

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO CLÍNICO E IMUNOPATOLÓGICO DA INFECÇÃO
EXPERIMENTAL EM CÃES COM A AMOSTRA
JABOTICABAL DE *Ehrlichia canis* NA FASE AGUDA E
APÓS O TRATAMENTO: EXPRESSÃO DE CITOCINAS
NO BAÇO E SANGUE E DE SUBPOPULAÇÕES DE
CÉLULAS IMUNES NO BAÇO**

Joice Lara Maia Faria

Orientadora: Prof^a Dr^a Mirela Tinucci Costa

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, *campus* de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

JABOTICABAL - SÃO PAULO – BRASIL
Janeiro de 2010

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

JOICE LARA MAIA FARIA – casada, nascida na cidade de Uberlândia-MG, em 30 de julho de 1980. Médica Veterinária formada pela Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia-MG, em janeiro de 2004. Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica do CNPq/PIBIC pesquisando os aspectos clínicos, laboratoriais e epidemiológicos da erliquiose canina. Ingressou no curso de Mestrado do programa de pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Clínica Médica Veterinária, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, *campus* Jaboticabal-SP, em agosto de 2004, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Mirela Tinucci Costa, o qual foi concluído em fevereiro de 2006. Em março do mesmo ano ingressou no curso de doutorado no programa de Medicina Veterinária na área de Clínica Médica. Durante o curso de doutorado foi professora substituta da disciplina de Semiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia-MG durante um semestre. Além disso, também prestou atendimentos clínicos no Setor de Oncologia Veterinária do Hospital Veterinário da UNESP/Jaboticabal. Atualmente é professora da disciplina de Semiologia Veterinária do Curso de Medicina Veterinária da Universidade de Uberaba, com carga horária de 40 horas.

*Ando devagar porque já tive pressa
e levo esse sorriso porque já chorei demais!
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe...
Só levo a certeza de muito pouco eu sei, ou nada sei..."*

Almir Sater

DEDICATÓRIA

Dedico ao Apolo, Banzé, Black, Estrelinha, Kika, Nina, Pelota, Pulga, Ratinha, Rock, Thor... os meus queridos cães que constituíram o grupo experimental, e que mesmo impostos à doença, continuaram nos prestigiando com um amor incondicional. Obrigada pela oportunidade de aprender cientificamente e espiritualmente! Serei eternamente grata!

Ofereço também aos meus pequenos Pink, Kika, Kate, Scooby, Ruiva, Zuca (*no coração*), Zebra, Clara e Sheep pelo amor concedido na sua forma mais pura!

“Ser veterinário é ter capacidade de compreender gratidões mudas e adivinhar olhares... É conviver lado a lado com ensinamentos profundos de amor e vida...”

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu grande e único amor, meu esposo Wanderson A. B. Pereira! Você foi imprescindível nesse árduo caminho. Me levantou quando caí, me deu forças para que eu não caísse novamente. Segurou firme a minha mão e disse: “Vamos em frente... vai dar tudo certo!” E, realmente deu! Obrigada pelo amor, pela paciência, apoio e ensinamentos. Te amo muito, e não tenho palavras que consigam expressar!

AGRADECIMENTOS

À Deus por sempre iluminar o meu caminho e me presentear com pessoas tão maravilhosas!!

À Prof^a. Dr^a. Mirela Tinucci Costa... foi um longo caminho até aqui! E... ainda resta muito pela frente. Você, foi mais do que uma orientadora e muito tenho a te agradecer pelos ensinamentos, pela amizade, confiança, carinho. Torço para que o nosso vínculo jamais se desfaça!

À Prof^a. Dr^a. Rosângela Zacarias Machado, pela imensa contribuição e colaboração com este trabalho. Pelo apoio estrutural do seu laboratório e pelos teus conhecimentos. Muitíssimo obrigada por tudo!

Aos meus irmãos Celso e Hiliano por toda a nossa história vivida e compartilhada. O passado hoje, se faz presente na minha determinação, e vocês são os responsáveis por isso! Obrigada por tudo que fizeram por mim, mesmo com todas as nossas limitações.

Aos meus pais Luzia e Hildebrando (*in memoriam*), mesmo que tenhamos convivido pouco me deixaram boas recordações que levarei sempre comigo.

Aos meus sogros Wanderley e Sônia que são meus segundos pais, e mais do que apoiaram, me cederam carinho, respeito e confiança. Vocês são nota 10! E, eu tenho muita sorte de tê-los como sogros!

Ao meu cunhado Gustavo, vô Júlio (no coração), vó Júlia, ao "Zê", Marilda, Carlinhos, Maurícia, Ricardo, Valéria e a todos os membros dessa grande família... pelo apoio incondicional! Vocês são muito especiais!

A minha querida amiga Carolina F. João pela amizade franca e cúmplice. A nossa amizade foi uma surpresa excelente, e que cresceu a cada dia mais ao longo desses anos. Obrigada pelo companherismo e por toda a ajuda, durante todo esse tempo!

Ao meu querido amigo e irmão Thiago D. Munhoz por dividir comigo todos os difíceis momentos dessa jornada! Obrigada pela imensa ajuda, pelo apoio e pela paciência!

Ao meu amigo Giovanny Vargas Hernandez pela imensa colaboração nas coletas e no cuidado com os cachorros, sempre muito prestativo e atencioso!

Ao Prof Dr Aureo Evangelista Santana, ao Biomédico Eugênio de Campos Filho, as Médicas Veterinárias Residentes em Patologia Clínica e ao auxiliar técnico Matheus de Andrade pelo auxílio na realização dos exames.

Ao pessoal do Laboratório de Tecnologia Jackson, Karla, Wellington, Érica, Ana Rita, Rosinha, Douglas, Vivi e a todos que de alguma forma me ajudaram na realização dos experimentos e me ouviram nos momentos de desespero! Valeu galera!

Ao Marcos Rogério André, doutorando do Laboratório de Imunoparasitologia, pela grande ajuda e colaboração na realização deste trabalho. Muito obrigada!

Às “meninas” do Diagnóstico por Imagem Adriana e Carol por todo apoio durante as coletas de baço, imprescindível para realização deste estudo.

À galera da Onco... Sabrina S. Costa, Sabryna Calazans, Aline Godoy, Geórgia (Kaneca), Érica (“Xorona”), Sophia... pela amizade, pelo carinho, pelos ensinamentos e experiências compartilhadas!

À pós-graduanda Mariana Cristina Hoepfner Rondelli pela tradução para o inglês do resumo deste trabalho.

A técnica Marilde pela ajuda sempre que solicitada e pela manutenção da organização do laboratório. Obrigada!

A FAPESP pelo auxílio à pesquisa concedido.

Ao curso de pós-graduação em Medicina Veterinária pela oportunidade concedida.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos começando...

A certeza de que precisamos continuar...

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...

Portanto devemos:

Fazer da interrupção um caminho novo, da queda um passo de dança,

do medo uma escada, do sonho uma ponte...

da procura o encontro!”

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE QUADROS E FIGURAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Erliquiose canina	3
2.2. Imunopatologia da erliquiose canina	11
3. OBJETIVOS	16
3.1. Objetivo Geral	16
3.2. Objetivos Específicos	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1. Animais experimentais	17
4.2. Inóculo e infecção experimental	18
4.3. Tempos experimentais e avaliações	18
4.3.1. Técnica das Reações de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para <i>Ehrlichia canis</i> e <i>Babesia anis</i>	21
4.3.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	21
4.4. Expressão gênica das citocinas	23
4.4.1. Extração do RNA	23
4.4.2. Reação de transcrição reversa	24
4.4.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação das regiões gênicas codificadoras de citocinas	25
4.4.4. Análise da expressão gênica relativa	27
4.5. Pesquisa de mórulas	28
4.6. Imunofenotipagem das células esplênicas	28
4.7. Análise dos resultados	30
5. RESULTADOS	32
5.1. Avaliação da infecção experimental	32

5.1.1. Exame físico dos animais	32
5.1.2. Hemograma e plaquetas.....	33
5.1.3. Detecção da infecção	37
5.1.4. Detecção de anticorpos anti- <i>E.canis</i> e anti- <i>B.canis</i>	37
5.1.5. Detecção do DNA de <i>E. canis</i>	38
5.2. Avaliação da Expressão Gênica de Citocinas.....	39
5.3. Imunocitoquímica esplênica	50
5.4. Pesquisa de mórulas	57
6. DISCUSSÃO	58
7. CONCLUSÃO.....	67
8. REFERÊNCIAS	68
ANEXOS	82

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Valores médios do hemograma obtidos para as características eritrométricas em cães controles (CO) e infectados (EC) experimentalmente com a amostra *E. canis* de Jaboticabal. Jaboticabal, SP. Janeiro/2010.....35
- Tabela 2.** Valores médios do hemograma obtidos para as características leucométricas de cães controles (CO) e infectados (EC) experimentalmente com a amostra *E. canis* de Jaboticabal. Jaboticabal, SP. Janeiro/2010.....36
- Tabela 3.** Resultados da sorologia anti-*E.canis* e anti-*B.canis* obtidos por meio da RIFI, nos cães dos grupos controle (CO) e infectado (EC), nos períodos pré-determinados. Jaboticabal, SP. Janeiro/2010.....37
- Tabela 4.** Resultados da nPCR de *E. canis* dos cães dos grupos controle (CO) e infectado (EC), nos períodos pré-determinados. Jaboticabal, SP. Janeiro/2010...38
- Tabela 5.** Média da taxa de expressão dos genes IL-10, TNF- α , e IFN- γ dos grupos CO e EC (leucócitos e baço). Jaboticabal, SP. Janeiro/2010. 40
- Tabela 6.** Valores médios e desvios padrão da contagem de células esplênicas imunomarcadas com os anticorpos CD4⁺, CD8⁺, CD79- α ⁺, MAC387⁺, MCH II⁺, dos cães dos grupos controle (CT) e infectado (EC), nos momentos pré-determinados. Jaboticabal, SP. Janeiro/2010.....53

LISTA DE QUADROS E FIGURAS

- Quadro 1.** Protocolo experimental adotado para os cães controle e experimentalmente infectados com a amostra *E. canis* de Jaboticabal.....20
- Quadro 2.** “Primers”, tamanho dos fragmentos gerados, sequência no GeneBank e referência dos “primers” para amplificação dos genes de interesse.....26
- Quadro 3.** Condições de termociclagem utilizadas na PCR para amplificação dos genes de interesse.....27
- Quadro 4.** Anticorpos empregados na caracterização morfofuncional dos leucócitos presentes na citologia esplênica, com os respectivos clones, especificidades, procedências e as diluições utilizadas nas reações de imunocitoquímica.....30
- Figura 1.** Média da variação diária de temperatura dos cães infectados com a amostra Jaboticabal de *E. canis*, desde o dia 1 até o dia 30 pós inoculação. Jaboticabal, SP. Janeiro/2009. A variação fisiológica de temperatura para a espécie canina é de 37,5° a 39,4°C (FEITOSA, 2004).....33
- Figura 2.** Visibilização do DNA de *E. canis* obtido pela nPCR de amostras de sangue total de cães do grupo EC, no D18. Canaleta 1: marcador de tamanho molecular (100 pb); canaleta 2: controle positivo; canaletas 3 a 7: animais do grupo CO; canaletas 8 a 13: animais do grupo EC; canaleta 14: controle negativo (água); pb (pares de base).....38
- Figura 3.** Visibilização do padrão de bandas obtidas no gel de agarose do gene constitutivo GAPDH. A. D6, B. D18, C. D30, D. D76. Canaleta 1. marcador de pares de base, Canaletas 2 a 5 amostras de leucócitos do Grupo EC, Canaletas de 6 a 10 amostras esplênicas do grupo EC. Canaletas de 11 a 15 amostras de leucócitos grupo CO. Canaletas de 16 a 20 amostras esplênicas do grupo CO.....41
- Figura 4.** Visibilização do padrão de bandas obtidas no gel de agarose do gene IL-10 no momento D18. Canaleta 1. marcador de pares de base, Canaletas 2 a 5 amostras de leucócitos do Grupo EC, Canaletas de 6 a 10 amostras esplênicas do grupo EC. Canaletas de 11 a 15 amostras de leucócitos grupo CO. Canaletas de 16 a 20 amostras esplênicas do grupo CO.....42

Figura 5. Visibilização do padrão de bandas obtidas no gel de agarose do gene IFN- γ no momento D30. Canaleta 1. marcador de pares de base, Canaletas 2 a 5 amostras de leucócitos do Grupo EC, Canaletas de 6 a 10 amostras esplênicas do grupo EC. Canaletas de 11 a 15 amostras de leucócitos grupo CO. Canaletas de 16 a 20 amostras esplênicas do grupo CO.....42

Figura 6. Representação gráfica da detecção do gene IL-10 no momento D18 obtido a partir do programa de análise Quantity one[®] 1D mostrando o pico de intensidade das bandas no gel de agarose. **A.** amostras esplênicas grupo CO; **B.** amostras esplênicas grupo EC; **C.** amostras de leucócitos grupo CO e **D.** amostras leucócitos grupo EC.....43

Figura 7. Representação gráfica da detecção do gene IFN- γ no momento D30 obtido a partir do programa de análise Quantity one[®] 1D mostrando o pico de intensidade das bandas no gel de agarose. **A.** amostras esplênicas grupo CO; **B.** amostras esplênicas grupo EC; **C.** amostras de leucócitos grupo CO e **D.** amostras leucócitos grupo EC.....44

Figura 8. Visibilização do padrão de bandas obtidas no gel de agarose do gene TNF- α . A. D6, B. D18, C. D30, D. D76. Canaleta 1. marcador de pares de base, Canaletas 2 a 5 amostras de leucócitos do Grupo EC, Canaletas de 6 a 10 amostras esplênicas do grupo EC. Canaletas de 11 a 15 amostras de leucócitos grupo CO. Canaletas de 16 a 20 amostras esplênicas do grupo CO.....45

Figura 9. Representação gráfica da detecção do gene TNF- α no momento D6 obtido a partir do programa de análise Quantity one[®] 1D mostrando o pico de intensidade das bandas no gel de agarose. **A.** amostras esplênicas grupo CO; **B.** amostras esplênicas grupo EC; **C.** amostras de leucócitos grupo CO e **D.** amostras leucócitos grupo EC.....46

Figura 10. Representação gráfica da detecção do gene TNF- α no momento D18 obtido a partir do programa de análise Quantity one[®] 1D mostrando o pico de intensidade das bandas no gel de agarose. **A.** amostras esplênicas grupo CO; **B.** amostras esplênicas grupo EC; **C.** amostras de leucócitos grupo CO e **D.** amostras leucócitos grupo EC.....47

Figura 11. Representação gráfica da detecção do gene TNF- α no momento D30 obtido a partir do programa de análise Quantity one[®] 1D mostrando o pico de intensidade das

bandas no gel de agarose. **A.** amostras esplênicas grupo CO; **B.** amostras esplênicas grupo EC; **C.** amostras de leucócitos grupo CO e **D.** amostras leucócitos grupo EC.....48

Figura 12. Representação gráfica da detecção do gene TNF- α no momento D76 obtido a partir do programa de análise Quantity one[®] 1D mostrando o pico de intensidade das bandas no gel de agarose. **A.** amostras esplênicas grupo CO; **B.** amostras esplênicas grupo EC; **C.** amostras de leucócitos grupo CO e **D.** amostras leucócitos grupo EC.....49

Figura 13. Representação gráfica da contagem das células esplênicas imunomarcadas com os anticorpos CD4⁺, CD8⁺, CD79- α ⁺, MAC387⁺, MCH II⁺, dos cães dos grupos infectado (EC) em A e controle (CT) em B e, nos momentos experimentais. 52

Figura14. Representação gráfica da porcentagem das subpopulações de células esplênicas e da expressão gênica de citocinas em cães experimentalmente infectados com a amostra Jaboticabal de *E. canis*.....53

Figura 15. Visibilização das imunomarcações dos linfonodos utilizados como controles da reação. **A** linfócitos T CD4+; **B.** linfócitos T CD8+, **C.** linfócitos B CD79- α +; **D** macrófagos, **E.** células expressando MHCII e **F** controle negativo. Método ABC e contra-coloração com Hematoxilina de Harris. 40X.....55

Figura 16. Visibilização das imunomarcações das células esplênicas. **A** linfócitos T CD4+; **B.** linfócitos T CD8+, **C.** linfócitos B CD79- α +; **D** macrófagos, **E.** células expressando MHCII e **F** controle negativo. Método ABC e contra-coloração com Hematoxilina de Harris. 40X.....56

Figura 17. Visibilização de mórulas em macrófagos esplênicos em cães EC em D18 e D30. 100X Rosenfeld modificado.....57

LISTA DE ABREVIATURAS

GAPDH – Gliceraldeído difosfato (gene constitutivo)

IL-1 β – interleucina 1 beta

IL-4 – Interleucina 4

IL-6 – interleucina 6

IL-10 – Interleucina 10

IL-8 – interleucina 8

IL-5 – interleucina 5

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa

IFN- γ – Interferon gama

TGF- β – Fator de crescimento transformador beta

Th1 – Célula auxiliar do tipo 1

Th2 – Célula auxiliar do tipo 2

CD4+ - células T auxiliares tipo 1

CD8+ - linócitos T citotóxicos

MHC I+ - células que expressam moléculas do complexo principal de histocompatibilidade classe I

MHC II+ - células que expressam moléculas do complexo principal de histocompatibilidade classe II

MAC387+ - anticorpo utilizado para imunomarcção de macrófagos

CD79+ - células B

IgA – imunoglobulina A

IgM – imunoglobulina M

IgG – imunoglobulina A

RESUMO: A infecção aguda experimental pela amostra Jaboticabal de *Ehrlichia canis* provoca alterações clínicas severas no hospedeiro, com graves distúrbios sanguíneos e imunológicos, que podem comprometer a vida do animal. Com este estudo buscou-se avaliar a expressão gênica de TNF- α , IFN- γ e IL-10, pesquisar a presença de mórulas no baço e avaliar o imunofenótipo das células esplênicas antes, nos dias 6, 18 e 30 após a inoculação e 25 dias após o tratamento com cloridrato de doxicilina, em cinco cães sem definição racial inoculados com a amostra Jaboticabal de *Ehrlichia canis*. Nas condições experimentais desta pesquisa, o início do desenvolvimento dos sinais clínicos, seis dias após a inoculação (D6) foi acompanhado pela expressão de TNF- α e aumento de células MHC II⁺ ($P < 0,05$) na citologia esplênica em relação ao controle. Com o desenvolvimento da infecção experimental (D18) ocorreu o agravamento dos sinais clínicos, os cães apresentaram febre, linfadenomegalia e esplenomegalia acompanhados de trombocitopenia, leucopenia e anemia, mórulas na citologia esplênica, aumento significativo da expressão de TNF- α em leucócitos e células esplênicas, detecção de IL-10, tanto em leucócitos como em células esplênicas e redução de células CD4⁺ ($P < 0,05$), em relação ao momento anterior e ao grupo controle, macrófagos ($P < 0,05$) em relação ao controle, e aumento de células B ($P < 0,05$) em relação a D-1 e ao grupo controle. Aos 30 dias os cães já não apresentavam sinais clínicos da infecção, porém persistia a trombocitopenia. Além disso, persistência do aumento das células B⁺ esplênicas ($P < 0,05$), diminuição significativa das células CD4⁺ e dos macrófagos em relação ao D18 e ao controle. O TNF- α atingiu sua maior taxa de expressão e ocorreu a detecção de IFN- γ . Após o tratamento (D76), os animais estavam clinicamente saudáveis, embora persistisse a trombocitopenia. Houve redução significativa das células CD4⁺ e de macrófagos em relação ao controle, aumento significativo do número de células CD8⁺ em relação ao controle e redução de aproximadamente 70% da taxa de expressão de TNF- α . Os resultados mostraram que a infecção experimental pela amostra Jaboticabal de *Ehrlichia canis* desencadeia no hospedeiro uma resposta inflamatória mediada pelo TNF- α , capaz de reduzir a resposta imune mediada por células e estimular a resposta

humoral. O tratamento com cloridrato de doxiciclina levou a melhora clínica e aumento das populações de células CD4⁺, macrófagos e redução da expressão do TNF- α .

Palavras-chave: Cães, Infecção experimental, *Ehrlichia canis*, células CD4⁺, TNF- α

SUMMARY: The experimental acute infection by *Ehrlichia canis* Jaboticabal sample provokes severe clinical alterations in the host with serious blood and immunological disorders that may compromise the animal's life. The present study aimed to evaluate the gene expression of TNF- α , IFN- γ and IL-10, search morulae presence in the spleen and evaluate the splenic cells' immunophenotype before, at days 6, 18 and 30 days post inoculation and 25 days after the treatment with doxycycline cloridrate, in five cross-bred dogs inoculated with *Ehrlichia canis* Jaboticabal sample. At the experimental conditions of this research, the beginning of the development of the clinical signs, six days after the inoculation (D6) was accompanied by expression of TNF- α and increase of MHC II⁺ cells ($P < 0,05$) at the splenic cytology when compared to the control group. As long as the experimental infection was developed (D18) the clinical signs were becoming worse, the dogs presented fever, lymphadenomegalia and spleenomegalia accompanied by thrombocytopenia, leucopenia and anemia, morulae in the splenic cytology, significant increase of the expression of TNF- α in leukocytes and splenic cells, detection of IL-10 both in leukocytes and in splenic cells and the decrease of CD4⁺ cells ($P < 0,05$) in comparison to the previous moment and to the control group, macrophages ($P < 0,05$) compared to the control group, and increase of cells B ($P < 0,05$) in comparison to the control group and D-1. At day 30 the dogs no more presented the infection clinical signs, although the thrombocytopenia persisted. Besides, persistent splenic cells B⁺ increase ($P < 0,05$), significant reduction of CD4⁺ cells and macrophages compared to D18 and to the control group were observed. The TNF- α reached its highest expression rate and the detection of IFN- γ occurred. After the treatment (D76), the animals were clinically healthy, although the thrombocytopenia had persisted. There was a significant decrease of CD4⁺ cells and macrophages compared to the control group, significant increase of CD8⁺ cell number when compared to the control group and decrease of approximately 70% of the TNF- α expression rate. The results have shown that the experimental infection by *Ehrlichia canis* Jaboticabal sample leads to an inflammatory response in the host mediated by TNF- α , capable to reduce the immune-mediated response by cells and to stimulate the humoral response. The treatment with

doxycycline cloridrate conducted to the better clinical aspects and increase of the CD4⁺ cell population, macrophages and reduction of the TNF- α expression.

Keywords: Dogs, Experimental infection, *Ehrlichia canis*, CD4⁺ cells, TNF- α

1. INTRODUÇÃO

A erliquiose canina foi descrita pela primeira vez na Argélia, quando DONATIEN & LESTOQUARD (1935) observaram que cães infectados com carrapatos desenvolviam uma doença severa caracterizada por anemia.

No Brasil, o primeiro relato de erliquiose canina foi em Belo Horizonte - MG, quando COSTA et al. (1973) analisando esfregaços sanguíneos, encontraram uma inclusão citoplasmática, em um linfócito, com aparência típica de *Ehrlichia canis*.

Anos mais tarde, MAREGATI (1978) apud KAVINSKI et al. (1988) relataram a ocorrência de erliquiose na cidade de Jaboticabal. Posteriormente, MACHADO (1993) apud MACHADO (2004) isolou uma amostra de *Ehrlichia canis* de um cão, fêmea da raça Weimaraner em fase aguda da doença, atendido no Hospital Veterinário - UNESP/Jaboticabal.

A erliquiose vem sendo registrada em número aparentemente crescente nesse Hospital Veterinário. Um levantamento feito entre os anos de 1985 e 1994 mostrou um total de 342 casos da doença (CORDEIRO et al., 1996). TINUCCI-COSTA & CAMACHO (1994)¹, verificaram que a erliquiose canina, representava 1,95% da casuística clínica de pequenos animais no mesmo hospital. Mais recentemente, MUNHOZ et al. (2003) encontraram uma casuística de 3,9%, mostrando a crescente incidência da erliquiose em cães atendidos no Hospital Veterinário – UNESP/Jaboticabal.

A erliquiose canina vem sendo alvo de vários estudos realizados no Laboratório de Imunoparasitologia da UNESP/Jaboticabal desde o isolamento da amostra obtido por MACHADO (1993).

Em um desses estudos CASTRO et al. (2004) observou, em cães experimentalmente infectados com a amostra *E. canis* de Jaboticabal, que todos apresentaram alterações clínicas, hematológicas e anatomopatológicas, além de imunidade humoral específica e presença de infiltrados mononucleares em vários tecidos. Posteriormente, o mesmo pesquisador, dando continuidade ao seu trabalho,

¹ TINUCCI-COSTA, M.; CAMACHO, A. A. (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) de Jaboticabal – UNESP. Comunicação Pessoal, 1994)

avaliou a imunidade celular de cães infectados com a amostra *E. canis* de Jaboticabal e sugeriu que a infecção experimental por *E. canis* desperta no hospedeiro um padrão de resposta imunológica do tipo Th1 (CASTRO, 2004). Neste ínterim outros pesquisadores avaliaram vários aspectos da erliquiose canina natural e experimental, como por exemplo OLIVEIRA et al. (2000) ao observarem que 48 (92,31%) dos 52 cães com suspeita clínica de erliquiose canina apresentavam títulos de anticorpos anti-*E. canis*. Posteriormente, ORIÁ (2001) detectou infiltrado inflamatório de células mononucleares no limbo, corpo e processo ciliar e anticorpos anti-*E. canis* no humor aquoso de cães naturalmente e experimentalmente infectados. Ainda neste período, SILVA (2001) identificou alterações clínicas, hematológicas e hiperplasia granulocítica e monofagocitária na medula óssea durante a fase aguda da doença, em cães experimentalmente infectados, com a amostra *E. canis* de Jaboticabal.

