

ALTERAÇÕES DO PROTEINOGRAMA SÉRICO EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Ehrlichia canis*.

(SERUM PROTEIN PROFILE ALTERATIONS IN DOGS NATURALLY INFECTED
BY *Ehrlichia canis*.)

(ALTERACIONES DEL PROTEINOGRAMA SÉRICO EN PERROS INFECTADOS
NATURALMENTE POR *Ehrlichia canis*.)

A. KATAOKA¹, A. E. SANTANA², M. C. SEKI³

RESUMO

Proteínas totais, albumina e fracionamento eletroforético das proteínas séricas foram realizados em 20 cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e em outros 10 cães clinicamente saudáveis (grupo controle). Todos os cães naturalmente infectados por *E. canis* apresentavam título de anticorpos > que 1:160 e trombocitopenia. Esses cães foram divididos em dois grupos experimentais de acordo com parâmetros hematológicos definidos como pancitopênicos (n=10) e não-pancitopênicos (n=10). Os resultados mostraram que ambos os grupos infectados apresentaram diminuição significativa na concentração de albumina (p<0.01), hiperglobulinemia (p<0,05) e hipergamaglobulinemia significativa (p<0,05) quando comparados com o grupo controle. Apesar de os grupos infectados terem apresentado hiperproteinemia, esse aumento não foi significativo quando comparado ao grupo controle.

PALAVRAS-CHAVE: *Ehrlichia canis*. Hipoalbuminemia. Hipergamaglobulinemia. Cão.

SUMMARY

Total proteins, albumin, and electrophoretic fractions of the serum proteins were performed in 20 dogs naturally infected by *Ehrlichia canis* and 10 healthy dogs (control group). All the *E. Canis*-naturally infected dogs presented antibodies titers > 1:160 and thrombocytopenia. These dogs were divided into two experimental groups according to hematological parameters defined as pancytopenic (n = 10) and non-pancytopenic (n = 10). The results showed that both infected groups had significantly lower concentrations of albumin (p<0.01), hyperglobulinemia (p<0.05), and hypergammaglobulinemia (p<0.05) when compared with control group. Although the infected groups had hyperproteinemia, this increase was not significant when compared to the control group.

KEY-WORDS: *Ehrlichia canis*. Hypoalbuminemia. Hypergammaglobulinemia. Dog.

RESUMEN

Proteínas totales, albúmina y fraccionamiento electroforético de las proteínas séricas fueron realizados en 20 perros infectados naturalmente por *Ehrlichia canis* y en 10 perros sanos (grupo control). Todos los animales infectados

¹ Professora do Curso de Medicina Veterinária da UNICASTELO - Fernandópolis - SP e UNIFRAN - Franca - SP. Rua José Garcia Fernandes, 301 - CEP 17203-020 - Jaú - SP. End. Eletrônico: alessakat@yahoo.com

² Professor Adjunto do Curso de Medicina Veterinária da FCAV/Unesp - Campus de Jaboticabal. Rod. Prof. Paulo Donatto Castalani, s/n - CEP 14884-900 - Jaboticabal - SP. End. Eletrônico: santana@fcav.unesp.br

³ Mestranda em Medicina Veterinária - Patologia Animal da FCAV/Unesp - Jaboticabal - SP

naturalmente por *E. canis* apresentaram titulação de anticorpos maior que 1:160 e trombocitopenia. Estes animais foram distribuídos em dois grupos experimentais, de acordo com los parâmetros hematológicos definidos como pancitopênicos (n=10) e no pancitopênicos (n=10). Los resultados mostraron que los dos grupos infectados presentaron diminuição significativa de la concentración de albúmina (p<0.01), hiperglobulinemia (p<0,05) e hipergamaglobulinemia significativa (p<0,05), cuando comparados al grupo control. Aunque los animales infectados presentaron hiperproteinemia, ese aumento no fue significativo cuando comparado al grupo control.

PALABRAS-CLAVE: *Ehrlichia canis*. Hipoalbuminemia. Hipergamaglobulinemia. Perro.

