

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE PATOS - PB**

MONOGRAFIA

**Influência do tratamento com doxiciclina associada ou não à prednisolona sobre os
parâmetros hematológicos e proteinograma sérico de cães com erliquiose**

Ariana de Castro Tavares da Silva

Patos, 2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE PATOS - PB**

MONOGRAFIA

**Influência do tratamento com doxiciclina associada ou não à prednisolona sobre os
parâmetros hematológicos e proteinograma sérico de cães com erliquiose**

Ariana de Castro Tavares da Silva
Graduanda

Prof. Dr. Almir Pereira de Souza
Orientador

Patos-PB
Abril de 2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSRT DA UFCG

S586i Silva, Ariana de Castro Tavares da

Influência do tratamento com doxiciclina associada ou não à prednisolona sobre os parâmetros hematológicos e proteinograma sérico de cães com erliquiose / Ariana de Castro Tavares da Silva. – Patos, 2016.
37f.:

Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2016.

‘Orientação: Prof. Dr. Almir Pereira de Souza’

Referências.

1. Proteína. 2. Hemoparasitose. 3. Carrapato. 4. Imunoglobulinas.

I. Título.

CDU 616:619

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA

ARIANA DE CASTRO TAVARES DA SILVA
Graduanda

Monografia submetida ao curso de Medicina Veterinária como requisito parcial para a obtenção do grau de Médica Veterinária.

APROVADA EM/...../.....

MÉDIA: _____

BANCA EXAMINADORA

_____ Prof. Dr. Almir Pereira de Souza Orientador	_____ Nota
_____ Prof ^ª . Dr ^ª . Rosangela Maria Nunes da Silva Examinador I	_____ Nota
_____ Prof. Dr. Antônio Fernando de Melo Vaz Examinador II	_____ Nota

DEDICATÓRIA

Aos meus amores, Ayron, Rômulo e minha mãe (Átila).

AGRADECIMENTOS

À minha família (minhas tias, tios e minha amada avó Rivanda), pelo imenso apoio e motivação em todos os momentos, serei eternamente grata.

À minha mãe, sua força e independência sempre foram minha inspiração, eu não teria conseguido sem você até aqui!

Ao meu amor, Rômulo, por ser um companheiro incrível e um pai tão amoroso e por ter me apresentado um mundo novo nesse curso e ter escolhido fazer parte dele comigo, mesmo com todas as dificuldades.

À minha família de Patos/PB, Marta (Tita), Isabela (Bela), Jade (Jadoca), Camila, Suelton e Aline, vocês foram uma fonte constante de alegria e amizade sincera e tornaram essa longa caminhada muito mais agradável.

Ao meu orientador, professor Almir Pereira de Souza, pelas oportunidades e importante contribuição nesta caminhada profissional.

Ao Laboratório de Patologia Clínica do HV/UFCG e aos residentes Talles Monte de Almeida, Eduardo de Melo e Laura Honório de Oliveira pelo tempo disponibilizado e todo auxílio e orientação na realização dos exames.

À médica veterinária Rosileide Carneiro e aos dedicados residentes da Clínica Médica de Pequenos Animais/UFCG, Aline de Sousa, Raquel Ximenes, Angélica da Silva, Carolina Barbosa e Roana Cecília pela disponibilidade e auxílio nas atividades realizadas na clínica.

Ao residente Sávio Martins, por todo o tempo dedicado a ajudar na realização deste trabalho, pela paciência e orientação dedicados aos estagiários e pelo exemplo de profissionalismo e ética que tornaram a experiência do estágio tão enriquecedora.

Aos funcionários do Hospital Veterinário da UFCG, em especial ao atencioso e solícito sr. Dinho.

À professora Márcia Almeida de Melo, por ter disponibilizado o Laboratório de Biologia Molecular/UFCG para a realização das análises.

Ao professor Fernando de Melo Vaz, pelo comprometimento em todas as etapas finais deste trabalho e pela enorme paciência no esclarecimento de todas as dúvidas.

Aos pós-graduandos Atticus Tanikawa e Vanessa Lira, sua contribuição ao longo desse trabalho foi essencial.

A todos os pacientes caninos que eu tive o prazer de acompanhar e seus tutores, que contribuíram muito para a realização das coletas.

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	
ABSTRACT	
1 INTRODUÇÃO	09
2 REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 AGENTE ETIOLÓGICO.....	10
2.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	10
2.3 FISIOPATOLOGIA.....	11
2.4 ASPECTOS CLÍNICOS.....	13
2.4.1 Fase aguda	13
2.4.2 Fase subclínica	14
2.4.3 Fase crônica	14
2.5 DIAGNÓSTICO.....	15
2.6 TRATAMENTO COM DOXICICLINA E ASSOCIAÇÕES.....	15
2.7 PROTEINOGRAMA SÉRICO.....	16
2.7.1 Proteínas séricas	16
2.7.2 Eletroforese de proteínas	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 SELEÇÃO DOS ANIMAIS.....	20
4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	20
4.3 MOMENTOS DE AVALIAÇÕES.....	20
4.4 ANÁLISES LABORATORIAIS.....	21
4.4.1 Hemograma	21
4.4.2 Bioquímica Sérica	21
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	22
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
6 CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS	31
ANEXOS	37

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 - Médias e coeficientes de variação dos valores do eritrograma e plaquetograma do grupo de animais tratados com cloridrato de doxiciclina (GD) e grupo tratado com doxiciclina associado a prednisolona (GDP), em função dos momentos de tratamento (M0, M10, M21 e M28) em cães diagnosticados com erliquiose, no Hospital Veterinário da UFCG.....	24
Tabela 2 – Médias e coeficientes de variação dos valores do leucograma do grupo de animais tratados com cloridrato de doxiciclina (GD) e grupo tratado com doxiciclina associado a prednisolona (GDP), em função dos momentos de tratamento (M0, M10, M21 e M28) em cães diagnosticados com erliquiose, no Hospital Veterinário da UFCG.....	26
Tabela 3 – Médias, coeficientes de variação e desvios-padrão dos valores do proteinograma sérico do grupo de animais tratados com cloridrato de doxiciclina (GD) e grupo tratado com doxiciclina associado a prednisolona (GDP), em função dos momentos de tratamento (M0, M10, M21 e M28) em cães diagnosticados com erliquiose, no Hospital Veterinário da UFCG.....	27

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 - Representação gráfica de tendência logarítmica das médias do GD e GDP, em cada momento de avaliação (M0, M10, M21 e M28) em cães diagnosticados com erliquiose, no Hospital Veterinário da UFCG.....	24

RESUMO

SILVA, ARIANA DE CASTRO TAVARES DA. **Influência do tratamento com doxiciclina associada ou não à prednisolona sobre os parâmetros hematológicos e proteinograma sérico de cães com erliquiose.** Monografia. Patos, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). 2016. 37p.

Objetivou-se com este estudo avaliar comparativamente os efeitos do tratamento com cloridrato de doxiciclina associada ou não à prednisolona sobre o perfil hematológico e de proteínas séricas de cães diagnosticados com *Ehrlichia canis* em diferentes momentos. Foram selecionados, na Clínica Médica de Pequenos Animais/Hospital Veterinário/UFCG, 10 cães diagnosticados com erliquiose através de exame clínico, hemograma e teste de imunoenensaio imunocromatográfico (com anticorpos anti *Ehrlichia canis*), que foram distribuídos em dois grupos experimentais, com cinco animais cada (n=5), denominados GD e GDP. O grupo GD foi tratado com doxiciclina (5 mg/kg, VO, BID durante 28 dias) e o grupo GDP foi tratado com doxiciclina na mesma dose e duração do GD e prednisolona (2 mg/kg, VO, BID, durante 5 dias). Os animais do grupo GDP foram escolhidos em função da intensidade de suas alterações hematológicas. Durante o período de tratamento, os cães foram submetidos a 4 coletas de sangue, uma coleta basal (M0), 10 dias (M10), 21 dias (M21) e ao final do tratamento (M28). A partir das amostras de sangue total e soro coletadas nos diferentes momentos foram realizados eritrograma, leucograma, plaquetograma e proteinograma (dosagem de proteínas totais, pré-albumina, albumina, alfa 1, alfa 2, beta e gama globulinas e proteína C-reativa), no Laboratório de Patologia Clínica/Hospital Veterinário/UFCG. Os resultados que apresentaram distribuição normal foram submetidos ao teste de Tukey ($p < 0,05$). Ao comparar os tratamentos GD e GDP, observou-se que os dois promoveram resposta discreta e semelhante dos parâmetros hematológicos nos diferentes momentos. Trombocitopenia foi observada em ambos os grupos, embora o GDP tenha demonstrado melhor resposta ao tratamento, apresentando curva de tendência crescente das médias. Em relação ao leucograma, embora alguns parâmetros tenham apresentado diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos, todos os valores estavam dentro dos valores de referência, exceto pela linfopenia nos cães do GDP, fato esperado devido à ação do glicocorticoide. Em relação ao proteinograma não se observou efeito do tratamento GDP ($p > 0,05$) sobre os diferentes momentos, contudo os valores de proteínas totais e globulinas que estavam acima dos valores de referência no início do tratamento retornaram aos valores de normalidade. Os resultados obtidos permitem concluir que ambos os protocolos terapêuticos resultaram em melhora clínica e dos parâmetros hematológicos e do proteinograma, porém, o uso da Prednisolona não demonstrou efeitos mais benéficos do que a administração isolada da doxiciclina.

Palavras-chave: Proteína, hemoparasitose, carrapato, imunoglobulinas

ABSTRACT

SILVA, CASTRO ARIANA TAVARES DA. **Influence of treatment with Doxycycline or not associated to Prednisolone on haematological and serum proteinogram of dogs with ehrlichiosis.** Patos, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). 2016. 37p.