Anos mais tarde NAKAGHI et al. (2008) demonstraram que a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), o “Dot-ELISA” e a nPCR são testes eficientes no diagnóstico da *E. canis* em cães naturalmente infectados. Seus estudos foram complementados por FARIA et al. (2010) ao concluírem que a nPCR de sangue e a de baço se equivalem no diagnóstico da erliquiose canina de ocorrência natural e ainda que a pesquisa e mórulas em aspirados esplênicos é mais eficaz quando comparada a da papa leucocitária.

Além da *E. canis* DAGNONE et al. (2009) também identificaram amostras de *Anaplasma platys* em cães atendidos no Hospital Veterinário – UNESP/Jaboticabal.

Vários foram os estudos realizados sobre a erliquiose canina, contudo algumas dúvidas ainda permanecem a respeito do tipo de resposta imunológica e as implicações dessa resposta para o organismo do animal. Neste estudo objetivou-se avaliar os efeitos imunopatológicos causados em cães pela infecção experimental com a amostra *E. canis* de Jaboticabal baseado no perfil de citocinas produzidas, relacionando com a imunofenotipagem de células esplênicas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Erliquiose canina

A erliquiose canina é causada pela *E. canis*, bactéria gram-negativa intracelular obrigatória, que pertence à Ordem *Rickettsiales*, Família *Anaplasmataceae* e Gênero *Ehrlichia* (DUMLER et al., 2001), transmitida, principalmente, pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (LEWIS et al., 1977), e embora, em condições experimentais, o carrapato *Dermacentor variabilis* também seja capaz de transmitir a *E. canis* (WANER et al., 1999). No Brasil, COSTA Jr et al. (2007) incluíram também o *Amblyomma cajennense* como potencial vetor de *E. canis* em áreas rurais.

Organismos pertencentes a família *Anaplasmataceae* dos gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma* têm sido responsáveis por causar doenças em seres humanos. Dentre eles a *E. chaffeensis* é um dos principais agentes causadores da erliquiose humana, além disso é geneticamente semelhante à *E. canis* (WINSLOW et al., 2005). PEREZ et al. (1996) encontraram um microorganismo, análogo à *E. canis*, infectando humanos na Venezuela, e sugeriram que a erliquiose canina seja uma zoonose. Reforçando esse achado, DINIZ et al. (2007) apontaram a *E. canis* como possível agente zoonótico e sugeriram que vários seres humanos são constantemente expostos a bactéria, uma vez que, carrapatos *R. sanguineus* podem parasitar humanos (DANTAS-TORRES et al., 2006).

A doença tem um período de incubação de oito a 20 dias (TROY & FORRESTER, 1990) em animais natural e experimentalmente infectados e, após esse período, seguem as fases aguda, subclínica e crônica da doença (HARRUS et al. 1999; WANER et al., 1999). Na infecção experimental é possível diferenciar as três fases, que não são evidentes em infecções naturais (HARRUS et al., 1999). É importante ressaltar que variações no período de incubação da doença podem estar associadas a diferentes amostras do parasita. Estudos realizados por UNVERA et al. (2009) demonstraram ao infectarem um animal com a amostra Novo México que a manifestação dos sinais clínicos ocorreu a partir de 19 dias após a inoculação. Já NORMAND et al. (2009)

observaram o aparecimento de sinais clínicos 11 dias após a infecção experimental com a amostra *E. canis* Borgo 89.

A fase aguda perdura por duas a quatro semanas (TROY & FORRESTER, 1990) sendo caracterizada por hipertermia, perda de peso, anorexia, palidez de mucosas, depressão, linfadenomegalia, esplenomegalia, hepatomegalia, distúrbios cardiorrespiratórios, diátese hemorrágica, vasculite, sinais oculares e musculares, e poliartrite (TROY et al., 1980; TROY & FORRESTER, 1990; WANER et al., 1999; DAGNONE et al., 2001; SILVA, 2001; CASTRO et al., 2004). Outros autores observaram também melena, epistaxes, edema, sensibilidade renal, vômito e diarreia (OLIVEIRA et al., 2000; FARIA et al., 2003). A presença de proteinúria foi registrada por CODNER & MASLIN (1992) em seis de oito cães experimentalmente infectados, três a quatro semanas após a inoculação. Proteinúria foi também evidenciada por FARIA et al. (2003) em 40,2% de 72 animais estudados. Sinais neurológicos podem estar presentes, tanto na fase aguda, como na fase crônica da doença e estão comumente associados a hemorragias, vasculites e extensas áreas de infiltração inflamatória nas meninges (PANCIERA; EWING; CONFER, 2001).

Na fase aguda, a presença de carrapatos é um achado constante em animais com erliquiose (TROY & FORRESTER, 1990). Corroborando este dado, FARIA et al. (2003) verificaram que de 72 cães com mórulas de *E. canis* 27 (37,5%) estavam parasitados por carrapatos. Em outro estudo, os carrapatos foram encontrados em 68 (53,5%) de 129 cães analisados e, destes, 40 (58,0%) foram positivos para erliquiose, por meio da PCR (DAGNONE et al., 2003). Porém, MURPHY et al. (1998) detectaram DNA de *E. canis*, por meio da nPCR, em apenas dois (3,1%) de 65 cães com carrapatos no Estado de Oklahoma nos Estados Unidos.

As anormalidades hematológicas mais comuns durante a fase aguda da erliquiose canina são trombocitopenia, leucopenia e anemia caracterizada como normocítica normocrômica, geralmente arregenerativa, devido à supressão da medula óssea (OLIVEIRA et al., 2000; FARIA et al., 2003; CASTRO et al., 2004; NAKAGHI et al., 2008).

A trombocitopenia é um achado consistente, mas não específico para os casos de erliquiose canina (BULLA et al., 2004). Todavia, segundo WANER et al. (1995), BATMAZ et al. (2001) e UENO et al. (2009) a trombocitopenia é a anormalidade mais comum em cães natural ou experimentalmente infectados, sendo observada em todas as fases da doença. Contudo, DAGNONE et al. (2003), mostraram que a trombocitopenia não é um achado consistente em animais com erliquiose canina, pois detectou-se o DNA da *E. canis* em 12 de 61 cães com trombocitopenia.

Os mecanismos envolvidos na patogênese da trombocitopenia na erliquiose aguda incluem aumento de consumo de plaquetas devido às alterações inflamatórias do endotélio vascular, aumento do sequestro de plaquetas pelo baço e destruição imunológica que resulta em diminuição significativa do tempo de vida das plaquetas (KAKOMA et al., 1978; HARRUS et al., 1999).

Anticorpos anti-plaquetários foram encontrados no soro de cães após a infecção experimental com *E. canis* e parecem não estar relacionados ao desenvolvimento de anticorpos anti-*E. canis* (WANER et al., 1995; HARRUS et al., 1996; WANER et al., 2000). Esses dados sustentam a teoria de que a trombocitopenia na erliquiose tem um componente imunomediado e que a exposição ao agente infeccioso desencadeia mecanismos autoimunes no hospedeiro (WANER et al., 2001).

Os sinais clínicos da fase aguda podem, aparentemente, resolver-se sem tratamento, porém a eliminação da *E. canis* pode ser difícil e os cães permanecem infectados, passando à fase subclínica da doença (HARRUS et al., 1998a).

A fase subclínica tem duração variável, estendendo-se de meses a anos (CODNER & FARRIS-SMITH, 1986; TROY & FORRESTER, 1990). O animal pode encontrar-se com trombocitopenia persistente e leucopenia, porém com ausência de sinais clínicos (CODNER & FARRIS-SMITH, 1986; WANER et al., 1997; HARRUS et al., 1998a). Nesta fase, alguns cães podem apresentar tendências hemorrágicas, lesões oculares, glomerulonefrite (HARRUS et al., 1999) e aumento com persistência dos títulos de anticorpos no soro por um período superior a seis meses, indicando duração prolongada da infecção e estimulação antigênica (WANER et al., 1997; HARRUS et al., 1998a).

IQBAL & RIKIHISA (1994a) acreditam que durante a fase subclínica ocorra sequestro da bactéria nos tecidos, após a eliminação do parasita do sangue, podendo resultar em recidiva da doença. Esta teoria foi comprovada por HARRUS et al. (1998a, 1998b, 2004), que observaram a presença do DNA erliquial, principalmente no baço, além da medula óssea e do sangue, 34 meses após a inoculação experimental e acreditam que o baço seja o último órgão a acomodar o parasita antes de sua eliminação. Em outro estudo realizado em macacos Rhesus inoculados com *Anaplasma phagocytophila*, o DNA erliquial também foi detectado no baço antes de sua eliminação (FOLEY et al., 1999). Os resultados destas pesquisas sugerem que o parasita pode permanecer alojado no baço por um período maior, comparado aquele no sangue. Corroborando esta afirmativa, FARIA et al. (2010) observaram que a pesquisa de mórulas em aspirados esplênicos é 48% mais eficaz que no sangue, em animais naturalmente infectados.

Outros agentes rickettsiais como *E. chaffeensis* e *Anaplasma marginale* podem persistir no hospedeiro por longos períodos, evadindo-se da resposta imune. Entretanto, o exato mecanismo desta persistência ainda não está muito claro (FOLEY et al., 1999; HARRUS et al., 2004).

HARRUS et al. (1998c) demonstraram que cães experimentalmente infectados com *E. canis* e esplenectomizados sofrem a doença de forma mais branda, quando comparados aos cães não esplenectomizados. A hipótese de que o baço produziria mediadores inflamatórios e outras substâncias que poderiam favorecer a persistência da bactéria no hospedeiro e assim atuar na patogênese da doença. Contrariamente, humanos com erliquiose e esplenectomizados apresentam a enfermidade mais grave do que os não esplenectomizados (RABINSTEIN et al., 2000), possivelmente por reduzirem o “clearance” de antígenos, a resposta a novos antígenos e a fagocitose, entre outras atividades protetoras (DAVIDSON & WALL, 2001). Essas variações funcionais do baço frente a agentes agressores podem decorrer das múltiplas diferenças de estrutura e função do órgão entre as espécies, como sugerido por BOWDLER (2002).

Os cães, incapazes de montar uma resposta imune efetiva contra a bactéria, ficam cronicamente infectados (HARRUS et al., 1998a). As condições que levam ao desenvolvimento da fase crônica não estão totalmente elucidadas; entretanto, podem estar relacionadas à raça, ao estado imune do animal, às condições de estresse, às coinfeções com outros parasitas, à cepa ou à localização geográfica (BREITSCHWERDT; HEGARTY; HANCOCK, 1998). Os cães podem apresentar, nesta fase, depressão, fraqueza, anorexia, emagrecimento, palidez de mucosas, febre, hemorragias, edemas periféricos, sinais pulmonares, glomerulonefrite, artrite, desordens reprodutivas, sinais oftálmicos e alterações neurológicas (HARRUS et al., 1999; MYLONAKIS et al., 2004). Ocorre, ainda, pancitopenia, devido à hipoplasia da medula óssea (HARRUS et al., 1999; MYLONAKIS et al., 2004), que varia em função da variabilidade e patogenicidade da cepa de *E. canis*, das áreas geográficas e de fatores ainda desconhecidos (FRANK & BREITSCHWERDT, 1999). Em concordância com esses dados KEYSARY et al. (1996) obtiveram a primeira caracterização genética da cepa Israel (*E. canis* 611) e demonstraram diferença de 0,54% em relação à amostra Oklahoma, e de 0,31% se considerar a amostra *E. canis* da Flórida, com base no gene *16S rRNA*. Para MCBRIDE et al. (1999) a variabilidade da sequência hipervariável dos epítomos imunogênicos, possibilitaria que o parasita persistisse e se evadisse da resposta imune do hospedeiro.

Outro estudo demonstrou diferenças genéticas e antigênicas entre quatro genes bem conservados (gp19, gp36, gp140, gp200) que codificam proteínas imunorreativas entre diferentes cepas de *E. canis* (uma americana, uma brasileira, a israelense 611 e a israelense Ranana) e sugerem que essa variabilidade pode ter relação com a resposta imunológica e deve ser considerada quanto à aplicabilidade de diagnósticos e vacinas (ZHANG et al., 2008). Analisando os resultados desses estudos, pode-se sugerir que o tipo de resposta imunológica pode variar de acordo com a cepa infectante.

Cães com erliquiose crônica têm prognóstico reservado, uma vez que a resposta à terapia pode ser parcial ou mesmo ausente. Os animais podem passar ao estado de portador do parasita, quando conseguem superar a infecção, ou morrer por complicações da doença (IQBAL et al., 1994). Contudo, EDDLESTONE et al. (2007)

demonstraram que animais experimentalmente infectados com *E. canis*, em fase crônica da doença, tratados com doxiciclina (5mg/kg/VO/q12h), durante quatro semanas, ficam livres do parasita, uma vez que não detectou-se DNA erliquial no sangue ou tecidos após o tratamento.

Anticorpos das classes IgA e IgM específicos aparecem cerca de quatro a sete dias após a infecção experimental, enquanto que a IgG é detectada 15 dias após a infecção e parece ser dependente da quantidade de organismos erliquiais aos quais o animal foi exposto (WANER et al., 2001). Em outro estudo experimental, utilizando-se culturas de células infectadas com *E. canis*, o aparecimento de IgG foi observado três dias após a infecção (IQBAL et al., 1994).

Segundo HARRUS et al. (1999) a função da imunidade humoral não está totalmente elucidada, mas parece estar relacionada à patogênese da doença. Aparentemente, a imunidade humoral é ineficaz na defesa contra os organismos rickettsiais, pelo fato das imunoglobulinas não atuarem diretamente no parasita no interior das células infectadas (WANER et al., 2001). Contudo, YAGER et al. (2005) e FENG & WALKER (2004) observaram que os anticorpos são efetivos na eliminação de *E. chaffeensis* e *E. muris*, respectivamente, e aparentemente auxiliam na eliminação de *Ehrlichia* sp (IOE) (ISMAIL et al., 2004).

Alguns mecanismos imunológicos que participam da patogênese da doença, foram evidenciados por CASTRO (2004) durante a fase aguda da erliquiose experimental em cães. Os autores observaram infiltrado mononuclear por meio de imuno-histoquímica, que revelou áreas foliculares positivas para IgG, IgM e presença de grande número de células CD3⁺, em região medular de linfonodos e no cordão esplênico, e aumento da população de células CD8⁺.

O diagnóstico laboratorial da erliquiose pode ser realizado, rotineiramente, pela identificação direta de corpúsculos de inclusão ou mórulas de *E. canis* em leucócitos de sangue periférico (ELIAS, 1991). Importante ressaltar, que, na maioria dos casos de infecção natural, a detecção direta do parasita não é possível, devido ao pequeno número de células infectadas (HARRUS et al., 1997).

Em estudos realizados a partir de esfregaço de sangue periférico, FRANK & BREITSCHWERDT (1999) observaram a presença de mórulas em apenas uma dentre 62 amostras avaliadas e OLIVEIRA et al. (2000) em apenas uma dentre 52 amostras. MYLONAKIS et al. (2003) sugeriram que a pesquisa de mórulas na papa leucocitária e nos aspirados de linfonodos é mais sensível quando comparada à pesquisa feita em esfregaço sanguíneo de ponta de orelha e medula óssea e, pode ser utilizada na rotina hospitalar. Contudo, outro estudo, constatou que a pesquisa de mórulas em aspirados esplênicos é mais eficaz quando comparada à pesquisa de mórulas em papa leucocitária (FARIA et al., 2010).

A detecção de anticorpos específicos anti-*E. canis* no soro, por meio da RIFI, desenvolvida por RISTIC et al. (1972) e desde então aplicada no diagnóstico da doença, foi considerada por WANER, STRENGER & KEYSARY (2000) como a técnica mais confiável e sensível de detecção de anticorpos para qualquer fase da doença. Contudo, a RIFI não determina o período em que ocorreu a exposição e também não é capaz de distinguir entre infecção aguda e a exposição anterior, uma vez que os cães podem permanecer com altos títulos por um longo período, mesmo após a eliminação do parasita (IQBAL et al., 1994; HARRUS et al., 1998a).

Vários pesquisadores demonstraram que mesmo após o tratamento bem sucedido da erliquiose, o animal continua apresentando títulos altos de anticorpos no soro (PERILLE & MATUS, 1991; IQBAL & RIKIHISA, 1994b; WEN et al., 1997; BREITSCHWERDT, HEGARTY, HANCOCK, 1998; HARRUS et al., 1998b; NEER et al., 1999; FRANK & BREITSCHWERDT, 1999). Devido a isto, não é confiável estabelecer o diagnóstico definitivo da erliquiose usando apenas o teste sorológico, especialmente em áreas endêmicas, uma vez que os cães podem, constantemente, ser reinfectados ou manterem-se positivos mesmo após a eliminação do parasita (WEN et al., 1997; HARRUS et al., 1998a, 1998b, 2001).

Em relação à aplicação do “Dot-ELISA” (Immunocomb[®], Biogal, Israel) como teste diagnóstico, CADMAN et al. (1994) demonstraram ser um ensaio sensível e específico, que não necessita de equipamento sofisticado para sua realização, além de ser mais rápido, quando comparado à RIFI. Empregando o mesmo ensaio para analisar cães

com suspeita clínica de erliquiose, OLIVEIRA et al. (2000) verificaram títulos de anticorpos anti-*E. canis* em 48 de 52 e FARIA et al. (2010) detectou resultado positivo em 33 de 40 amostras.

O uso do ELISA para a detecção de antígeno erliquial presente no plasma de cães experimentalmente infectados segundo WANER et al. (1996), não ofereceu resultados confiáveis para o diagnóstico da erliquiose.

Reações sorológicas cruzadas entre *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii* e outras espécies de erlíquias são comuns (WEN et al., 1997; NEER et al., 2002) e a identificação da espécie pode não ser obtida, tornando importante a utilização de técnicas de biologia molecular, como a nPCR.

A nPCR é um ensaio altamente específico e sensível, sendo uma técnica capaz de determinar se um cão soropositivo é portador ou não de *E. canis*, (IQBAL & RIKIHISA, 1994b; WEN et al., 1997) podendo também ser empregada para avaliação da eficácia da terapia contra *E. canis* (HARRUS et al., 1998b).

Aspirados de baço, fígado, rins, mesentério, linfonodos poplíteos, sangue e de medula óssea de cães infectados, podem ser utilizados para extração de DNA do parasita; contudo, para alguns pesquisadores o DNA extraído de baço é o melhor tipo de amostra para PCR, no diagnóstico do estado de portador de *E. canis*, durante a fase subclínica (IQBAL & RIKIHISA, 1994a; HARRUS et al., 1998a). Todavia, FARIA (2006) comparando a detecção de DNA erliquial em sangue e aspirados de baço, constatou que ambos são eficientes no diagnóstico da doença em cães naturalmente infectados. Esses dados são reforçados por BANETH et al. (2009) que também constataram que o material esplênico e o sangue são efetivos para a pesquisa de DNA erliquial em animais experimentalmente infectados durante a fase aguda da doença.

Recentemente, alguns indicadores prognósticos foram estabelecidos em um estudo realizado por SHIPOV et al. (2008). Leucopenia ($< 0,93 \times 10^3/\mu\text{L}$), anemia severa (hematócrito $< 11,5\%$), hipocalemia ($< 3,65 \text{ mmol/L}$) e tempo de tromboplastina parcial ativada aumentada ($> 18,25$ segundos) indicam prognóstico desfavorável com 100% de probabilidade de óbito. De forma contrária, leucócitos acima de $5,18 \times 10^3/\mu\text{L}$, contagem plaquetária acima de $89,5 \times 10^3/\mu\text{L}$, hematócrito superior a 33,5%, tempo de

tromboplastina parcial ativada abaixo de 14,5 segundos e hipercalemia ($>4,75$ mmol/L) indicam 100% de predição para sobrevivência. Os mesmos autores comentam que estes indicadores prognósticos podem ser facilmente obtidos, não são caros e podem ser úteis quanto à decisão sobre tratamento.

O tratamento da erliquiose canina é baseado no uso de tetraciclina, doxiciclina, dipropionato de imidocarb, quinolonas e terapia de suporte (TROY & FORRESTER, 1990).

2.2. Imunopatologia da erliquiose canina.

As citocinas são um grupo de proteínas produzidas por muitos tipos celulares incluindo linfócitos, macrófagos, neutrófilos, basófilos, mastócitos, eosinófilos, além de células endoteliais, epiteliais e do tecido conectivo. Estão envolvidas em várias funções orgânicas dentre as quais a hematopoiese, imunidade inata e adaptativa, ativação das respostas imunológicas tipos Th1 e Th2 (ABBAS; LICHTMANN; PILLAI, 2008). As células Th1 produzem basicamente IL-2, IFN- γ e TNF- α , responsáveis pela resposta mediada por células. As células Th2 produzem IL-4, IL-5 e IL-10 e estão relacionadas com a produção de anticorpos.

Ao longo dos anos foram sendo conhecidas muitas das funções de cada uma das citocinas. TRINCHIERI (2003) observou que diferentes classes de patógenos reconhecidos pelas células inflamatórias induzem a produção de diferentes citocinas pró-inflamatórias. Aparentemente, são os receptores distribuídos nas superfícies das células inflamatórias que determinam, em parte, o padrão de citocinas e outros mediadores que serão induzidos naquela condição específica.

As citocinas participam de muitos processos no organismo e várias desempenham atividades conhecidas em processos patológicos. Além disso, estudos mostram citocinas envolvidas na proteção do hospedeiro contra as infecções, enquanto que outras exacerbam os danos causados aos hospedeiros. Conhecimentos advindos de experimentos com animais infectados por agentes parasitários têm esclarecido o

mecanismo de ação de muitas delas (BARNEWALL & RIKIHISA, 1994; SANTOS-GOMES et al., 2002; BRACHELENTE et al., 2005).

Num estudo em seres humanos apresentando erliquiose granulocítica, observou-se o desenvolvimento de altos níveis de IFN- γ no soro, sugerindo predomínio da imunidade mediada por células (DUMLER et al., 2000). RINKLER et al. (2005) averiguaram, em camundongos experimentalmente infectados com *Anaplasma phagocytophilum*, que a imunidade mediada por células, principalmente células T é imprescindível para debelar a infecção. Em outro estudo realizado, observou-se que seres humanos coinfectados com *A. phagocytophilum* e *Borrelia burgdorferi* apresentaram aumento na produção de citocinas, que culminou com o aumento da permeabilidade vascular da barreira hematoencefálica, agravando a resposta inflamatória e o grau de lesão neural (GRAB et al., 2007).

Os hemoparasitas, têm a capacidade de induzir a expressão gênica de citocinas *in vitro*. IL-1 β , TNF- α , IL-6 são induzidas pela cultura de *A. phagocytophilum* com leucócitos humanos (KIM & RIKIHISA, 2002). Em outro estudo *in vitro*, observou-se que monócitos de humanos infectados com *Ehrlichia chaffeensis* produzem IFN- γ que tem função protetora por estimular macrófagos a eliminarem o parasita (BARNEWALL & RIKIHISA 1994; RIKIHISA, 2006).

Vários pesquisadores têm utilizados camundongos como modelo experimental na tentativa de avaliar a relação parasita-hospedeiro que as erliquias estabelecem com o indivíduo, com intuito de entender os mecanismos imunopatológicos que ocorrem nessas enfermidades (WINSLOW et al., 2005). Por exemplo, MARTIN, CASPERSEN & DUMLER (2001) avaliaram os efeitos imunopatológicos da infecção experimental com *A. phagocytophilum* em camundongos e observaram naqueles que eram deficientes em IFN- γ alta quantidade do parasita no sangue e tecidos. Em contraste, na ausência de IL-10 foi observado extenso dano hepático, porém poucos parasitas no sangue e tecidos. Estas alterações são justificadas pelo fato do IFN- γ ser imprescindível para eliminação de micorganismos intracelulares, pois é a principal citocina a estimular a ativação de macrófagos (ABBAS; LICHTMANN; PILLAI 2008). Entretanto, a IL-10 é inibidor de macrófagos e, é responsável por modular a resposta inflamatória exacerbada,

justificando a lesão tecidual e a diminuição de parasitas apresentadas pelos camundongos infectados com *A. phagocytophilum* (ABBAS; LICHTMANN; PILLAI 2008).

FENG & WALKER (2004) observaram, em camundongos experimentalmente infectados com *E. muris*, que TNF- α e IFN- γ atuam de forma sinérgica contra o parasita. Entretanto, de acordo com ISMAIL et al. (2004) o TNF- α está diretamente relacionado a gravidade da doença. Os autores observaram que quanto mais virulenta a amostra de *Ehrlichia* spp há predomínio da subpopulação esplênica de células TCD8⁺ e aumento na produção de TNF- α , o que contribui para o desenvolvimento de uma síndrome semelhante ao choque, causando o óbito dos animais infectados. Segundo ABBAS, LICHTMANN & PILLAI (2008) a principal função do TNF- α é recrutar neutrófilos e monócitos para focos de infecção, sendo responsável por regular e mediar a imunidade inata e a resposta inflamatória aguda. Já o IFN- γ é produzido por células TCD4⁺, TCD8⁺ e NK, e sua principal função é ativar macrófagos e estimular a expressão de moléculas MHC de classes I e II, além da resposta imunológica do tipo Th1 inibindo a Th2 (ABBAS; LICHTMANN; PILLAI 2008).

De acordo com BITSAKTSIS, HUNTINGTON & WISLOW (2004), WISLOW et al. (2005) e CHOI et al. (2007) infecções com microorganismos erliquiais despertam no hospedeiro uma resposta imune mediada por células TCD4⁺ que resulta na produção de IFN- γ que induz a morte dos patógenos intracelulares, como por exemplo a *Ehrlichia* spp.

Estudos posteriores realizados na tentativa de avaliar aspectos imunopatológicos em hospedeiros infectados com diferentes amostras de *Ehrlichia* spp, demonstraram que a resposta imunológica varia com amostra infectante. Além disso, para a adequada proteção contra uma amostra altamente virulenta é necessário a produção de células efectoras derivadas tanto de células TCD4⁺ quanto de TCD8⁺, juntamente com uma intensa produção de IFN- γ , as quais influenciam diretamente a capacidade do hospedeiro reagir ao parasita (THIRUMALAPURA et al., 2008).

