

Irma Ximena Barbosa Sanchez

**APOPTOSE NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM *Ehrlichia canis* EM CÃES
DOMÉSTICOS**

Belo Horizonte

Faculdade de Medicina

Universidade Federal de Minas Gerais

Junho de 2013

Faculdade de Medicina

Tese de doutorado

**APOPTOSE NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM *Ehrlichia canis* EM CÃES
DOMÉSTICOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Patologia.

Orientador:

Prof. Dr. Anilton César Vasconcelos

Co-orientadora:

Profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado

Belo Horizonte

Junho de 2013



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409-9640



UFMG

ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO de IRMA XIMENA BARBOSA SÁNCHEZ, nº de registro 2009664595. Às nove horas do dia 07 de junho de dois mil e treze, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de defesa de tese, indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG, para julgar o trabalho intitulado: "APOPTOSE NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM *Ehrlichia canis* EM CÃES DOMÉSTICOS", requisito final para a obtenção do grau de doutor em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG - Área de Concentração em Patologia Geral. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Anilton Cesar Vasconcelos, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final passou a palavra à candidata para apresentação do seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Anilton Cesar Vasconcelos/Orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Profa. Maria Norma Melo	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Profa. Milene Alvarenga Rachid	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>
Profa. Marlene Isabel Vargas Viloria	Instituição: UFV	Indicação: <u>Aprovada</u>
Prof. Joaquin Hernan Patarroyo Salcedo	Instituição: UFV	Indicação: <u>Aprovado</u>

Pelas indicações, a candidata foi considerada APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 07 de junho de 2013.

Prof. Anilton Cesar Vasconcelos _____
 Profa. Maria Norma Melo _____
 Profa. Milene Alvarenga Rachid _____
 Profa. Marlene Isabel Vargas Viloria _____
 Prof. Joaquin Hernan Patarroyo Salcedo _____
 Profa. Rosa Maria Esteves Arantes (Coordenadora) _____

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

Profa. Rosa Maria Esteves Arantes
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Patologia
Faculdade de Medicina / UFMG

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Apoptose do Departamento de Patologia Geral, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, tendo a colaboração dos Laboratórios de Imunoparasitologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Departamento de Patologia da Universidade Estadual Paulista “Julho de Mesquita Filho” Campus de Jaboticabal e do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Contou com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Universidad del Tolima da Colômbia.

Dedico este trabalho a *Deus*, a minha mãe *Beatriz*, minha tia *Martha Paulina* e meus irmãos, *Beatriz Eugenia*, *Tatiana* e *Luis Alberto*.

AGRADECIMENTOS

À Deus, nosso senhor, pela sua maravilhosa presença, sempre na minha vida nos momentos felizes e tristes, nos fáceis e nos difíceis, sempre preenchendo minha vida de fortaleza e amor, me levando pela mão para o caminho que devo seguir.

A minha mãe Beatriz, pela vida, o exemplo, o carinho e o apoio incondicional; pelas suas amorosas orações, por me estimular a ser cada dia uma pessoa melhor e me ensinar a seguir em frente em todos os momentos da vida, a mãe com quem posso sempre contar! Obrigada, Mami!

A minha tia Martha, pelo carinho e apoio, pela alegria que sempre transmite em todo momento e em todo lugar. Obrigada, minha tia favorita!!

Aos meus Irmãos Beatriz, Tatiana e Luis Alberto, mesmo à distância, me dando sua presença constante, sua felicidade, boas energias, carinho, conselhos e apoio incondicional. Muito obrigada!

Ao meu Orientador, Prof. Anilton, por ter me acolhido sem me conhecer, neste país, no seu laboratório, não só como aluna, mas como colega e amiga. Muito obrigada por todos seus ensinamentos, pelo apoio e o exemplo profissional, e pela confiança depositada em mim.

A minha co-orientadora, Prof^a. Rosângela, meu imenso agradecimento, por ter me recebido no Laboratório de Imunoparasitologia da UNESP, por disponibilizar a amostra de *Ehrlichia canis*, os animais e toda a estrutura para fazer possível a execução da primeira parte desse projeto, e igualmente pela oportunidade de aprender as diferentes técnicas de diagnóstico empregadas neste trabalho. Muito obrigada!

Ao meu namorado, Hélio, pela paciência, pelos conselhos, as correções da língua portuguesa, pelos momentos de descontração e principalmente pelo seu grande apoio e amor incondicional. Obrigada por fazer a minha vida mais feliz!

A minha amiga e colega Núbia, por sua grande e valiosa amizade, realmente amiga de todas as horas, por ser uma pessoa extremamente agradável de conviver. As palavras não são suficientes para te mostrar o quão agradecida sou a você, obrigada por tudo!

A minha amiga Teresa, por sempre estar perto de mim, pelo companheirismo e, sem dúvida, pela grande amizade que nos une há vários anos, obrigada pelos conselhos, por ser o apoio nos momentos difíceis, nos momentos felizes e por compartilhar a fé em Deus comigo. Obrigada Tere!

Aos meus amigos colombianos Ana Maria, Omar, Jessica, Dunia, Helenita, Andrés e Ricardo. Agradeço pela amizade, apoio e conselhos, além dos inúmeros momentos de descontração durante esse período, que sem dúvida foram essenciais para a conclusão desse trabalho.

As minhas amigas Louisa e Natassia, pelo convívio, carinho e apoio durante o tempo que moramos juntas, de onde nasceu uma bonita amizade, muito obrigada!

A Dra. Carla, de Jaboticabal, obrigada pela amizade sincera e desinteressada, pela sua disposição de tempo, pelos ensinamentos em técnicas de biologia molecular e sorologia, as quais, sem dúvida, foram imprescindíveis para a padronização e obtenção dos resultados.

Ao Daniel, pela gentileza, paciência e disponibilização do tempo para a padronização e execução da técnica de RT-PCR, pelo convívio agradável e por compartilhar o seu conhecimento de biologia molecular comigo. Muito Obrigada!

Ao Prof. Ricardo Fujiwara, por disponibilizar seu laboratório para a realização das técnicas moleculares de RT-PCR, e permitir que Daniel me ajudasse no desenvolvimento dessa parte do projeto.

Aos Colegas do Laboratório de Apoptose: Núbia, Teresa, Juliana, Luciana, Ana Cristina, Ana Paula, Bárbara, Bruno, Tatiane, Marcus Vinicius e Fabricio, pelo carinho e pelos momentos compartilhados juntos.