The objective of this study was evaluate comparatively the effects of treatment with doxycycline hydrochloride associated or not with prednisolone on the haematological parameters and serum proteins in dogs diagnosed with *Ehrlichia canis* at different times. In Small Animal Medical Clinic/Veterinary Hospital/ UFCG, 10 dogs diagnosed with ehrlichiosis by clinical examination, blood tests and serology test, (with antibodies anti Ehrlichia canis) were selected and assigned into two groups, with five animals each, denominated GD and GDP. The GD group was treated with doxycycline (5 mg / kg P.O. BID for 28 days) and the GDP group was treated with doxycycline using the same dose e period, associated to prednisolone (2mg/kg P.O. BID for 5 days). During the treatment period, blood samples were collected at different times, day 0 (M0), with 10 days (M10), one with 21 days (M21) and the other in conclusion of treatment with 28 days (M28). From the blood samples and serum collected at different times were performed erythrogram, leukogram, platelet count and proteinogram (dosage of total proteins, prealbumin, albumin, alpha 1, alpha 2, beta and gamma globulins and C-reactive protein), in the Clinical Pathology Laboratory/ Veterinary Hospital/UFCG. The results with normal distribution were submitted to Tukey test ($p < 0.05$). By comparing the GD and GDP treatments, it was observed that both treatments promoted a discrete and similar response of haematological parameters in the different moments. Thrombocytopenia was observed in both groups, but the GDP has demonstrated better response to treatment, with tendency curve increasing of the average. In the leukogram, although some parameters have presented statistical difference ($p < 0.05$) between the groups, all the values were within the reference values, except for lymphopenia observed in GDP treatment, fact expected due to glucocorticoid action. In the proteinogram, no effect was observed in GDP treatment ($p > 0.05$) on the different times, but the total protein and globulin values that were above the reference values at the start of treatment, returned to reference value. The results showed that both treatment protocols resulted in improvement of clinical, hematological and proteinogram parameters, however, the use of Prednisolone has not shown more benefits than the separate administration of doxycycline.

Key-words: Protein, hemoparasitosis, tick, immunoglobulins

1 INTRODUÇÃO

A erliquiose monocítica canina (EMC) é uma doença infecciosa severa, causada por bactérias do gênero *Ehrlichia*. No Brasil, a doença foi descrita pela primeira vez em 1973 por Costa et al. (1973) e apresenta-se distribuída em todas as regiões do país. Isto se deve, principalmente, ao seu vetor, o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. Trata-se de uma das enfermidades mais importantes em cães, representada por aproximadamente 20% a 30% dos casos atendidos em hospitais e clínicas veterinárias no Brasil (TRAPP et al., 2002; AGUIAR, 2006). No município de Patos-PB, foi observada uma ocorrência variando de 69,4% (TANIKAWA et al., 2012) a 72,5% (AZEVEDO et al., 2011). É indiscutível a relevância dessa patologia na rotina de clínica médica, devido à alta casuística, que está relacionada à exposição cada vez maior dos cães aos locais com a presença do vetor, à elevada morbimortalidade promovida pela infecção e à inexistência de vacina.

A doença é multissistêmica, sendo classificada em aguda, subclínica ou crônica, de acordo com as alterações clínicas (WOODY; HOSKINS, 1991). Os sinais clínicos da erliquiose são inespecíficos, o que pode levar a doença a ser confundida com outras enfermidades e desta forma ser subdiagnosticada, sendo este um fator de risco para os animais doentes. Em geral, os cães apresentam sinais que incluem depressão, perda de peso, anorexia, febre, linfadenopatia e tendência a hemorragias (HARRUS et al., 1996), podendo em casos mais crônicos e graves, apresentar desde significativa perda de peso, mucosas pálidas, fraqueza, até manifestações neurológicas como consequência de meningite e/ou hemorragia meningeal.

A doxiciclina é a droga de predileção para o tratamento da EMC, tendo sido bem documentada sua eficácia no tratamento de cães infectados por *Ehrlichia canis*. É comum na clínica médica de pequenos animais, a utilização de glicocorticoide em doses imunossupressoras como adjuvante no tratamento nos casos em que a hematologia indique destruição imunomediada de plaquetas e hemácias.

As proteínas séricas participam ativamente de processos inflamatórios, em reações imunomediadas e na formação de imunocomplexos. Considerando a inexistência de trabalhos avaliando o perfil dessas proteínas no processo patológico da erliquiose em cães tratados com doxiciclina em associação a glicocorticoides em doses imunossupressoras, objetivou-se com este estudo avaliar o perfil hematológico e de proteínas séricas de cães diagnosticados com *Ehrlichia canis* em diferentes momentos, tratados com dois protocolos terapêuticos à base de cloridrato de doxiciclina e doxiciclina associado à prednisolona.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Agente etiológico

A erliquiose monocítica canina (EMC) é uma doença causada por bactérias gram-negativas, pleomórficas, parasitas intracelulares obrigatórias, que se apresentam individualmente ou, mais frequentemente, em inclusões compactas (mórulas). Três organismos estão associados à infecção no cão, são eles *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis* e *Neorickettsia risticii* variante *atypicalis*. A *E. chaffeensis* é a responsável pela erliquiose mononuclear humana e a *Neorickettsia risticii* variante *atypicalis*, associada à erliquiose monocítica equina. A infecção por *E. canis* é a mais comum e causa doença clínica mais grave. Sua ação no organismo afeta células hematopoiéticas maduras ou imaturas, especialmente do sistema fagocitário mononuclear, tais como monócitos e macrófagos (DUMLER et al., 2001; NELSON; COUTO, 2010).

2.2 Aspectos Epidemiológicos

A infecção causada por bactérias do gênero *Ehrlichia* (família *Anaplasmataceae*), pode ser observada em várias espécies de animais domésticos e silvestres, inclusive o homem (COHN, 2003). Perez (2006) relatou a infecção sintomática por *E. canis* em seis pacientes humanos através da reação em cadeia pela polimerase (PCR), confirmando o potencial deste agente em causar infecções zoonóticas.

Nos cães, a *E. canis* (DUMLER et al., 2001) é a principal bactéria causadora da EMC. Essa hemoparasitose é transmitida a partir do vetor *Rhipicephalus sanguineus* (*R. sanguineus*) (família Ixodidae), conhecido como carrapato marrom do cão (DANTAS-TORRES, 2008). A infecção do cão sadio se dá no momento do repasto sanguíneo de larvas, ninfas ou adultos dos carrapatos infectados (MONTEIRO, 2014). Cães que receberam transfusão de doadores cronicamente infectados por até 5 anos também podem adquirir a *E. canis* (BREITSCHWERDT, 2004).

A ocorrência de anticorpos anti-*E. canis* em caninos, foi determinada em estudos realizados em vários estados do Brasil. Azevedo et al. (2011) no município de Patos, Paraíba, observaram uma ocorrência de 72,5% de animais positivos para *E. canis* através de diagnóstico sorológico. Em pesquisa mais recente realizada no mesmo município, foi demonstrado uma ocorrência de 69,4% de positividade dentre os 108 cães avaliados, através

da técnica de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (TANIKAWA et al., 2012). Em Teresina, Piauí no Nordeste do Brasil, Silva et al. (2010) analisaram amostras de 270 cães através de PCR, apresentando resultados positivos para o DNA erliquial em 29,63% dos animais. Em Ituberá, na Bahia, de 379 cães submetidos a avaliação molecular (PCR), 25,6% foram identificados como positivos (GUEDES et al., 2015).

De acordo com o que foi relatado por Sousa et al. (2010), não se observa diferença estatística significativa quanto à ocorrência da *E. canis* em cães quanto à faixa etária e ao gênero. Entretanto, foi sugerido por Baneth et al. (2006); Sousa et al. (2010); Tanikawa et al., (2012) uma maior prevalência em cães adultos e idosos, associado ao maior tempo de exposição destes ao vetor e maior suscetibilidade dos cães idosos.

2.3 Fisiopatologia

A primeira da fase da infecção inicia-se com a entrada e multiplicação dos corpos elementares em monócitos através de fissão binária. Nos primeiros três dias pós infecção, a multiplicação resulta no desenvolvimento de estruturas compactas, chamadas de corpúsculos iniciais. Sete a doze dias após a infecção, os corpúsculos iniciais desenvolvem-se, formando as mórulas. No interior das mórulas encontram-se vários corpos elementares, que são liberados na corrente sanguínea após lise ou exocitose da célula, disseminando-os pelo organismo do hospedeiro num intervalo de oito a vinte dias, tempo que corresponde ao período de incubação (ALMOSNY, 2002; GREENE, 2006).

Após o período de incubação, o cão infectado entra na fase aguda da erliquiose, que dura cerca de duas a quatro semanas (NELSON; COUTO, 2010). Somente nesta fase o cão é infectante, pois existe uma quantidade importante de hemoparasitos no sangue (MONTEIRO, 2014). Durante esse período, o microrganismo multiplica-se dentro das células mononucleares circulantes e dos tecidos fagocitários mononucleares do fígado, baço e linfonodos, resultando em linfadenomegalia e hiperplasia linforreticular do fígado e do baço. As células infectadas são transportadas pelo sangue para outros órgãos do corpo, especialmente pulmões, rins e meninges, e aderem-se ao endotélio vascular, induzindo vasculite e infecção tecidual subendotelial.

O consumo, o sequestro e a destruição das plaquetas parecem contribuir para a trombocitopenia durante a fase aguda, bem como o consumo ou destruição imunomediada (BREITSCHWERDT, 2004; NELSON; COUTO, 2010), possivelmente devido à ligação inespecífica da IgG às plaquetas (TIZARD, 2008). Este é um possível mecanismo para a

ocorrência de petéquias ou outras evidências de sangramento verificadas durante a fase aguda. (NELSON; COUTO, 2010).

É citado entre as principais anormalidades hematológicas durante a fase aguda a presença de leve anemia e leucopenia (HARRUS, 1999). De acordo com Harrus; Waner (2011), um aumento moderado nas enzimas alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA) são com frequência observados em cães durante esta fase.