INTRODUÇÃO

A erliquiose canina é uma enfermidade infecciosa com hospedeiros vertebrados, principalmente os cães domésticos e selvagens, podendo ser encontrada também em primatas (HEERDEN e GOOSEN, 1981) e até mesmo no homem (ENG e GILES, 1989). O agente etiológico conhecido como *Ehrlichia canis* (DONATIEN e LESTOQUARD, 1935, COLES, 1953, PHILIP, 1953) pertence à família Rickettsiaceae e é transmitido ao seu hospedeiro pela picada do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. A *E. canis* infecta células mononucleares circulantes, formando inclusões intracelulares (móculas), que são observadas por ocasião do exame citoscópico de esfregaços sangüíneos e encontradas, geralmente, durante o estágio inicial da infecção (BREITSCHWERDT, 1995). A erliquiose pode ocorrer nas formas aguda, subclínica e crônica, tendo como principais sinais clínicos anorexia, letargia, inatividade, perda de peso e distúrbios hemorrágicos, como petéquias hemorrágicas, epistaxe, equimoses e hematúria (FRANK e BREITSCHWERDT, 1999).

No Brasil, a erliquiose canina foi diagnosticada pela primeira vez em 1973 por Costa et al., em Belo Horizonte - Minas Gerais.

A *Ehrlichia canis* é um parasito que apresenta potencial zoonótico, e vários casos foram relatados tanto em adultos como em crianças (MAEDA, et al., 1987, TAYLOR et al., 1988, ENG e GILES, 1989). A transmissão do parasito ao homem ocorre através da picada do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* e os sinais clínicos da doença mais comuns são: febre, dor de cabeça, anorexia, mialgia, calafrios, náusea/vômito, perda de peso, leucopenia e trombocitopenia, como possível resultado de hipoplasia de medula óssea (ENG e GILES, 1989). A partir de 1992, a erliquiose em humanos passou a ser considerada como doença de importância zoonótica pela Organização Panamericana de Saúde (BENENSON, 1992). No cão, as alterações hematológicas que ocorrem com maior frequência são trombocitopenia e pancitopenia. A trombocitopenia ocorre 10 a 20 dias após a infecção, tendendo a persistir durante todas as fases da doença (DAVOUST et al., 1991). A pancitopenia ocorre nos casos crônicos e graves devida à hipoplasia das células progenitoras na medula óssea (HIBBLER et al., 1986). Buhles Jr. et al. (1975) constataram, nos casos mais

acentuados da doença, ao realizarem biópsias de medula óssea, que elas se apresentavam hipocelulares, com evidente depleção de todos os setores hematopoéticos, caracterizando o quadro de anemia aplástica.

Muitos autores têm relatado alterações seroprotéicas em cães infectados por *E. canis* (BREITSCHWERDT et al., 1987, WEISER et al., 1991, HARRUS et al., 1996, HARRUS, et al., 1998, HEEB et al., 2003). As proteínas séricas apresentaram-se aumentadas acima dos valores esperados, em aproximadamente 50 a 75% em cães soropositivos para *E. canis* (CODNER et al., 1985, KUEHN e GAUNT, 1985). A hiperglobulinemia é caracterizada por aumento nas globulinas beta e gama. A eletroforese das proteínas séricas pode revelar uma gamopatia policlonal ou monoclonal. A hipoalbuminemia ocorre em associação à perda protéica por nefropatia ou a um decréscimo recíproco da albumina associado com a hiperglobulinemia.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar alterações seroprotéicas pelo fracionamento das proteínas séricas por eletroforese, em cães infectados naturalmente, que apresentavam sinais clínicos consistentes de erliquiose, confirmada pela hematologia e sorologia.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 30 cães, entre machos e fêmeas, com ou sem raça definida, com idades entre 1 e 5 anos, divididos em 3 grupos experimentais:

Grupo 1: cães sadios: dez (10) cães adultos, apresentando títulos de anticorpos para *E. canis* negativos e perfil hematológico dentro da normalidade.

Grupo 2: cães portadores de *Ehrlichia canis* e trombocitopênicos: dez cães, apresentando títulos de anticorpos para *E. canis* > 1:160.

Grupo 3: cães portadores de *Ehrlichia canis* e pancitopênicos: dez cães, apresentando títulos de anticorpos para *E. canis* > 1:160.

Os animais dos grupos 2 e 3 foram obtidos junto à rotina do serviço ambulatorial do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp - Campus de Jaboticabal. Sua inclusão no protocolo experimental fundamentou-se na avaliação do quadro hematológico, exame clínico e

positividade de anticorpos contra a *E. canis*, com base na técnica de “Dot-blot ELISA”⁴, que é capaz de determinar anticorpos da classe IgG específico para o agente.