Aos Colegas do Laboratório de Imunoparasitologia de Jaboticabal: Carla, Tatiane, Marcia, Mayra, Marcos e Munhoz, pelos ensinamentos, o apoio, ajuda no desenvolvimento dos experimentos e o convívio agradável no tempo que estive lá.

Aos Colegas do Departamento de Patologia: Karine, Carolina, Cristina, Conrado, Fabricio e Luana, obrigada pela companhia!

Às Professoras Milene e Tatiane, pelo companheirismo, pelo imenso carinho e amizade, muito obrigada!

Aos Professores, Coordenadores, e Secretárias do Programa de Pós-Graduação em Patologia Geral da Faculdade de Medicina da UFMG.

À Soraia e Olinda, Técnicas da Patologia, pelo tempo, paciência, ensinamentos das técnicas histopatológicas e também pela amizade que me ofereceram durante minha estada em Belo Horizonte.

Ao Eugenio, técnico de Laboratório da UNESP em Jaboticabal, por ser sempre gentil e oportuno no processamento e entrega dos resultados da Patologia Clínica.

Ao Danilo, técnico da Zootecnia na UFMG, pela ajuda no processamento dos dados e pela paciência com que me ensinou a analisar e executar a estatística deste trabalho. Obrigada!

Ao CNPq, CAPES, Universidad Del Tolima e FAPEMIG, pelo suporte financeiro para o desenvolvimento do projeto, e pela bolsa de estudos que me permitiu cursar o doutorado no Brasil.

*“A dor pode nos fazer lembrar que estamos vivos,
mas o amor nos faz lembrar por quê”*

RystanOwain Hughes

SUMÁRIO

	LISTA DE TABELAS.....	xii
	LISTA DE FIGURAS.....	xiii
	LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
	RESUMO.....	xviii
	ABSTRACT.....	xx
1	INTRODUÇÃO.....	22
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
3	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
4	OBJETIVOS.....	69

CAPITULO I

	DIAGNÓSTICO DA EHRLIQUIOSE CANINA EXPERIMENTAL NA FASE AGUDA DA DOENÇA	73
1	ABSTRACT.....	73
2	INTRODUÇÃO.....	74
3	MATERIAL E METODOS.....	75
4	RESULTADOS.....	76
5	DISCUSSÃO.....	80
6	CONCLUSÃO.....	80
7	AGRADECIMENTOS.....	80
8	REFERÊNCIAS.....	80

CAPITULO II

	APOPTOSE NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE CÃES DOMÉSTICOS COM <i>EHRlichia canis</i>	84
1	RESUMO.....	84
2	ABSTRACT.....	86
3	INTRODUÇÃO.....	87
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	88
4.1	<i>Animais Experimentais</i>	88
4.2	<i>Coleção de amostras sanguíneas</i>	89
4.3	<i>Amostras de tecidos</i>	90
4.4	<i>Avaliações de apoptose</i>	90
4.5	<i>Marcação in situ para detecção de apoptose pela reação de TUNEL</i>	90
4.6	<i>Reação Imunohistoquímica com o anticorpo anti-Bax</i>	91
4.7	<i>Reação Imunohistoquímica com o anticorpo anti-Bcl-2</i>	91
4.8	<i>Nested-PCR</i>	92
4.9	<i>Análise estatística dos resultados obtidos</i>	92
5	RESULTADOS.....	93

5.1	<i>Técnica de TUNEL e imunohistoquímica para a detecção de moléculas Bcl-2 e Bax</i>	93
5.2	<i>Índices apoptóticos</i>	94
5.3	<i>Técnicas imunohistoquímicas</i>	96
6	DISCUSSÃO.....	98
7	AGRADECIMENTOS.....	100
8	COMITÉ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA.....	100
9	REFERÊNCIAS.....	100

CAPITULO III

	GENE EXPRESSION OF BAX, BCL-2, CASPASES 3, 8 AND 9 IN SPLEEN, LYMPH NODE, BONE MARROW, LIVER AND KIDNEYS FROM DOGS EXPERIMENTALLY INFECTED WITH <i>EHRlichia CANIS</i>	109
	ABSTRACT.....	110
1	INTRODUCTION.....	110
2	MATERIALS AND METHODS.....	112
2.1	<i>Sample of Ehrlichia canis</i>	112
2.2	<i>Experimental Animals</i>	113
2.3	<i>Collection of blood samples</i>	113
2.4	<i>Nested-PCR</i>	114
2.5	<i>Tissue samples collection, extraction of total RNA and synthesis of first strand cDNAs</i>	114
2.6	<i>Primers for gene evaluation</i>	115
2.7	<i>Real-Time PCR</i>	115
2.8	<i>Statistical analysis</i>	116
3	RESULTS.....	116
4	DISCUSSION.....	117
6	CONFLICT OF INTEREST STATEMENT.....	121
7	ACKNOWLEDGMENTS.....	121
8	REFERENCES.....	121
	CONCLUSÕES GERAIS.....	128
	PERSPECTIVAS.....	129
	ANEXOS.....	130

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

Tabela 1	Contagem de leucócitos (WBC) ($\times 10^3/\mu\text{l}^{-1}$) por tratamento e tempo	76
Tabela 2	Contagem de hemácias ($\times 10^6/\text{dl}$) por tratamento e tempo....	77
Tabela 3	Hematócrito (%) por tratamento e tempo.....	77
Tabela 4	Contagem de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{l}$) por tratamento e tempo....	78

CAPITULO III

Table 1	Sequences of primers used for quantification of mRNA expression for apoptosis related target genes, and housekeeping gene GAPDH and β -Actin, by real-time PCR. F: forward primer, R: reverse primer.....	126
---------	---	-----

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1	Representação esquemática do ciclo de transmissão de <i>Ehrlichia canis</i>	30
Figura 2	Representação esquemática de mudanças morfológicas da célula na apoptose.....	38
Figura 3	Fotomicrografia de cultura de Linfócitos T SBm7462-reativos.....	40
Figura 4	Representação esquemática da via apoptótica extrínseca através de receptor Fas.....	44
Figura 5	Representação esquemática da via apoptótica extrínseca através de receptor TNF.....	45
Figura 6	Representação esquemática da via intrínseca da apoptose.....	47

CAPITULO I

Figura 1	Diagnóstico de <i>E. canis</i> por RIFI e nPCR.....	79
----------	---	----

CAPITULO II

Figura 1	Técnica de TUNEL.....	95
----------	-----------------------	----

Figura 2	Imunohistoquímica para detecção de Bcl-2 (A e B) e Bax (C e D).....	97
----------	---	----