As principais alterações observadas nos valores de proteínas séricas incluem: hipoalbuminemia, hiperglobulinemia e hipergamaglobulinemia (HARRUS et al., 1996). Segundo Harrus et al. (1999), a hipoalbuminemia pode ser consequência da perda periférica de albumina para fluidos inflamatórios como resultado de alterações na permeabilidade vascular na fase aguda. Na fase crônica pode estar associado a perda glomerular decorrente da deposição de imunocomplexos ou imunoestimulação crônica (SOUSA, 2010). Foi demonstrado existir uma escassa correlação entre as concentrações de gamaglobulinas e títulos de anticorpos específicos para *E. canis* (HARRUS et al., 1996), sendo sugerido que este patógeno induz a produção de anticorpos não específicos e que anticorpos anti-*E. canis* não são a principal fonte de gamaglobulinas contribuindo para a hipergamaglobulinemia (HARRUS et al., 1999). Este fenômeno está associado a doenças com longa estimulação antigênica e sugere uma resposta imune exagerada e pouco efetiva contra *E. canis* (TIZARD, 2008; REARDON; PIERCE, 1981). A hiperglobulinemia, não relacionada à resposta imune humoral contra a *E. canis*, está tipicamente associada com a doença crônica (BREITSCHWERDT, 2004).

A fase subclínica dura de meses a anos em cães naturalmente infectados (NELSON; COUTO, 2010). Os cães nesta fase podem ser carreadores da *E. canis* por anos sem desenvolver a forma crônica da doença, e alguns cães (provavelmente imunocompetentes) podem eliminar o parasita e se recuperar da doença sem tratamento médico. Trombocitopenia moderada é citada como a principal alteração hematológica nesta fase (HARRUS et al., 1998).

As condições que levam ao desenvolvimento da fase crônica não estão bem esclarecidos, porém, alguns fatores podem estar relacionados, tais como o estado imunológico do animal, condições de estresse, co-infecção com outros parasitas, a cepa do patógeno ou infecções persistentes (HARRUS et al., 1997). Nesta fase, os animais podem apresentar-se caquéticos, apáticos e com suscetibilidade a infecções secundárias pelo comprometimento da imunidade. A trombocitopenia observada se deve ao decréscimo na produção de plaquetas

devido a hipoplasia da medula óssea (WOODY; HOSKINS, 1991). Os fatores que predisõem à mielofibrose ainda não estão esclarecidos (SHAW et al., 2001).

Hepatomegalia, esplenomegalia e linfadenomegalia são decorrentes da estimulação imune crônica e são detectadas com mais frequência em cães durante esta fase da doença. Usualmente, é possível observar mucosas pálidas devido ao desenvolvimento da pancitopenia. Em alguns cães com erliquiose, mecanismos como edema intersticial ou alveolar, secundários à vasculite ou à inflamação; hemorragia pulmonar parenquimal, secundária à vasculite ou à trombocitopenia ou infecções secundárias decorrentes de neutropenia resultam em dispneia ou tosse (NELSON; COUTO, 2010).

Algumas das manifestações mais severas da doença associadas à infecção crônica, como glomerulonefrite e síndrome da hiperviscosidade, resultam de uma resposta imune humoral exuberante, porém não protetora (HARRUS et al., 1999). Plasmocitose da medula óssea é comum em cães na fase subclínica e crônica da erliquiose e a doença pode ser confundida com mieloma múltiplo, particularmente em cães com gamopatias monoclonais (p.ex., imunoglobulina G) ou policlonais (aumento na concentração de todas as imunoglobulinas), sendo esta última mais comum (NELSON; COUTO, 2010).

2.4 Aspectos Clínicos

A doença clínica decorrente da infecção erliquial pode ocorrer em qualquer cão, mas a gravidade varia de acordo com o organismo, fatores do hospedeiro e presença de co-infecção (NELSON; COUTO, 2010). Com base no aparecimento cronológico dos sinais clínicos e anormalidades clinicopatológicas, podem ser descritas três fases da doença: aguda, subclínica e crônica (RISTIC; HOLLAND, 1993).

2.4.1 Fase aguda

Os sinais clínicos durante a fase aguda da doença variam de depressão, anorexia e febre até grave perda do vigor, perda de peso, corrimentos ocular e nasal, dispneia, linfadenopatia e edema dos membros ou do escroto. Os sinais clínicos dessa fase aguda são transitórios e, em geral, resolvem-se em uma a duas semanas sem tratamento. A trombocitopenia e a leucopenia comumente ocorrem de 10 a 20 dias após a infecção. Apesar da trombocitopenia de moderada a grave, raramente são observadas hemorragias. Uma variedade de sinais do sistema nervoso, incluindo hiperestesia, contorção muscular e déficit

de nervos cranianos, pode ocorrer devido à inflamação ou ao sangramento no interior das meninges (BREITSCHWERDT, 2004).

2.4.2 Fase subclínica

A fase subclínica da infecção ocorre de seis a nove semanas após a inoculação e é caracterizada pela persistência variável de trombocitopenia, leucopenia e anemia na ausência de sinais clínicos (BREITSCHWEDT, 2004). Em estudos, Waner et al. (1997) demonstraram através de Imunofluorescência Indireta (IFI) elevada titulação de anticorpos para *E. canis* em cães subclínicamente infectados, bem como, alterações hematológicas como trombocitopenia, decréscimo na contagem de leucócitos e hipergamaglobulinemia. De acordo com Nelson; Couto (2010), além destas alterações, podem ocorrer ainda hiperglobulinemia, linfocitose e monocitose. Frequentemente não são observados carrapatos nesta fase.

2.4.3 Fase crônica

Os sinais clínicos associados com a fase crônica da doença são discretos e ausentes em alguns cães e graves em outros. Tendência a sangramentos, palidez devido à anemia, perda de peso acentuada, debilidade, sensibilidade abdominal, uveíte anterior, hemorragias retiniais e sinais neurológicos compatíveis com meningoencefalite caracterizam os cães que desenvolvem manifestações da doença durante a infecção crônica (BREITSCHWERDT, 2004). Nesta fase, usualmente ocorre grave trombocitopenia com marcada anemia e leucopenia. A pancitopenia devido à hipoplasia da medula óssea é um marcador da forma crônica severa (HARRUS et al., 1997). Outros sinais clínicos estão relacionados a complicações secundárias à infecção crônica, tais como glomerulonefrite ou infecções secundárias devido à pancitopenia (COHN, 2003). O quadro de hipoalbuminemia pode estar associado à nefropatia (deposição de imunocomplexos), com perda de proteína ou diminuição recíproca na albumina associada com a hiperglobulinemia (BREITSCHWERDT, 2004). Frank; Breitschwerdt (1999) demonstraram aumento das enzimas fosfatase alcalina (FA) e alanina aminotransferase (ALT), e em uma pequena porcentagem dos casos, azotemia.

2.5 Diagnóstico

O diagnóstico da erliquiose canina exige a visão das mórulas, a detecção dos anticorpos contra a *E. canis* ou amplificação do DNA do patógeno por meio da PCR. As mórulas, inclusões intracelulares compostas de aglomerados de microrganismos riquetsianos, ocasionalmente são observadas nos esfregaços sanguíneos durante a fase inicial da infecção, mas raramente em associação com infecção crônica (BREITSCHWERDT, 2004). O exame do esfregaço da camada leucoplaquetária ou esfregaço sanguíneo realizado com sangue periférico proveniente de vasos auriculares marginais podem aumentar a chance de localizar a mórula. Pode-se realizar cultura de algumas *Ehrlichia* spp., mas o procedimento é custoso, com baixa produtividade e, portanto, não é útil para a clínica. Somente a detecção de anticorpos não é suficiente para permitir o estabelecimento do diagnóstico de erliquiose porque há reação cruzada entre os anticorpos para *E. canis*, *N. helminthoeca* e *E. ruminantium* e porque alguns cães podem estar subclínicamente infectados (NELSON; COUTO, 2010).

Usualmente, o diagnóstico de erliquiose é realizado com base na detecção de anticorpos séricos através da técnica de imunofluorescência indireta (IFI). Em cães experimentalmente infectados com *E. canis*, o teste foi capaz de detectar anticorpos a partir de 7 dias da infecção inicial, porém, alguns cães podem não se tornar soropositivos até 28 dias após a infecção (NEER et al., 2002).

A infecção pela *E. canis* não pressupõe a imunidade protetora; portanto, a exposição subsequente a carrapatos infectados após o tratamento resulta na recidiva da doença, geralmente de menor gravidade. Após a antibioticoterapia anti-riquetsiana, alguns cães tornam-se assintomáticos, mas mantêm altos títulos do anticorpo contra a *E. canis* durante anos (BREITSCHWERDT, 2004).

2.6 Tratamento com doxiciclina e suas associações

A doxiciclina é uma clortetraciclina e apresenta eficácia clínica com poucos efeitos colaterais. Seu mecanismo de ação é semelhante ao das tetraciclina, inibindo a síntese protéica ribossomal, porém, ela apresenta maior eficácia contra microrganismos intracelulares, como é o caso da *Ehrlichia* sp., em razão da sua alta lipossolubilidade, que lhe permite atravessar a membrana celular e atingir o agente infectante no interior da célula (ANDRADE, 2008). Além disso, possui propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras, que resultam da inibição do óxido nítrico sintase induzível e de citocinas

pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral α (TNF- α). Ela não é eliminada pelos mesmos meios das outras tetraciclina e não se acumula no sangue se houver insuficiência renal ou disfunção renal, as doses devem ser reduzidas para se evitar acúmulo sistêmico excessivo. É excretada nas fezes como conjugado inativo ou quelato, portanto, exerce pouco efeito sobre a microbiota gastrointestinal. A presença de alimento não interfere com a absorção da doxiciclina (CORRÊA; CORRÊA, 1992). O Grupo de Estudos de Doenças Infecciosas da Faculdade Americana de Medicina Interna Veterinária (ACVIM) recomenda o uso da doxiciclina na dose de 10mg/kg, por via oral, a cada 24 horas durante pelo menos 28 dias (NEER et al., 2002).