Poucos são os estudos dessas citocinas na erliquiose canina causada pela *E. canis*. Em um deles, UNVER et al. (2006) procuraram detectar os níveis de expressão gênica de IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IFN- γ e TNF- α em leucócitos de cães experimentalmente infectados com a amostra *E. canis* Novo México, diferente geneticamente da amostra Oklahoma. Neste estudo, os autores observaram uma maior expressão do mRNA dos genes IL-1 β e IL-8 e concluíram que estas citocinas poderiam ser responsáveis pelos sinais clínicos observados nos cães avaliados. Em outro estudo realizado, os pesquisadores demonstraram que cães SRD (Sem Raça Definida) inoculados com a cepa de Oklahoma expressaram, de forma significativa, o mRNA dos genes TNF- α e IFN- γ durante o curso experimental (TAJIMA & RIKIHISA, 2005).

A participação das citocinas em eventos patológicos associadas a outras enfermidades, também, têm sido amplamente estudada. Por exemplo, em cães naturalmente infectados com o vírus da cinomose, GRÖNE et al. (1998) observaram que a depleção linfóide esplênica, desmielinização, broncopneumonia e alterações gastrointestinais têm relação com o aumento da expressão do mRNA para TGF- β , IL-6 e TNF- α . MARKUS et al. (2002) sugerem que a desmielinização que ocorre na cinomose está relacionada com a ausência da expressão de IL-10 e TGF- β , provavelmente devido ao papel mediador dessas citocinas no organismo. Como já mencionado a IL-10 é responsável por modular a resposta inflamatória exacerbada, regulando outras citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL-6. Já o TGF- β é um importante inibidor da ativação de macrófagos e da resposta inflamatória (ABBAS; LICHTMANN; PILLAI 2008).

ALMEIDA (2006) observou em cães com ceratocunjunctivite seca decorrente da cinomose de ocorrência natural, que a IL-6 e a IL-10 têm função protetora na conjuntiva dos cães, enquanto que o TNF- α e a IL-1 contribuem para a severidade das lesões oculares. BEINEKE et al. (2008) sugerem que o antígeno viral no cérebro e cerebelo de cães com cinomose induz a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, e TNF- α , enquanto que IL-10 e TGF- β , não se expressaram de forma significativa.

A IL-6 é responsável pela indução da produção de proteínas de fase aguda, como a proteína C reativa, amilóide A sérico, fibrinogênio e haptoglobina. Sabe-se que a produção de IL-6, é também estimulada pelo TNF- α (GRÖNE et al., 1998). Além disso, atua tanto na imunidade inata quanto na adaptativa; nesta última, juntamente com a IL-10, estimula a proliferação de linfócitos B e inibe a imunidade mediada por células (ABBAS; LICHTMANN; PILLAI 2008).

Na leishmaniose visceral canina, vários pesquisadores têm buscado avaliar o perfil da resposta imunológica de cães natural ou experimentalmente infectados (SANTOS-GOMES et al., 2002; BRACHELENTE et al., 2005; CHAMIZO et al., 2005), assim como, correlacionar a carga parasitária com o tipo de citocinas produzidas (MANNA et al., 2006; LAGE et al., 2006; SANCHEZ-ROBERT et al., 2008; ALVES et al., 2009).

O papel das citocinas na patogênese de outras enfermidades que acometem os cães como, por exemplo, dermatite atópica (NUTTALL et al., 2002), poliartrite (HEGEMANN et al., 2005), pododermatite linfocítica-plasmocitária (BREATHNACH et al., 2006), broncopneumopatia eosinofílica (PEETERS et al., 2006), aspergilose nasal e rinite linfocítica-plasmocitária (PEETERS et al., 2007), demonstram diferenças com relação ao perfil de citocinas produzidas em cada doença.

Aparentemente as citocinas pró-inflamatórias IL1 β , IL-6, IL-12 e TNF- α estão associadas à progressão de doenças infecciosas por meio da ativação de células inflamatórias e indução da produção de óxido nítrico por macrófagos. As citocinas como a IL-10 e o TGF- β tem função essencial na remissão das enfermidades (BEINEKE et al., 2008). Contudo, cada doença exhibe, dentro de seus estágios de evolução, diferenças em relação ao perfil de citocinas produzidas e esse perfil muda de acordo com a causa ou o microorganismo infectante envolvido no processo.

O limitado conhecimento a respeito da imunidade na erliquiose canina motivou esse estudo que deu continuidade aos trabalhos desenvolvidos por CASTRO et al. (2004) e CASTRO (2004) que investigaram os aspectos clínicos e imunopatológicos em cães infectados experimentalmente com amostra Jaboticabal de *E. canis*

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Este estudo pretendeu avaliar o perfil de citocinas produzidas por cães experimentalmente infectados pela amostra Jaboticabal de *E. canis*, durante a fase aguda da erliquiose e após o tratamento com cloridrato de doxiciclina (5mg/Kg/PO/BID/21 dias) e relacioná-lo com a evolução clínica e patológica da infecção.

3.2. Objetivos Específicos

- Determinar a expressão gênica das citocinas IL-10, IFN- γ , TNF- α por meio da RT-PCR em sangue periférico e esplênico, antes e durante a infecção experimental e após o tratamento;
- Avaliar o percentual de macrófagos (MAC387⁺), células B (CD79 α ⁺), células CD4⁺ e CD8⁺; e células expressando moléculas do complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC II⁺), em preparações obtidas de aspirados esplênicos, por meio de imunocitoquímica;
- Pesquisar mórulas de *E. canis* em preparações citológicas obtidas de esfregaços sanguíneos de ponta de orelha e em aspirados esplênicos;
- Buscar relacionar a expressão gênica das citocinas com as alterações patológicas e clínicas induzidas pela infecção por *E. canis* em cães.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais experimentais

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA) da Universidade Estadual Paulista, campus de Jaboticabal (protocolo 002460-08).

Foram empregados 10 cães sem raça definida (SRD), irmãos de mesma ninhada, sendo 5 machos e 5 fêmeas, com 2 anos de idade, nascidos e mantidos no canil experimental do Hospital Veterinário – UNESP/ Jaboticabal, sem contato com ectoparasitas e alimentados com ração comercial (Sabor e Vida® - Guabi) e água à vontade.

No período pré-experimental todos os cães foram imunizados contra doenças infecciosas (Duramune Max 5-CvK/4L e Rai-Vac I - Fort Dodge®), vermifugados (Drontal Plus® - Bayer), conforme protocolo do Hospital Veterinário da UNESP/ Jaboticabal e, preventivamente, tratados com parasiticida (Front Line® - Merial).

Durante o período pré-inoculação, os cães foram avaliados por meio de exames físicos e hemogramas periódicos, com o intuito de acompanhar o estado de saúde dos mesmos.

Imediatamente antes da infecção experimental foram coletados 10 mL de sangue, por venipunção jugular, sendo uma alíquota conservada em ácido etilenodiaminotetracético dissódico (EDTA), para realização de hemograma e nested PCR e a parte remanescente dessorada e empregada na pesquisa de anticorpos anti-*E. canis* e anti-*B. canis*. Esses mesmos procedimentos foram também realizados após a infecção experimental, com o intuito de avaliar a soroconversão, detectar o DNA da bactéria e as alterações clínicas e hematológicas provocadas pela infecção experimental, conforme especificados no Quadro 1.

Após a inoculação, os cães dos grupos infectados e controle foram examinados, enfocando-se, principalmente, a temperatura corpórea, coloração das mucosas visíveis, ingestão hídrica e alimentar além do grau de hidratação, frequências cardíaca e respiratória, tempo de preenchimento capilar, palpação dos órgãos abdominais e dos

linfonodos. O exame físico dos animais foi realizado diariamente até o término do período experimental. Hemogramas foram realizados no Laboratório Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto (Patologia Clínica) do Hospital Veterinário da FCAV Jaboticabal - UNESP.

4.2. Inóculo e infecção experimental

Confirmada a ausência de infecção por ambos os parasitas, os 10 cães foram separados, aleatoriamente, em dois grupos experimentais: Grupo EC composto por cinco cães que receberam o inóculo de *E. canis* (EC1 a EC5) e o Grupo CT, composto pelos demais cães, que serviram como controle (CT1 a CT5).

Os cinco cães do grupo EC foram inoculados, por via intravenosa, com alíquotas individuais de 3mL de sangue infectado com a amostra Jaboticabal de *E. canis* (*Gene Bank* nº DQ401044), colhida e criopreservada em nitrogênio líquido (MACHADO, 1993; AGUIAR, et al., 2007).

Após a inoculação, o aparecimento da parasitemia foi acompanhado por meio de pesquisa de mórulas em esfregaços sangüíneos de ponta de orelha (ELIAS, 1991), além do exame físico diário.

Após o término da fase aguda, 30 dias (D30) após a inoculação, iniciou-se o tratamento dos animais infectados com cloridrato de doxiciclina na dosagem de 5mg/Kg a cada 12 horas durante 21 dias. Ao término do tratamento, no momento D76, realizaram-se novas coletas para avaliação da expressão gênica de citocinas, celularidade esplênica e da eliminação da infecção.

Amostras de sangue e de aspirados esplênicos foram coletadas em intervalos descritos no Quadro 1 e empregadas para a pesquisa da expressão gênica de citocinas, imunocitoquímica esplênica, além da pesquisa de mórulas.

4.3. Tempos experimentais e avaliações

Os procedimentos realizados e os tempos experimentais adotados previamente e durante a infecção experimental, foram baseados no descrito por CASTRO (2004), e

estão descritos no Quadro 1. A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e a nested PCR (nPCR) foram realizadas no Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV – UNESP/Jaboticabal.

Quadro 1. Protocolo experimental instituído para os cães controle e experimentalmente infectados com a amostra Jaboticabal de *E. canis* , Jaboticabal, 2010.

TEMPO (em dias)	AVALIAÇÕES DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL
Dia menos 1 (D-1) (pré-inoculação)	Hemograma RIFI para <i>E.canis</i> e <i>B.canis</i> nPCR para <i>E.canis</i> Pesquisa de mórulas em aspirados esplênicos RT-PCR para avaliar a expressão gênica de citocinas Imunocitoquímica das células esplênicas
Dia zero (D0)	Inoculação da amostra <i>E.canis</i> de Jaboticabal
Dia 6 (D6) (pós-inoculação)	Hemograma Pesquisa de mórulas em aspirados esplênicos RT-PCR para avaliar a expressão gênica de citocinas Imunocitoquímica das células esplênicas
Dia 18 (D18) (pós-inoculação)	Hemograma Pesquisa de mórulas em aspirados esplênicos RT-PCR para avaliar a expressão gênica de citocinas Imunocitoquímica das células esplênicas nPCR para <i>E.canis</i> e RIFI para <i>E.canis</i>
Dia 30 (D30) (pós-inoculação)	Hemograma Pesquisa de mórulas em aspirados esplênicos RT-PCR para avaliar a expressão gênica de citocinas Imunocitoquímica das células esplênicas Início do tratamento dos animais com cloridrato de doxiciclina (5mg/Kg/PO/BID/durante 21 dias)
Dia76 (D76) (25 dias após o término do tratamento)	Hemograma nPCR para <i>E.canis</i> e RIFI para <i>E.canis</i> Pesquisa de mórulas em aspirados esplênicos RT-PCR para avaliar a expressão gênica de citocinas Imunocitoquímica das células esplênicas

4.3.1. Técnica das Reações de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Ehrlichia canis* e *Babesia canis*.

A RIFI foi realizada como descrito por NAKAGHI et al. (2008), para o sistema *E. canis* e por FURUTA et al. (2009), para o sistema *B. canis*. As amostras de soros foram diluídas a 1:20 e 1:40 em solução salina tamponada com fosfato (Anexo A), e empregadas na detecção de anticorpos anti-*E. canis* e anti-*B. canis*, respectivamente. Depositou-se 10 µL do soro diluído, em cada poço nas lâminas, nos quais estavam fixados os substratos antigênicos (células DH82 infectadas com mórulas de *E. canis* / hemácias parasitadas com *B. canis*), reservando-se dois poços em cada lâmina para a adição das amostras de soros controle positivo e negativo, frente aos antígenos de *E. canis* e de *B. canis*. Posteriormente incubaram-se as lâminas em câmara úmida a 37°C, por 30 minutos para *E. canis* e por 45 minutos para *B. canis*. A seguir, as lâminas foram lavadas em PBS (pH 7,2), secas, e a cada poço, adicionados 10 µL de conjugado anti-IgG de cão (catalogo n° F7884 Sigma®), diluído conforme orientação do fabricante. O material foi incubado novamente a 37°C por 30 minutos para *E. canis* e por 45 minutos para *B. canis*, em câmara úmida.

Depois de montadas em glicerina tamponada, avaliaram-se as lâminas à microscopia com emissão de luz ultravioleta. Para *E. canis*, foram considerados positivos aqueles soros que reagiram em diluições maiores ou iguais a 1:20; a positividade da reação deu-se pela observação de fluorescência nas mórulas, comparativamente às amostras de soro controle positivo e negativo. Para *B. canis*, consideraram-se positivas as reações em que toda a periferia do parasita apresentasse fluorescência, na diluição de 1:40.

4.3.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Neste estudo empregou-se a nPCR padronizada por NAKAGHI et al. (2008) e também utilizada por FARIA et al. (2010), descrita a seguir, resumidamente.

A extração de DNA do sangue total foi realizada por meio do QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit (cat. n° 51104, Qiagen[®]), como descrito por MURPHY et al. (1998) seguindo as orientações preconizadas pelo fabricante.

Os primers utilizados para a PCR de *Ehrlichia* spp basearam-se na sequência do gene 16S *rRNA* ECC e ECB, que amplifica todo o gênero. Na nPCR para amplificação do DNA da espécie *Ehrlichia canis* foram utilizados os primers ECAN e HE3 (MURPHY et al., 1998 e HARRUS et al., 1998a).

ECC: (5'– GAACGAACGCTGGCGGCAAGC –3') – sense

ECB: (5'– CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA –3') – anti-sense

ECAN: (5'– CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA –3') – sense

HE3: (5'– TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT –3') – anti-sense

As reações constituíram-se por 5,0μL do DNA da amostra em 5,0μL de tampão da PCR (PCR buffer 10X – 100mM Tris-HCl, pH 9,0, 500 mM KCl), 0,2mM de cada deoxinucleotídeo (dTTP, dATP, dGTP, dCTP, Invitrogen[®] cat. n°10297018), 2,5mM de Cloreto de Magnésio, 1pmol de cada primer (Invitrogen[®]), 0,25U de Taq DNA Polimerase Recombinante (Invitrogen[®] cat. n°11615010) e água mili-Q filtrada e autoclavada q.s.p. 50μL.

As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador (MJ Research - PTC 200). A amplificação com os primers ECC e ECB consistiu-se de um ciclo inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por um minuto, anelamento a 65°C por dois minutos e extensão a 72°C por dois minutos, e uma extensão final a 72°C por cinco minutos.

Para a segunda amplificação utilizaram-se as mesmas soluções, além de 1,0μL da amostra de DNA amplificado e os primers espécie-específicos ECAN5 e HE3. A reação constituiu-se de três ciclos de desnaturação a 94°C por um minuto, anelamento a 55°C por dois minutos e extensão a 72°C por um e meio minutos e 37 ciclos de desnaturação a 92°C por um minuto, anelamento a 55°C por dois minutos e extensão a 72°C por um e meio minutos, além da extensão final a 72°C por cinco minutos (MURPHY et al., 1998).

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose (Invitrogen® cat. nº 15510019) a 1,5% corado com brometo de etídio (0,5µL/mL) em tampão de corrida TAE (40mM Tris-acetato, 2mM EDTA pH 8,0) e a eletroforese realizada a 100V/50mA durante 90 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados utilizou-se um marcador de tamanho molecular de 100 pares de base (100bp ladder, Invitrogen® cat nº 15628019). Os resultados foram visualizados e analisados por meio de um transiluminador de luz ultravioleta (2020E) acoplado a um programa computacional analisador de imagens (Eagle Eye II - Stratagene®).

4.4. Expressão gênica das citocinas

Neste estudo avaliou-se a expressão gênica de citocinas utilizando a técnica de transcrição reversa do mRNA (RT-PCR), como preconizada por CHAMIZO et al. (2001) e empregada por ALMEIDA (2006).

4.4.1. Extração do RNA

Protocolos relativos à extração do RNA e processamento da reação de RT-PCR foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia de Plantas (LBMP) do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, campus de Jaboticabal.

O sangue foi coletado por venipunção jugular, acrescido de EDTA. Nessa etapa utilizaram-se 6mL de sangue. A seguir, prosseguiu-se a separação dos leucócitos, utilizando-se o Histopaque 1077 (Sigma cód. 1077-1) e o Histopaque 1119 (Sigma cód. 1119-1), de acordo com as instruções do fabricante; centrifugado a 700g por 30 minutos. Na sequência, coletou-se o anel de células, que foi lavado em solução salina a 0,85% preparada em água tratada com dietil-pirocarbonato (DEPC), então centrifugadas por 10 minutos a 4°C, para retirada do Histopaque. A seguir, procedeu-se a extração do RNA das células utilizando-se o Trizol Reagent (Invitrogen® cat. nº

15596-026), seguindo-se o protocolo do fabricante, adaptado no LBMP/UNESP, Jaboticabal.

Para as amostras de baço, realizou-se a extração diretamente do material obtido da punção, conservado em EDTA, mantido no gelo até o momento da extração, realizado logo após o término da coleta. Para a extração do RNA, utilizou-se 1000uL de Trizol Reagent a 4°C, agitado em vórtex durante um minuto e mantido em temperatura ambiente durante cinco minutos. A seguir adicionaram-se 200µl de clorofórmio, agitado em vórtex por mais um minuto e mantido à temperatura ambiente por três minutos. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 12.000g por 15 minutos a 4°C. Ato contínuo, coletou-se o sobrenadante que foi acrescido de 500µL de isopropanol a 4°C, agitado por inversão durante dois minutos e mantido à temperatura ambiente durante oito minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000g durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente descartou-se o sobrenadante e o pelet lavado com 1000uL de etanol a 75%, mantido em -20°C, e novamente centrifugaram-se as amostras a 7500g durante cinco minutos. Posteriormente descartou-se o sobrenadante e as amostras deixadas à temperatura ambiente por 10 minutos. A seguir suspendeu-se o pelet em 60µL de água tratada com DEPC e congelados a -80°C, até o momento do uso.

Os primers utilizados na reação de PCR foram desenhados para garantir a amplificação de fragmentos de cDNA, dispensando a necessidade de tratar as amostras com DNase. As amostras que estavam contaminadas com DNA foram tratadas para eliminar essa contaminação. O protocolo utilizado encontra-se no Anexo B.

4.4.2. Reação de transcrição reversa

Para realização da reação de transcriptase reversa, utilizou-se o Termociclador PTC-200 Peltier Thermal Cycler MJ Research, USA. A mistura inicial da reação constituiu-se por 1µg/µL de RNA extraído, 40U de RNaseout Recombinant Rnase Inhibitor (Invitrogen® cat. n° 10777019), 0,5 ug de Oligo dT12-18 (Invitrogen® cat. n° 15508013), água tratada com DEPC, em quantidade suficiente para completar um

volume final de 11µL e incubada a 65°C por 5 minutos. A esta mistura acrescentou-se 1,0mM de dNTP (dTTP, dATP, dGTP, dCTP, Invitrogen® cat. n° 10297018), 3,0mM de Cloreto de Magnésio, (tampão 5x da enzima Transcriptase Reversa [Tris-HCl (250 mM, pH 8,3), KCl (375 mM), MgCl₂ (15 mM)], 1µL da enzima Transcriptase Reversa Impron II (Promega cat. n° A3803) e posterior incubação a 25°C por 5 minutos, seguidos por 60 minutos a 40°C. Após a obtenção do cDNA, o mesmo foi armazenado a -20°C até o momento do uso.

4.4.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação das regiões gênicas codificadoras de citocinas

A amplificação dos genes GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) (*Gene Bank* AF054608), IL-10 (*Gene Bank* U33843), TNF- α (*Gene Bank* X94932), e IFN- γ (*Gene Bank* S41201) foi realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR) específica, em termociclador PTC-200 Peltier Thermal Cycler. A sequência dos oligonucleotídeos iniciadores ou “primers”, utilizados para amplificação de cada gene, a sequência dos genes no Genbank, o tamanho dos fragmentos gerados e as referências das quais obtiveram-se os “primers”, estão descritos no Quadro 2.

Nas reações de PCR, foram utilizados 2,5 µL de cDNA provenientes da reação de transcrição reversa, sendo acrescentados ao tampão da reação 10X [Tris- HCl (200 mM; pH 8,4), KCl (500 mM)], 1,5 mM MgCl₂, dNTP (0,2 mM) (Invitrogen®, cat. n° 10297018), 10 pmol de um dos primers específicos para GAPDH, IL-10, TNF- α e IFN- γ , previamente publicados (CHAMIZO et al., 2001), e 1,0 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®, cat. n° 11615010), completando-se com água mili-Q filtrada e autoclavada, para um volume final de 20 µL. As amplificações foram compostas de um ciclo inicial a 94°C por 3 minutos, seguido da desnaturação, anelamento, extensão e uma extensão final. As temperaturas de desnaturação, anelamento e extensão, estão discriminadas no Quadro 3.

Quadro 2. “Primers”, tamanho dos fragmentos gerados, sequência no GeneBank e referência dos “primers” para amplificação dos genes de interesse. Jaboticabal, SP. Janeiro/2010.

Citocina	“Primers” (5' → 3')	Frag. (bp)	Referência (GeneBank)
<i>GAPDH</i>	GTGATGCTGGTGCTGAGTATG GTGATGGCATGGAC(G/T)GTGG	282	CHAMIZO et al. (2001) (AF054608)
<i>TNF-α</i>	GCCCAGACAGTCAAATCATC CTTGATGGCAGAGAGTAGGTTG	302	CHAMIZO et al. (2001) (X94932)
<i>IL-10</i>	GAGCTCCGAGCTGCCTTC GATGAAGATGTCAAACCTCACTC	374	CHAMIZO et al. (2001) (U33843)
<i>IFN-γ</i>	CATTCAAAGGAGCATGGATACC GACTCCTTTTCCGCTTCCTTAG	202	CHAMIZO et al. (2001) (S41201)

Quadro 3. Condições de termociclagem utilizadas na PCR para amplificação dos genes de interesse. Jaboticabal, SP. Janeiro/2010.

Etapa	GAPDH	TNFα	IL-10	IFN-γ
Inicial	94°C/3min	94°C/3min	94°C/3min	94°C/3min
Ciclos	45	45	50	50
Desnaturação	94°C/10seg	94°C/10seg	94°C/10seg	94°C/10seg
Anelamento	62°C/10seg	60°C/10seg	60°C/10seg	64°C/10seg
Extensão	72°C/20seg	72°C/20seg	72°C/20seg	72°C/20seg
Extensão Final	72°C/7min	72°C/7min	72°C/7min	72°C/7min

4.4.4. Análise da expressão gênica relativa

Realizou-se a eletroforese em gel de agarose (Invitrogen® cat. n°15510019) a 1,5%, preparado com tampão TBE 0,5x [Tris (0,045 M), ácido bórico (0,045 M) e EDTA (0,001 M, pH 8,0)] e corado com brometo de etídio. Alíquotas de 5 μ L dos produtos amplificados foram adicionadas de 2 μ L de tampão de diluição da amostra [0,05% (p/v) de azul de bromofenol, 40% sacarose (p/v), Tris-HCl (10 mM, pH 7,8), EDTA (1M, pH 8,0)]. Em cada corrida, aplicou-se o padrão de tamanho (Fermentas® cat. n°SM0311/2/3). A corrida realizou-se em cuba de eletroforese com tampão TBE 0,5x a 80 V, por aproximadamente, 1 hora e 30 minutos.

Ao final da eletroforese, o gel foi posicionado em um transiluminador de UV (Syngene, Synoptics Ltd ,Cambridge) e a imagem obtida, digitalizada em programa computacional Genelink, Genetools, versão 2.11.03. Confirmou-se a amplificação do gene de interesse pela comparação da banda obtida de tamanho esperado com o padrão de tamanho. A densidade de cada banda foi determinada por escaneamento densitométrico (valor da intensidade da banda, em pixels, subtraído do “background”) através do programa de análise Quantity One® 1D (The Discovery Series™, Bio-rad Laboratories). Calculou-se taxa de expressão do gene de interesse dividindo-se a

intensidade da banda do gene-alvo pela intensidade da banda do *GAPDH* (gene de expressão constitutiva) da mesma amostra.

4.5. Pesquisa de mórulas

Após a obtenção do material esplênico, coletado por meio da punção aspirativa com agulha fina, guiada por ultrassom confeccionaram-se esfregaços em lâminas, que após secagem foram fixados e corados com Rosenfeld modificado (Anexo A) durante dois minutos. A pesquisa de mórulas foi realizada nas preparações citológicas utilizando microscópio óptico em objetiva de 100X (imersão).

4.6. Imunofenotipagem das células esplênicas

As reações de imunocitoquímica foram realizadas no Laboratório de Imunoistoquímica do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, campus de Jaboticabal.

Após a coleta do material esplênico, obtido por meio da punção aspirativa com agulha fina, guiada por ultrassom, este foi conservado com EDTA, em tubo Falcon de 15 mL. Para a lise de hemácias, procedeu-se o choque hipotônico em água destilada e, a seguir, a isotonização do meio com solução salina 3,6% e, então, centrifugação a 700g por 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e as células foram lavadas com 1,0mL de solução fisiológica. O procedimento foi repetido por duas vezes. Ato contínuo confeccionaram-se as lâminas, nas quais depositou-se 80µL da suspensão celular, deixando-se secar à temperatura ambiente. Posteriormente procedeu-se à fixação das células com uma mistura de formol tamponado/acetona (PA) (1:1) por 30 segundos e secagem em temperatura ambiente. As lâminas foram embaladas individualmente em papel fino, depois em papel alumínio e mantidas a -20°C até o momento do uso.