CAPITULO III

Figure 1	Expression of Bax, Bcl-2, Caspase-3, Caspase-8 and Caspase-9 messenger RNA in spleen, lymph node, bone marrow, liver and kidney from dogs experimentally infected with <i>Ehrlichia canis</i>	127
----------	---	-----

ANEXOS

Figura 1	Curva de dissociação referente aos iniciadores GAPDH, β -Actina, Bax, Bcl-2, Casp3, Casp8, Casp 9.....	132
----------	--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIF	Fator indutor de apoptose
APAF-1	Fator adaptador ativador de protease-apoptótica
APO-1	Antígeno da apoptose 1, receptor de morte CD95 (cluster of differentiation 95)Fas.
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i> , proteína pró apoptotica da família Bcl-2
Bak	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer pro-apoptotic member of the Bcl-2 gene family</i> (membro pró-apoptótico da família dos genes Bcl-2)
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma protein anti-apoptotic</i> (proteína antiapoptotica do Linfoma de células B)
Bcl _{XL}	<i>B-cell lymphoma-extra large</i> (Bcl-xl) Molécula transmembranosa da mitocôndria.
Bok	Proteína codificada por genes da família Bcl-2 (<i>Bcl-2 related ovarian killer</i>)
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CETEA	Comité de Ética e Experimentação Animal
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DD	Domínio de Morte
DED	Domínio Executor de morte
DIABLO	Sinônimo de SMAC é uma proteína mitocondrial que potencializa algumas formas de apoptose
DISC	Complexo sinalizador indutor de morte
<i>E. canis</i>	<i>Ehrlichia canis</i>
EDTA	(do inglês <i>Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid</i>) Ácido etilenodiamino tetra-acético
FAAD	Domínio de morte associado ao Fas
Fas	CD95/Apo1, proteína de transmembranosa tipo II, iniciada pela família do Fator de Necrose Tumoral (TNF)
FasL	<i>apoptosis antigen 1, death receptor CD95 (cluster of differentiation 95)</i>

FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FCAV	Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
FLICE	<i>DED of FADD-like ICE</i>
G I	Grupo Inoculado
G II	Grupo controle
HtrA2	<i>Serine protease HTRA2</i> , Precursor mitocondrial. Exige temperatura elevada de proteína A2
IA	Índice Apoptótico
IAPs	Proteínas inibidoras de apoptose
IFA	Técnica de Imunofluorescência
IL-2	Interleucina2
INF- γ	<i>Interferongamma</i>
MACH	Sinônimo de FLICE, Caspase8
MCL-1	Sequência 1de células daLeucemia Mielóide
MORT-1	<i>AdaptorCitosolicocritico para asinalização com CD95</i>
NF- κ B	Fator Nuclear Kappa β
NOXA	<i>Membro pro-apoptotico da familiaBcl-2</i>
nPCR	<i>Nested PCR</i>
OMM	Permeabilidade de membrana externa mitocondrial
PBMC	Células Mononucleares de Sangue Periférico
PBS	<i>PhosphateBuffered Saline</i> (solução salina tamponada)
PI	Pós- inoculação
PUMA	<i>p53 UpregulatedModulator of Apoptosis</i>
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativo
RIFI	Reação de Imunofluorescência indireta
rRNA	Ácido ribonucléicoribossômico
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SMAC	Segundo ativador de caspase derivado da mitocôndria
SRD	Sem Raça Definida
TCR	Receptor de células T

TH-1	Células T auxiliaadoras tipo 1
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TNFR1	Receptor 1 do Fator de Necrose Tumoral
TRADD	Receptor tipo 1 do Fator de Necrose Tumoral associado ao domínio de morte
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyltransferaseUTP nick end labeling</i>

RESUMO

A Erliquiose monocítica canina é uma zoonose causada pela *Ehrlichia canis*, bactéria Gram negativa de distribuição mundial. Alguns cães com erliquiose se tornam portadores assintomáticos enquanto outros desenvolvem uma doença aguda com morte rápida. A apoptose pode ser importante na eliminação de patógenos intracelulares, podendo, nas infecções por *Ehrlichia sp.* e *Anaplasma sp.*, ocorrer modulação da apoptose celular para prolongar a sobrevivência desses organismos, permitindo sua proliferação e disseminação, atuando como um cavalo de Tróia inibindo a resposta imune. Neste contexto, a apoptose pode contribuir indistintamente para a progressão ou regressão das lesões. Para avaliação do papel da apoptose na erliquiose monocítica canina, sete cães foram distribuídos em dois grupos. No Grupo inoculado, realizou-se a infecção por via intravenosa com sangue infectado com *E. Canis* (isolado Jaboticabal), sendo realizada a inoculação com PBS estéril nos animais pertencentes ao Grupo Controle. Semanalmente e até 35 dias pós-inoculação, amostras de sangue foram coletadas e submetidas a n-PCR e reação de Imunofluorescência (RIFI) para confirmação da infecção. No 36º dia pós-inoculação, os animais foram eutanasiados, sendo amostras de baço, linfonodo, rim e fígado coletadas e processadas para as técnicas de TUNEL e imunohistoquímica (Bcl-2, Bax) e amostras dos mesmos, medula óssea e coração para expressão gênica de moléculas apoptóticas (Bax, Bcl-2, Caspase3, Caspase8 e Caspase 9) por RT-PCR. Verificou-se pelo n-PCR que os animais inoculados se tornaram positivos para *E. canis* a partir da segunda

semana pós inoculação. Pela RIFI, verificou-se animais com sorologia positiva a partir da terceira semana pós-inoculação. No grupo controle, todos os testes realizados foram negativos para *E. canis*. Ambas as moléculas pro e anti-apoptóticas avaliadas neste estudo mostraram mais alta expressão de genes em tecidos dos animais do grupo inoculado que nos animais do grupo controle. Apesar da reação de TUNEL mostrar maior ocorrência de apoptose no Grupo Inoculado, sendo o baço e os linfonodos os órgãos que apresentaram maior marcação, os resultados da imunohistoquímica para Bcl-2 e Bax indicaram que a via intrínseca de apoptose não é tão importante nos órgãos analisados. Em conclusão nós encontramos que na fase aguda da doença experimental a *Ehrlichia canis* modula a apoptose por diferentes vias em tecidos distintos e que a apoptose tem um papel na progressão da doença.