Tanto em humanos como em animais, o uso dos glicocorticoides é, em alguns casos, adotado como forma de diminuir os efeitos de uma resposta imunológica excessiva, que contribui para a patologia da infecção (SYKES, 2013). Na erliquiose monocítica canina (EMC), a recomendação da administração de anti-inflamatórios ou de doses imunossupressoras de glicocorticoides para os animais agudamente afetados se deve, principalmente, aos eventos imunomediados que resultam na destruição de hemácias ou de plaquetas que ocorrem na infecção erliquial. O uso de prednisolona na dose de 2,2 mg/kg, por via oral, dividida a cada 12 horas durante os primeiros 3 a 4 dias após o diagnóstico pode ser benéfica nesses casos (NELSON; COUTO, 2010).

O cloranfenicol e a enrofloxacin podem ser eficazes, mas estudos terapêuticos controlados não estão disponíveis (BREITSCHWERDT, 2004).

2.7 Proteinograma sérico

2.7.1 Proteínas séricas

As proteínas atuam em inúmeras funções nos animais, incluindo a formação da base da estrutura de células, órgãos e tecidos; a manutenção da pressão osmótica; a catalisação de reações bioquímicas e o equilíbrio ácido-básico. As principais atividades das proteínas no plasma incluem a coagulação sanguínea (fibrinogênio), mecanismos de defesa contra patógenos (imunoglobulinas, complemento), transporte de metabólitos (transferrina, albumina), regulação do metabolismo celular (hormônios), prevenção da proteólise (α 1-antitripsina) e balanço de nitrogênio para nutrição (albumina) (KANEKO et al., 2008).

A. Pré-albumina

Também conhecida como transtiretina ou pré-albumina de ligação à tiroxina, esta proteína desempenha a função de ligação ao hormônio tireoidiano promovendo a manutenção de uma reserva hormonal no plasma e facilitando a absorção do mesmo pelos tecidos (RIVIERE; PAPICH, 2013). Sua produção pelo fígado é reduzida na presença de processos inflamatórios agudos, sendo dessa forma classificada como uma proteína de fase aguda negativa (JAIN et al, 2011). Encontra-se diminuída também em casos de insuficiência hepatocelular (KANEKO et al., 2008).

B. Albumina

Os dois principais tipos de proteínas encontradas no plasma são a albumina e as globulinas. A albumina apresenta-se como uma das menores proteínas e a mais abundante no plasma, representando aproximadamente 75% da pressão oncótica do plasma no interior dos vasos, mecanismo que regula a difusão da água do sangue para os tecidos (THRALL et al., 2012). Além disso, é uma importante proteína de transporte de metabólitos e xenobióticos hidrofóbicos ou anfífilicos, que ao ligar-se a albumina, permanecem estáveis em solução aquosa no plasma (KANEKO et al., 2008). A hiperalbuminemia é observada apenas em casos de desidratação. A presença de baixas concentrações de albumina sérica está relacionada a fatores em que ocorre perda ou diminuição em sua produção, como nos casos de doença hepática crônica, restrição proteica alimentar, parasitismo gastrointestinal, má absorção intestinal, processos inflamatórios agudos e doenças glomerulares (THRALL et al., 2012)

C. Globulinas

As globulinas englobam uma variedade de proteínas que variam em tamanho, mas que normalmente são maiores do que a albumina. Centenas de tipos de globulinas circulam no plasma, entre elas as imunoglobulinas, as proteínas de complemento, os fatores de coagulação, as enzimas e as proteínas carreadoras de lipídeos, vitaminas, hormônios, hemoglobina extracelular e íons metálicos. A maioria dessas proteínas são sintetizadas no fígado, exceto as imunoglobulinas (anticorpos), que são produzidas em tecidos linfóides (THRALL et al., 2012).

As frações de proteínas recebem nomenclatura baseada em sua localização durante a separação na eletroforese e são identificadas como α , β ou γ - globulinas. Na fração alfa globulina estão presentes as proteínas α 1-fetoproteína, α 1-glicoproteína ácida (orosomucoide), α 1-antitripsina (inibidor de protease), α 1-lipoproteína (transporte de lipídeos), ceruloplasmina (transporte de cobre), haptoglobina (ligação à hemoglobina), α 2-macroglobulina (inibidor de protease) e amiloide sérica A (KANEKO et al., 2008; THRALL et al., 2012). Na fração beta globulina encontram-se a β 2-lipoproteína (transporta lipídeos), transferrina (transporta ferro), ferritina (armazenamento de ferro) e componentes do complemento (C3 e C4). Ocasionalmente migram moléculas de IgA e IgM na fração beta, porém é na zona gama que se encontram primariamente todos os tipos de imunoglobulinas. Nos cães, é nesta fração que ocorre a migração da proteína C-reativa (THRALL et al., 2012).

A proteína C-reativa (CRP) é a principal proteína de fase aguda em diversas espécies, incluindo o cão, espécie que pode apresentar níveis de CRP cerca de cem vezes maiores durante processos infecciosos (TIZARD, 2008). Foi demonstrado seu papel na opsonização de bactérias, parasitas, partículas estranhas e imunocomplexos e seu auxílio na remoção destes pelo sistema imune (TRAUTWEIN et al., 1994).

A imunoglobulina (Ig) G é produzida e secretada pelos plasmócitos localizados no baço, linfonodos e medula óssea. É a imunoglobulina de maior concentração no sangue e, por esta razão, exerce o papel principal nos mecanismos de defesa mediados por anticorpos.

A imunoglobulina responsável pela segunda maior concentração de anticorpos é a IgM, também produzida por plasmócitos no baço, nos linfonodos e na medula óssea. Esta é a principal imunoglobulina produzida durante uma resposta imune primária. Embora seja produzida também nas respostas secundárias, a IgG é a imunoglobulina predominante.

A IgA é secretada pelos plasmócitos, predominantemente, localizados nos tecidos imediatamente abaixo da superfície corpórea. É produzida nas paredes do trato intestinal, trato respiratório, sistema urinário, pele e glândula mamária impedindo a aderência de antígenos às superfícies corpóreas. Quando presente nas secreções, conjuga-se com um componente secretor, formando uma molécula complexa chamada de IgA secretora. Este componente secretor auxilia o transporte da IgA pela mucosa e protege esta imunoglobulina da degradação pelas secreções (TIZARD, 2008).

Para animais com erliquiose, foi evidenciado, experimentalmente, que o desenvolvimento de anticorpos das classes IgA e IgM específicos ocorre cerca de quatro a sete dias após a infecção, enquanto que a IgG ocorre em aproximadamente 15 dias. O

surgimento de IgG parece ser dependente da quantidade de organismos erliquiais aos quais o animal foi exposto (WANER et al., 2001).

Autores sugerem que algumas manifestações clínicas na erliquiose são mediadas por imunocomplexos. Harrus et al, (2001), relata detecção de imunocomplexos 45 dias após a infecção em um cão do grupo de seis infectados experimentalmente com *E. canis* e Breitschwerdt, (1997), descreve que a erliquiose provoca grande diversidade de alterações clínicas e condições patológicas suspeitas de serem relacionadas à formação de imunocomplexos citando como exemplos alterações como glomerulonefrites, uveíte e poliartrite.

De acordo com o estudo de Munhoz (2009) proteínas como as imunoglobulinas A e G foram identificadas no traçado eletroforético em animais experimentalmente infectados com *Erlíquia canis*. Nos animais do grupo infectado, a IgG de cadeia pesada e a IgG de cadeia leve aumentaram suas concentrações séricas a partir do D6, sendo máximas no D30. No D76 (25 dias após D30 tratados com doxiciclina), as concentrações estavam bem próximas às encontradas no D0 para o grupo controle e infectado.

HESS et al. (2006) não observaram alterações significativas de IgM, IgG e IgA na doença experimentalmente induzida, durante os 4 meses de estudo. Por fim, sugerem que a resposta imune destes animais não foi severamente afetada durante a enfermidade.

2.7.2 Eletroforese de proteínas

A eletroforese é uma técnica baseada no movimento de partículas carregadas através de uma solução eletrolítica sob influência de um campo elétrico. Em bioquímica clínica, esta técnica é comumente utilizada para separar e analisar proteínas séricas (THRALL et al., 2012). Dentre os métodos para o fracionamento de proteínas, podem ser citados o uso de acetato de celulose e o gel de agarose, sendo este último o mais empregado na rotina laboratorial devido a fácil utilização, grande reprodutibilidade e disponibilidade comercial, além de produzir melhor resultado no processo de fracionamento do que o acetato (NAOUM, 1999; KANEKO et al., 2008). Podem ser identificadas 7 ou 8 frações de proteínas séricas utilizando-se o gel de agarose, embora isso possa variar de acordo com as amostras e entre espécies. São identificadas no traçado eletroforético, a albumina e as frações de alfa globulinas (α -1 e α -2), beta globulinas (β -1 e β -2) e gama globulinas (γ -1 e γ -2) (KANEKO et al., 2008).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi submetido previamente ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), com protocolo nº 202-2014.

4.1 Seleção dos animais

Foram selecionados para o estudo 10 cães, entre machos e fêmeas, de idade e pesos variados, diagnosticados clinicamente com erliquiose provenientes do atendimento ambulatorial da Clínica Médica de Pequenos Animais (CMPA), do Hospital Veterinário, da UFCG, Campus de Patos-PB atendidos no período de outubro de 2014 a janeiro de 2016. Para a inclusão no experimento foi realizada avaliação inicial consistindo de exame clínico geral e determinação de parâmetros clínicos. Após o exame clínico, foi coletado sangue total e enviado para o Laboratório de Patologia Clínica/UFCG para hemograma. Os animais com sintomatologia e hemograma sugestivos (trombocitopenia) foram submetidos ao imunoenensaio imunocromatográfico (Alere Erliquiose Ac Teste Kit) que detecta qualitativamente (positivo ou negativo) anticorpos (IgG e IgM) anti *Ehrlichia canis* utilizando amostras de sangue total.