A amostra de sangue total de cada animal foi imediatamente processada após a colheita. A determinação do número total de eritrócitos e leucócitos, taxa de hemoglobina, hematócrito e contagem global de plaquetas foi obtida com o auxílio de um contador automático de células² modelo AcT-8. As fórmulas leucocitárias relativas foram obtidas do exame de esfregaços sangüíneos corados com uma mistura de Metanol, May-Grunwald e Giemsa.

As determinações da concentração sérica de proteínas totais e albumina foram realizadas, respectivamente, pelos métodos do biureto e verde de bromocresol, com leituras espectrofotométricas¹.

O fracionamento eletroforético das diferentes frações protéicas do soro sangüíneo foi realizado utilizando-se um sistema de eletroforese FEA-250² e obedeceu ao seguinte procedimento: após o preenchimento da cuba com 80 mL de tampão tris pH 9.5 gelado (2 a 8° C), foi aplicado 0,4 mL do soro de cada animal no filme de agarose. Em seguida o filme de agarose foi colocado em suporte apropriado com a extremidade onde foram aplicadas as amostras voltada para o pólo negativo. O suporte foi colocado de modo a apoiar-se na cuba, que foi tampada e ligada a uma voltagem de 80 volts, por 20 minutos. A seguir, o suporte foi retirado da cuba e colocado sobre uma folha de papel de filtro para eliminar o excesso de tampão das bordas. O filme foi retirado do suporte e mergulhado em 200 mL de corante (negro de amido), onde permaneceu por cinco minutos. Depois, o filme de agarose passou por uma fase de descoloração, sendo imerso em 200 mL de ácido acético (5%), durante cinco minutos. A seguir, o filme foi colocado em estufa, a 60 °C, até que ficasse completamente seco. Em seguida, passou por nova fase de descoloração com banhos sucessivos de ácido acético (5%), seguidos de nova secagem a 60°C. A leitura do filme foi feita por meio de programa de computador SDS-60³.

Os valores médios obtidos para proteínas séricas totais, albumina e demais frações e subfrações protéicas e suas relações foram analisados dentro de um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três tratamentos e 10 repetições. A confrontação das médias obtidas para os diferentes tratamentos foi realizada pelo Teste Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade.

RESULTADOS

Os valores médios obtidos para as diferentes variáveis do quadro seroprotéico (proteínas totais,

albumina, α 1-globulinas, α 2-globulinas, β -globulinas, γ -globulinas e relação albumina/globulina) de todas as parcelas experimentais estão expressos na Tabela 1.

Proteínas Totais

Em relação aos níveis de proteínas totais séricas, não foi observada diferença significativa entre os animais dos grupos G1, G2 e G3.

Albumina

Constatou-se diferença significativa entre os animais dos três grupos estudados (G1, G2 e G3), sendo os valores encontrados para os animais do grupo controle (G1) mais altos que aqueles dos grupos G2 e G3, respectivamente ($p < 0,01$).

Globulina

Os grupos pancitopênico e não-pancitopênico apresentaram valores médios significativamente maiores quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$)

α 1-Globulina

Em relação aos níveis de α 1-globulina, não foi observada diferença significativa entre os animais dos grupos G1, G2 e G3.

α 2-Globulina

Em relação aos níveis de α 2-globulina, não foi observada diferença significativa entre os animais dos grupos G1, G2 e G3.

Betaglobulinas

Em relação aos níveis de betaglobulina, não foi observada diferença significativa entre os animais dos grupos G1, G2 e G3.

Gamaglobulinas

Os valores médios para a concentração de gamaglobulina foram significativamente maiores no grupo pancitopênico e não-pancitopênico, quando comparado com o grupo controle ($p < 0,05$).

Albumina/Globulina

Os valores médios para proporção de albumina/globulina foram significativamente menores em ambos os grupos, não-pancitopênicos (G2) e pancitopênicos (G3), quando comparados ao grupo controle ($p < 0,01$).

DISCUSSÃO

O resultado deste estudo demonstra alterações significativas no perfil seroprotéico de cães infectados naturalmente por *E. canis*. Hipoalbuminemia, hiperglobulinemia e hipergamaglobulinemia significativas

3 CELM – Cia Equipadora de Laboratórios Modernos – Barueri - SP

Tabela 1 - Valores médios e respectivos desvios-padrão obtidos para proteínas totais, albumina, globulinas, alfa globulinas 1 e 2, betaglobulinas, gamaglobulinas e relação albumina/globulina em cães hígidos (grupo controle) e com erliquiose, não-pancitopênicos e pancitopênicos, atendidos pelo serviço de rotina ambulatorial do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Campus de Jaboticabal, Jaboticabal (SP), 2004.