ABSTRACT

The Canine Monocytic Ehrlichiosis is a zoonotic disease caused by *Ehrlichia canis*, a Gram negative bacteria, with a worldwide distribution. Some dogs with ehrlichiosis become asymptomatic carriers while others develop an acute disease with rapid death. Apoptosis can be important in the elimination of intracellular pathogens in infections caused by *Ehrlichia sp.* and *Anaplasma sp.* occur modulation of apoptosis to prolong the survival of these organisms allowing their proliferation and spread, acting as a Trojan horse by inhibition the immune response. In this context apoptosis may contribute to the progression or regression of the lesions. To evaluate the role of apoptosis in Canine Monocytic Ehrlichiosis, seven mongrel dogs, clinically healthy and free of ticks, aged among six and eight months, were randomly assigned into two groups: GI, Inoculated - with four dogs and GII, Control -with three dogs. Each dog was inoculated intravenously with 3 ml of either infected blood (strain Jaboticabal) in GI or sterile PBS in GII. Weekly and 35 days post-inoculation, blood samples were collected and subjected to nested reaction chain polymerase (nPCR) and immunofluorescence assay (IFA) for confirmation of infection. On day 36 post-inoculation, animals were euthanized and samples of spleen, lymph node, kidney and liver were collected and processed for TUNEL and immunohistochemical techniques (Bcl-2, Bax). Another set of the same samples, with bone marrow and heart were processed for gene expression of apoptotic molecules (Bax, Bcl-2, caspase-3, caspase 8 and caspase 9) by RT-PCR. As verified by nPCR inoculated animals became positive for *E. canis* from

the second week after inoculation. IFAT showed seropositive animals from the third week after inoculation. In the control group, all tests were negative for *E. canis*. Both pro and anti-apoptotic molecules showed higher expression of genes in tissues of inoculated animals than in the control group. TUNEL assay showed increased incidence of apoptosis in the group inoculated, with more intense labeling in spleen and lymph nodes, however the results of the immunohistochemistry for Bcl-2 and Bax indicated that the intrinsic pathway of apoptosis was not important. In conclusion we found that in the acute phase of the experimental disease, *Ehrlichia canis* modulates apoptosis in different ways in different tissues and that apoptosis plays a role in disease progression.

Introdução

1. Introdução

A trombocitopenia tropical canina é uma zoonose bacteriana (RIKIHISA et al., 1992; WAGNERA et al., 2004; MANNA et al., 2004; YU XUE-JIE et al., 2007) causada por *Ehrlichia canis*, um microrganismo Gram Negativo, intracitoplasmático obrigatório que pertence à Ordem dos *Rickettsiales*, Família *Anaplasmataceae* (DUMLER et al., 2001; RODRIGUEZ et al., 2003). É encontrada no citoplasma dos linfócitos e monócitos dos cães afetados, sendo transmitida pela picada do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (GROVES et al., 1975; SMITH et al., 1976; LABRUNA & PEREIRA, 2001; MOREIRA, 2005).

A *E. canis* foi descrita pela primeira vez no ano de 1935 na Argélia (DONATEIN & LESTOQUARD, 1935). Seu genoma consiste em um cromossomo circular de uma fita, de 1.315.030 nucleotídeos constituídos de aproximadamente 28,96% de guanina e citosina. O material genético de *E. canis* está bem conservado na espécie de diferentes locais no mundo, sendo que o gene 16S rRNA é 99,9 a 100% idêntico nos diferentes isolados das Américas do Sul (cepa VHD e VED) e do Norte (cepa Oklahoma), da Ásia (genótipo AF162860 na China e Kagoshima no Japão), e do meio oriente - Turquia e Israel (SIARKOU et al, 2007).

Em 1993, na cidade de Jaboticabal-SP, AGUIAR et al. (2007) compararam o genótipo da cepa isolada de uma cadela da raça Weimaraner em fase aguda da doença, com as sequências Norte-Americanas disponíveis no GeneBank e encontraram 100% de similaridade. Tal fato indica que os testes genéticos utilizados para diagnosticar a doença são também de uso universal.

Em Belo Horizonte, COSTA et al. (1973), descreveram pela primeira vez a doença no Brasil. Em 2003 há relatos de que a doença possa afetar 20% dos cães atendidos em hospitais e clínicas veterinárias de estados das regiões Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste (LABARTHE et al., 2003; MOREIRA et al., 2003).

Os fatores ambientais afetam diretamente a prevalência da erliquiose. As variações do clima influenciam especialmente a dinâmica das populações de carrapatos infectados, interferindo diretamente na presença da doença em cada região. COSTA et al. (2007) reportaram soroprevalência de *E. canis* em zonas urbanas com temperaturas oscilando entre 19,2 e 22,4°C e altitudes variando entre 159 até 1060 metros sobre o nível do mar. A soroprevalência de 65,6%, 37,8% e 24,7% em Nanuque, Belo Horizonte e Lavras respectivamente foi determinada pela imunofluorescência indireta (RIFI) em diluições de 1:40, 1:160, 1:640 e outras.

Os cães e o homem podem ser contaminados por diferentes espécies de rickettsias: *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophila*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia chaffeensis* e *Ehrlichia canis*. Na Venezuela, há relatos de seis casos clínicos de erliquiose humana causada por *E. canis* (PEREZ et al., 2006).

O quadro hematológico usualmente mostra pancitopenia, anemia aplástica e trombocitopenia; sendo essa última a alteração mais consistente na infecção (McBRIDE et al., 1999; McBRIDE et al., 2003). A forma crônica se caracteriza pela perda progressiva de peso, anorexia, mucosas ictéricas, hemorragias de retina e nas mucosas, equimoses e petéquias na pele (MOREIRA et al., 2003)

A função imune em cães infetados pela *E. canis* não está ainda bem caracterizada. Alguns destes animais tornam-se portadores assintomáticos

provavelmente devido à tolerância ou à inadequada resposta imunológica. O desenvolvimento subsequente de enfermidades mediadas imunologicamente ou infecções oportunistas na erliquiose crônica é indicativo de alteração da função imune. Para GOKCE & WOLDEHIWET (2002) a imunodepressão causada pela *Anaplasma phagocytophila* em ovelhas parece estar associada com dano funcional ou físico dos leucócitos e com a liberação de substâncias imunossupressivas como o Fator de Necrose Tumoral Alfa (*TNF- α*) e intermediários reativos de nitrogênio pelas células mononucleares do sangue periférico. Este mecanismo pode também ser utilizado por outras *Ehrlichias*.