Previamente às coletas, as lâminas de microscopia foram pré-tratadas com 0,1 mg/mL de Poly-L-Lysina (Sigma® cat. n° P8920) por 30 minutos, depois enxaguadas em tampão fosfato (PBS pH 7,2 – Anexo A) e secas ao ar.

Pesquisaram-se células T (CD4 e CD8), células B (CD79 α), células da linhagem monócito/macrófago (Myeloid/histiocyte antigen) e células expressando MHC de classe II (HLA-DR antigen), especificados no Quadro 4, empregando-se o complexo avidina-biotina (ABC), desenvolvido por HSU, RAINE & FANGER (1981).

No momento do uso retirou-se as lâminas do congelador e então mantidas em temperatura ambiente por aproximadamente 20 minutos e posteriormente lavadas em solução tampão de PBS (pH 7,2) com 10% de BSA (PBS+BSA) (Sigma[®] cat. n°A7906).

Para controle da reação, além das células esplênicas utilizaram-se cortes de linfonodos parafinizados obtidos de animais hígidos. As lâminas contendo os linfonodos foram mantidas em estufa a temperatura de 60°C durante uma hora. Posteriormente submetidas à desparafinização e hidratação por meio de duas passagens de 15 minutos cada em xilol PA e, na sequência, passagens de 30 segundos em álcool etílico absoluto PA, álcool etílico à 95% e então álcool etílico a 70%. A seguir, lavou-se as lâminas em água destilada e posteriormente, juntamente com as lâminas contendo as células esplênicas, lavadas em solução tampão de PBS (pH 7,2) com 10% de BSA (PBS+BSA) (Sigma[®] cat. n°A7906).

A seguir realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena utilizando 92 mL de metanol e oito mL de água oxigenada 30 volumes, quatro passagens de 10 minutos cada. Posteriormente as lâminas foram lavadas durante cinco minutos por três vezes em PBS+BSA quando então prosseguiu a recuperação antigênica em banho-maria por 45 minutos a 97°C. As lâminas foram imersas em solução diluída de recuperação antigênica Target Retrieval Solution (Dako[®] cat.n S1699), contendo 10mL da solução em 100mL de água destilada. Fez-se uma nova lavagem em PBS+BSA. Bloqueou-se os sítios inespecíficos com Protein Block Serum Free (Dako[®] cat. n X0909). Posteriormente, recobriram-se as células com o anticorpo primário na diluição apropriada (Quadro 4), e então incubadas a 4°C "overnight". Para os controles negativos (células esplênicas e cortes de linfonodos) utilizou-se o Universal Negative Control Mouse (Dako[®] N1698-1). Após o período de incubação, as retiraram-se as lâminas da geladeira e mantiveram-nas em temperatura ambiente por aproximadamente 20 minutos, para então serem lavadas em PBS+BSA. Na sequência,

incubou-se as lâminas com EnVision™ + Dual Link System HRP (Dako® K4061-1) por 60 minutos, a temperatura ambiente. Realizou-se nova lavagem em PBS+BSA e a reação revelada pelo substrato cromogênico DAKO liquid DAB (cat. n.º K3466), de acordo com as instruções do fabricante. A seguir, a reação foi interrompida com a lavagem das lâminas em água destilada e a contra-coloração feita com hematoxilina de Harris modificada (Sigma® cat. n.º HHS16). As lâminas foram passadas rapidamente pela bateria de álcool etílico absoluto, álcool etílico a 95%, álcool com xilol (1:1) e xilol, montadas com Entellan (Merck® cat. n.º 1.07961.0100) e observadas em microscópio óptico comum.

Quadro 4. Anticorpos empregados na caracterização morfofuncional dos leucócitos presentes na citologia esplênica, com os respectivos clones, especificidades, procedências e as diluições utilizadas nas reações de imunocitoquímica. Jaboticabal, SP. Janeiro/2010.

Anticorpo	Clone	Especificidade	Diluição
CD4 (VMRD, WA, USA)	DH29A0	Camundongo anti-cão	1:20
CD8 (VMRD, WA, USA)	CADO46	Camundongo anti-cão	1:20
CD79α (DAKO)	HM57	Camundongo anti-humano	1:10
Myeloid/histiocyte antigen (DAKO)	MAC-387	Camundongo anti-humano	1:50
HLA-DR (DAKO)	TAL.1B5	Camundongo anti-humano	1:300

4.7. Análise dos resultados

A análise estatística foi realizada com o programa computacional Sigma Stat for Windows, Versão 3.0.1, SPSS Inc.2003. Para a análise estatística dos parâmetros hematológicos, realizou-se primeiramente uma análise de variância para medidas repetidas. Sempre que o resultado se mostrou significativo, utilizou-se o teste Dunnett com significância de 5%. Para a análise das variáveis independentes (grupo CxI) foi

utilizado do teste T de Student também com significância de 5%. Os dados coletados relativos à expressão gênica e à imunocitoquímica foram submetidos ao teste Mann-Whitney T, para determinação das diferenças entre os grupos de animais infectados e o grupo controle. A análise de variância foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis e quando significativa (5%) as diferenças dentro de cada grupo nos diferentes momentos foram comparadas pelo método Student Newmann-Keuls. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o nível de significância foi de 5%.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação da infecção experimental

5.1.1. Exame físico dos animais

Os animais do grupo controle (grupo CT) não apresentaram alterações nos exames físicos feitos durante todo o período experimental. Inversamente, todos os animais infectados (grupo EC) tornaram-se inapetentes por volta do 17º dia pós-inoculação (PI), havendo a necessidade de apoio nutricional (introdução de ração úmida ou dieta caseira para estimulação do apetite). O animal EC2 foi alimentado, durante quatro dias, por sonda nasogástrica, voltando a se alimentar espontaneamente ao final deste período.

Nos animais de ambos os grupos não foram observadas alterações dignas de nota quanto ao grau de hidratação, frequências cardíaca e respiratória e tempo de preenchimento capilar. Os animais do grupo EC apresentaram alterações na coloração das mucosas oral e ocular a partir do 22º dia PI, tornando-se de róseo-claras a pálidas, mantendo-se assim até o início do tratamento.

A média da temperatura retal (Figura 1) mostrou-se elevada no grupo EC, registrando aumento significativo ($P<0,05$) entre os dias 12 e 20 PI, quando comparados aos dias anteriores e ao grupo controle voltando aos valores de referência após o dia 22 PI. Após este período, houve alteração individual da temperatura e somente o animal EC5 manteve a temperatura acima de 39,4°C até o dia 28 pós-inoculação.

Todos os animais infectados apresentaram linfadenomegalia dos submandibulares, pré-escapulares (cervicais superficiais) e poplíteos, coincidente com o início do quadro febril.

Quanto à palpação abdominal, dois animais (EC1 e EC4) apresentaram destacada esplenomegalia a partir do 14º dia PI, persistindo até o início do tratamento e, gradativamente, reduzindo ao longo do mesmo.

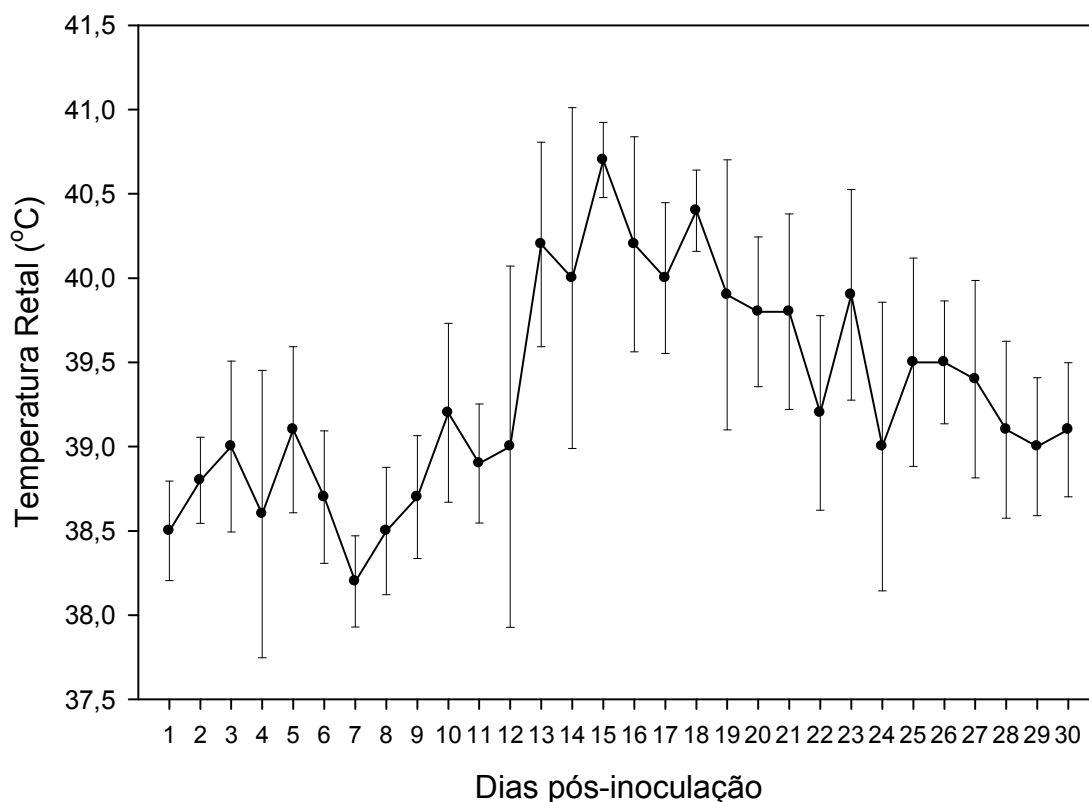


Figura 1. Média da variação diária e desvios-padrão da temperatura dos cães infectados com a amostra Jaboticabal de *E. canis*, desde o dia 1 até o dia 30 pós inoculação. Jaboticabal, SP. Janeiro/2010. A variação fisiológica de temperatura para a espécie canina é de 37,5° a 39,4°C (FEITOSA, 2004).

5.1.2. Hemograma e plaquetas

Quando se avaliaram os resultados dos hemogramas, apresentados pela média, não se observaram alterações para os cães do grupo controle, como podem ser conferidos nas Tabelas 1 e 2. Individualmente, cães deste grupo exibiram algumas poucas alterações nos resultados dos hemogramas, sem que estas pudessem ser relacionadas a processos patológicos.

Por sua vez, a partir do D3 foi possível observar trombocitopenia nos cães do grupo EC, que persistiu até o término do período experimental, mesmo após o

tratamento. Leucopenia ($P < 0,05$) foi observada a partir do D6 e perdurou, da mesma forma que a trombocitopenia ($P < 0,05$), até o final das avaliações. Quanto à contagem diferencial de leucócitos, o grupo EC apresentou eosinopenia ($P < 0,05$) nos dias 18 e 30, assim como neutropenia (neutrófilos segmentados) também no dia 18 ($P > 0,05$), quando comparados ao D-1. A contagem de basófilos e neutrófilos bastonetes permaneceu dentro dos valores de normalidade para os dois grupos experimentais.

Anemia discreta foi registrada nos D18 e D30, onde atingiu seus índices mais baixos ($P < 0,05$) no grupo EC, tanto em relação ao D-1 quanto em relação ao grupo CT. No D76, após o tratamento, as contagens médias de hemácias estavam dentro da variação de normalidade para a espécie.

O Anexo C contém a tabela com os valores de referência do hemograma para a espécie canina.

Tabela 1. Valores médios obtidos para as características eritrométricas e trombométricas em cães controles (CT) e infectados (EC) experimentalmente com a amostra Jaboticabal de *E. canis*. Jaboticabal, SP. Janeiro/2010.

		Dias Experimentais				
		-1	6	18	30	76
Hemácias/μL						
CT	7.000.000 ^{Aa}	6.680.000 ^{Aa}	6.020.000 ^{Aa}	7.530.000 ^{Aa}	6.450.000 ^{Aa}	
EC	7.220.000 ^{Aa}	6.970.000 ^{Aa}	4.510.000 ^{Bb}	4.220.000 ^{Bb}	6.560.000 ^{Aa}	
Hemoglobina (g/dL)						
CT	17,44 ^{Aa}	16,18 ^{Aa}	15,08 ^{Aa}	19,58 ^{Aa}	15,86 ^{Aa}	
EC	17,92 ^{Aa}	17,10 ^{Aa}	11,88 ^{Bb}	10,94 ^{Bb}	15,82 ^{Aa}	
Hematócrito (%)						
CT	48,98 ^{Aa}	47,02 ^{Aa}	42,42 ^{Aa}	53,26 ^{Aa}	46,22 ^{Aa}	
EC	50,50 ^{Aa}	48,64 ^{Aa}	30,78 ^{Bb}	29,30 ^{Bb}	45,28 ^{Aa}	
Plaquetas/μL						
CT	247.600 ^{Aa}	249.600 ^{Aa}	226.200 ^{Aa}	225.400 ^{Aa}	203.400 ^{Aa}	
EC	222.400 ^{Aa}	140.200 ^{Bb}	56.400 ^{Bb}	166.200 ^{Aa}	181.400 ^{Aa}	

Nota: Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os momentos. (P< 0,05) Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (P< 0,05) entre os grupos infectado (EC) e controle (CT). Valores de referência no Anexo B.

Tabela 2. Valores médios obtidos para as características leucométricas de cães controles (CT) e infectados (EC) experimentalmente com a amostra Jaboticabal de *E. canis* . Jaboticabal, SP. Janeiro/2010.

		Dias Experimentais				
		-1	6	18	30	76
Leucócitos/ μ L						
CT	8.180 ^{Aa}	8.900 ^{Aa}	8.160 ^{Aa}	7.820 ^{Aa}	6.560 ^{Aa}	
EC	7.380 ^{Aa}	5.180 ^{Bb}	3.520 ^{Bb}	5.100 ^{Bb}	5.180 ^{Aa}	
Eosinófilos/ μ L						
CT	890 ^{Aa}	440 ^{Aa}	500 ^{Aa}	940 ^{Aa}	850 ^{Aa}	
EC	520 ^{Aa}	310 ^{Aa}	40 ^{Ba}	50 ^{Ba}	260 ^{Aa}	
Segmentados/ μ L						
CT	4.260 ^{Aa}	5.970 ^{Aa}	5.460 ^{Aa}	4.390 ^{Aa}	3.540 ^{Aa}	
EC	3.980 ^{Aa}	3.110 ^{Ab}	2.390 ^{Ab}	3.520 ^{Aa}	3.370 ^{Aa}	
Linfócitos/ μ L						
CT	2.870 ^{Aa}	1.790 ^{Aa}	1.640 ^{Aa}	2.270 ^{Aa}	2.040 ^{Aa}	
EC	2.660 ^{Aa}	1.500 ^{Aa}	840 ^{Bb}	1.270 ^{Ba}	1.240 ^{Ba}	
Monócitos/ μ L						
CT	160 ^{Aa}	530 ^{Ba}	400 ^{Aa}	150 ^{Aa}	130 ^{Aa}	
EC	220 ^{Aa}	260 ^{Aa}	180 ^{Aa}	210 ^{Aa}	210 ^{Aa}	

Nota: Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os momentos. (P< 0,05) Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (P< 0,05) entre os grupos infectado (EC) e controle (CT). Valores de referência no Anexo D.

5.1.3. Detecção da infecção

Mórulas intracitoplasmáticas foram encontradas em esfregaços sanguíneos de ponta de orelha em três (EC2, EC4 e EC5) dos 5 animais do grupo infectado 15 após a inoculação, confirmando a parasitemia e a infecção por *E. canis*.

5.1.4. Detecção de anticorpos anti-*E.canis* e anti-*B.canis*

Os resultados da pesquisa de anticorpos anti-*E. canis* e anti-*B.canis*, por meio da RIFI foram negativos para todos os animais deste experimento no dia -1, demonstrando que se tratavam de cães não expostos aos respectivos hemoparasitas. Nas avaliações subsequentes (D18 e D76), os animais do grupo controle permaneceram negativos aos anticorpos anti-*E.canis*, sendo a soroconversão verificada nos animais infectados. Os títulos variaram de 1:2.560 a 1:5.120 no D18 a 1:320 a 1:2.560 no D76. Todos os animais mantiveram-se negativos à RIFI anti-*B. canis*. Os resultados da RIFI podem ser vistos na Tabela 3.

Tabela 3. Resultados da sorologia anti-*E.canis* e anti-*B.canis* obtidos por meio da RIFI, nos cães dos grupos controle (CT) e infectado (EC), nos períodos pré-determinados. Jaboticabal, SP. Janeiro/2010.

	<i>E. canis</i> (D18)	<i>E. canis</i> (D76)
CT1	-	-
CT2	-	-
CT3	-	-
CT4	-	-
CT5	-	-
EC1	1:2.560	1:320
EC2	1:2.560	1:2.560
EC3	1:2.560	1:1.280
EC4	1:5.120	1:640
EC5	1:2.560	1:1.280

5.1.5. Detecção do DNA de *E. canis*

O DNA de *E. canis* foi detectado nos cães infectados somente no 18º dia PI, tornando-se negativos após o tratamento (D76) (Tabela 4). Os produtos amplificados, fragmentos de 398 pares de base de *E. canis* dos cães do grupo infectado, no momento 18, podem ser vistos na Figura 2. Após o tratamento (D76), também realizou-se a nPCR do material esplênico, no qual não foi evidenciado DNA erliquial em nenhum animal infectado (Dado não mostrado).

Tabela 4. Resultados da nPCR de *E. canis* dos cães dos grupos controle (CT) e infectado (EC), nos períodos pré-determinados. Jaboticabal, SP. Janeiro/2010.

	<i>E. canis</i> (D18)	<i>E. canis</i> (D76)
CT1	-	-
CT2	-	-
CT3	-	-
CT4	-	-
CT5	-	-
EC1	+	-
EC2	+	-
EC3	+	-
EC4	+	-
EC5	+	-



Figura 2. Visibilização do DNA de *E. canis* obtido pela nPCR de amostras de sangue total de cães do grupo EC, no D18. Canaleta 1: marcador de tamanho molecular (100 pb); canaleta 2: controle positivo; canaletas 3 a 7: animais do grupo CT; canaletas 8 a 13: animais do grupo EC; canaleta 14: controle negativo (água); pb (pares de base).

5.2. Avaliação da Expressão Gênica de Citocinas

Avaliação da expressão gênica de citocinas foi realizada em leucócitos de sangue e em aspirados esplênicos de cães dos grupos EC e CT, obtidos como descritos no item 4.4.

Em todos os animais e em todos os momentos experimentais avaliados foi detectado o gene GAPDH, demonstrando a integridade do RNA extraído.

O TNF- α foi expresso em baixos níveis no momento D6. Neste momento (D6) no grupo CT a média da taxa de expressão foi de 0,40 nos leucócitos sanguíneos, , enquanto que no grupo EC essa média foi de 0,05 para os leucócitos e de 0,77 para o baço. Não houve expressão do TNF- α no baço no grupo CT no momento D6. No D18 houve aumento na expressão do TNF- α de forma significativa no grupo EC em relação ao CT. A média da taxa de expressão para os leucócitos foi de 1,46 e para o baço foi de 3,99 no grupo EC, enquanto que no grupo CT essa média foi de 0,38 somente para os leucócitos.

A expressão se manteve aumentada tanto no grupo EC (leucócitos e baço) em D30, sem que houvesse diferença significativa entre os grupos e os momentos avaliados. Os leucócitos do grupo EC apresentaram média da taxa de expressão de 2,88 e para o baço a média foi de 4,14. No grupo CT a taxa de expressão foi de 0,03 para os leucócitos e de 1,83 para o baço.

No D76 (após o tratamento) ocorreu redução na expressão do gene TNF- α em todos os animais dos grupos EC, quando a média da taxa de expressão foi 0,42 para os leucócitos e de 0,47 para o baço. No grupo CT a média da taxa de expressão foi de 0,75 para os leucócitos e nula para o baço.

Analisando as expressões de TNF- α entre os diferentes momentos após a infecção, o D18 destacou-se de forma significativa em relação aos momentos D-1 e D6. Entre os momentos D30 e D76, quando comparados aos outros momentos, não houve significância.

Diferentemente, a IL-10 estava expressa em todos os cães do grupo EC no D18. Os leucócitos dos animais do grupo infectado apresentaram uma média da taxa de

expressão de 1,23 e no material esplênico foi de 1,87. As amostras do grupo CT apresentaram uma taxa de expressão nula. Houve diferença estatística entre os grupos (CT e EC) e entre os momentos avaliados. Em nenhum outro momento experimental a expressão de IL-10 foi detectada.

O IFN- γ estava expresso apenas nos leucócitos de dois animais do grupo EC (EC2 e EC5), unicamente no momento D30.

Os dados da expressão relativa dos genes alvo podem ser observados na Tabela 5, e a representação gráfica da detecção dos genes-alvo, bem como a visibilização das bandas no gel de agarose constam das figuras de 3 a 12.

Tabela 5. Média da taxa de expressão dos genes IL-10, TNF- α , e IFN- γ dos grupos CT e EC (leucócitos e baço). Jaboticabal, SP. Janeiro/2010.

Citocinas	Amostra	Grupos	Momentos				
			D-1	D6	D18	D30*	D76
TNF- α	Baço	CT	0,0	0,00	0,00 ^a	1,83	0,00
		EC	0,0	0,77	3,99 ^b	4,14	0,47
	Leucócitos	CT	0,0	0,40	0,38 ^a	0,03	0,75
		EC	0,0	0,05	1,46 ^b	2,88	0,42
IL-10	Baço	CT	0,0	0,0	0,00 ^a	0,0	0,0
		EC	0,0	0,0	1,87 ^b	0,0	0,0
	Leucócitos	CT	0,0	0,0	0,00 ^a	0,0	0,0
		EC	0,0	0,0	1,23 ^b	0,0	0,0
IFN- γ	Baço	CT	0,0	0,0	0,0	0,00	0,0
		EC	0,0	0,0	0,0	0,00	0,0
	Leucócitos	CT	0,0	0,0	0,0	0,00	0,0
		EC	0,0	0,0	0,0	1,50	0,0

Nota: Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos CO e EC.

* Início do tratamento com cloridrato de doxiciclina

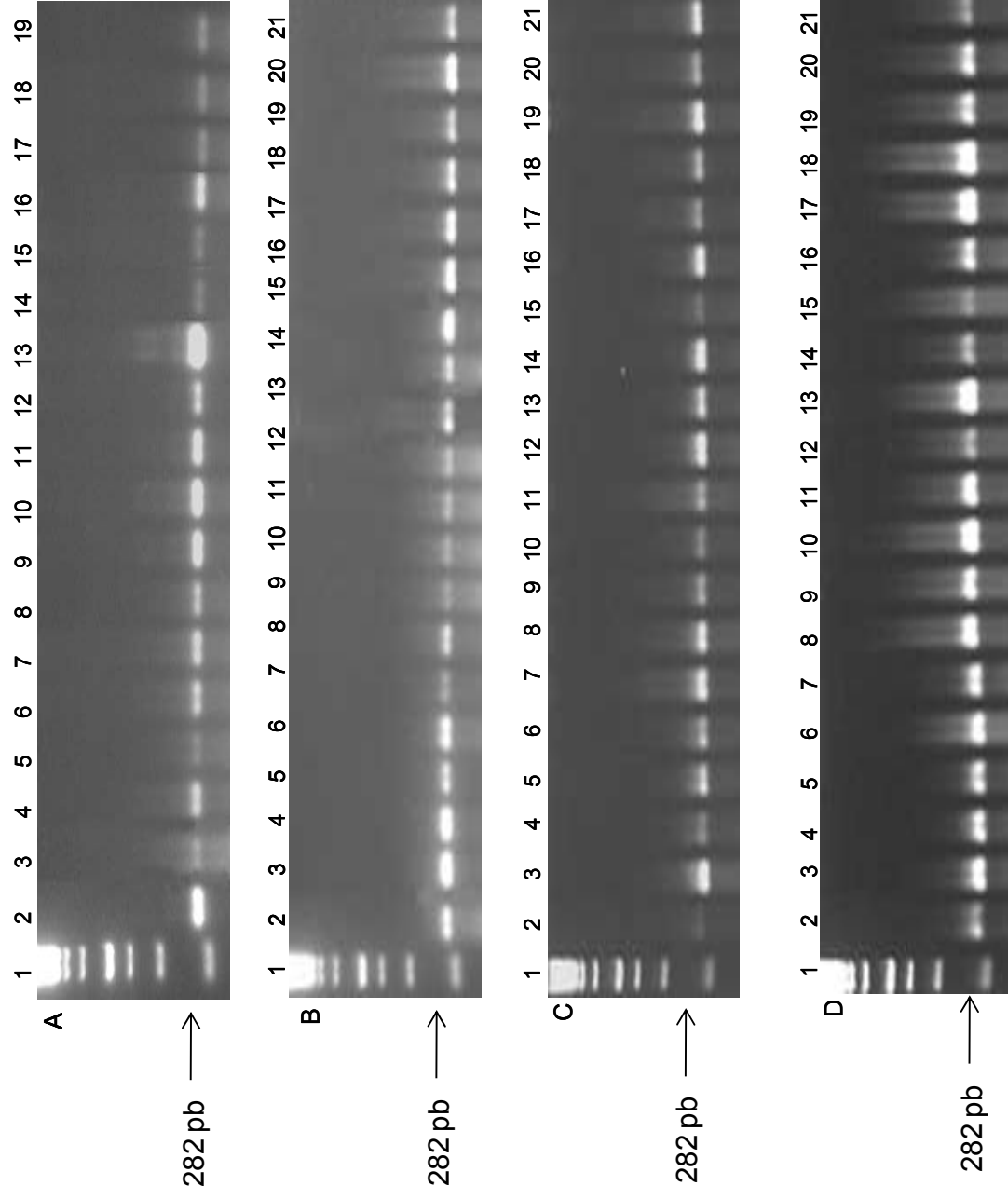


Figura 3. Visualização do padrão de bandas obtidas no gel de agarose do gene constitutivo GAPDH. A. D6, B. D18, C. D30, D. D76. Canaleta 1. marcador de pares de base, Canaletas 2 a 5 amostras de leucócitos do Grupo EC,

Canaletas de 6 a 10 amostras esplênicas do grupo EC. Canaletas de 11 a 15 amostras de leucócitos grupo CT.
Canaletas de 16 a 20 amostras esplênicas do grupo CT.