Variáveis	Grupo controle	Não-pancitopênicos	Pancitopênicos
Proteínas Totais	6,25±0,65 a ¹	7,79±1,78 a	7,34±2,20 a
Albumina	3,28±0,19 a ^{**}	2,55±0,64 b	1,92±0,65 c
Globulina	2,96±0,53 b ^{**}	5,24±2,08 a	5,42±2,57 a
A/G	1,13±0,16 a ^{**}	0,56±0,24 b	0,44±0,26 b
α1 globulina	0,63±0,06 a	0,55±0,09 a	0,52±0,16 a
α2 globulina	0,54±0,09 a	0,57±0,17 a	0,53±0,16 a
β globulina	1,17±0,25 a	1,35±0,27 a	1,42±0,37 a
γ globulina	0,64±0,19 a [*]	2,24±1,99 b	1,58±0,36 b

* = Significativo (p<0,05)

** = Significativo (p<0,01)

⁽¹⁾ = Médias de uma mesma linha, seguidas por letras minúsculas iguais não diferem entre si (p>0,05) pelo Teste Tukey.

foram observadas nos cães com erliquiose.

O grupo não-pancitopênico apresentou valor médio para proteínas totais elevado, quando comparado aos demais grupos, porém mesmo esta diferença não tendo significância estatística, concorda com relatos de Harrus et al. (1996), que encontraram hiperproteinemia estudando 42 cães infectados. Weiser et al. (1991) também relataram a ocorrência de hiperproteinemia em oito cães com erliquiose crônica.

A hipoalbuminemia observada em todos os estágios da erliquiose pode ser consequência de vários fatores: anorexia, que leva à diminuição da ingestão de proteínas, decréscimo da produção de proteínas devido a doenças hepáticas concomitantes e proteinúria (HARRUS et al., 1996). Durante a fase aguda da erliquiose, Codner et al. (1992) relataram uma albuminúria transitória em seis cães da raça Beagle experimentalmente infectados.

A hiperglobulinemia observada nos cães infectados pode ser atribuída à hipergamaglobulinemia presente tanto nos cães pancitopênicos como nos não-pancitopênicos. Harrus et. al (1996) observaram concentrações baixas da fração gamaglobulina em cães pancitopênicos, quando comparados ao grupo não-pancitopênico, indicando um estágio avançado da doença, sendo consequência de hipoplasia da medula óssea. Tais achados concordam com os resultados deste experimento, em que, mesmo não sendo significativa a diferença entre os grupos de animais infectados, houve diminuição de gamaglobulinas no grupo pancitopênico. A diminuição de gamaglobulinas no grupo pancitopênico pode ser consequência da leucopenia pronunciada apresentada por esses cães.

Como a ativação, divisão e diferenciação dos linfócitos B em células formadoras de anticorpos requer citocinas secretadas principalmente por células T-

auxiliadoras e por células apresentadoras de antígenos (GUY e HODES, 1989), uma leucopenia pronunciada em cães com pancitopenia pode resultar em interações inapropriadas entre as células mencionadas acima, deficiência de citocinas e células apresentadoras de antígenos, resultando, assim, em menor concentração de gamaglobulinas.

CONCLUSÕES

Considerando-se os resultados obtidos no presente experimento, conclui-se que ocorre marcante alteração no perfil seroprotéico em cães infectados naturalmente por *E. canis*, como hipoalbuminemia, hiperglobulinemia e hipergamaglobulinemia. Devido à leucopenia e consequente neutropenia, além de menores níveis de gamaglobulinas em cães pancitopênicos, sugere-se que tais animais sejam mais susceptíveis a infecções secundárias, quando comparados com animais não-pancitopênicos.