A apoptose é um tipo de morte celular fisiológica e programada, caracterizada por modificações estruturais e funcionais na célula (KERR et al., 1972; VAUX, 2011). Trata-se de uma morte silenciosa, onde a célula é estimulada a acionar mecanismos que resultarão em sua eliminação, sem induzir reações inflamatórias (ADAMS, 2003; ELMORE, 2007). Desta maneira a apoptose participa na regulação da resposta imunológica e na eliminação ou infecção de patógenos intracelulares. Uma célula infectada pode, por um lado, sofrer apoptose na presença de vários agentes e por outro, pode ser capaz de inibi-la (DeLEO, 2004).

Considerando-se que os mecanismos de sobrevivência e de morte celular nas infecções com *E. canis*, e que em bactérias intracelulares similares, a apoptose está envolvida na modulação da infecção, e ainda que as vias apoptóticas ainda não estão elucidadas, objetivou-se aqui estudar o processo da apoptose na patogenia da erliquiose monocítica canina, particularmente na morte das células de diferentes tecidos em animais infectados experimentalmente.

Assim, procurou-se avaliar a expressão das proteínas Bax, Bcl-2, Caspase 3, e Caspase 8, através de reações imunohistoquímicas em amostras de baço, linfonodo, fígado e rim de cães inoculados experimentalmente com *E. canis* e quantificar os mRNAs dos genes de algumas moléculas que intervém no processo apoptótico como Bax, Bcl-2, Caspase 3, Caspase 8 e Caspase 9, através da reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (qRT-PCR).

Revisão de Literatura

2. Revisão de Literatura

As doenças causadas por rickettsias que pertencem ao gênero *Ehrlichia* recebem o nome de erliquioses. Atualmente este gênero compreende cinco espécies válidas: *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia muris* e *Ehrlichia ruminantium* (DUMLER et al., 2001). Estudos sorológicos e moleculares têm avaliado a ocorrência de espécies de *Ehrlichia* em cães, gatos, animais selvagens e seres humanos. Na América do Sul, agentes da família *Anaplasmataceae* foram detectados no Brasil (DAGNONE et al., 2003, 2009; SOUZA et al., 2010; COSTA et al., 2007; CARLOS et al., 2007, 2011), Venezuela (UNVER et al., 2001), Chile (ABARCA et al., 2007), Perú (VINASCO et al., 2007) e Colômbia (PARRADO & VARGAS, 2002; GOMEZ, 2002; BENAVIDES & RAMIREZ, 2003; CONTRERAS & SANABRIA 2006; HIDALGO et al., 2009; VARGAS-HERNANDEZ, et al., 2011). A *Ehrlichia canis* é a principal espécie em cães no Brasil (OLIVEIRA et al., 2000; DAGNONE et al., 2003; VIERA et al., 2011).

A *Ehrlichia canis*, foi descrita pela primeira vez no ano de 1935 na Argélia (DONATEIN & LESTOQUARD, 1935), e posteriormente foi reportada como uma epizootia que afetou cães militares da raça pastor alemão, pertencentes ao exército dos Estados Unidos, durante a guerra do Vietnã (HUXSOLL et al., 1970). A erliquiose canina apresenta alta prevalência em regiões tropicais e subtropicais devido à distribuição geográfica do vetor (ANDEREG & PASSOS, 1999). Em Belo Horizonte, COSTA et al. (1973) fizeram o primeiro relato da doença no Brasil. Posteriormente foi relatada afetando aproximadamente 20% dos cães atendidos

em hospitais e clínicas veterinárias de estados das regiões nordeste, sudeste, sul e centro-oeste (LABARTHE et al., 2003; MOREIRA et al., 2003).

Fatores ambientais afetam diretamente a prevalência da erliquiose, já que variações do clima influenciam na dinâmica das populações dos carrapatos infectados, interferindo diretamente na presença da doença em cada região. COSTA et al. (2007) reportaram soro prevalência de *E. canis* pela Imunofluorescência indireta (RIFI) em diversas zonas do Brasil onde as temperaturas oscilavam entre os 19,2 e 22,4°C com altitudes variando entre os 159 até os 1060 metros sobre o nível do mar, e encontraram valores de 65,6%, 37,8% e 24,7% em Nanuque, Belo Horizonte e Lavras respectivamente.

Os cães e o homem podem ser contaminados pelas diferentes espécies de rickettsias: *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophila*, *E. ewingii*, *E. chaffeensis* e *E. canis*. Na Venezuela, há relatos de seis casos clínicos de erliquiose humana causada por *E. canis*, o que reforça o potencial zoonótico deste agente (PEREZ et al., 2006).

Nos carrapatos a transmissão da *E. canis* é transestadial, mas não transovariana (GROVES et al., 1975; SMITH et al., 1976). As larvas e ninfas se infectam quando se alimentam em um cão em fase aguda da doença, através da ingestão de leucócitos infectados (SMITH et al., 1976; LEWIS et al., 1977). No carrapato, as ehrlíquias se disseminam por hemócitos do intestino para a glândula salivar. Durante a alimentação, os carrapatos inoculam a secreção salivar contaminada com ehrlíquias no interior do sítio de alimentação no hospedeiro (SMITH et al., 1976). Todos os três estágios podem transmitir a doença (larva, ninfa e adulto). (Figura 1). Os carrapatos sobrevivem como adultos sem se

alimentar de 155 a 568 dias, e podem transmitir a infecção por até 155 dias após se tornarem infectados (LEWIS et al., 1977).