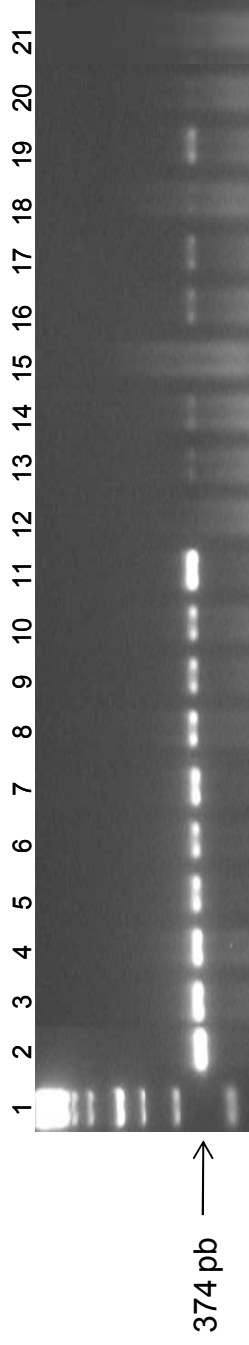


Figura 4. Visibilização do padrão de bandas obtidas no gel de agarose do gene IL-10 no momento D18. Canaleta 1. marcador de pares de base, Canaletas 2 a 5 amostras de leucócitos do Grupo EC, Canaletas de 6 a 10 amostras esplênicas do grupo EC. Canaletas de 11 a 15 amostras de leucócitos grupo CT. Canaletas de 16 a 20 amostras esplênicas do grupo CT.

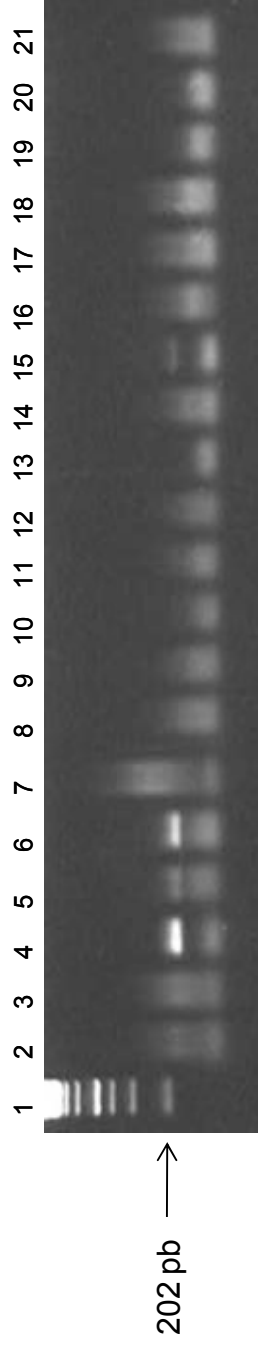


Figura 5. Visibilização do padrão de bandas obtidas no gel de agarose do gene IFN- γ no momento D30. Canaleta 1. marcador de pares de base, Canaletas 2 a 5 amostras de leucócitos do Grupo EC, Canaletas de 6 a 10 amostras esplênicas do grupo EC. Canaletas de 11 a 15 amostras de leucócitos grupo CT. Canaletas de 16 a 20 amostras esplênicas do grupo CT.

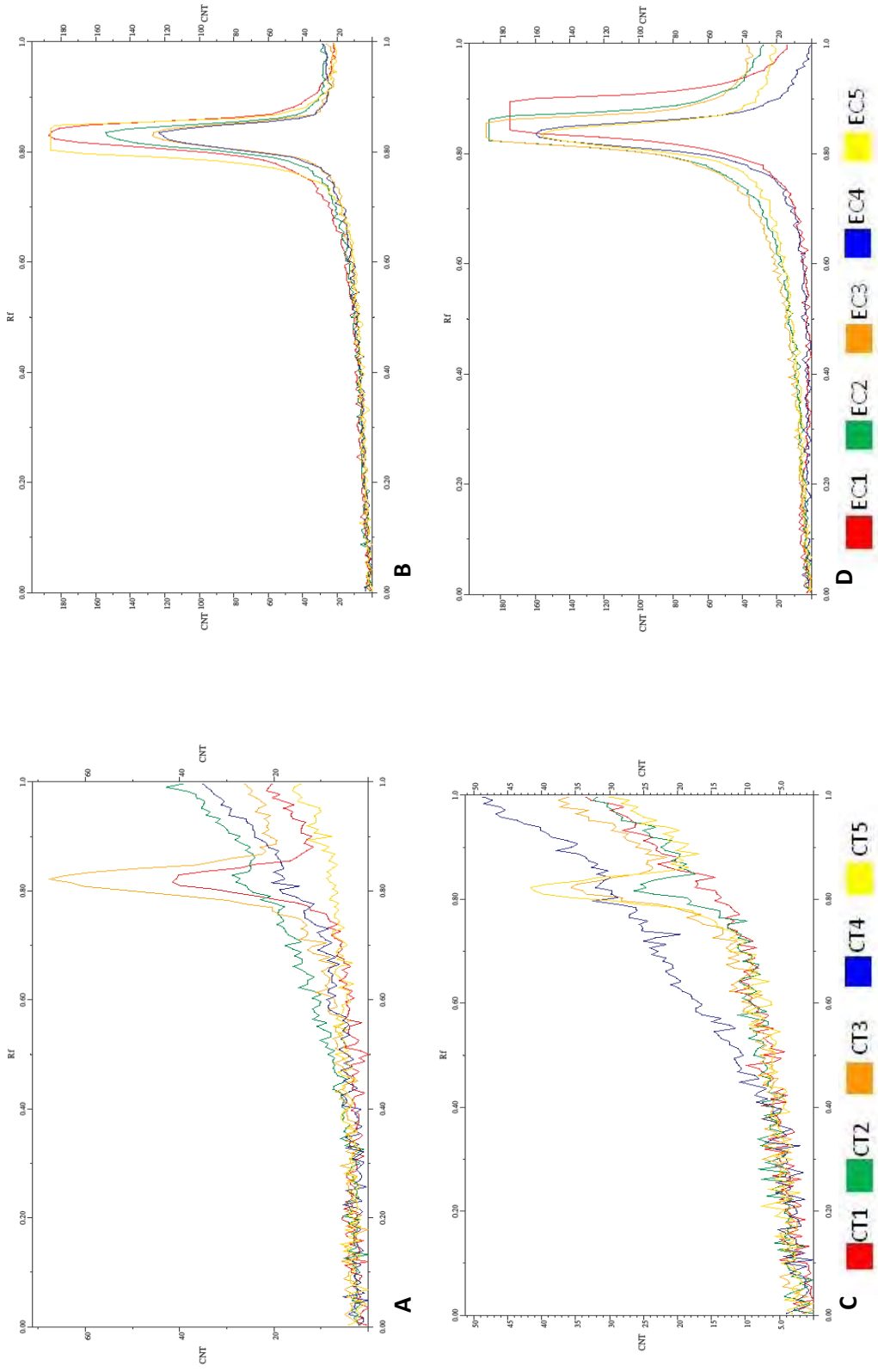


Figura 6. Representação gráfica da detecção do gene IL-10 no momento D18 obtido a partir do programa de análise Quantity one[®] 1D mostrando o pico de intensidade das bandas no gel de agarose. **A.** amostras espiências grupo CT; **B.** amostras espiências grupo EC; **C.** amostras de leucócitos grupo CT e **D.** amostras de leucócitos grupo EC.

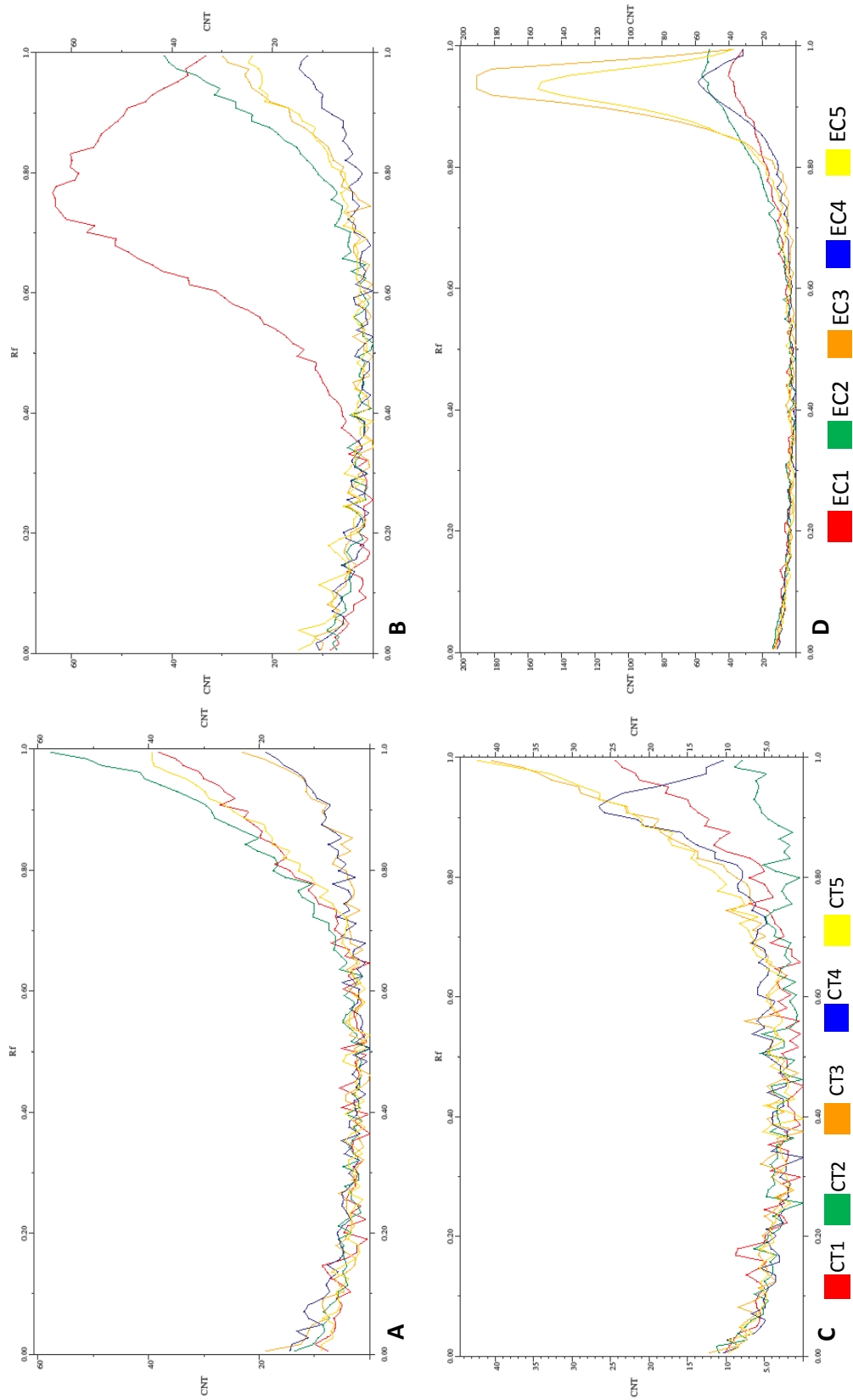


Figura 7. Representação gráfica da detecção do gene IFN- γ no momento D30 obtido a partir do programa de análise Quantity one[®] 1D mostrando o pico de intensidade das bandas no gel de agarose. **A.** amostras esplênicas grupo CT; **B.** amostras esplênicas grupo EC; **C.** amostras de leucócitos grupo CT e **D.** amostras de leucócitos grupo EC.

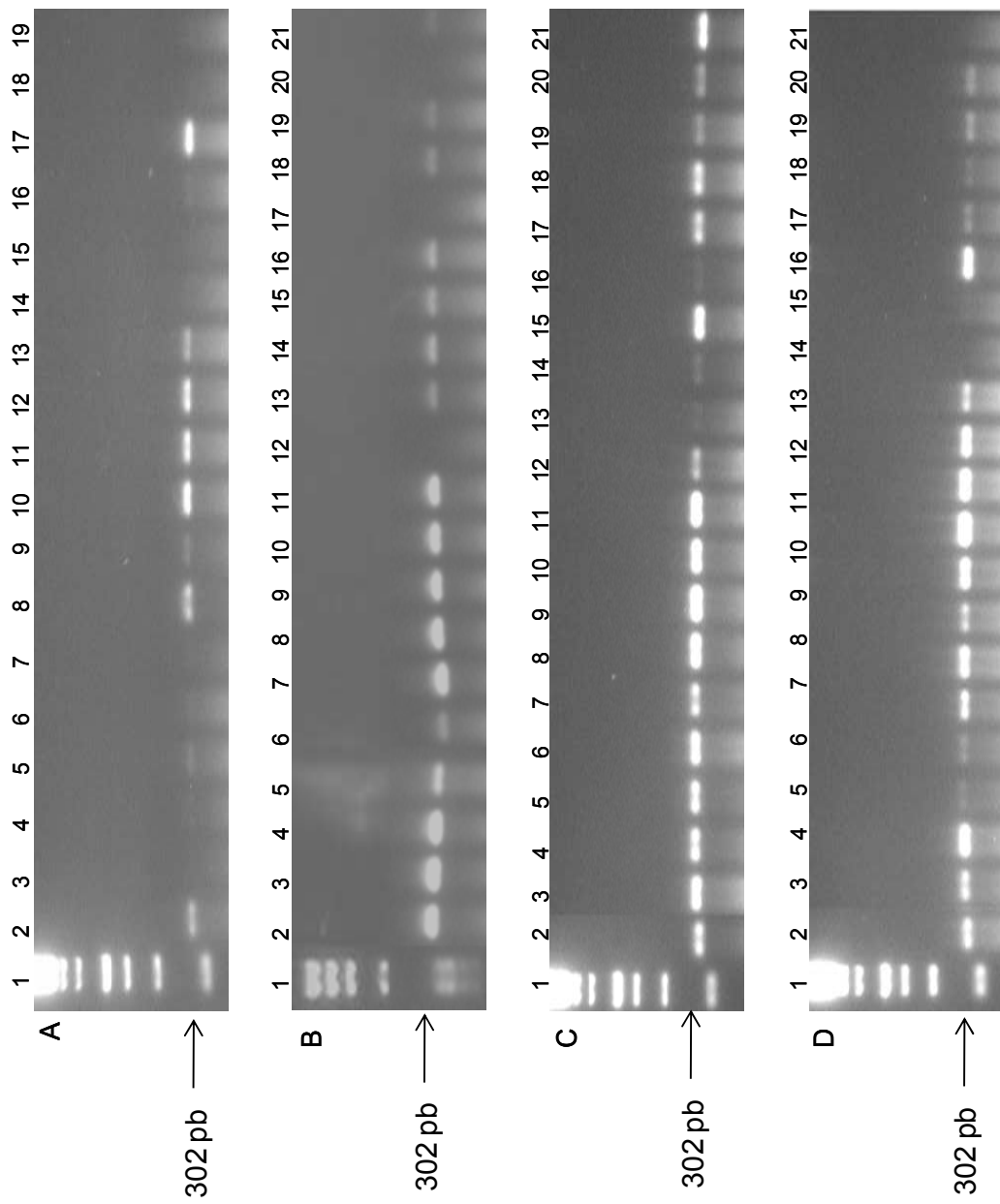


Figura 8. Visualização do padrão de bandas obtidas no gel de agarose do gene $TNF-\alpha$. A. D6, B. D18, C. D30, D. D76. Canaleta 1. marcador de pares de base, Canaletas 2 a 5 amostras de leucócitos do Grupo EC, Canaletas de 6 a 10 amostras esplênicas do grupo EC. Canaletas de 11 a 15 amostras de leucócitos grupo CT. Canaletas de 16 a 20 amostras esplênicas do grupo CT.

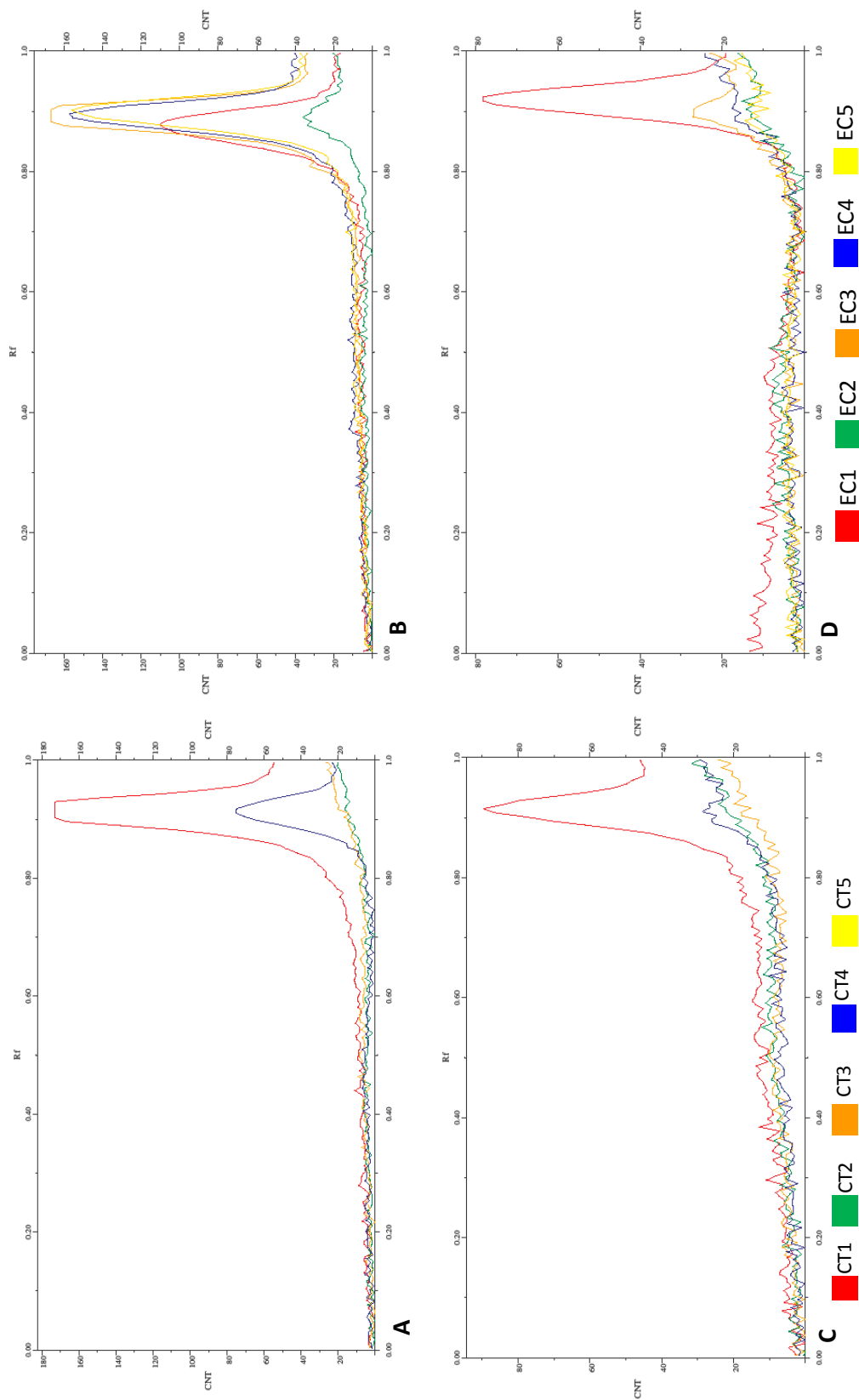


Figura 9. Representação gráfica da detecção do gene $TNF-\alpha$ no momento D6 obtido a partir do programa de análise Quantity one[®] 1D mostrando o pico de intensidade das bandas no gel de agarose. **A.** amostras esplênicas grupo CT; **B.** amostras esplênicas grupo EC; **C.** amostras de leucócitos grupo CT e **D.** amostras de leucócitos grupo EC.

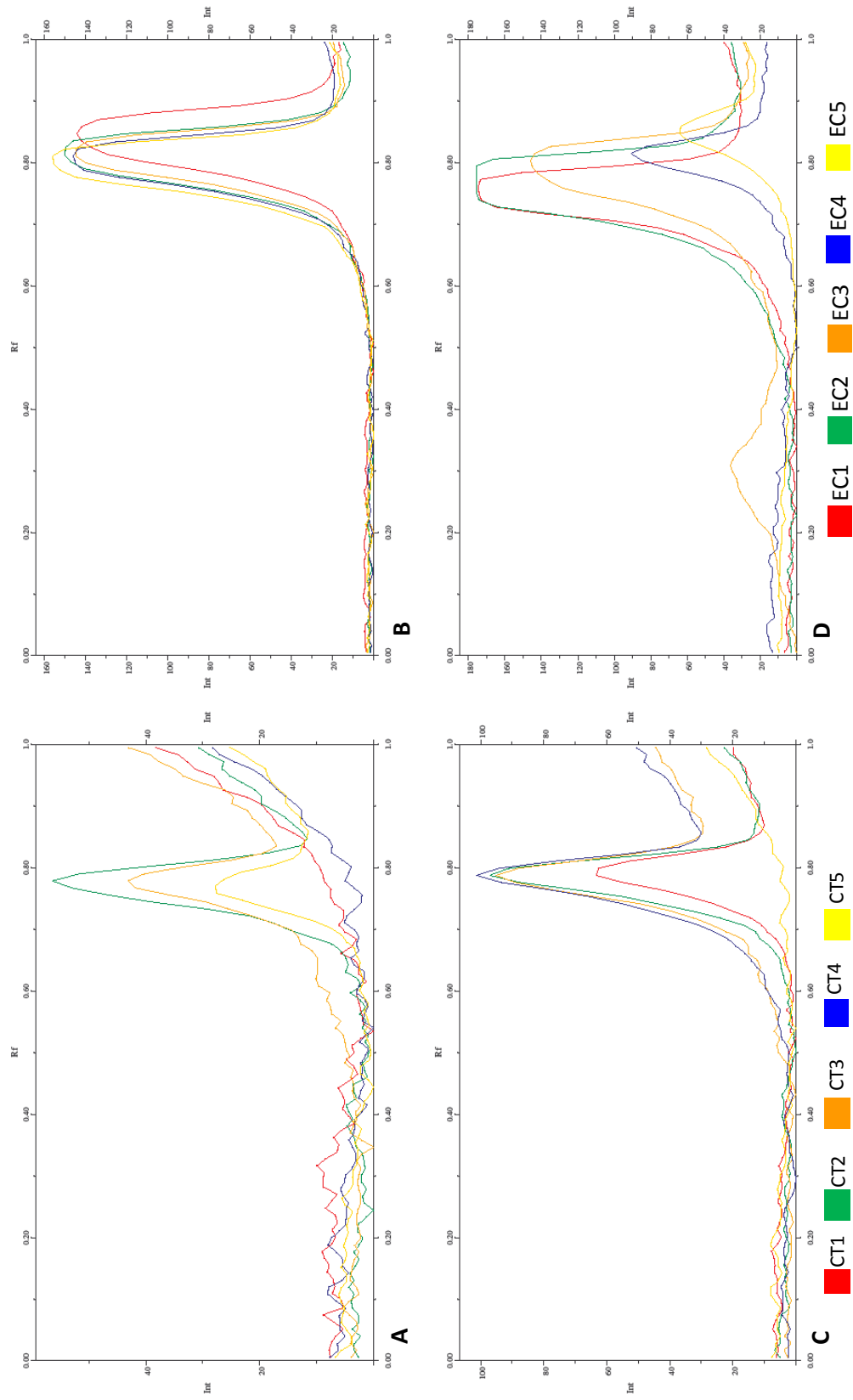


Figura 10. Representação gráfica da detecção do gene TNF- α no momento D18 obtido a partir do programa de análise Quantity one[®] 1D mostrando o pico de intensidade das bandas no gel de agarose. **A.** amostras esplênicas grupo CT; **B.** amostras esplênicas grupo EC; **C.** amostras de leucócitos grupo CT e **D.** amostras leucócitos grupo EC.