4.2 Grupos experimentais

Os animais selecionados foram divididos em dois grupos com 5 animais cada: tratados com doxiciclina (GD) e tratados com doxiciclina e prednisolona (GDP). Os animais do grupo GDP foram escolhidos em função da intensidade de suas alterações hematológicas. A dose utilizada para a doxiciclina foi 5 mg/kg, por via oral, a cada 12 horas, durante 28 dias. A dose adotada para a prednisolona foi de 2 mg/kg, por via oral, a cada 12 horas, durante 5 dias (NELSON; COUTO, 2010).

4.3 Momentos de avaliações

Os cães foram submetidos a 4 momentos de avaliação dos parâmetros hematológicos, uma avaliação basal (M0), uma com 10 dias (M10), uma aos 21 dias (M21) e outra ao final do tratamento (M28). Em cada momento foram coletados 6 ml sangue, 3 ml com Etilenodiamino

Tetraacetato de Sódio 10% (EDTA) para hemograma e 3 ml para separação do soro, e determinação das proteínas séricas.

4.4 Análises laboratoriais

Os exames foram realizados no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da UFCG – Campus de Patos.

4.4.1 Hemograma

As amostras EDTA foram submetidas a contagem no analisador automático veterinário Sysmex pocH-100iV™. Foram analisadas as séries eritrocitárias, leucocitárias e plaquetárias em quatro momentos, antes e ao longo do tratamento (M0, M10, M21 e M28), como forma de monitorar a evolução dos animais e determinar a presença de infecções concomitantes. Simultaneamente, foram realizados esfregaços sanguíneos corados pelo panótico rápido (Laborclin) para a contagem diferencial de leucócitos (monócitos, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e pesquisa de mórulas de *E. canis*.

4.4.2 Bioquímica sérica

As dosagens de Proteínas Totais (PT) e Albumina foram realizadas através de métodos colorimétricos em analisador bioquímico semiautomático (BIO-START 200) conforme procedimento do fabricante (Proteínas Totais Labtest e Albumina Vet Labtest). A dosagem de proteína C-reativa (PCR) foi realizada pelo método de imunoturbidimetria em analisador automático (Cobas C 111). As concentrações de proteínas séricas das frações de pré-albumina, albumina, alfa 1, alfa 2, beta e gama globulinas foram determinadas por eletroforese de acordo com método de Kremers et al. (1967) com algumas modificações. O proteinograma foi obtido por fracionamento eletroforético horizontal em gel de agarose 1% (p/v) (D1 Agarose Low EEO, CONDA LAB.) em tampão Tris-glicina pH 8,8 (25mM Tris, 1920 mM) após 50 minutos sob 400 mA e 200 V. Após o procedimento, o gel foi corado durante 60 minutos em uma solução metanólica de azul de Comassie 0,2% (p/v) e, em seguida, descorado em solução de ácido acético glacial 7% (v/v), até que as bandas proteicas estivessem nítidas. A proporção de cada fração de proteína foi criada pelo software ImageJ

(disponível em: <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>) através da análise de densitometria do gel após a digitalização.

4.5 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à testes de normalidade. Aqueles que apresentaram distribuição normal foram submetidos ao teste de Tukey ($p < 0,05$).

A tendência determinística das variáveis dos grupos GD e GDP foi analisada pelo método de regressão logarítmica. As mudanças na média da série de dados foram ajustadas (variável mensurada) em função do tempo de tratamento. O modelo utilizado foi o de tendência logarítmica, descrito na equação: $y = c \ln x + b$, onde c e b são constantes, e \ln é a função do logaritmo natural.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Parâmetros hematológicos

Ao analisar os grupos tratados com cloridrato de doxiciclina (GD) e tratados com cloridrato de doxiciclina associado a prednisolona (GDP) quanto aos valores de eritrócitos observou-se diferença estatística ($p < 0,05$) nos momentos M0, M10 e M28 (Tabela 1), onde apenas o GD permaneceu com os valores dentro da referência de normalidade. Essa diferença entre os grupos deve-se a possibilidade dos animais do GD se encontrarem em uma fase da doença em que já tenha havido uma recuperação do organismo à hemólise ou supressão da atividade hematopoiética e, portanto, independentemente do tratamento, não haveria grande variação nos valores.

No GDP, foi possível observar a presença de anemia moderada a severa em dois animais, nos quais observou-se aumento na contagem de hemácias a partir do 10º dia de avaliação até o M28. O quadro anêmico pode estar associado a uma resposta imunológica de hipersensibilidade do tipo II, que em doenças imunomediadas ou infecciosas, como a erliquiose, podem estimular um excesso de atividade fagocítica dos macrófagos e o reconhecimento dos eritrócitos como imunologicamente estranhos por anticorpos e complemento, provocando a lise destas células (TIZARD, 2008). A supressão da eritropoiese

na medula óssea é outro mecanismo sugerido na etiopatogenia da anemia na erliquiose (MOREIRA, 2003). A aplasia medular está em muitos casos associada à infecção por *E. canis* e caracteriza-se pela diminuição de todos os precursores celulares, podendo ser responsivo em até duas semanas após remoção da causa base, no caso da forma aguda, e quando na forma crônica, apresentar recuperação depois de meses, ou não apresentar resposta (FELDMAN et al., 2000).

Em relação ao teor de hemoglobina (Tabela 1), os tratamentos GD e GDP, diferiram entre si ($P < 0,05$) em todos os momentos. Tal como foi observado em relação aos eritrócitos, as médias do teor de Hb e hematócrito permaneceram abaixo dos valores de referência no GDP durante todo o período de avaliação. Contudo, pôde ser verificado um aumento nesses parâmetros a partir do M10. As médias ao final do tratamento associado ao corticoide apresentaram uma discreta diminuição, sugerindo-se que haja nesses animais ainda a persistência do organismo.

McClure et al. (2010) relataram ineficiência em eliminar o parasita de cães na fase crônica da doença tratados com doxiciclina, detectando amostras positivas no PCR após os 28 dias de terapia antimicrobiana, o mesmo não foi observado em cães tratados na fase aguda, que permaneceram PCR-negativos após o tratamento. Iqbal; Rikihisa (1994); Harrus et al. (1998) observaram a persistência da infecção após o tratamento em cães na fase subclínica. Considerando as alterações hematológicas observadas no GDP, que variaram de moderada a graves, além da presença de hipergamaglobulinemia e alterações clínicas mais severas ou ausentes, sugere-se que estes animais se encontravam na fase subclínica ou crônica da doença, uma vez que tais alterações são detectadas principalmente nessas fases (WANER et al., 1997; SYKES, 2013).

Conforme demonstrado na Tabela 1, as proteínas plasmáticas totais (PPT) não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$) entre os dois grupos tratados. Verificou-se médias acima dos valores normais no GDP durante todos os momentos avaliados (M0, M10, M21 e M28), o que pode ser atribuído à hiperglobulinemia observada neste grupo. No GD, observou-se decréscimo nas médias a valores normais a partir do M21 até o final do tratamento, evidenciado estatisticamente.

Na Tabela 1, observa-se que nos dois grupos tratados, houve presença de trombocitopenia até a última avaliação (M28), havendo diferença estatística ($p < 0,05$) entre o GD e o GDP apenas no M21, com um aumento nos valores de plaquetas do GDP. Observou-se neste grupo uma melhor resposta terapêutica, indicado por uma curva de tendência crescente (Figura 1).

Tabela 1. Médias e coeficientes de variação dos valores do eritrograma e plaquetograma do grupo de animais tratados com cloridrato de doxiciclina (GD) e grupo tratado com doxiciclina associado a prednisolona (GDP), em função dos momentos de tratamento (M0, M10, M21 e M28) em cães diagnosticados com erliquiose, no Hospital Veterinário da UFCG.

	Grupo	M0	M10	M21	M28	Valores de Referência
Eritrócitos (x10 ⁶ /mm ³)	GD	6,17 Aa	6,83 Aa	6,72 Aa	6,82 Aa	5,5 – 8,5 x 10 ⁶ /μL*
	GDP	4,24 Ba	5,22 Ba	5,32 Aa	5,14 Ba	
	CV(%)	24,91	17,89	16,14	15,26	
Teor de hemoglobina (g/dL)	GD	13,62 Aa	15,30 Aa	15,18 Aa	15,12 Aa	12 – 18 g/dL*
	GDP	9,28 Ba	11,50 Ba	11,60 Ba	11,22 Ba	
	CV (%)	23,64	17,93	17,20	14,99	
Hematócrito (%)	GD	38,78 Aa	43,32 Aa	42,54 Aa	43,4 Aa	37 – 55 %*
	GDP	27,62 Ba	34,44 Aa	34,4 Aa	33,2 Ba	
	CV (%)	22,18	16,18	15,79	13,75	
Plaquetas (μL)	GD	123000 Aa	235300 Aa	147400 Ba	195600 Aa	200.000 – 500.000 μL*
	GDP	86000 Ab	166200 Aab	231600 Aa	178000 Aab	
	CV (%)	74,30	32,61	29,49	33,32	
PPT (g/dL)	GD	8,72 Aab	9,16 Aa	7,86 Ab	7,68 Ab	6,0–8,0 g/dL*
	GDP	9,48 Aa	8,96 Aa	9,04 Aa	8,36 Aa	
	CV (%)	11,08	13,82	13,46	9,50	

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes, nas colunas, indicam diferença significativa entre grupos ($p < 0,05$). Médias seguidas por letras minúsculas diferentes, nas linhas, indicam diferença significativa entre momentos ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey.