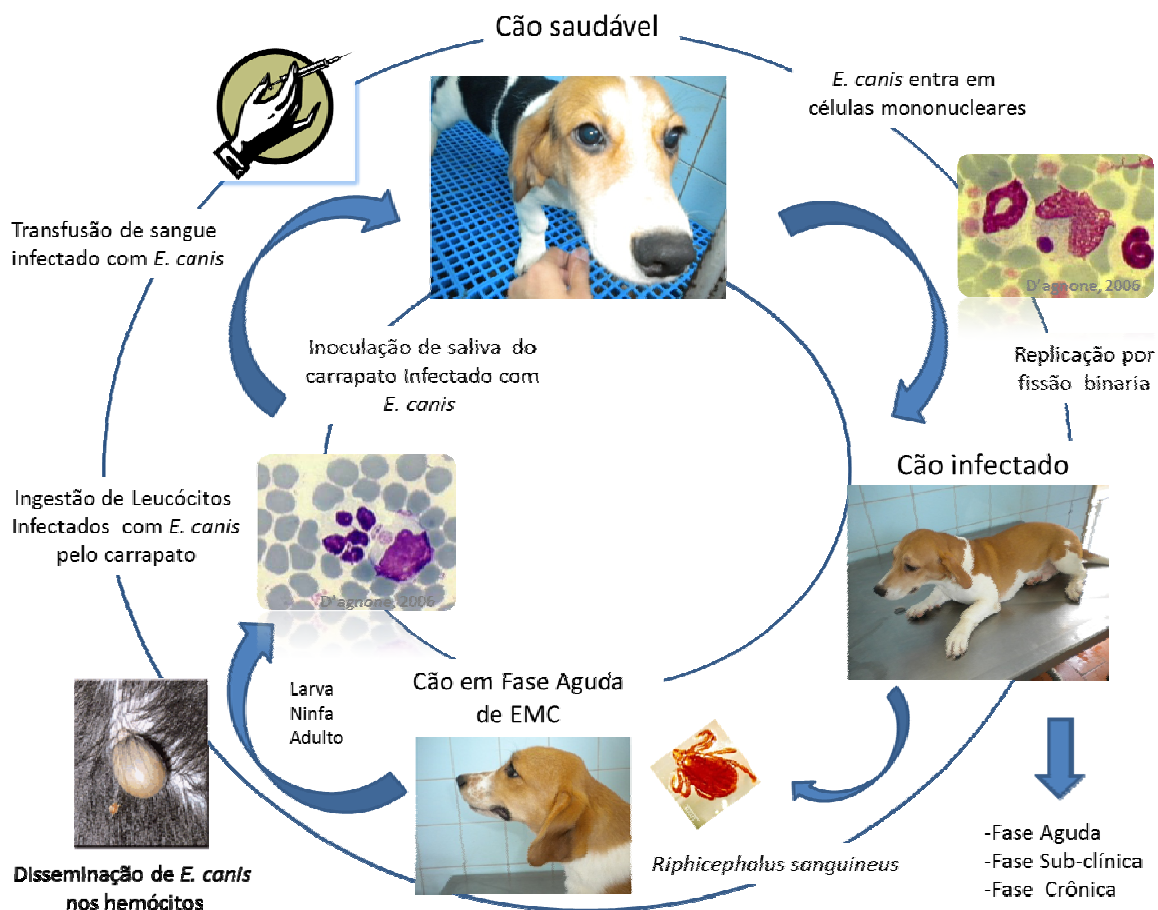


Figura 1: Representação esquemática do ciclo de transmissão de *Ehrlichia canis*.

O genoma da *E. canis* consiste em um cromossomo circular de uma fita, de 1.315.030 nucleotídeos, com 28,96% de guanina e citosina, bem conservado, sendo o gene 16S rRNA 99,9 a 100% idêntico nos diferentes isolados da América do Sul e do Norte e da Ásia (SIARKOU et al., 2007).

AGUIAR et al. (2007), comparando o genótipo de uma cepa isolada em 1993 na cidade de Jaboticabal, (São Paulo, Brasil), com a sequência Norte-Americana/Oklahoma disponível no GeneBank sob o registro M73221.1, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/M73221.1>), considerada padrão mundial para o diagnóstico sorológico, encontraram 100% de homologia entre eles.

A erliquiose monocítica canina (EMC) apresenta três fases: aguda, subclínica e crônica (NEER, 1998). A primeira manifestação clínica pode ocorrer após o período de incubação, que varia entre 8 e 20 dias (HARRUS et al., 1997). Os sinais clínicos incluem letargia, anorexia, vômito, febre, perda de peso, linfadenomegalia, hepatomegalia, esplenomegalia, membranas mucosas pálidas, descarga nasal e ocular e em casos avançados epistaxe e hemorragias (HARRUS et al., 1997; MOREIRA et al., 2003; CASTRO et al., 2004; AGUIAR et al., 2007b; ORIÁ et al., 2008; BORIN et al., 2009).

A fase aguda usualmente se desenvolve entre duas e quatro semanas após a transmissão do agente pelo carrapato. Nesta fase, o microrganismo infecta as células mononucleares e replica por fissão binária, antes de se disseminar para outros órgãos do hospedeiro. A doença pode ser mais grave com certas cepas de *E. canis*, exacerbando-se quando ocorrem co-infecções com outros patógenos rickettsiales ou protozoários transmitidos por carrapatos (GAL et al., 2008; UNVER et al., 2006).

Apesar de alguns casos de infecção aguda por *E. Canis* serem graves e incluir óbito, muitos cães parecem ser tolerantes à infecção sem desenvolver enfermidade clínica aparente. Por outro lado, no Brasil, cães infectados naturalmente pela *E. canis* com erliquiose aguda mostraram lesões em

cardiomiócitos (DINIZ et al., 2008) indicando maior risco de lesões no miocárdio na fase aguda que na fase crônica.

Cães com EMC podem progredir para a fase subclínica, que ocorre entre seis a nove semanas pós-infecção (MOREIRA et al., 2003; BORIN et al., 2009), permanecendo cronicamente infectados por meses ou anos sem evidência de sinais clínicos. Estes animais freqüentemente apresentam trombocitopenia (WARNER et al., 1997; DAGNONE et al., 2003; BULLA et al., 2004; SANTOS et al., 2009), anemia não regenerativa (MOREIRA et al., 2003, 2005; ORIÁ et al., 2008, BORIN et al., 2009) e função plaquetária alterada, o que explica as hemorragias superficiais, tais como epistaxe e petéquias, ainda que a contagem das plaquetas e os perfis de coagulação estejam dentro dos valores de referência (FRANK & BREITSCHWERDT, 1999; MOREIRA et al., 2005).

Alguns cães desenvolvem uma fase crônica leve, enquanto outros evoluem para uma forma grave e potencialmente fatal de erliquiose crônica, meses ou anos após a infecção inicial com *E. Canis*. Nestes casos, os animais apresentam dificuldade para montar uma resposta imune efetiva. A febre, anorexia e perda de peso estão acompanhadas de mialgia, tendência à hemorragia, lesões oculares e anormalidades neurológicas (STICH et al., 2008; HARRUS & WANER, 2010). Epistaxe, petéquias ou equimoses cutâneas, hiperemia, hemorragia retinal e hematúria assim como uveíte anterior e alterações na retina são também descritas (PANCIERA et al., 2001; LEIVA et al., 2005; KOMNENOU et al., 2007). O comprometimento da medula óssea leva a pancitopenia (WALKER et al., 1970; MOREIRA et al., 2005) e a morte pode ocorrer devido a hemorragias secundárias

e trombocitopenias (DAGNONE et al., 2001) ou devido a infecções em pacientes neutropênicos (HUSXOLL et al., 1970).