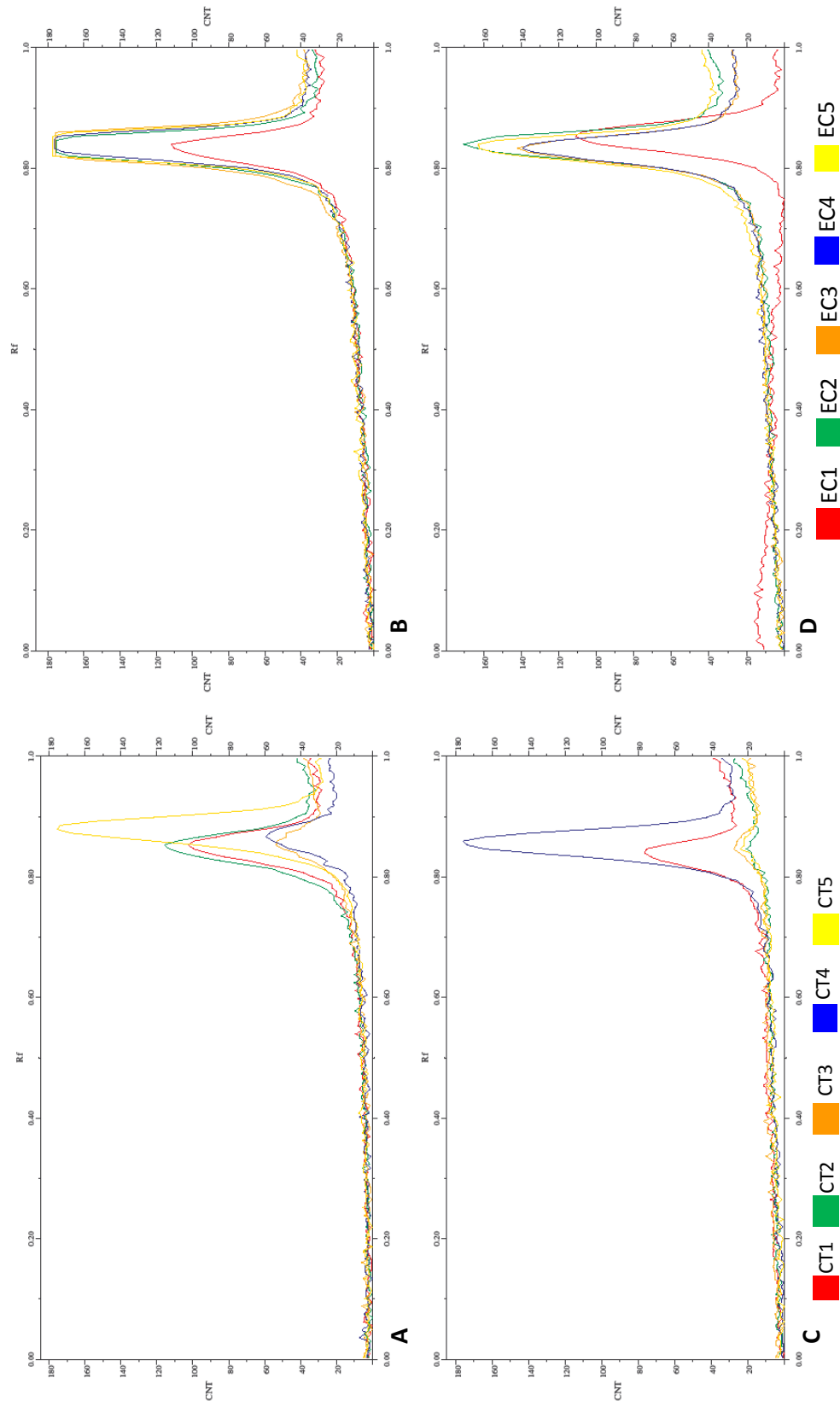


Figura 11. Representação gráfica da detecção do gene TNF- α no momento D30 obtido a partir do programa de análise Quantity one[®] 1D mostrando o pico de intensidade das bandas no gel de agarose. **A.** amostras esplênicas grupo CT; **B.** amostras esplênicas grupo EC; **C.** amostras de leucócitos grupo CT e **D.** amostras de leucócitos grupo EC.

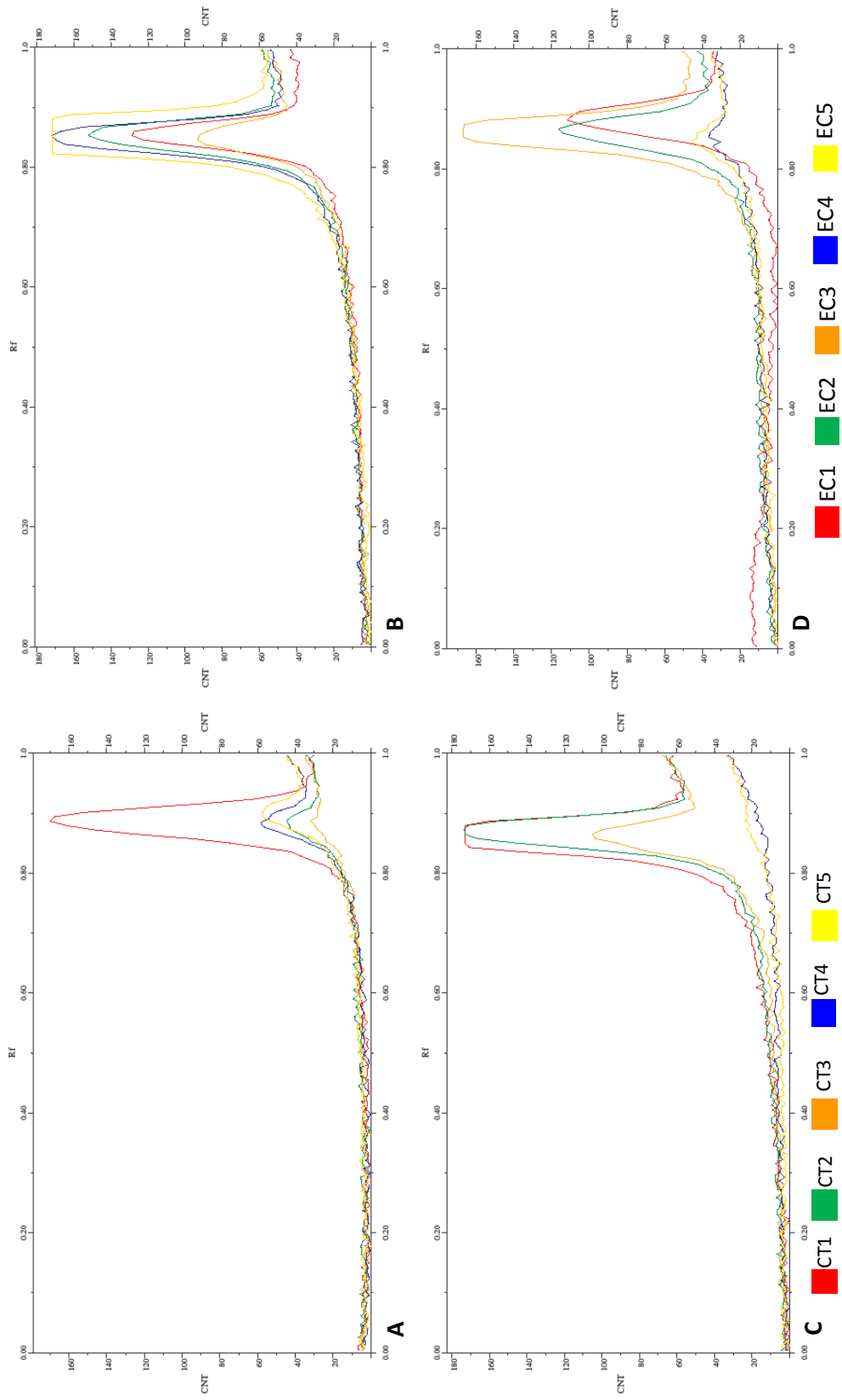


Figura 12. Representação gráfica da detecção do gene $\text{TNF-}\alpha$ no momento D76 obtido a partir do programa de análise Quantity one[®] 1D mostrando o pico de intensidade das bandas no gel de agarose. **A.** amostras esplênicas grupo CT; **B.** amostras esplênicas grupo EC; **C.** amostras de leucócitos grupo CT e **D.** amostras de leucócitos grupo EC.

5.3. Imunocitoquímica esplênica

Em todas as reações foram utilizados cortes de linfonodos como controle positivo e negativo. As imunomarcações desses controles podem ser visibilizadas na Figura 15

A imunofenotipagem da celularidade esplênica revelou a presença de macrófagos, células $CD4^+$, $CD8^+$, linfócitos B $CD79-\alpha^+$, e de células expressando MHC II^+ tanto nos animais do grupo CT como nos animais do grupo EC em todos os momentos experimentais (Figura 16). Foi utilizado como controle negativo cortes de linfonodos de animais saudáveis e também as células esplênicas dos animais do grupo CT e EC.

A análise estatística comparou as médias dos grupos CT e EC nos diferentes momentos experimentais, e também comparou os momentos dentro de cada grupo.

Em relação às células $CD4^+$ houve redução significativa no número de células marcadas do grupo EC nos momentos D18 ($P < 0,05$), D30 ($P < 0,05$) e D76 ($P < 0,05$) em relação ao grupo CT. Além disso, no grupo EC a redução das células $CD4^+$ foi significativa quando comparou-se os momentos D18 e D30 ao momento D-1.

Quando se avaliou as células $CD8^+$, de forma geral, estas células foram detectadas em menor número em todos os momentos experimentais, tanto no grupo controle como no infectado. Entretanto, houve um aumento significativo ($P < 0,05$) no número de células $CD8^+$ nos animais infectados no D76 em relação ao grupo controle.

Já a imunomarcação dos linfócitos B $CD79-\alpha^+$ foi significativa nos momentos D18 e D30 ($P < 0,05$) quando foi observado um aumento dessas células no grupo EC em relação ao grupo CT. Entre os animais infectados houve aumento da celularidade no D18 relação ao D-1 ($P < 0,05$).

A imunofenotipagem de macrófagos $MAC387^+$ mostrou-se reduzida no grupo EC em relação ao grupo CT nos momentos D18, D30 e D76 ($P < 0,05$) e ainda no grupo EC houve diminuição no momento D30 em relação ao D-1.

A expressão de moléculas de MHCII aumentou significativamente nos animais do grupo EC em relação ao grupo CT apenas no momento D6 ($P < 0,05$).

Todos os valores das médias e desvios padrão da contagem das células imunomarcadas no material esplênico durante o curso da infecção experimental, podem ser visibilizadas na Tabela 6. A variação da contagem de células em todos os momentos experimentais, tanto dos animais do grupo CT quanto so animais do grupo EC podem ser visibilizadas na Figura 13.

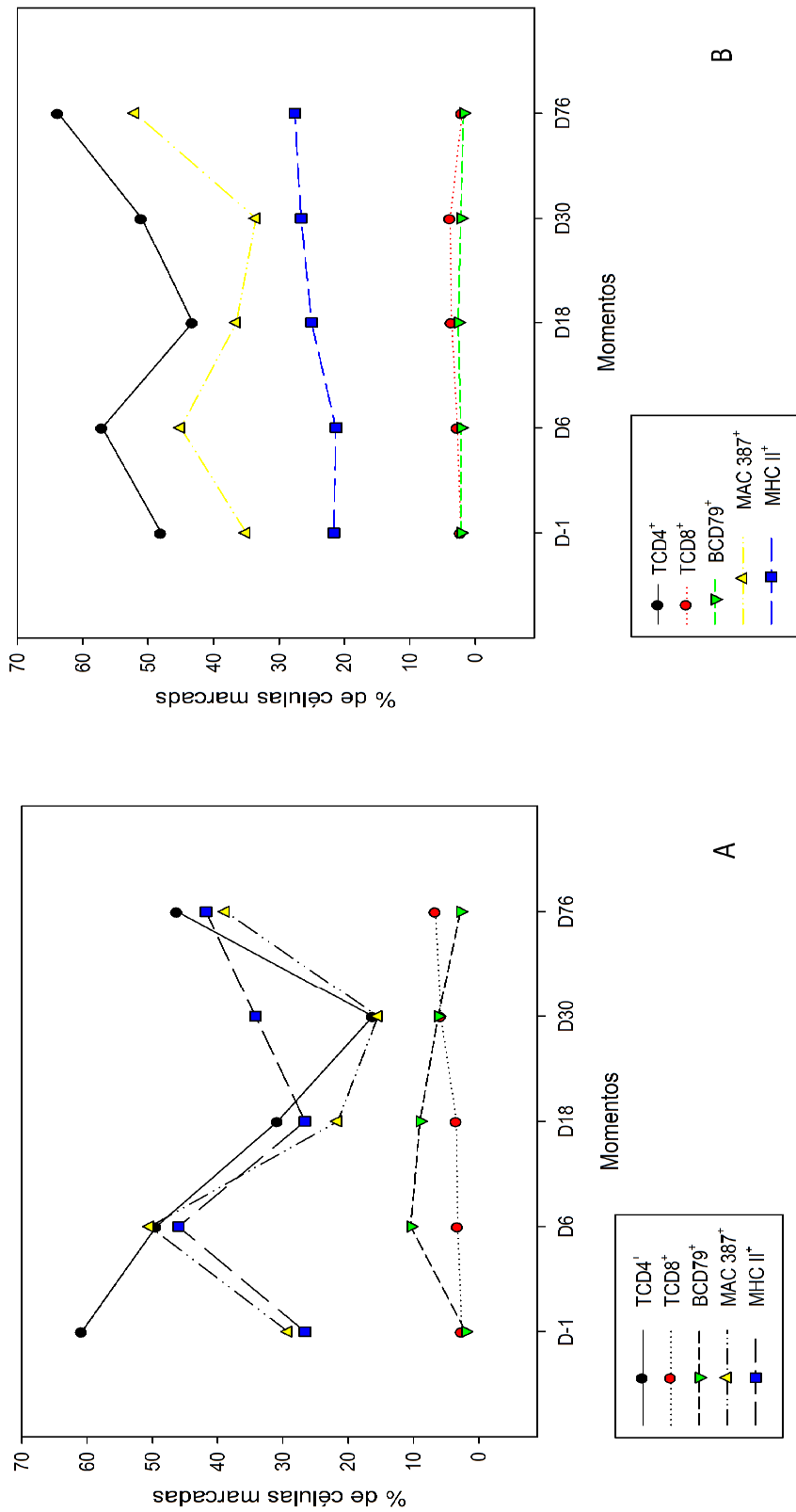


Figura 13. Representação gráfica da contagem das células esplênicas imunomarcadas com os anticorpos CD4⁺, CD8⁺, CD79- α ⁺, MAC387⁺, MCH II⁺, dos cães dos grupos infectado (EC) em A e controle (CT) em B e, nos momentos experimentais.

Tabela 6. Valores médios e desvios padrão da contagem de células esplênicas imunomarcadas com os anticorpos CD4⁺, CD8⁺, CD79- α ⁺, MAC387⁺, MCH II⁺, dos cães dos grupos controle (CT) e infectado (EC), nos momentos pré-determinados. Jaboticabal, SP. Janeiro/2010.

GRUPO	TEMPOS EXPERIMENTAIS				
	D-1	D6	D18	D30	D76
CD4⁺					
CT	48,0 $\pm$ 6,05 ^{Aa}	57,0 $\pm$ 9,8 ^{Aa}	43,2 $\pm$ 26,8 ^{Aa}	51,0 $\pm$ 27,5 ^{Aa}	63,7 $\pm$ 9,8 ^{Aa}
EC	60,8 $\pm$ 18,7 ^{Aa}	49,4 $\pm$ 24,7 ^{Aa}	30,8 $\pm$ 9,5 ^{Aa}	16,20 $\pm$ 6,2 ^{Bb}	46,2 $\pm$ 8,1 ^{Ab}
CD8⁺					
CT	2,2 $\pm$ 1,3 ^{Aa}	2,7 $\pm$ 0,5 ^{Aa}	3,6 $\pm$ 4,7 ^{Aa}	3,8 $\pm$ 1,9 ^{Aa}	2,0 $\pm$ 0,7 ^{Aa}
EC	2,6 $\pm$ 1,1 ^{Aa}	3,2 $\pm$ 1,1 ^{Aa}	3,4 $\pm$ 2,7 ^{Aa}	5,8 $\pm$ 2,5 ^{Aa}	6,6 $\pm$ 5,7 ^{Ab}
CD79-α⁺					
CT	2,2 $\pm$ 0,8 ^{Aa}	2,2 $\pm$ 1,0 ^{Aa}	2,6 $\pm$ 0,5 ^{Aa}	2,2 $\pm$ 1,3 ^{Aa}	1,8 $\pm$ 1,3 ^{Aa}
EC	2,0 $\pm$ 1,0 ^{Aa}	10,4 $\pm$ 8,5 ^{Aa}	9,0 $\pm$ 3,5 ^{Bb}	6,2 $\pm$ 2,3 ^{Ab}	2,8 $\pm$ 0,8 ^{Aa}
MAC387⁺					
CT	35,0 $\pm$ 20,8 ^{Aa}	45,0 $\pm$ 17,7 ^{Aa}	36,5 $\pm$ 4,9 ^{Aa}	33,5 $\pm$ 12,4 ^{Aa}	52,0 $\pm$ 5,0 ^{Aa}
EC	29,2 $\pm$ 14,9 ^{Aa}	50,4 $\pm$ 12,1 ^{Aa}	21,6 $\pm$ 7,7 ^{Ab}	15,4 $\pm$ 9,0 ^{Bb}	38,8 $\pm$ 10,6 ^{Aa}
MHC II⁺					
CT	21,6 $\pm$ 16,6 ^{Aa}	21,3 $\pm$ 10,2 ^{Aa}	25,0 $\pm$ 13,6 ^{Aa}	26,6 $\pm$ 13,7 ^{Aa}	27,6 $\pm$ 18,2 ^{Aa}
EC	26,6 $\pm$ 14,9 ^{Aa}	46,0 $\pm$ 12,1 ^{Ab}	26,6 $\pm$ 9,2 ^{Aa}	34,2 $\pm$ 16,4 ^{Aa}	41,8 $\pm$ 13,4 ^{Aa}

Nota: Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os momentos. (P< 0,05) Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (P< 0,05) entres grupos infectado (EC) e controle (CT).

As alterações das subpopulações de células esplênicas associada à dinâmica da expressão gênica das citocinas ao longo do curso experimental, podem ser visibilizadas na Figura 14.

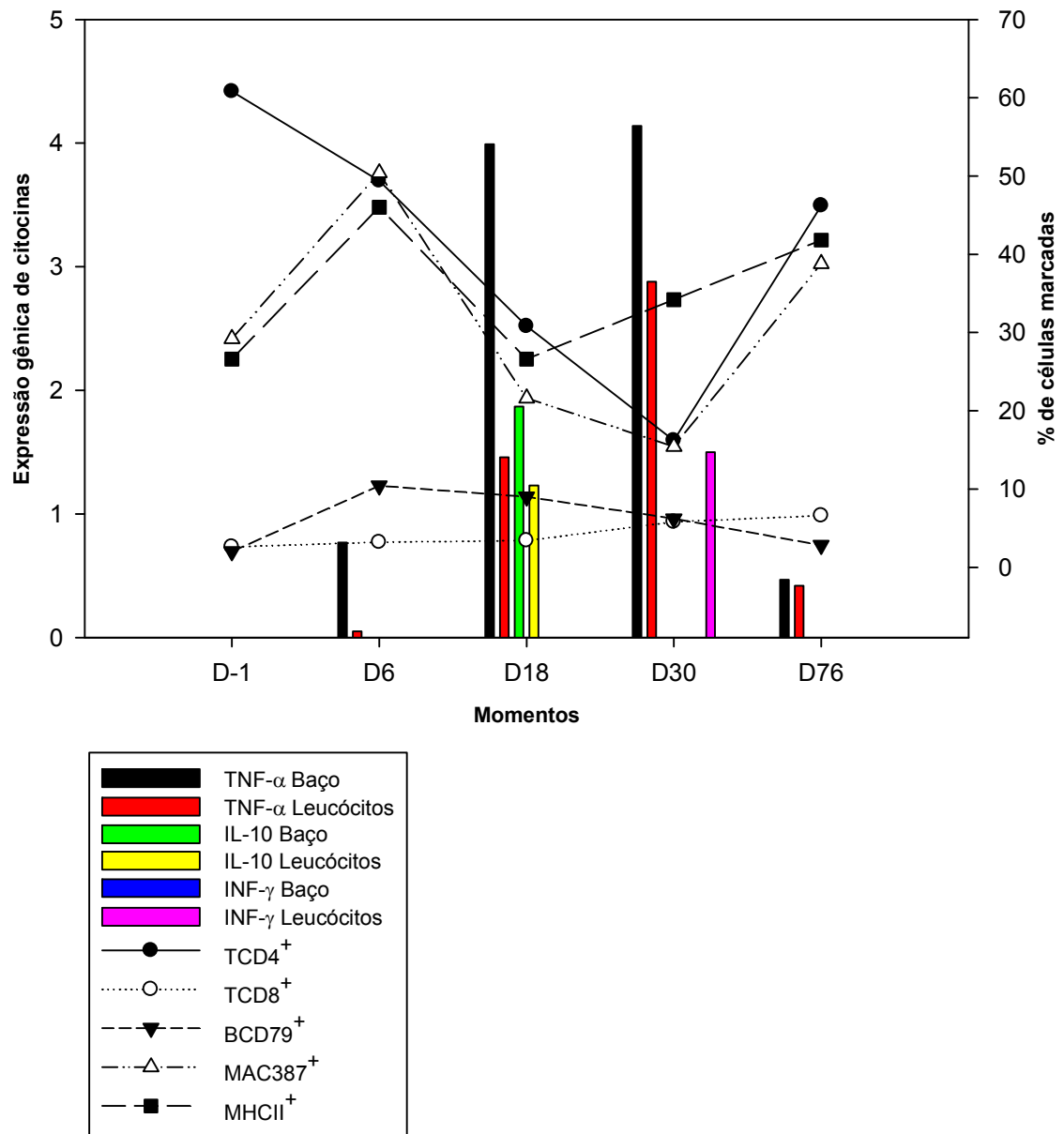


Figura14. Representação gráfica da porcentagem das subpopulações de células esplênicas e da expressão gênica de citocinas em cães experimentalmente infectados com a amostra Jaboticabal de *E. canis*.

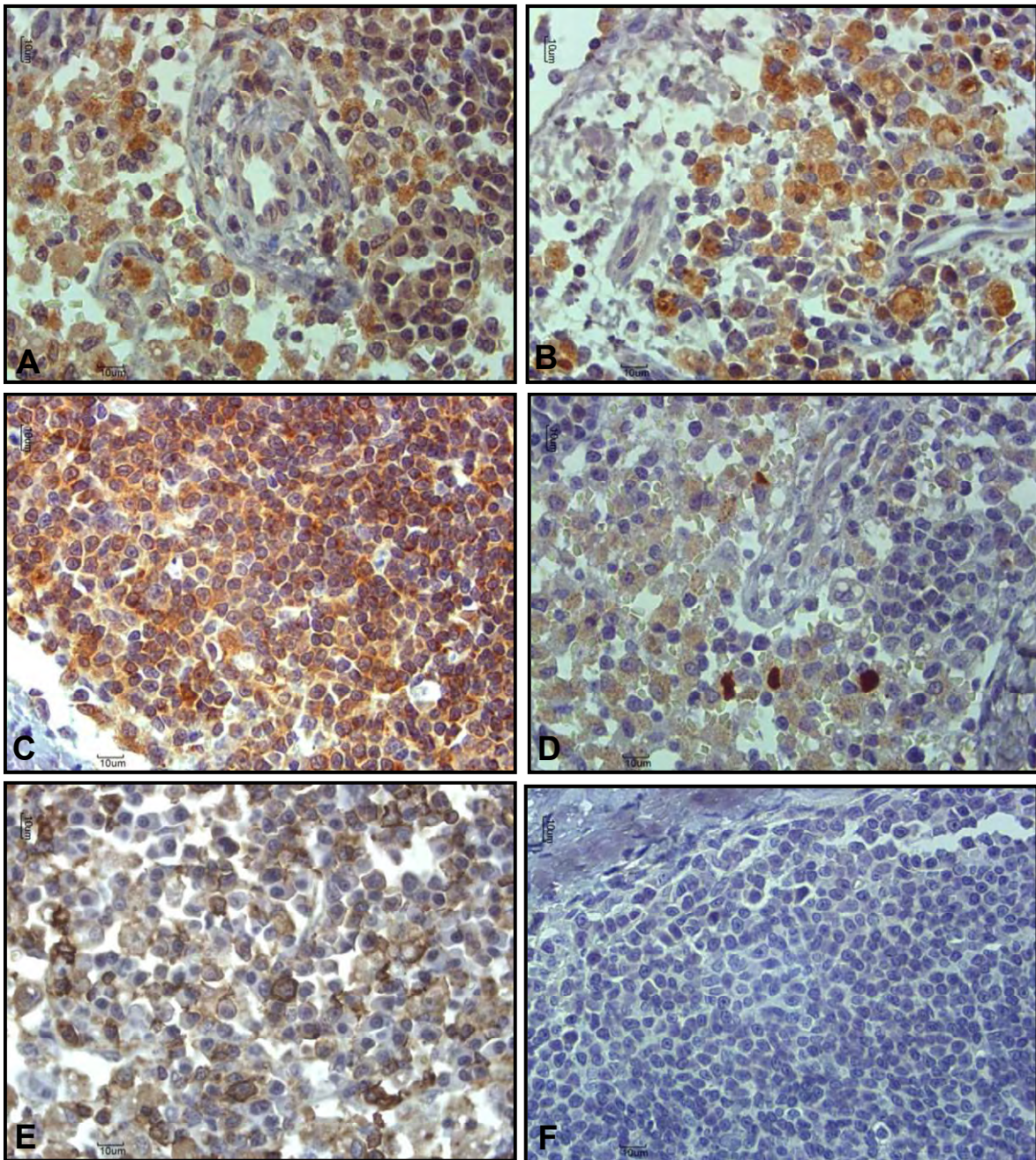


Figura 15. Visibilização das imunomarcações dos linfonodos utilizados como controles da reação. **A** células CD4⁺; **B**. células CD8⁺, **C**. linfócitos B CD79- α ⁺; **D** MAC387⁺, **E**. células expressando MHCII⁺ e **F** controle negativo. Método ABC e contra-coloração com Hematoxilina de Harris. 40X.