*Kaneko et al. (2008)

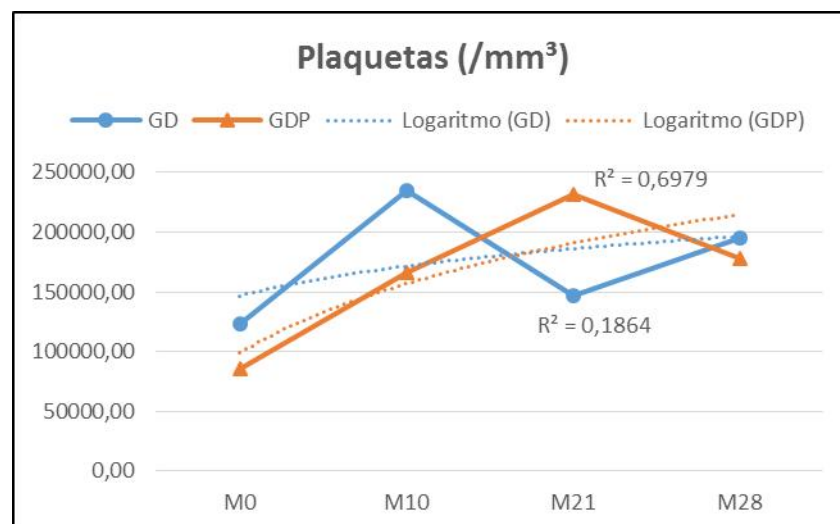


Figura 1. Representação gráfica de tendência logarítmica das médias do GD e GDP, em cada momento de avaliação (M0, M10, M21 e M28), em cães diagnosticados com erliquiose, no Hospital Veterinário da UFCG.

Neste trabalho, a variação na contagem de trombócitos pode ser justificada pelas reações imunes desencadeadas na erliquiose, tais como, aumento do consumo associados à vasculite, destruição imunomediada por anticorpos antiplaquetários, normalmente do subtipo IgG e destruição por fixação de complemento ou fagocitose (WANER et al, 1995; GRINDEM et al. 1999; TIZARD, 2008).

Grindem et al. (1999) sugeriram que animais com um quadro mais severo da doença podem induzir uma persistência maior de títulos de IgG antiplaquetárias, isso pode ter influenciado no decréscimo da contagem de plaquetas no último momento de coleta, sugerido também pela hipergamaglobulinemia observada ao longo do tratamento em ambos os grupos. O retorno dos valores a níveis normais evidencia a capacidade de resposta medular (XAVIER, 2009).

Os grupos estudados apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) quanto a contagem total de leucócitos em M10, M21 e M28 (Tabela 2). As médias do GDP foram significativamente menores ($p < 0,05$) devido à acentuada leucopenia observada em três animais, indicando que estes encontravam-se cronicamente infectados. Tal alteração clínico patológica é vista frequentemente nesta fase da doença associada à hipocelularidade da medula óssea (BIRCHARD; SHERDING, 2005; NELSON; COUTO, 2010).

Quanto à contagem diferencial, os grupos não apresentaram variação estatística significativa ($p > 0,05$) nos valores de monócitos, segmentados e bastonetes.

Quanto à contagem de linfócitos, os tratamentos diferiram entre si ($p < 0,05$) nos momentos M10, M21 e M28, onde os valores apresentaram-se mais baixos no GDP. Dos cinco animais avaliados neste grupo, quatro apresentaram linfopenia em uma ou mais avaliações. A linfopenia observada nos animais do GDP pode estar relacionada a patogenicidade do agente, bem como a capacidade imunológica dos indivíduos avaliados, já que estes apresentaram linfopenia desde a primeira avaliação e mesmo com a administração de glicocorticoide exógeno, os animais apresentaram aumento discreto a moderado na contagem de linfócitos.

O decréscimo na contagem de linfócitos geralmente é atribuível a resposta a esteroides endógenos ou exógenos. Estes contribuem para o sequestro de linfócitos em órgãos linfoides, incluindo a medula óssea, além de potencializar a apoptose de linfócitos sensíveis. Em doenças sistêmicas severas, a liberação de glicocorticoides endógenos desempenham um papel importante na linfopenia observada nessas condições (HARVEY, 2012; THRALL et al., 2012). Na erliquiose canina, a linfocitose é a alteração mais relatada nas fases aguda,

subclínica e crônica (NELSON; COUTO, 2010; LITTLE, 2010; MCCLURE et al., 2010), embora possa ser verificada linfopenia em vários animais afetados (SYKES, 2013).

Na contagem de eosinófilos, apresentaram-se estatisticamente ($p < 0,05$) diferentes as avaliações em M21 e M28, com médias inferiores no GDP, sendo este decréscimo associado aos efeitos do glicocorticoide (THRALL et al., 2012; SYKES, 2013;).

Tabela 2. Médias e coeficientes de variação dos valores do leucograma do grupo de animais tratados com cloridrato de doxiciclina (GD) e do grupo tratado com doxiciclina associado a prednisolona (GDP), em função dos momentos de tratamento (M0, M10, M21 e M28) em cães diagnosticados com erliquiose, no Hospital Veterinário da UFCG.

	Grupo	M0	M10	M21	M28	Valores de Referência
Leucócitos (μL)	GD	11320 Aa	12380 Aa	14080 Aa	12480 Aa	6.000 – 17.000 μL*
	GDP	7390 Aa	6306 Ba	7944 Ba	6954 Ba	
	CV (%)	54,50	21,18	29,32	34,23	
Monócitos (μL)	GD	361,40 Aa	352,80 Aa	518,40 Aa	374,80 Aa	0 – 1.200 μL*
	GDP	674,50 Aa	234,40 Aa	153,40 Aa	103,80 Aa	
	CV (%)	73,10	64,18	94,71	120,15	
Linfócitos (μL)	GD	3680,2 Aa	3976,6 Aa	4429,4 Aa	2886 Aa	1.000 – 4.800 μL*
	GDP	2195 Aa	863,4 Ba	1186,2 Ba	966,8 Ba	
	CV (%)	80,01	75,15	70,59	55,40	
Segmentados (μL)	GD	6570,80 Aa	6698,40 Aa	7789,80 Aa	7458,80 Aa	3.000 – 11.500 μL*
	GDP	6127 Aa	4753,60 Aa	6151,60 Aa	5500 Aa	
	CV (%)	66,76	24,28	44,96	44,93	
Bastonetes (μL)	GD	0,00 Aa	89,60 Aa	28,60 Aa	0,00 Aa	0 – 300 μL*
	GDP	0,00 Aa	14,20 Aa	0,00 Aa	4,80 Aa	
	CV (%)	0	173,74	316,23	316,23	
Eosinófilos (μL)	GD	707,60 Aa	1241,40 Aa	1513,80 Aa	1760,40 Aa	100 – 1.250 μL*
	GDP	704,67 Aa	440 Aa	453,20 Ba	379,20 Ba	
	CV (%)	109,64	84,73	40,39	71,99	

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes, nas colunas, indicam diferença significativa entre grupos ($p < 0,05$). Médias seguidas por letras minúsculas diferentes, nas linhas, indicam diferença significativa entre momentos ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey.

*Thrall et al. (2012)

5.1 Parâmetros bioquímicos

Não foram observadas variações significativas ($p > 0,05$) na avaliação das proteínas totais entre os dois grupos tratados (Tabela 3). Contudo, este parâmetro não deve ser avaliado isoladamente. Como foi observado no GDP, os valores de proteínas totais discretamente

aumentados ou dentro da normalidade não sinalizam a gravidade da condição clínica, que nos animais deste grupo estava associada a hipoalbuminemia e hiperglobulinemia.

Tabela 3. Médias e coeficientes de variação dos valores do proteinograma sérico do grupo de animais tratados com cloridrato de doxiciclina (GD) e do grupo tratado com doxiciclina associado a prednisolona (GDP), em função dos momentos de tratamento (M0, M10, M21 e M28) em cães diagnosticados com erliquiose, no Hospital Veterinário da UFCG.