Ataxia, inclinação da cabeça, nistagmo, e convulsões têm sido reportadas numa minoria de casos de erliquiose clínica (NEER & HARRUS, 2006). Claudicações podem ocorrer, embora se associe mais à mialgia que artralgia. Os cães da raça Pastor Alemão parecem ser particularmente susceptíveis à forma clínica da doença (NIYINDO et al., 1980), e quadros graves podem ser observados em animais infectados com cepas mais patogênicas (UNVER et al., 2008).

Achados de patologia clínica na erliquiose monocítica canina incluem trombocitopenia, pancitopenia, linfocitose granular pronunciada, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, e incremento da alaninoamino transferase no soro, além de hipoplasia da medula óssea (NEER & HARRUS, 2006; STICH et al., 2008). A redução na função plaquetária contribui para diátese hemorrágica vista na erliquiose aguda e crônica (HARRUS et al., 1996). A diminuição da produção de plaquetas por parte da medula óssea hipoplásica associada ao seqüestro, incremento no consumo e secreção do fator inibidor da migração plaquetária por linfócitos expostos a células infectadas com *E. canis*, contribuem para a trombocitopenia e a hemorragia clínica (NEER & HARRUS, 2006).

Embora uma gamaglobulinopatia monoclonal ou policlonal possa desenvolver altos títulos de anticorpos, estes não protegem contra futuras infecções ou não eliminam infecções já existentes (RISTIC & HOLLAND, 1993). Parte das alterações observadas em erliquiose parecem ser mediadas por complexos imunes, e cães com gamaglobulinopatia monoclonal podem

desenvolver seqüelas, tais como glomerulopatia e hemorragia subretinal (HARRUS et al., 1998; LUCKSCHANDER et al., 2003; NEER & HARRUS, 2006).

O diagnóstico clínico da erliquiose canina é baseado nos sinais clínicos e achados clinico-patológicos, que não são específicos (HARRUS et al., 1997). Assim, é necessário técnicas mais precisas para a confirmação do diagnóstico. Inicialmente a avaliação citológica e detecção citoplasmática de corpos elementares, corpos iniciais e de mórulas em esfregaços sanguíneos de sangue periférico e/ou papa leucocitária (PBMC) corados com colorações derivadas de Romanowsky, confirmam a doença, embora esta técnica careça de sensibilidade (HIBLER et al., 1986; MILONAKIS et al., 2003). Há décadas vem-se implementando o uso de técnicas de diagnóstico sorológico, como a imunofluorescência indireta (RIFI) (RISTIC et al., 1972; CADMAN et al., 1994; WANER et al., 2001), Ensaio imuno - adsorvente ligado a enzima (ELISA), Dot-ELISA, *Western immunoblotting*, dentre outros (MAHAN & KELLY, 2005; NAKAGHI et al., 2008; HARRUS & WANER, 2011). Na atualidade a precisão no diagnóstico vem aumentando pela introdução e difusão de técnicas de biologia molecular e cultura celular (IQBAL et al., 1994; McBRIDE et al., 1996; WEN et al., 1997; HARRUS et al., 1998; DAGNONE et al., 2009; HARRUS & WARNER, 2011), ainda que esta última se reserve para laboratórios de pesquisa especializados em estudar o agente.

NAKAGUI et al. (2008) sugerem que, para a melhor interpretação dos resultados de laboratório, é importante considerar o estágio da infecção e as limitações destes testes. Reações cruzadas de DNA são pouco comuns em *nested* PCR, enquanto falsos positivos podem ocorrer em sorologia, devido a

reações cruzadas com outras espécies de Ehrlichias ou pela persistência de títulos de anticorpos pós-tratamento. Porém, um extenso número de amostras sorologicamente positivas e *nested* PCR negativas sugerem que a sorologia é o teste mais apropriado para o diagnóstico de infecção natural por *E. canis* na fase crônica, quando a *E. canis* raramente se encontra na circulação sanguínea.

A reação em cadeia da polimerase (PCR “real time quantitativo” ou qRT-PCR) é uma técnica sensível, específica e confiável para a detecção de Ehrlichias em sangue e em cultura de tecidos (BRANGER et al., 2004; BELL & PATEL, 2005; DOYLE et al., 2005; SIRINGIREDDY & GANTA, 2005), sendo também empregada para avaliação longitudinal em estudos comparativos entre infecção natural e experimental (BANETH et al., 2009).

Com relação à distribuição da bactéria nos tecidos, Gal et al. (2008) mostraram que os linfonodos e o sangue apresentaram maior positividade quando submetidos à PCR, enquanto que o baço e o fígado foram positivos somente numa pequena proporção de animais e a medula óssea negativa. Nos cadáveres de cães a PCR deve usar preferivelmente espécimes de sangue e linfonodo. Já em cães naturalmente infectados, o baço foi mais parasitado que o sangue (IQBAL & RIKIHISA, 1994). Baneth et al. (2009), usando RT-PCR, verificaram que o baço foi mais frequentemente positivo que o sangue, e que estas amostras proveram resultados mais acurados que os obtidos pela detecção de DNA erliquial na conjuntiva.

Apoptose é uma forma de morte celular programada morfológica e bioquimicamente distinta que requer energia, síntese e degradação protéica (HENGARTNER, 2000; DOSEFF, 2004). Neste tipo de morte, a própria célula

aciona individualmente os mecanismos que culminarão com sua autodestruição (ELMORE, 2007). Exerce um papel importante na remoção de células não desejadas ou danificadas durante o desenvolvimento, na homeostase de tecidos (SHAMAS et al., 2011), no envelhecimento de organismos multicelulares e na seleção de repertório de linfócitos (VANUX & STRASSER, 1996). Este tipo de eliminação celular pode ser iniciado por estímulos fisiológicos e patológicos (MARSDEN & STRASSER, 2003). Adicionalmente, a apoptose é reconhecida como importante mecanismo de defesa contra patógenos parasitários, virais e bacterianos durante a resposta imune inata e adaptativa (WILLIAMS, 1994; LILES, 1997; CARSTEN et al., 2001).

Em algumas infecções, se a proliferação de microrganismos viáveis é diminuída, a modulação da morte celular infectada pode facilitar a sobrevivência do organismo hospedeiro. Assim, a apoptose em distintas populações de células contribui especificamente para a regulação de respostas imunes induzidas por patógenos (LILES, 1997). Apesar disso, vírus, bactérias, e parasitas têm desenvolvido várias estratégias para modular a apoptose das células hospedeiras (LILES, 1997; GAO & KWAIT, 2000).