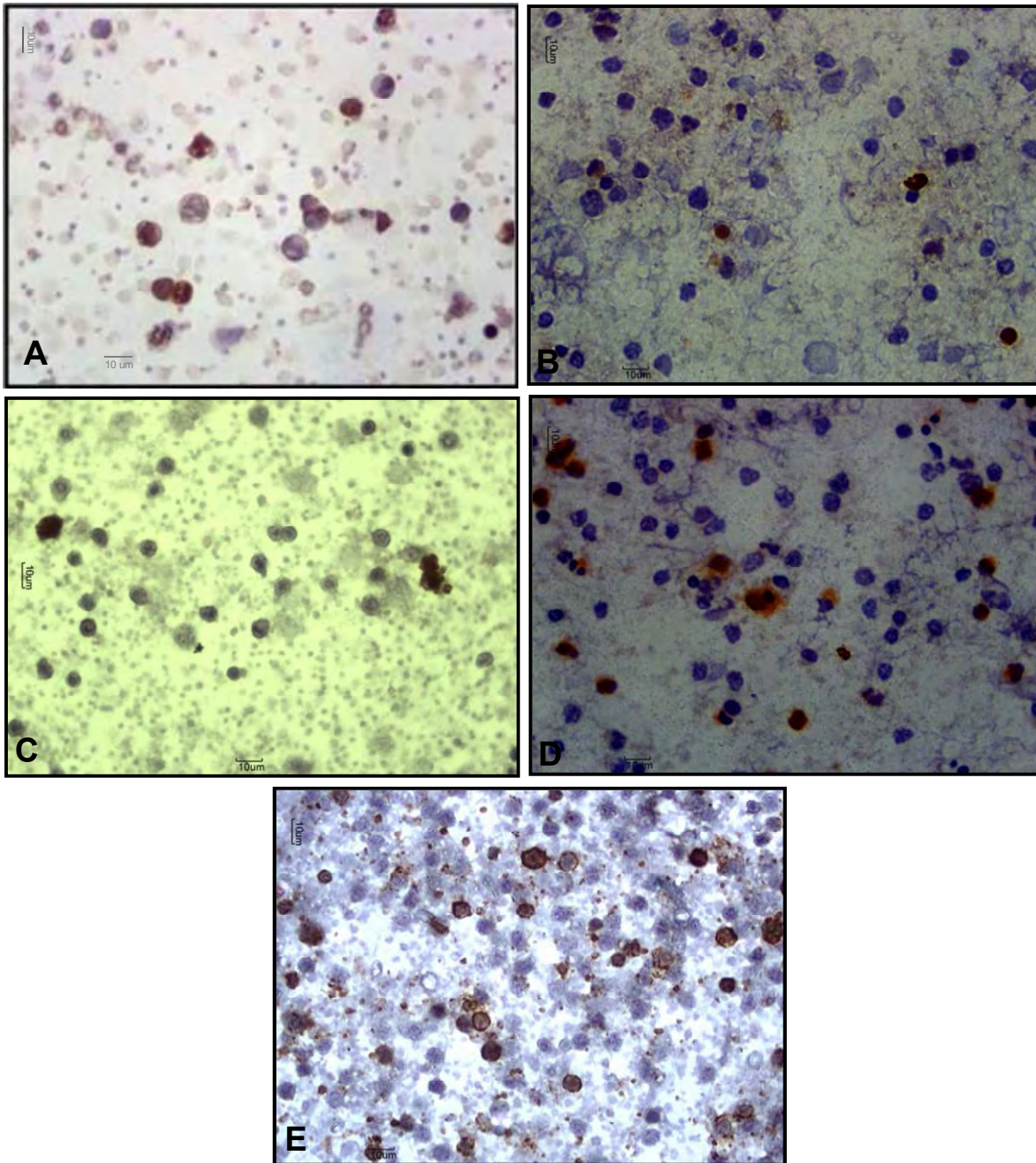


Figura 16. Visibilização das imunomarcações das células esplênicas. **A** células CD4⁺; **B**. células CD8⁺, **C**. linfócitos B CD79- α ⁺; **D** MAC387⁺, **E**. células expressando MHCII⁺. Método ABC e contra-coloração com Hematoxilina de Harris. 40X.

5.4. Pesquisa de mórulas

Mórulas e corpúsculos iniciais foram detectados na citologia esplênica em todos os animais infectados nos momentos D18 e D30, não sendo mais detectadas após o tratamento em D76. Algumas das mórulas encontradas podem ser visibilizadas na Figura 17. A pesquisa de mórulas na citologia esplênica é mais eficiente comparada ao esfregaço sanguíneo de ponta de orelha, pois as mórulas foram visibilizadas em todos os animais infectados e durante um período maior de avaliação.

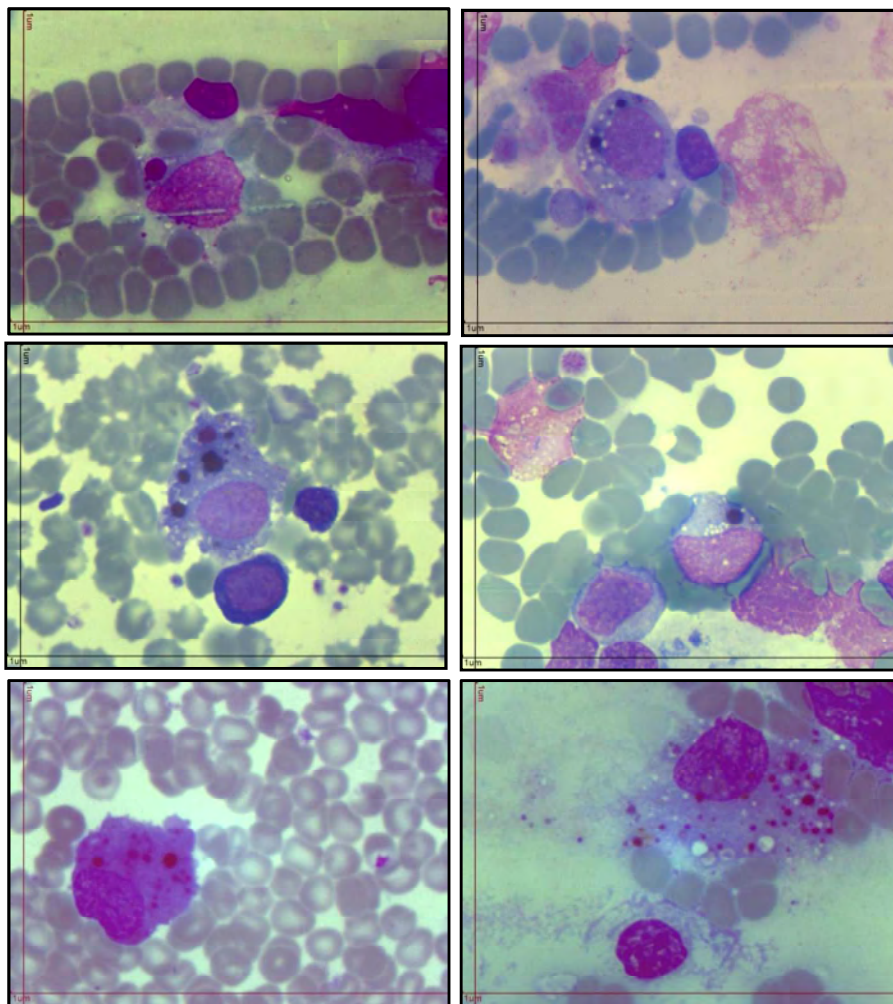


Figura 17. Visibilização de mórulas em células monócíticas esplênicas em cães EC em D18 e D30. 100X Rosenfeld modificado.

6. DISCUSSÃO

A erliquiose canina é uma doença de alta incidência na clínica de pequenos animais e muitos cães acabam morrendo por complicações decorrentes desta enfermidade. Embora os meios de diagnóstico e tratamento da erliquiose canina estejam consolidados, muitas dúvidas ainda cercam a patogenia da relação parasita-hospedeiro, que essa bactéria estabelece com o cão, e suas consequências para o animal. Estudos apontam que as bactérias da família *Anaplasmatidae* causam diversas alterações nos hospedeiros e a resposta imunológica a essas bactérias estaria envolvida na gênese das lesões imunopatológicas que ocorrem nos indivíduos (MARTIN; BUNNELL; DUMLER, 2001; ISMAIL et al., 2004; ISMAIL et al., 2005; DUMLER et al., 2006; SCORPIO et al., 2006; CHOI et al., 2007). Outros estudos mostraram que a resposta inata contra a *A. phagocytophilum* causa injúria tecidual antes mesmo que se inicie a resposta imune adaptativa, provavelmente em decorrência da ação de citocinas como o TNF- α (SCORPIO et al., 2005) e IFN- γ (MARTIN; BUNNELL; DUMLER, 2001). Também foi observado por KIM e RIKIHISA (2002) que *A. phagocytophilum* é capaz de alterar a transcrição genética de neutrófilos culminando na produção de citocinas pró-inflamatórias, que poderiam agravar o quadro clínico da doença. Em outro estudo, HASEGAWA et al. (2008) evidenciaram que a atividade oxidativa dos neutrófilos se mantém nos animais infectados com *E. canis*, tornando-as mais ativas na fase aguda da doença.

A detecção de DNA da *E. canis*, assim como a presença de títulos de anticorpos contra o parasita, associado as alterações clínicas e hematológicas, demonstram que o método de inoculação empregado foi eficaz, como também observado por CASTRO et al. (2004) e CASTRO (2004). A inoculação em cães com a amostra Jaboticabal de *E. canis* reproduz a doença de ocorrência natural, e os sinais clínicos característicos dessa enfermidade (TROY & FORRESTER, 1990; FRANK & BREITSCHWERDT, 1999; HARRUS et al., 1999) surgem por volta de 10 a 12 dias após a inoculação, como

constatados neste estudo e nos estudos anteriores desenvolvidos por CASTRO et al. (2004) e CASTRO (2004).

Nosso estudo e os estudos de CASTRO, empregaram a amostra Jaboticabal de *E. canis*. CASTRO et al. (2004) e CASTRO (2004) utilizaram uma alíquota da amostra original criopreservada, enquanto que na presente pesquisa o inóculo utilizado passou por cultivo celular em células DH82, uma linhagem histiocítica canina imortalizada (ATCC nº: CRL-10389; WELLMAN et al., 1988), procedimento que não alterou a patogenia da bactéria. No presente estudo, não observamos alterações clínicas divergentes das observadas por CASTRO et al. (2004) durante o desenvolvimento da infecção experimental, como também as alterações hematológicas aqui encontradas (leucopenia e trombocitopenia) surgiram mais precocemente do que as descritas por CASTRO et al. (2004). Isto mostra que a passagem da amostra Jaboticabal de *E. canis* por cultivo celular não alterou a virulência da mesma e discorda do recentemente descrito SAMISH, WANER & HARRUS (2009). Esses pesquisadores observaram que passagens de amostras de *E. canis* por cultivo celular atenuam a virulência das mesmas e sugerem que este método poderia ser utilizado para a imunização de cães contra infecção natural.

Também a idade e raça dos cães poderiam interferir na gravidade e duração da manifestação clínica da doença, segundo TROY & FORRESTER (1990), o que de fato não aconteceu. No presente estudo os cães receptores do inóculo infectante eram adultos e SRD, ao passo que nos estudos de CASTRO et al. (2004) eram filhotes de 4 meses de idade da raça Pastor alemão que, segundo a literatura, desenvolvem um quadro clínico severo da doença (TROY & FORRESTER, 1990; SHIMADA et al., 2002).

Um achado interessante observado neste experimento foi à persistência da trombocitopenia mesmo após o tratamento (D76). Neste momento (D76), os animais encontravam-se clinicamente saudáveis com nPCR negativa (sangue e baço), em todos os cinco cães, sugerindo a eliminação da bactéria. A trombocitopenia persistente poderia ser atribuída a um componente imunológico (WARNER et al., 2000), ao aumento do consumo de plaquetas devido as alterações no endotélio vascular, o sequestro esplênico das plaquetas e a imunossupressão da medula óssea que ocorrem

na erliquiose (WANER et al., 1995; HARRUS et al., 1996). Além disso, a possível presença de anticorpos anti-plaquetários que se formam ainda no período de incubação da doença (WANER et al., 2000), poderiam justificar a trombocitopenia observada nesse estudo, a partir do terceiro dia após a inoculação. Apesar de a contagem plaquetária ser útil para avaliar a resposta ao tratamento (NEER et al., 2002), nossos resultados sugerem que é preciso ter cautela quanto a essa avaliação.

No presente estudo observamos que os animais infectados desenvolveram anemia normocítica normocrômica coincidente com o observado por SILVA (2001), CASTRO et al. (2004), NAKAGHI et al. (2008) e FARIA et al. (2010). Acredita-se que a anemia na erliquiose ocorra devido a aumento de consumo e sequestro esplênico, associada a imunossupressão medular (WOODY & HOSKINS 1991; STILES, 2000). Contudo, em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa foi observado que a anemia arregenerativa está associada a hiperplasia da série eritrocítica, acompanhada de alterações mielodisplásicas e na arquitetura da medula óssea, após a inoculação com a amostra Jaboticabal (SILVA, 2001).

A observação de mórulas em esfregaços sanguíneos de ponta de orelha foi coincidente com o aparecimento dos primeiros sinais da doença, semelhante ao observado por CASTRO et al. (2004) e HASEGAWA (2005), porém contraria resultados de outros pesquisadores que não detectaram mórulas em esfregaços sanguíneos de animais experimentalmente infectados (HARRUS et al., 1998a, 2004; HESS et al., 2006). Contudo, a pesquisa de mórulas em aspirados esplênicos foi mais eficiente, confirmando resultados anteriores do nosso grupo de pesquisa, quando a punção do baço mostrou superioridade de aproximadamente 48% na pesquisa de mórulas em relação a papa leucocitária (FARIA et al., 2010). Esses achados reforçam a importância do baço na erliquiose canina, que funcionaria como abrigo para a persistência da bactéria no organismo do hospedeiro (HARRUS et al., 1998a, 2004; BANETH et al., 2009)

A presença dos anticorpos específicos da classe IgG aos 18 dias após a inoculação demonstram a resposta imune humoral frente ao parasita, corroborando com outros estudos que observaram títulos de anticorpos da classe IgG em torno de 7 a 21

dias após a inoculação (WANER et al., 1995, 2000; BANETH et al., 2009). Todavia, muitas pesquisas sugerem que a resposta imune humoral é ineficiente contra a *E. canis* (WANER et al., 2001; HESS et al., 2006), muito embora outros estudos mostram que em algumas infecções erliquiais a resposta imune humoral é responsável por debelar a infecção (YAGER et al., 2001; FENG & WALKER, 2004; ISMAIL et al., 2004), e ainda que as células CD4⁺ seriam dispensáveis para combater essas bactérias (BITSAKTSIS et al., 2007). Autores sugerem que seriam as células B e não as células T, as responsáveis pela resposta imunológica contra a *Ehrlichia* spp, contribuindo de forma efetiva na eliminação da bactéria (BITSAKTSIS et al., 2007). Baseado em nossos resultados, não foi possível afirmar que as células B e a imunidade humoral seriam as responsáveis pela eliminação da *E. canis*, contudo no momento em que reduziram as contagens de células CD4⁺, os animais responderam com o aumento das células B. A partir desses resultados nós poderíamos sugerir que na ausência das células B e produção de anticorpos os animais poderiam adoecer de forma mais grave, tornando o curso da doença desfavorável. Todavia, a realização do tratamento nos animais do grupo EC somado ao fato de não se ter um grupo de animais infectados e não tratados, nos impede de afirmar que as células B na ausência das células TCD4⁺ seriam imprescindíveis para a defesa do animal contra a *E. canis*, como citado por BITSAKTSIS et al.(2007)

Entre os métodos de diagnóstico da erliquiose canina, a detecção do DNA específico pela nPCR é considerada uma técnica de excelência para o diagnóstico da doença (WEN et al.,1997; HARRUS et al., 1998a, 2004; NAKAGHI et al., 2008). O presente estudo concorda com esses autores, uma vez que todos os animais inoculados tornaram-se positivos à nPCR. Além disso, a nPCR pode ser utilizada como uma forma de se avaliar a resposta a terapia empregada (BREITSCHWERDT et al., 1998; HARRUS et al., 2004). Corroborando com esta informação, todos os animais infectados deste experimento tornaram-se negativos após o tratamento com cloridrato de doxiciclina. Vale salientar, que a persistência de títulos de anticorpos e a baixa contagem de plaquetas observadas nos animais, mesmo após o tratamento, foram atribuídas às reações imunopatológicas que a bactéria causa no hospedeiro, não

significando necessariamente a persistência da infecção. Reforçando essa teoria, nós observamos que após o término do tratamento, a contagem das células CD4⁺, macrófagos se reestabeleceu e isso foi acompanhado pelo declínio na expressão do TNF- α , somado a melhora clínica, além da redução dos títulos de anticorpos e a não detecção de DNA erliquial no sangue e no baço dos animais do grupo EC.

Nas condições experimentais desta pesquisa, o início do desenvolvimento dos sinais clínicos foi acompanhado pelo aumento crescente da expressão de TNF- α , o que vai ao encontro dos resultados de outros pesquisadores (ISMAIL et al., 2004; TAJIMA & RIKIHISA, 2005). Aparentemente, a expressão do gene TNF- α está associada com a infecção erliquial, que segundo FENG & WALKER (1994) poderia auxiliar na eliminação do parasita por um mecanismo dependente do óxido nítrico, responsável pela morte de bactérias intracelulares, mas poderia causar também lesões teciduais (DUMLER et al., 2000) da medula óssea, sendo este, um dos mecanismos incriminados no aparecimento das citopenias (HARA et al., 2004), e agravamento do quadro clínico do animal (ISMAIL et al., 2004; WINSLOW et al., 2005; BEINEKE et al., 2008). Analisando essas informações conjuntamente sugere-se que a infecção experimental pela amostra Jaboticabal induz no hospedeiro uma reação inflamatória imunomediada.

Associado ao aumento crescente da expressão do TNF- α , outros eventos imunológicos foram observados durante a fase aguda da infecção experimental neste estudo. Após a inoculação dos cães, em D6, as proporções de células MHC II⁺ e macrófagos aumentaram ao mesmo tempo em que células CD4⁺ progressivamente, reduziram a população, possivelmente em resposta ao agente infectante. Somente após o tratamento dos animais, em D76, as contagens das células voltaram aos patamares encontrados em D6. Esses dados sugerem um comprometimento da imunidade celular durante a infecção experimental pela amostra Jaboticabal de *E. canis*, e concordam com o observado por outros pesquisadores que analisaram as mesmas linhagens celulares em cães infectados pela mesma (CASTRO et al., 2004), ou por outras amostras de *Ehrlichia spp* (HEEB et al., 2003; ISMAIL et al., 2004). Nesses estudos, os pesquisadores sugerem que a redução das células CD4⁺ seja uma provável causa da imunodeficiência desencadeada pela bactéria *E. canis*. Outros

pesquisadores também evidenciaram que a redução de células $CD4^+$ seria responsável pela permanência dos microrganismos erliquiais no hospedeiro, uma vez que essas células seriam responsáveis pela produção de $INF-\gamma$, resultando na morte destas bactérias (BITSAKTSIS; HUNTINGTON; WISLOW, 2004; GANTA et al., 2004; WISLOW et al., 2005; CHOI et al., 2007; BIRKNER et al., 2008). Em contrapartida, HESS et al. (2006) acreditam que a infecção experimental com *E. canis* não seja capaz de causar depleção das células $CD4^+$. Os mesmos pesquisadores também evidenciaram aumento da subpopulação de células $CD8^+$, semelhante ao encontrado em nosso estudo.

Supostamente o comportamento das células imunes é bastante controverso na erliquiose canina. Em nosso estudo, a contagem da subpopulação de células $CD8^+$ sofreu pouca variação ao longo do período experimental, aumentando apenas após a realização do tratamento. Nos estudos de CASTRO et al. (2004) houve aumento das células $CD8^+$ nos linfonodos, porém redução no baço e esses achados foram atribuídos a resposta protetora do hospedeiro contra a *E. canis*. Baseados nos resultados de nosso estudo poderíamos supor que o aumento nas contagens de células $CD8^+$ após o tratamento estaria relacionada com a eliminação do parasita e também com a resposta do sistema imunológico frente a diminuição das células $CD4^+$ ao longo de período experimental. Para outros pesquisadores, as células $CD8^+$ são responsáveis pela síntese do $TNF-\alpha$, que quando secretado de forma exacerbada pelas células $CD8^+$ contribui para lesão dos tecidos do hospedeiro infectado com *Ehrlichia* spp. (ISMAIL et al., 2004). THIRUMALAPURA et al. (2008) sugerem que para a adequada eliminação da *Ehrlichia* spp é necessário equilíbrio e a ação conjunta das subpopulações de células $CD4^+$ e $CD8^+$. Nas condições experimentais do nosso estudo não foi possível afirmar se as células $CD8^+$ seriam responsáveis pela expressão do $TNF-\alpha$, contudo, durante os momentos em que se dectaram altas taxas de expressão de $TNF-\alpha$ as contagens das células $CD8^+$ do grupo EC não diferiram das do grupo CT, o que expõe a necessidade de estudos adicionais, como sugerido por TAJIMA & RIKIHISA (2005). Além disso outros estudos ressaltam ainda que a resposta do hospedeiro pode variar dependendo da quantidade do inóculo e da amostra infectante (TAJIMA & RIKIHISA, 2005; UNVER et al., 2006; THIRUMALAPURA et al., 2008; ISMAIL et al., 2004, 2005).

Aparentemente, o início da infecção experimental gerou estímulo suficiente para mobilizar subpopulações de células imunes no baço, porém não foram capazes de interromper o curso da doença. Esse estímulo inicial de subpopulações de macrófagos e células MHCII⁺ foi inibido durante o curso da doença experimental, e isto poderia ser um dos mecanismos de evasão da bactéria. A redução dessa subpopulação de células também poderia estar relacionada com a expressão de IL-10, uma vez que foi sugerido por alguns pesquisadores que a IL-10 inibe a expressão de MHCII (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Coincidentemente, no momento em que se detectou a expressão de IL-10 (D18) houve redução máxima da contagem, embora não significativa, de células que expressam MHC de classe II. Alguns estudos mostram que camundongos “knockout” para MHCII⁺ são incapazes de combater a infecção pela *E. chaffeensis* (GANTA et al.; 2002) e, que células infectadas por *E. canis* não expressam MHC de classe II (HARRUS et al., 2003). Analisando esses resultados em conjunto, supõe-se que a ausência do MHC de classe II comprometeria a apresentação antigênica às células CD4⁺ e isso favoreceria a permanência do agente no hospedeiro (HARRUS et al.; 2003). Outros mecanismos de resposta imunológica contra a bactéria mostraram que camundongos “knockout” para células CD4⁺ conseguem debelar a infecção por *E. chaffeensis*, porém este processo leva um tempo superior se comparado com a resposta em animais normais, possivelmente porque outras células auxiliariam na eliminação da infecção erliquial (GANTA et al., 2004). Os resultados desse estudo mostram que outras células que não as células CD4⁺ poderiam participar da resposta imunológica contra a *E. canis* e concordam com o estudo em tela.

Interessante que, enquanto as células de defesa reduziam suas populações a partir de seis dias após a inoculação da amostra Jaboticabal, inversamente houve detecção de IL-10 em leucócitos e nas células esplênicas, semelhante ao encontrado por ISMAIL et al. (2006). É sabido que a IL-10 também está relacionada com a inibição da resposta inflamatória e da atividade dos macrófagos (DUMLER et al., 2000; MARTIN; CARSPERSEN; DUMLER, 2001), o que poderia gerar baixos níveis de INF- γ . Resultado semelhante foi observado em nosso estudo, pois somente tardiamente (D30) foi detectada a expressão de IFN- γ , que poderia ter sido causada em resposta a

produção de IL-10, porém estaria nesse momento (D30) exercendo uma função protetora no hospedeiro, como sugerido em outros estudos (MARTIN; CASPERSEN; DUMLER, 2001). Segundo algumas pesquisas, o efeito protetor do IFN- γ seria potencializado pelo TNF- α (FENG & WALKER, 2004).

Aparentemente, existe também uma relação direta entre a quantidade de antígenos e a produção de IFN- γ (NORMAND et al., 2009), principalmente em situações em que seja necessário a eliminação de microorganismos intracelulares (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Contudo, na presente pesquisa essa relação não se estabeleceu, pois apesar de uma grande porção de células esplênicas estarem infectadas com mórulas de *E. canis*, observadas a partir de D18, perdurando até D30, a expressão de IFN- γ detectada foi pontual e proveniente dos leucócitos, não das células esplênicas. Portanto, o estímulo antigênico provocado pela presença de mórulas nos esplenócitos não foi suficiente para estimular a transcrição de IFN- γ . Um mecanismo de evasão foi sugerido por ZANG et al. (2004), que demonstraram que a *E. chaffeensis* ao infectar os macrófagos é capaz de alterar a transcrição de genes como IL-12, IL-15 e IL-18 nestas células, prejudicando a resposta imunológica e favorecendo a permanência do microorganismo nas células do hospedeiro. Tais resultados poderiam sugerir que também a *E. canis* seria capaz de alterar a transcrição de IFN- γ e possivelmente de outros genes, favorecendo sua permanência no hospedeiro, principalmente se a terapia correta não for instituída.

Acredita-se que seja necessário um equilíbrio entre as subpopulações de linfócitos, células apresentadoras de antígeno e produção de citocinas para que o parasita seja eliminado, sem que o hospedeiro tenha lesões em órgãos importantes (ISMAIL et al., 2005; BIRKNER et al., 2008; THIRUMALAPURA et al., 2008). Apesar do efeito protetor contra o parasita atribuído ao IFN- γ , estudos evidenciaram que a resposta imunológica disparada pelos microorganismos da família *Anaplasmataceae* desencadeia nos hospedeiros lesões teciduais (SCORPIO et al., 2006).

Analisando conjuntamente os dados imunofenotípicos e as expressões gênicas das citocinas pesquisadas, pode-se sugerir que a amostra Jaboticabal de *E. canis*

causa uma desregulação do sistema imunológico, semelhante a outras bactérias da família *Anaplasmatidae*. A infecção experimental tem reproduzido a infecção natural de forma muito semelhante. Desta forma, estudos comparativos entre as duas formas de infecção, tratadas e não tratadas, além de outras avaliações acompanhando as fases subclínica e crônica poderiam contribuir com valiosas informações acerca da patogenia da erliquiose canina.

