACTH. Jaboticabal, 2015.

Grupo	Cão	Cortisol (ng/mL)				DHEA-S (µg/mL)			
		D0		D40		D0		D40	
		Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
I	1	13	84,3	13	84,3	0,084	0,06	0,084	0,06
	2	8,9	148	8,9	148	0	0	0	0
	3	15,2	110,9	15,2	110,9	0,007	0	0,007	0
	4	14,1	127,8	14,1	127,8	0,065	0,052	0,065	0,052
	5	8,4	133	8,4	133	0,021	0,01	0,021	0,01
	6	14,3	81,1	14,3	81,1	0,021	0,015	0,021	0,015
II	1	7,4	75,3	43,1	117,1	0	0,023	0,01	0
	2	15,3	127,3	15	125,2	0	0	0	0,008
	3	22,3	133,3	18,1	133,2	0,131	0,194	0,042	0,025
	4	60,3	190,1	46,7	141	0,065	0,131	0,065	0,076
	5	110,3	192,7	76,1	101,1	0	0	0	0
	6	11,1	125,2	48,2	128,3	0	0	0,005	0
III	1	10	166,7	12,1	178,1	0	0	0,026	0,023
	2	10,1	105,2	10,2	127,2	0,031	0,026	0	0
	3	18,2	117,2	26,1	135,1	0	0,007	0	0
	4	68,1	176,2	8,5	132,7	0	0,057	0	0
	5	28,7	111,2	34,2	88,3	0,073	0,052	0,131	0,094
	6	14,2	122,1	13,2	112,2	0	0,031	0	0

DHEA-S: sulfato de dehidroepiandrosterona; D0: dia zero de avaliação; D40: dia quarenta de avaliação; ACTH: hormônio adrenocorticotrófico.

APÊNDICE D1. Tabela da análise de variância dos parâmetros hematológicos.

Parâmetros hematológicos						
Valores de P para as variáveis						
Fonte de variação	Grau de liberdade	Hemácias	Hemoglobina	Hematócrito	Leucócitos	Plaquetas
Grupo	2	0,0487	0,02	0,0312	0,419	0,048
Erro	15	0,0051	0,0001	0,002	<,0001	<,0001
Tempo	2	0,0007	0,001	0,004	0,0021	<,0001
Grupo X tempo	4	0,0722	0,0759	0,181	0,093	<,0001
R ²		0,76	0,83	0,76	0,90	0,88
C.V. (%)		7,89	7,50	8,20	17,69	20,98

APÊNDICE D2. Tabela da análise de variância dos parâmetros tireoideanos.

Parâmetros tireoideanos					
Valores de P para as variáveis					
Fonte de variação	Grau de liberdade	T4 livre	T4 total	TSH	TgAA
Grupo	2	0,15	0,31	0,36	0,034
Erro	15	0,056	0,005	<,0001	0,074
Tempo	1	0,057	0,19	0,88	0,005
Grupo X tempo	2	0,22	0,46	0,57	0,02
R ²		0,77	0,83	0,96	0,82
C.V. (%)		15,84	19,90	27,80	35,91

APÊNDICE D3. Tabela da análise de variância dos parâmetros de estresse oxidativo (NOx).

Parâmetros estresse oxidativo		
Valores de P para a variável		
Fonte de variação	Grau de liberdade	NOx[†]
Grupo	2	0,13
Erro	15	0,51
Tempo	1	0,007
Grupo X tempo	2	0,11
R ²		0,69
C.V. (%)		11,54

[†]Variável transformada em log (observação).

APÊNDICE D4. Tabela da análise de variância dos parâmetros de estresse oxidativo (AOPP e FRAP).

Parâmetros estresse oxidativo			
Valores de P para a variável			
Fonte de variação	Grau de liberdade	AOPP[†]	FRAP[†]
Grupo	2	0,64	0,048
Erro	14	0,49	0,54
Tempo	1	0,63	0,50
Grupo X tempo	2	0,19	0,40
R ²		0,65	0,70
C.V. (%)		20,22	7,05

[†]Variável transformada em log (observação).

APÊNDICE D5. Tabela da análise de variância dos parâmetros adrenais.

Parâmetros adrenais			
Fonte de variação	Grau de liberdade	Valores de P para a variável	
		Cortisol[†]	DHEA-S^{††}
Grupo	2	0,02	0,91
Erro (cão)	15	0,14	<,0001
Tempo	1	0,94	0,01
Grupo X tempo	2	0,53	0,003
Erro (Grupo X Tempo)	15	0,38	<,0001
Momento	1	<,0001	0,71
Tempo X momento	1	0,66	0,02
Grupo X momento	2	0,02	0,03
Grupo X tempo X momento	2	0,41	0,23
R ²		0,92	0,95
C.V. (%)		11,6	47,56

[†] Variável transformada em log (observação).

^{††} Variável transformada em log (observação +1).