		M0	M10	M21	M28	Valores de Referência
Proteínas totais (g/dL)	GD	6,54 ± 0,53Aa	6,6 ± 0,81 Aa	6,7 ± 0,3 Aa	6,56 ± 0,66 Aa	5,4 – 7,1 g/dL*
	GDP	7,6 ± 1,02 Aa	7,5 ± 1,03 Aa	6,7 ± 0,65 Aa	6,8 ± 1,40 Aa	
	CV (%)	11,59	13,19	7,54	16,49	
Albumina (g/dL)	GD	3,71 ± 0,85 Aa	3,774 ± 1,04 Aa	4,174 ± 1,39 Aa	3,696 ± 1,43 Aa	2,6 – 3,3 g/dL*
	GDP	2,504 ± 0,80 Aa	2,432 ± 0,52 Ba	2,58 ± 0,53 Ba	2,352 ± 0,62 Aa	
	CV (%)	26,67	26,76	31,29	36,60	
Globulinas (g/dL)	GD	2,83 ± 1,03 Ba	2,82 ± 1,28 Ba	2,52 ± 1,27 Ba	2,86 ± 1,20 Aa	2,7 – 4,4 g/dL*
	GDP	5,09 ± 1,00 Aa	5,07 ± 1,12 Aa	4,2 ± 0,81 Aa	4,45 ± 1,71 Aa	
	CV (%)	25,76	30,67	31,80	40,55	
Proteína C reativa (mg/dL)	GD	0,01 ± 0,00 Ba	0,01 ± 0,01 Aa	0,02 ± 0,01 Aa	0,01 ± 0,00 Aa	Até 5,0 mg/L**
	GDP	0,022 ± 0,0 Aa	0,028 ± 0,01 Aa	0,04 ± 0,02 Aa	0,035 ± 0,02 Aa	
	CV (%)	0	53,74	60,18	48,30	
Pré-albumina	GD	0,536 ± 0,22 Aa	0,5 ± 0,21 Aa	0,41 ± 0,12 Ba	0,538 ± 0,22 Aa	-
	GDP	0,752 ± 0,39 Aa	0,826 ± 0,38 Aa	0,84 ± 0,23 Aa	0,902 ± 0,29 Aa	
	CV (%)	49,70	46,75	30,25	37,05	
Alfa-1	GD	0,172 ± 0,06 Aa	0,174 ± 0,07 Aa	0,21 ± 0,14 Aa	0,206 ± 0,08 Aa	0,62 – 0,92 g/dL*
	GDP	0,33 ± 0,25 Aa	0,294 ± 0,26 Aa	0,27 ± 0,09 Aa	0,31 ± 0,12 Aa	
	CV (%)	75,47	82,35	51,96	41,50	
Alfa-2	GD	0,34 ± 0,15 Aa	0,278 ± 0,10 Aa	0,332 ± 0,25 Aa	0,344 ± 0,23 Aa	0,37 – 0,71 g/dL*
	GDP	0,648 ± 0,39 Aa	0,724 ± 0,54 Aa	0,588 ± 0,20 Aa	0,694 ± 0,34 Aa	
	CV (%)	60,77	77,83	51,02	57,65	
Beta	GD	0,822 ± 0,36 Aa	0,942 ± 0,54 Aa	0,812 ± 0,46 Aa	0,874 ± 0,48 Aa	1,14 – 2,14 g/dL*
	GDP	1,316 ± 0,49 Aa	1,1 ± 0,55 Aa	1,07 ± 0,16 Aa	1,142 ± 0,24 Aa	
	CV (%)	40,73	53,93	36,99	37,91	
Gama	GD	0,956 ± 0,38 Aa	0,932 ± 0,48 Aa	0,764 ± 0,36 Aa	0,898 ± 0,36 Aa	0,43 – 0,81 g/dL*
	GDP	1,698 ± 0,73 Aa	1,436 ± 0,90 Aa	1,384 ± 0,60 Aa	1,534 ± 0,82 Aa	
	CV (%)	44,34	61,53	46,56	52,38	

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes, nas colunas, indicam diferença significativa entre grupos ($p < 0,05$). Médias seguidas por letras minúsculas diferentes, nas linhas, indicam diferença significativa entre momentos ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey.

*Abate et al. (2000) **Cerón et al. (2005)

Observou-se diferença estatística ($p < 0,05$) quanto aos valores de albumina e globulinas. A albumina diferiu estatisticamente entre os tratamentos nos momentos M10 e M21. O GDP apresentou médias inferiores ($p < 0,05$) ao GD em todos os momentos avaliados.

Os principais fatores associados a hipoalbuminemia quando não observamos diminuição concomitante de globulinas, são a diminuição da produção de albumina ou maior perda. Como o fígado apresenta uma capacidade de reserva, seria necessário a perda de 60 a 80% de sua capacidade funcional para levar a diminuição sérica de albumina (THRALL et al., 2012).

Reardon; Pierce (1981) sugeriram que alterações causadas por *E. canis* em células hepáticas teriam um efeito apenas limitado em alterar as concentrações desta proteína e por um período curto de tempo, principalmente na fase aguda, quando foi observada hipoalbuminemia associada ao desenvolvimento da expansão de focos de células monócitos fagocitárias ao redor dos sinusoides hepáticos, causando compressão e necrose de hepatócitos adjacentes.

No presente estudo, os valores de albumina abaixo da referência observados no GDP podem estar relacionados a um quadro crônico, com perda glomerular e redução na síntese de albumina pelo incremento na produção de globulinas (HARRUS et al., 1999), como foi observado quanto a este último parâmetro. Esta variação entre os grupos se deve a tendência a escolha do protocolo de tratamento associado a prednisolona naqueles animais que demonstraram um quadro clínico e hematológico mais severo, justificado pela suposta ação protetora dos glicocorticoides contra os eventos imunomediados e consequente desenvolvimento de alterações mais graves (BIRCHARD; SHERDING, 2005; SYKES, 2013).

Os glicocorticoides possuem diversos efeitos anti-inflamatórios e a liberação endógena é um dos meios de suprimir a resposta inflamatória quando esta não é mais necessária, de modo que haja menos danos teciduais. Dessa forma, uma das ações antagonistas dos corticosteroides relaciona-se com o fluxo sanguíneo capilar e vasodilatação, evitando a formação de edema e perda de proteínas para o tecido danificado. Martinez-Subiela et al. (2004) relataram um aumento moderado nos valores séricos de albumina induzido pelo uso de glicocorticoides, mesmo em doses anti-inflamatórias. No presente estudo, o uso de prednisolona em doses imunossupressoras resultou em discreto aumento nos valores de albumina em três dos cinco animais tratados, embora todos tenham permanecido abaixo do intervalo de referência (THRALL et al., 2012)..

Quanto às globulinas, em três momentos (M0, M10 e M21) houve variação estatística ($p < 0,05$) entre os grupos, observando-se valores superiores em todas as avaliações no GDP. Quanto às frações de α -1 globulina, α -2 globulina, β -globulina e γ -globulina, não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos estudados, embora as médias destes parâmetros do GDP tenham sido superiores em todos os momentos de avaliação, evidenciado pelo elevado coeficiente de variação (CV).

O significado clínico da hiperglobulinemia vai depender da magnitude e do tipo de globulina responsável pelo aumento. Durante a resposta inflamatória aguda, o aumento na síntese de proteínas de fase aguda pode causar hiperglobulinemia, que normalmente é moderada. Geralmente, para que seja possível detectar alterações na eletroforese, é necessário o aumento de diversas proteínas de fase aguda, entretanto, a haptoglobina sozinha pode estar aumentada a níveis suficientes para causar hiperglobulinemia e um aumento nas proteínas totais (THRALL et al., 2012).

A haptoglobina é uma das principais proteínas de fase aguda em cães e está localizada na região α -2 do traçado eletroforético, apresentando-se moderadamente elevada em processos inflamatórios agudos (TIZARD, 2008; MUNHOZ, 2012). Seu aumento também foi relatado em doenças hemolíticas, em cães diabéticos ou após administração de glicocorticoides (HARVEY; WEST, 1987; ABATE et al., 2000;). Sugere-se que este último fator esteja associado aos valores elevados de α -2 globulinas encontrados no GDP, uma vez que os demais parâmetros avaliados neste grupo indicam que os animais não se encontravam agudamente afetados. Contudo, os resultados para α -2 globulinas encontrados neste estudo não corroboram aqueles relatados por Harvey; West (1987). De acordo com os autores citados anteriormente, os valores de α -2 globulinas permaneceram significativamente acima dos valores de referência, mesmo após 9 dias da administração do glicocorticoide. Os valores encontrados no GDP permaneceram dentro dos valores normais em todas as avaliações.

A ceruloplasmina, outra proteína de fase aguda importante nos cães (TIZARD, 2008), também está presente na zona α -2, porém, foi demonstrado por Martinez-Subiela et al. (2004) não haver influência do uso de glicocorticoide em sua concentração.

Quanto aos valores de proteína C-reativa, não foram observadas variações significativas ($p > 0,05$) entre os momentos de cada tratamento nem entre as médias de cada grupo.

O traçado eletroforético revelou cinco frações de proteínas (pré-albumina, albumina, α -1 globulina, α -2 globulina, β -globulina e γ -globulina). Na avaliação da pré-albumina, os valores diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) apenas aos 21 dias de tratamento (M21). O GDP

apresentou valores maiores dessa proteína ao longo de todo o tratamento quando comparado ao GD. Sua observação no eletroforetograma é relatada com maior frequência em aves (THRALL et al., 2012) e em cães sua função é associada exclusivamente ao papel de carreadora da tiroxina (T₄) (FELDMAN et al., 2014).

Em ambos os grupos foi observada hipergamaglobulinemia, com médias acentuadamente maiores no GDP. O aumento nos valores de gamaglobulinas é um achado consistente na infecção por *Ehrlichia canis* e pode ser observado desde as três primeiras semanas após a infecção e persistir por tempo indeterminado (REARDON; PIERCE, 1981). Seu aumento é representado por uma resposta humoral inespecífica e, embora a partir de duas a três semanas pós-infecção possam ser identificados anticorpos anti-*Ehrlichia canis*, estes não são a principal fonte de gamaglobulinas (BURGHEN et al., 1971; BUHLES et al., 1974).

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que tanto a o uso da doxiciclina como o da doxiciclina associada a prednisolona resultaram em melhora clínica, dos parâmetros hematológicos e do proteinograma sérico, porém, o uso da prednisolona durante os primeiros cinco dias de tratamento não demonstrou efeitos mais benéficos do que a administração isolada da doxiciclina.