Avaliações que estabeleçam a relação entre a expressão gênica de citocinas e as lesões em órgãos como o baço, medula óssea e linfonodos, poderiam esclarecer melhor os efeitos imunopatológicos decorrentes da erliquiose canina.

7. CONCLUSÃO

- Cães experimentalmente infectados com a amostra Jaboticabal de *Ehrlichia canis* desenvolvem a doença clínica semelhante à doença de ocorrência natural.
- A doença clínica causada pela amostra Jaboticabal induz a uma reação inflamatória mediada por TNF- α com concomitante redução das células CD4⁺, macrófagos e MHC II⁺.
- O tratamento com cloridrato de doxiciclina parece ser eficaz contra a bactéria, restaurando o equilíbrio das subpopulações de células CD4⁺ e macrófagos esplênicos e reduzindo a expressão de TNF- α .
- A pesquisa de mórulas na citologia esplênica é mais eficaz quando comparada a pesquisa no esfregaço sanguíneo de ponta de orelha.
- A trombocitopenia não deve ser o único parâmetro para avaliar a resposta ao tratamento instituído.

8. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**, 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 564 p.
- AGUIAR, D. M. et al., Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 796-802, 2007.
- ALMEIDA, D. E. **Expressão gênica de citocinas e histopatologia da conjuntiva bulbar de cães acometidos por ceratoconjuntivite seca decorrente de cinomose**. 2006. 95f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.
- ALVES, C. F. et al. Expression of INF-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 128, n. 4, p. 349-358, 2009.
- BANETH, G. et al. longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparasion to natural infection. **Vet. Mic.**, 2009, doi:10.1016/j.vetmic.2008.11.22
- BARNEWALL, R. E.; RIKIHISA, Y. Abrogation of gamma interferon-induced inhibition of *Ehrlichia chaffensis* infection in human monocytes with iron-transferrin. **Infect. Immun.**, v. 62, n. 11, p. 4804-4810, 1994.
- BEINEKE, A. et al. Increase of pro-inflammatory cytokine expression in non-demyelinating early cerebral lesions in nervous canine distemper. **Viral Immunol.**, v. 21, n. 4, p. 401-410, 2008
- BITSAKTSIS, C. et al. Production of INF- γ by CD4 T cells is essential for resolving ehrlicuia infection. **The Journal of Immunology**, v. 172, p. 6894-6901, 2004.
- BITSAKTSIS, C. et al. T-cell-independent humoral immunity is sufficient for protection against fatal intracellular ehrlichia infection. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 10, p. 4933-4941, 2007.

BIRKNER, K. et al. The elimination of *Anaplasma phagocytophilum* requires CD4⁺ T cells, but is independent of Th1 cytokines and wide spectrum of effector mechanisms. *Eur. J. Immunol.*, v. 38, p. 3395-3410, 2008.

BRACHELENTE, C. et al. Cutaneous leishmaniasis in naturally infected dogs is associated with a T Helper-2-biased immune response. **Vet. Pathol.**, v. 42, p. 166-175, 2005.

BREATHNACH, R. M. et al. Evaluation of Th1-like, Th2-like and immunomodulatory cytokine mRNA expression in the skin of dogs with immunomodulatory-responsive lymphocytic-plasmacytic pododermatitis. **Vet. Dermatol.**, v. 17, n. 5, p. 313-321, 2006.

BATMAZ, H. et al. Seroprevalence of *Ehrlichia canis* antibodies among dogs in Turkey. **Vet. Rec.**, v. 148, n. 26, p. 665-666, 2001.

BOWDLER, A. J. **The Complete Spleen: Structure, Function, and Clinical Disorders**. Humana, Totowa, p 19-21, 2002.

BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; HANCOCK, S. I. Doxycycline hyclate treatment of experimental canine ehrlichiosis followed by challenge inoculation with two *Ehrlichia canis* strains. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, n. 2, p. 362-368, 1998.

BULLA et al. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Vet. Res.**, v. 35, p. 141-146, 2004.

CADMAN, H. F. et al. Comparison of the dot-blot enzyme linked immunoassay with immunofluorescence for detecting antibodies to *Ehrlichia canis*. **Vet. Rec.**, v. 135, n. 15, p. 362, 1994.

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

CASTRO, M. B. **Caracterização imunoistoquímica das células mononucleares em lesões observadas na infecção aguda experimental em cães por *Ehrlichia canis***

2004. 76 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2004.

CHAMIZO, C. et al. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v. 103, p. 67-75, 2005.

CHAMIZO, C. et al. Semi-quantitative analysis of multiple cytokines in canine peripheral blood mononuclear cells by a single tube RT-PCR. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v. 83, p. 191-202, 2001.

CHOI, E. W. et al. Hormonal change and cytokine mRNA expression in Peripherals blood mononuclear cells during the development of canine autoimmune thyroiditis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 146, n. 1, p. 101-108, 2006.

CHOI, E. W. et al. Differential innate immune cell activation and proinflammatory response in *Anaplasma phagocytophilum* infection. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 6, p. 3124-3130, 2007.

CODNER, E. C., FARRIS-SMITH, L. L. Characterization of the subclinical phase of ehrlichiosis in dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 189, n.1, p. 47-49. 1986.

CODNER, E. C., MASLIN, W. R. Investigation of renal protein loss in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. **Am. J. Vet. Res.**, v. 53, n. 3, p. 295-299, 1992.

CORDEIRO, F.F.; TINUCCI-COSTA, M.; CAMACHO, A.A. Estudo da ocorrência da erliquiose canina na região nordeste do Estado de São Paulo – Brasil. **Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias**, XV, Campo Grande – MS, p.143, 1996.

COSTA, J.O. et al. *Ehrlichia canis* infection in dog in Belo Horizonte – Brazil. **Arq. Esc. Vet. UFMG**, v. 25, n. 2, p. 199-200, 1973.

COSTA Jr., L.M. et al. Sero-prevalence and risk indicators for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil. **The Vet. J.**, v. 174, p. 673-676, 2007.

DAGNONE, A. S. et al. Ehrlichiosis in anemia, thrombocytopenic, or tickinfested dogs from a hospital population in South Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.117, p. 285-290, 2003.

DAGNONE, A. S.; MORAIS, H. S. A.; VIDOTTO, O. Erliquiose nos animais e no homem. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n. 2, p. 115-248, 2001.

DAGNONE, A. S. **Caracterização molecular de espécies da família Anaplasmataceae em leucócitos e plaquetas de cães de Jaboticabal e Campo Grande**. 2006. 141f. Tese (Doutorado em Patologia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

DANTAS-TORRES, F. et al. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari:Ixodidae), the Brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Revista Brasileira da Sociedade de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 64-67, 2006.

DAVIDSON, R. N., WALL, R. A. Prevention and management of infections in patients without a spleen. **Clinical Microbiology Infection**, v. 7, p. 657-660, 2001.

DINIZ, P. P. V. P. et al. Surveillance for zoonotic vector-borne infections using sick dogs from southeastern Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.7, n.4, p. 1-9, 2007.

DONATIEN, A.; LESTOQUARD, F. Existence en Algérie d'une Rickettsia du chien. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, v. 28, p. 418-419, 1935.

DUMLER, J. S. et al. Serum cytokine responses during acute human granulocytic ehrlichiosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 7, n. 1, p. 6-8, 2000.

DUMLER, J. S. et al. 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*. **Int. J. Syst. Evolut. Microbiol.**, v. 51, p. 2145-2165, 2001.

DUMLER, J. S. et al. Human granulocytic anaplasmosis and macrophage activation. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, p. 199-204, 2007.

EDDLESTONE et al. Doxycycline clearance of experimentally induced chronic *Ehrlichia canis* infection in dogs. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 21, p. 1237-1242, 2007.

ELIAS, E. Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusion bodies or morulae of *E. canis*. **J. Small Anim. Pract.**, v. 33, n. 11, p.540-543, 1991.

FARIA, J. L. M.; RIBEIRO, S. C. A.; TINUCCI-COSTA, M. Estudo da sintomatologia e alterações do hemograma e urinálise em cães com ehrlichiose na fase aguda. In: Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais, 24., 2003, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Congress, 2003. 1 CD-ROM.

FARIA, J. L. M. et al. *Ehrlichia canis* morulae and DNA detection in whole blood and spleen aspiration samples.. **Rev.Bras. Parasitol. Vet.**, **2010**. (no prelo) FEITOSA, F. L. F. Semiologia Veterinária – a arte do diagnóstico. São Paulo: Roca, 2004. 807p.

FENG, H.; WALKER, D. H. Mechanisms of immunity to *Ehrlichia muris*: a model of monocytotropic ehrlichiosis. **Infect. Immun.** v. 72, n. 2, p. 966-971, 2004.

FOLEY, J. E. et al. A simian model of human granulocytic ehrlichiosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 60, n. 6, p. 988-994, 1999.

FRANK, J. R.; BREITSCHWERDT, E. B. A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 13, n. 3, p. 194-201, 1999.

FURUTA, P. I. et al. Comparison between a soluble antigen-based ELISA and IFAT in detecting antibodies against *Babesia canis* in dogs. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 18, n. 3, p. 41-45, 2009.

GANTA, R. R. et al. Persistent *Ehrlichia chaffeensis* infection occurs in the absence of functional major histocompatibility complex class II genes. **Infection and Immunity**, v. 70. n. 1, p. 380-388, 2002.

GANTA, R. R. et al. Delayed clearance of *Ehrlichia chaffeensis* infection in CD4⁺ T-cell knockout mice. **Infection and Immunity**, v. 72. n. 1, p. 159-167, 2004.

GRAB, D. J. et al. *Anaplasma phagocytophilum*-*Borrelia burgdorferi* coinfection enhances chemokine, cytokine, and matrix metalloprotease expression by human brain microvascular endothelial cells. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 11, p. 1420-1424, 2007.

GRÖNE, A. et al. Cytokine mRNA expression in whole blood samples from dogs with natural canine distemper virus infection. **Vet. Immunol. Immunopathol.** V. 65, p. 11-27, 1998.

HARA et al. Excessive production of tumor necrosis factor-alpha by bone marrow T lymphocytes is essential in causing bone marrow failure in patients with aplastic anemia. **Eur. J. Haematol.**, v. 73, p. 10-16, 2004.

HARRUS, S. et al. Kinetics of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 51, p. 13-20, 1996.

HARRUS, S., BARK, H., WANER, T.; Canine monocytic ehrlichiosis: an update. **Parasitol.**, v. 19, n. 4, p. 431-444, 1997.

HARRUS, S. et al. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n. 1, p. 73-76, 1998a.

HARRUS, S. et al. Therapeutic effect of doxycycline in experimental subclinical canine monocytic ehrlichiosis: evaluation of a 6-week course. **J. Clin. Microbiol.**, v.36, n.7, p. 2140-2412, 1998b.

HARRUS, S. et al. Investigation of splenic functions in canine monocytic ehrlichiosis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 62, n.1, p. 15-27, 1998c.

HARRUS, S. 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*. **Vet. Microbiol.**, v. 83, p. 343-349, 2001.

HARRUS, S. et al. Down-regulation of MHC class II receptors of DH82 cells, following infection with *Ehrlichia canis*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 96, p. 239-243, 2003.

HARRUS, S. et al. Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment of experimental *Ehrlichia canis* infection. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 11, p. 4488-4490, 2004.

HEGEMANN, N. et al. Cytokine profile in canine immune-mediated polyarthritis and osteoarthritis. **Vet. Comp. Orthop. Traumatol.**, v. 18, n. 2, p. 67-72, 2005.

HASEGAWA, M. Y. **Dinâmica da infecção experimental de cães por *Ehrlichia canis*: aspectos clínicos, laboratoriais e resposta imune celular e humoral**. 2005. 134 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo. 2005.

HEEB, et al. Large granular lymphocytosis, lymphocyte subset inversion, thrombocytopenia, dysproteinemia, and positive *Ehrlichia* serology in a dog. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v. 39, p. 379-384, 2003.

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

HSU, S. M.; RAINE, L.; FANGER, H. A. a comparative study of the peroxidase-antiperoxidases method and an avidin biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 75, p. 734-738, 1981.

IQBAL, Z.; RIKIHISA, Y. Application of the polymerase chain reaction for the detection of *Ehrlichia canis* in tissues of dogs. **Vet. Microbiol.**, v. 42, n. 4, p. 281-7, 1994a.

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

IQBAL, Z.; et al. Comparasion of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, n. 7, p. 1658-62, 1994.

ISMAIL, N. et al. Overproduction of TNF- α by CD8⁺ type 1 cells and down-regulation of INF- γ production by CD4⁺ Th1 cells contribute to toxic shock-like syndrome in an animal model of fatal monocytotropic ehrlichiosis. **The Journal of Immunology**, v. 172, p. 1786-1800, 2004.

ISMAIL, N. et al. Balancing protective immunity and immunopathology. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1063, p. 383-394, 2005.

ISMAIL, N. et al. Role of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and Interleukin-10 in the pathogenesis of severe murine monocytotropic ehrlichiosis: increased resistance of TNF receptor p55- and p75-deficient mice to fatal ehrlichial infection. **Infect. Immun.** v. 74, p. 1846-1856, 2006.

KAKOMA, C. A. et al. Platelet migration inhibition as an indicator of immunologically mediated target cell injury in canine ehrlichiosis. **Infect. Immun.**, v. 20, n. 1, p. 242-247, 1978.

KAVINSKI, L. C. et al. Ocorrência de um caso de ehrlichiose canina em Curitiba-PR. **Rev. Set. Ciênc. Agr.**, v. 10, n. 1-2, p.217-219, 1988.

KEYSARY, A. et al. The first isolation, in vitro propagation, and genetic characterization of *Ehrlichia canis* in Israel. **Vet. Parasitol.**, v. 62, p. 331-340, 1996.

KIM, H. Y.; RIKIHISA, Y. Roles of p38 mitogen-activated protein kinase, NF-kappaB, and protein kinase C in proinflammatory cytokine mRNA expression by human peripheral blood leukocytes, monocytes, and neutrophils in response to *Anaplasma phagocytophila*. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 8, p. 4132-4141, 2002.

LAGE, R. S. et al. Analysis of the cytokine profile in Spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 115, n. 1-2, p. 135-145, 2006.

LEWIS, G. E. The brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* and the dog as experimental hosts of *Ehrlichia canis*. **Am. J. Vet. Res.**, v. 32, n. 12, p. 1953-1955, 1977.

MACHADO, R. Z. Erliquiose canina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 52-57, 2004. Suplemento 1.

MAEDA, K. et al. Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia. **New Engl. J. Med.**, v.316, n.14, p.1987.

MANNA, L. et al. Leishmania DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 142, n. 3-4, p. 271-280, 2006.

MARKUS, S.; FAILING, K.; BAUMGÄRTNER, W. Increased expression of pro-inflammatory cytokines and lack of up-regulation of anti-inflammatory cytokines in early distemper CNS lesions. **J. Neuroimmunol.**, v. 125, n. 1-2, p. 30-41, 2002.

MARTIN, M. E. CARSPERSEN, K. DUMLER, J. S. Immunopathology and ehrlichial propagation are regulated by interferon- γ and interleukin-10 in a murine model of human granulocytic ehrlichiosis. **Am. J. Pathol.**, v. 158, n. 5, p. 1881-1888, 2001.

McBRIDE, J. W. et al. Molecular Cloning of the Gene for a Conserved Major Immunoreactive 28-Kilodalton Protein of *Ehrlichia canis*: a Potential Serodiagnostic Antigen. **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, v. 6, p. 392-399, 1999.

MYLONAKIS, M. E. et al. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. **Vet. Microbiol.**, v. 91, p. 197-204, 2003.

MYLONAKIS, M. E. et al. Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): A retrospective study of 19 natural cases. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v. 40, p. 174-184, 2004.

MUNHOZ, T.D.; OKADA, Y.G.; TINUCCI-COSTA, M. Incidência de ocorrência da erliquiose canina na Região Nordeste do Estado de São Paulo. In: Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo, 11^o, 2003, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Congress, 2003. 1 CD-ROM.

MURPHY, G.L. et al. molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. **Vet. Parasitol.**, v. 79, p. 325-39, 1998.

NAKAGHI, A. C. H. et al. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. **Ciência Rural**. v. 38, n. 3, p.766-770, 2008.

NEER, T. M. et al. Efficacy of enrofloxacin for the treatment of experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 13, p. 501-504, 1999.

NEER, T. M. et al. Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 16, p. 309-315, 2002.

NORMAND, T. et al. Gamma IFN *Ehrlichia canis*-specific cell responses. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. 2, p. 70-71, 2009.

NUTTALL, T. J. et al. T-helper 1, T-helper 2 and immunosuppressive cytokines in canine atopic dermatitis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 87, n. 3-4, p. 379-384, 2002.

OLIVEIRA, D. et al. Anti-*Ehrlichia canis* antibodies detection by "Dot-ELISA" in naturally infected dogs. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 9, n. 1, p. 1-5, 2000.

ORIÁ, A.P. **Correlação entre uveítes, achados de patologia clínica, sorológicos (Reação de Imunofluorescência Indireta e Dot-blot Elisa) e de anatomopatologia do bulbo do olho em animais da espécie canina, natural e experimentalmente infectados pela *Ehrlichia canis*.** 2001. 79 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

PANCIEIRA, R. J.; EWING, S. A.; CONFER, A. W. Ocular histopathology of ehrlichial infections in the dog. **Vet. Pathol.**, v. 38, p. 43-46, 2001.

PEREZ, M.; RIKIHISA, Y.; WEN, B. *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 9, p. 2133-2139, 1996.

PERILLE, A. L.; MATUS, R. E. Canine ehrlichiosis in six dogs with persistently increased antibody titers. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 5, p. 195-198, 1991.

PETERS, D. et al. Quantification of mRNA encoding cytokines and chemokines in nasal biopsies from dogs with sino-nasal aspergilosis. **Vet. Microbiol.**, v. 114, n. 3-4, p. 318-326, 2006.

PETERS, D. et al. Distinct tissue cytokine and chemokine mRNA expression in canine sino-nasal aspergilosis and idiopathic lymphoplasmacytic rhinitis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 117, n. 1-2, p. 95-105, 2007.

RABINSTEIN, A. et al. Recurrent and prolonged fever in asplenic patients with human granulocytic ehrlichiosis. **Q.J. Medicine**. v.93, p.198-201, 2000.

RIKIHISA, Y. *Ehrlichia* subversion of host innate responses. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 9, n. 1, p. 95-101, 2006.

RINKLER, C. et al. Mechanisms of Immunological Control of *Anaplasma phagocytophilum* in mice. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1063, p. 411-412, 2005.

RISTIC, M. et al. Serological diagnosis of tropical canine pancytopenia by indirect immunofluorescence. **Infect. Immun.**, v. 6, n. 3, p. 226-231, 1972.

SAMISH, M. O. M.; WANER, T.; HARRUS. S. Attenuation of *Ehrlichia canis* by multiple passages in two different cultures. **Clinical Microbiology Infection**, v.15, n.2, p 74-75, 2009.

SANCHEZ-ROBERT, E. et al. Longitudinal analysis of cytokine gene expression and parasite load in PBMC in *Leishmania infantum* experimentally infected dogs. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 125, n. 1-2, p. 168-175, 2008.

SANTOS-GOMES, G. M. et al. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 88, p. 21-30, 2002.

SCORPIO, D. G. et al. Innate immune tissue injury and murine HGA. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1063, p. 425-428, 2005.

SCORPIO, D. G. et al. Innate immune response to *Anaplasma phagocytophilum* contributes to hepatic injury. **Clin. Vaccine Immunol.**, v.13, n. 7, p. 806-809, 2006.

SHIPOV, A. et al. Prognostic indicators for canine monocytic ehrlichiosis. **Vet. Parasitol.**, v. 153, n. 1-2, p. 131-138, 2008..

SILVA, V. L. D. **Avaliação das alterações hematológicas e dos aspectos citológicos e histopatológicos da medula óssea na erliquiose canina aguda: estudo experimental.** 2001. 102f. Dissertação (Mestrado em Patologia Veterinária Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

STILES, J. Canine rickettsial infections. **Vet. Clin. North Am.**, v. 30, n.5, p.1135-1149, 2000.

TAJIMA, T.; RIKIHISA, Y. Cytokine response in dogs infected with *Ehrlichia canis* Oklahoma strain. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, n. 1063, p. 429-432, 2005.

THIRUMALAPURA, N. R. et al. Protective heterologous immunity against fatal ehrlichiosis and lack of protection following homologous challenge. **Infect. Immun.**, v. 76, n. 5, p. 1920-1930, 2008.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptative immunity. **Nat. Rev. Immunol.** v. 3, p.133-146, 2003.

TROY, G. C. et al. Canine ehrlichiosis: a retrospective study of 30 naturally occurring cases. **J. Am Anim. Hosp. Assoc.**, v. 16, p. 181-187, 1980.

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

UENO, T. E. H. et al. *Ehrlichia canis* em cães atendidos em Hospital Veterinário de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 18, n. 3, p. 57-61, 2009.

UNVER, A.; HUANG, H.; RIKIHISA, Y. Cytokine gene expression by peripheral blood leukocytes in dogs experimentally infected with a new virulent strain of *Ehrlichia canis*. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, n. 1078, p. 482-486, 2006.

UNVERA, A. et al. An acute severe ehrlichiosis in a dog experimentally infected with a new virulent strain of *Ehrlichia canis*. **Clin Microbiol. Infect.**, v. 15, n. 2, p. 59-61, 2009.

WANER, T. et al. Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. **Vet. Immunol. Immunopatol.**, v. 48, p. 177-182, 1995.

WANER, T. et al. Detection of ehrlichial antigen in plasma of beagle dogs with experimental acute *Ehrlichia canis* infection. **Vet. Parasitol.**, v. 63, p. 331-335, 1996.

WANER, T. et al. Characterization of subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 69, p. 307-317, 1997.

- WANER, T. et al. Canine Monocytic Ehrlichiosis – an overview. **Isr. J. Vet. Med.**, v. 54, n. 4, p. 103-107, 1999.
- WANER, T. et al. Detection of platelet-bound antibodies in beagle dogs after artificial infection with *Ehrlichia canis*. **Vet. Immunol. Immunopatol.**, v. 77, p. 145-150, 2000.
- WANER, T.; STRENGER, C.; KEYSARY, A. Comparison of a clinic-based ELISA test kit immunofluorescence test for the assay of *Ehrlichia canis* antibodies in dogs. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 12, p. 240-244, 2000.
- 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*. **Vet. Parasitol.**, v. 95, p. 1-5, 2001.
- WELLMAN, M.L. et al. A macrophage-monocyte cell line from a dog with malignant histiocytosis. **In Vitro Cell Dev Biol.**, v.24, p.223-229, 1988.
- WEN, B. et al. Comparison of nested PCR with Immunofluorescent-Antibody Assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n. 7, p. 1852-1855, 1997.
- WINSLOW, G. M.; BITSAKTSIS, C. Immunity to the ehrlichiae: new tools and recent developments. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 18, p. 217-221, 2005.
- WINSLOW, G. M., et al. Susceptibility and resistance to monocytic ehrlichiosis in the mouse. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, n. 1063, p. 395-402, 2005.
- WOODY, B. J.; HOSKINS, J. D. Ehrlichial diseases of dog. **Vet. Clin. North Am.**, v.21, n.1, p.75-98, 1991.
- YAGER, E. et al. Essential role for humoral immunity during ehrlichia infection in immunocompetent mice. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 12, p. 8009-8016, 2005.
- ZHANG et al. Survival strategy of obligate intracellular *Ehrlichia chaffeensis*: Novel modulation of immune response and host cell cycles. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 1, p. 498-507, 2004.

ZHANG et al. Genetic and antigenic diversities of major immunoreactive proteins in globally distributed *Ehrlichia canis* strains. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 15, n. 7, p. 1080-1088, 2008.

ANEXOS

Anexo A - Fórmulas empregadas

Rosenfeld modificado

1000 mL de metanol

0,93g de GIEMSA

0,53g de May-Grünwald

0,50g de Wright

Solução tamponada de fosfato PBS 0,01M-pH 7,2-7,6

16,36g de NaCl PA

2,1g de Fosfato de sódio dibásico anidro PA

0,6g de Fosfato de sódio monobásico di-hidratado PA

Água destilada q.s.p. 2000 mL

Anexo B – protocolo de tratamento com DNase

30 µL da amostra

3 µL de tampão RQ1 RNase-free DNase (Promega® M6101)

1 µL de RQ1 RNase-free DNase (Promega® M6101)

1 µL de RNase out (Invitrogen® cat. n° 10777019)

Incubar a 37° C por 15 minutos

Acrescentar:

65 µL de H₂O DEPC

100 µL de clorofórmio

Vórtex e incubar por 1 minuto

Centrifugar - 12000xg a 4°C por 15 minutos

Retirar o sobrenadante

100 µL de clorofórmio

Centrifugar - 12000xg a 4°C por 15 minutos

Retirar o sobrenadante

Acrescentar 2 volumes de etanol absoluto

Manter a -80°C durante 1 hora

Centrifugar - 12000xg a 4°C por 15 minutos

Descartar o sobrenadante

500mL de etanol 75%

Centrifugar - 7500xg a 4°C por 5 minutos

Secar e ressuspender em 9mL de H₂O DEPC

Anexo C. Valores hematológicos de referência* para a espécie canina.

Eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	5,0 – 8,5
Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	6,0 – 17,0
Hemoglobina (g/dL)	12 – 18
Hematócrito (%)	37 – 55
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	200 – 500
Basófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0 – 0
Eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0,12 – 1,8
Neutrófilos bastonetes ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0 – 0,5
Neutrófilos segmentados ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	3,6 – 13,8
Linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0,72 – 5,4
Monócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0,18 – 1,8

*Fonte: JAIN, N.C. Essentials of Veterinary Hematology. 1. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417 p.