ARTIGO RECEBIDO: Setembro/2004
APROVADO: Março/2005

REFERÊNCIAS

BENENSON, A. S. Ehrlichiosis. In: _____. **El control de las enfermedades transmisibles en el hombre**. 15 ed. Washington D.C.: Organization Mundial de Salud, 1992. p.115-117 1992

- BREITSCHWERDT, E. B. The rickettsioses. In: ETTINGER, S. J., FELDMAN, E. C. **Textbook of veterinary internal medicine**. 4.ed. Philadelphia: Saunders, 1995. p.376-383.
- BREITSCHWERDT, E. B., WOODY, B. J., ZERBE, C. A., DE BUYSSCHER, E. V., BARTA, O. Monoclonal gammopathy associated with naturally occurring canine ehrlichiosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 1, p. 2-9, 1987.
- BUHLES Jr, W. C., HUXSOLL, D.L., HILDEBRANDT, P. K. Tropical Canine Pancitopenia: role of aplastic anemia in the pathogenesis of severe disease. **Journal of Comparative Pathology**, v.85, n.4, p.511-521, 1975.
- CODNER, E. C., ROBERTS, R. E., AINSWORTH, A. G. Atypical findings in 16 cases of canine ehrlichiosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.186, p.166-169, 1985.
- CODNER, E. C., CACECI, T., SAUNDERS, E.K., SMITH, C. A., ROBERTSON, J. L., MARTIN, R. A., TROY, G.C. Investigation of glomerular lesions in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. **American Journal of Veterinary Research**, v.53, p.2286-2291, 1992.
- COLES, J. D. W. A. Classification of rickettsiae pathogenic to vertebrates. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.56, p.457, 1953.
- COSTA, J. O. *Ehrlichia canis* infection in dog in Belo Horizonte - Brazil. **Arquivos da Escola de Veterinária UFMG**, v.25, n.2, p.199-200, 1973.
- DAVOUST, B., PARZY, D., VIDOR, E., HASSELOT, N., MARTET, G. Ehrlichiose canine experimentale: etude clinique et therapeutique. **Revue de Medecine Veterinaire**, v.167, n.1, p.33-40, 1991.
- DONATIEN, A., LESTOQUARD, F. Existence en Algérie d'une Rickettsia du chien. **Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique**, v.28, p.418-419, 1935.
- ENG, T. R., GILES, R. Ehrlichiosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.194, n.4, 1989.
- 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.
- GUY, R., HODES, R. J. Antigen-specific, MHC-restricted B cell activation by cell-free Th2 cell products. Synergy between antigen-specific helper factors and IL-4. **Journal of Immunology**, v.143, p.1433-1440, 1989.
- HARRUS, S., WARNER, T., AVIDAR, Y.; BOGIN, E., PEH, H., BARK, H. Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.66, p.241-249, 1996.
- HARRUS, S., OFRI, R., AIZENBERG, I., WARNER, T. Acute blindness associated with monoclonal gammopathy induced by Ehrlichia canis infection. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 78, p. 155-160, 1998.
- HEEB, H. L., WILKERSON, M. J., CHUN, R., GANTA, R. R., Large granular lymphocytosis, lymphocyte subset inversion, thrombocytopenia, dysproteinemia, and positive *Ehrlichia* serology in a dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 39, p. 379-384, 2003.
- HEERDEN, J. V., GOOSEN, D. J. Attempted transmission of canine ehrlichiosis to the vervet monkey (*Cercopithecus pygerythrus*). **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.48, n.2, p.127-128, 1981.
- HIBBLER, C. S., HOSKINS, J. D., GREENE, C. E. Rickettsial infections in dogs Part II: Ehrlichiosis and infectious Cyclic Trombocytopenia. **Compendium of Continuing Education in Practice Veterinary**, v.8, n.2, p.106-113, 1986.
- KUEHN, N. F., GAUNT, S. D. Clinical and hematologic findings in canine ehrlichiosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.186, n.4, p.355-358, 1985.
- MAEDA, K., MARKOWITZ, N., HAWLEY, R. C., RISTIC, M., COX, D., MCDADE, J. E. Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia. **The New England Journal of Medicine**, v.316, n.14, 1987.
- PHILIP, C. B. Nomenclature of Rickettsiaceae pathogenic to vertebrates. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.56, p.484, 1953.
- TAYLOR, J. P., BETZ, T. G., FISHBEIN, D. B., ROBERTS, M. A., DAWSON, J., RISTIC, M. Serological evidence of possible human infection with *Ehrlichia canis*. In Texas. **Journal of Infections Diseases**. v.158, n.1, p.217-220, 1988.
- WEISER, M. G., THRALL, M. A., FULTON, R., BECK, E., WISE, L., VAN STEENHOUSE, J. Granular lymphocytosis and hyperproteinemia in dogs with chronic ehrlichiosis. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.27, n.1, p.84-88, 1991.