7 REFERÊNCIAS

- ABATE, O. et al. Canine serum protein patterns using high-resolution electrophoresis (HRE). **The Veterinary Journal**, v. 159, n. 2, p. 154-160, 2000.
- AGUIAR, D. M. **Aspectos epidemiológicos da erliquiose canina no Brasil**. São Paulo: USP, 2006. 95 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2006.
- ANDRADE, S. F. **Manual de Terapêutica veterinária**. 3ª ed. São Paulo: Roca, 2008. Endo e Ectoparasitocidas. p. 542.
- AZEVEDO, S. S. et al. Soroprevalência e fatores de risco associados à soropositividade para *Ehrlichia canis* em cães do Semiárido da Paraíba. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 48, n. 1, p. 14-18, 2011.
- BANETH, G. et al. Survey of *Ehrlichia canis* antibodies among dogs in Israel. **Veterinary Record**, v.138, n.11, p.257-259, 1996.
- BIRCHARD, S. J.; SHERDING, Robert G. **Saunders Manual of Small Animal Practice**. Elsevier Health Sciences, 2005.
- BREITSCHWERDT, E. B. As Riquetsioses. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. (Eds). **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 5ª ed. 2004. São Paulo: Manole. Seção IV. Moléstias Infecciosas. p. 546-548.
- BURGHEN, G. A. et al. Development of hypergammaglobulinemia in tropical canine pancytopenia. **American Journal of Veterinary Research**, v. 32, n. 5, p. 749-756, 1971.
- BUHLES, William C.; HUXSOLL, David L.; RISTIC, Miodrag. Tropical canine pancytopenia: clinical, hematologic, and serologic response of dogs to *Ehrlichia canis* infection, tetracycline therapy, and challenge inoculation. **Journal of Infectious Diseases**, v. 130, n. 4, p. 357-367, 1974.
- CERÓN, José Joaquín; ECKERSALL, Peter David; MARTÍNEZ-SUBIELA, Silvia. **Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives**. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 34, n. 2, p. 85-99, 2005.
- COHN, L. A. Ehrlichiosis and related infections. **Veterinary Clinic of Small Animal**. v. 33, p. 863-884, 2003.
- COSTA, J. O.; SILVA, M.; BATISTA JR., J. A.; GUIMARÃES, M. P. *Ehrlichia canis* infection in dogs in Belo Horizonte – Brazil. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade de Minas Gerais**, v. 25, p. 199-200, 1973.
- CORRÊA, W.M.; CORRÊA, N. M. **Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos**, 2ª ed. São Paulo: MEDSI, 1992.

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

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P. J.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and HGE agent as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 2145-2165, 2001.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, v. 152, p. 173-185, 2008.

EDDLESTONE, S. M. et al. Doxycycline clearance of experimentally induced chronic *Ehrlichia canis* infection in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, p. 1237-1242, 2007.

FAGLIARI, J. J. & SILVA, S. L. Hemograma e proteinograma plasmático de equinos hípidos e de equinos acometidos por abdômen agudo, antes e após laparotomia. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 54, n. 6, p. 559-67, 2002.

FELDMAN B. F., ZINKL J. G., JAIN N. C. **Schalm's Veterinary hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 1344p.

FELDMAN, E. C. et al. **Canine and feline endocrinology**. Elsevier Health Sciences, 2014.

FRANK, J. R.; BREITSCHWERDT, E. B. A Retrospective Study of Ehrlichiosis in 62 Dogs from North Carolina and Virginia. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, p. 194-201, 1999.

GROVES, M. G., DENNIS, G. L.; AMYX, H. L.; HUXSOL, D. L. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). **American Journal of Veterinary Research**, v. 36, n. 7, p. 937-940, 1975.

GREENE, C. E.; HARVEY, J. W. Canine ehrlichiosis. In: GREENE, C. E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. Philadelphia: W. B. Saunders, p. 545-561, 1990.

GRIDEM, C.B.; BREITSCHWERDT, E. B.; PERKINS, P.C. et al. Platelet-associated immunoglobulin (antiplatelet antibody) in canine rocky mountain spotted fever and ehrlichiosis. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v.35, p.56-61, 1999.

HARVEY, J. W.; WEST, C. L. Prednisone-induced increases in serum alpha-2-globulin and haptoglobin concentrations in dogs. **Veterinary Pathology Online**, v. 24, n. 1, p. 90-92, 1987.

HARVEY, J. W. **Veterinary hematology: a diagnostic guide and color atlas**. Elsevier Health Sciences, 2012.

HARRUS, S.; WANER, T.; AVIDAR, Y.; BOGIN, E.; PEH, H.; BARK, H. Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. **Veterinary Parasitology**. v.66, p. 241-249, 1996.

HARRUS, S.; WANER, T., BARK, H. Canine monocytic ehrlichiosis 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. et al. Therapeutic effect of doxycycline in experimental subclinical canine monocytic ehrlichiosis: evaluation of a 6-week course. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 7, p. 2140-2142, 1998

HARRUS, S.; WANER, T.; BARK, H. et al. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. **J. Clin. Microbiol.** v. 37, n. 9, p. 2745-2749, 1999.

HARRUS, S. et al. Presence of immune-complexes and absence of antinuclear antibodies, in sera of dogs naturally and experimentally infected with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Microbiology**, v. 83, n. 4, p. 343-349, 2001.

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

HESS, P.R. et al. Experimental *Ehrlichia canis* infection in the dog does not cause immunosuppression. **Vet. Immun. Immunopathol.**, v. 109, p. 117-125, 2006.

IQBAL, Z.; RIKIHISA, Y. Reisolation of *Ehrlichia canis* from blood and tissues of dogs after doxycycline treatment. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 7, p. 1644-1649, 1994.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6ª Edição. Academic press, 2008.

KREMERS B., BRIERE R. & BATSAKIS J.G. 1967. Reflectance densitometry of cellulose acetate protein eletrophoresis. **Am. J. Med. Technol.** 33(1):28-34.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-85, 1970.

LITTLE, Susan E. Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 40, n. 6, p. 1121-1140, 2010.

- MACHADO, R. Z. Erliquiose Canina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. V. 13, supl. 1, p. 53-57, 2004.
- MARTINEZ-SUBIELA, S.; GINEL, P. J.; CERON, J. J. Effects of different glucocorticoid treatments on serum acute phase proteins in dogs. **Veterinary Record: Journal of the British Veterinary Association**, v. 154, n. 26, 2004.
- MCCLURE, J. C. et al. Efficacy of a doxycycline treatment regimen initiated during three different phases of experimental ehrlichiosis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 5012-5020, 2010.
- MOREIRA, S. M. et al. Estudo retrospectivo (1998-2001) da erliquiose canina em Belo Horizonte, MG, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 2, p. 141-147, 2003.
- MONTEIRO, S. G. Rickéttias. **Parasitologia na Medicina Veterinária**. 1ª edição, São Paulo: Roca, 2014. p. 169-176.
- MUNHOZ, T. D. **Concentrações séricas de proteínas de fase aguda e IgG na infecção experimental por *Ehrlichia canis***. Jaboticabal: UNESP, 2009. 55 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009.
- NAOUM, P. C. **Eletroforese-técnicas e diagnósticos**. 2ª edição, Santos, 1999.
- NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Doenças Riquetsianas Polissistêmicas. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 4ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. p.1325-1329.
- NEER, T. M. et al. 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.
- NYINDO, M., HUXSOLL, D. L., RISTIC, M., KAKOMA, I., BROWN, J. L., CARSON, A., STEPHENSON, E. Cell-mediated and humoral immune response of German Shepherd dogs and Beagles to experimental infection with *Ehrlichia canis*. **American Journal of Veterinary Research**. v. 41, p. 250-254, 1980.
- PEREZ, M. et al. Human Infection with *Ehrlichia Canis* Accompanied by Clinical Signs in Venezuela. **Annals of The New York Academy of Sciences**. 1078: 110-117, 2006.
- REARDON, M. J., PIERCE, K. R. Acute Experimental Canine Ehrlichiosis: I. Sequential Reaction of the Hemic and Lymphoreticular Systems. **Veterinary Pathology**. v. 18, p. 48-61, 1981.
- RISTIC, M.; HOLLAND, C.J. Canine ehrlichiosis. In: Woldehiwet, Z., RISTIC, M. (Eds.), **Rickettsial and Chlamydial Diseases of Domestic Animals**. Pergamon Press, Oxford, p. 169-186, 1993.

RIVIERE, J. E.; PAPICH, M. G. **Veterinary pharmacology and therapeutics**. 9ª Ed. John Wiley & Sons, 2013.

SAINZ, A., TESOURO, M. A., AMUSATEGUI, I., RODRÍGUEZ, F., MAZZUCHELLI, F., RODRÍGUEZ, M. Propective Comparative Study of 3 Treatment Protocols Using Doxycycline or Imidocarb Dipropionate in Dogs with Naturally Occurring Ehrlichiosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 14, p. 134-139, 2000.

SILVA, L. S. et al. **Erliquiose e anaplasnose canina em Teresina, Piauí**. Teresina: UFPI, 2010. 92p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, 2010.

SOUSA, V. R. F. et al. Avaliação clínica e molecular de cães com erliquiose. **Ciência Rural**. v. 40, n. 6, p. 1309-1313, 2010.

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

SHAW, S. E.; DAY, M. J.; BIRTLES, R. J.; BREITSCHWERDT, E. B. Tick-borne infectious diseases of dogs. **Trends in Parasitology**. v. 17, n. 2, 2001.

SYKES, J. E. **Canine and feline infectious diseases**. Elsevier Health Sciences, 2013.

TANIKAWA, A. et al. **Rickettsia felis e Ehrlichia canis em cães do semiárido brasileiro: diagnóstico sorológico, molecular e fatores associados**. Patos: UFCG, 2012. 51p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2012.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária - uma Introdução**, 8ª Ed. Elsevier, 2008. 587p.

TRAPP, S.M. et al. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population in south Brazil. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 16, p. 365, 2002.

TRAUTWEIN, C.; BÖKER, K.; MANNS, M. P. Hepatocyte and immune system: acute phase reaction as a contribution to early defence mechanisms. **Gut**, v. 35, n. 9, p. 1163-1166, 1994.

THRALL, M. A. et al. **Veterinary hematology and clinical chemistry**, 2ª Ed. John Wiley & Sons, 2012.

WANER, T.; HARRUS, S.; WEISS, D.J. et al. Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.48, p.177-182, 1995.

WANER, Trevor et al. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 69, n. 3, p. 307-317, 1997.

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

WOODY, B.J.; HOSKINS, J.D. Ehrlichial diseases of dogs. **Vet. Clin. N. Am.: Small Anim. Pract.**, v. 21, p. 75-98, 1991.

XAVIER, M. S. et al. Avaliação da coagulação plasmática e plaquetometria em cães não infectados e infectados experimentalmente com *Ehrlichia* spp. **Arq. bras. med. vet. zootec**, v. 61, n. 5, p. 1049-1053, 2009.

ANEXO