A apoptose pode ser iniciada ou inibida pelos parasitas e contribuir para a disseminação no hospedeiro, inibindo ou modulando a resposta imune do mesmo, ou facilitando a sobrevivência do patógeno nas células. Vários protozoários podem modular a morte da célula hospedeira por mecanismos diretos ou indiretos. Quando o parasita infecta a célula hospedeira e bloqueia apoptose nesta, pode assim preservar e prolongar a vida do reservatório do agente. Por outro lado, se promove a apoptose da célula hospedeira, pode causar morte dos parasitas, ou

favorecer o escape e disseminação do mesmo. Células não infectadas podem ser diretamente afetadas por produtos solúveis dos parasitas e sofrerem apoptose. Da mesma forma, mecanismos indiretos via indução de células T antígeno-específicas podem modular a morte da célula hospedeira: células T auxiliares ativam macrófagos infectados para eliminar patógenos intracelulares, células T ativadas expressam Fas e Fas ligante e tornam-se susceptíveis para morte por apoptose induzida pela sinalização de Fas, ou por último, o agente pode aproveitar-se de respostas imunes suprimidas. Além disso, a fagocitose de corpos apoptóticos desativa macrófagos e favorece infecção parasitária (CARSTEN et al., 2001).

As células apoptóticas apresentam vários aspectos morfológicos característicos (Figura 2). À microscopia óptica, apresentam-se retraídas, tipicamente circundadas por um halo claro e possuem citoplasma acidófilo. Seus núcleos sofrem uma série de alterações, incluindo marginação da cromatina, condensação e fragmentação, seguidas pela fragmentação da própria célula em corpos apoptóticos (HACKER, 2000). (Figura 3).

Tais corpos apoptóticos podem apresentar fragmentos citoplasmáticos, nucleares ou ambos e são reconhecidos e fagocitados por histiócitos ou células parenquimatosas adjacentes, sem induzir inflamação (HACKER, 2000; ELMORE, 2007). A apoptose pode ocorrer por duas vias distintas, mas parcialmente sobrepostas: a via extrínseca, mediada por receptores de morte, e a via intrínseca mitocondrial (DONOVAN & COTTER, 2004; SALVESEN & RIEDL, 2008; LANDES & MARTINOU, 2011). Em ambos os casos, cascatas bioquímicas são ativadas por ligantes extracelulares ou por dano intracelular. Assim, caspases, cisteino

proteases específicas para resíduos de ácido aspartato são ativadas em cadeia. Estas enzimas medeiam a maior parte do programa apoptótico, e algumas delas podem ser bloqueadas por inibidores de proteínas apoptóticas (IAPs) (SCOTT et al., 2005).

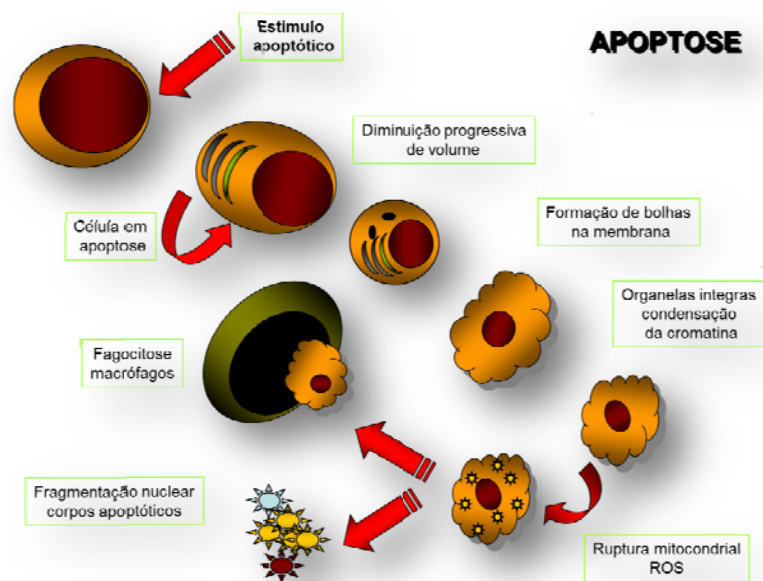


Figura 2: Representação esquemática de mudanças morfológicas da célula em apoptose.

As caspases clivam muitas proteínas celulares vitais e ativam proteoliticamente enzimas que contribuem para a morte celular, tais como a DNase DFF40/CAD. Muitas caspases estão presentes em células normais como pró-enzimas cataliticamente inativas (zimogênios), que são ativadas em resposta

a sinais programados e a estímulos de estresse (THORNBERRY & LAZEBNIK, 1998).

As caspases diretamente envolvidas na apoptose podem ser separadas em caspases iniciadoras (caspases 8, 9 e 10) e caspases efetoras (caspases 3, 6 e 7). As caspases iniciadoras fazem proteólise das efetoras que, por sua vez, atuam ativando outras proteases que degradam diferentes substratos das células (LANDES & MARTINOU, 2011).

Existem dois mecanismos para a ativação de caspases: a) Certos zimogênios (caspases 1, 2, 4, 5, 8, 9,10,11 e 12) têm pró-domínios N-terminal longos de baixa interação homotípica com proteínas adaptadoras específicas, como FAAD/MORT-1 ou Apaf-1. Estes promotores de agregação de zimogênios possuem baixa atividade enzimática e promovem uma ação autocatalítica para gerar polipeptídios de 10 e 20 kDa que se acoplam com sucesso e ativam as caspases. b) caspases com pró-domínios curtos (caspases 3, 6, e 7) são ativadas predominantemente através de proteólise por caspases ativadas ou por granzimas: serino proteases aspartato-específicas (THORNBERRY & LAZEBNIK, 1998).

A atividade das caspases na célula pode ser controlada em dois níveis. Primeiro, a atividade de caspase é induzida por um complexo de vias de sinalização de apoptose que são altamente reguladas. Segundo, certas caspases podem ser antagonizadas pelas proteínas inibidoras de apoptose (IAPs). Estas IAPs ligam-se ao sítio ativo das caspases, atuando como inibidores competitivos. O efeito anti apoptótico das IAPs é neutralizado pela liberação de proteínas mitocondriais, tais como SMAC/DIABLO, que podem seqüestrar as IAPs

(VERHAGEN et al., 2001). As caspases são consideradas as executoras da apoptose, uma vez que sua ativação cliva importantes substratos celulares. A apoptose induzida em linfócitos T maduros e a decorrente da privação de fatores de crescimento e a morte celular induzida por ativação são mediadas por estes complexos enzimáticos (DE ALBORÁN et al., 2003).

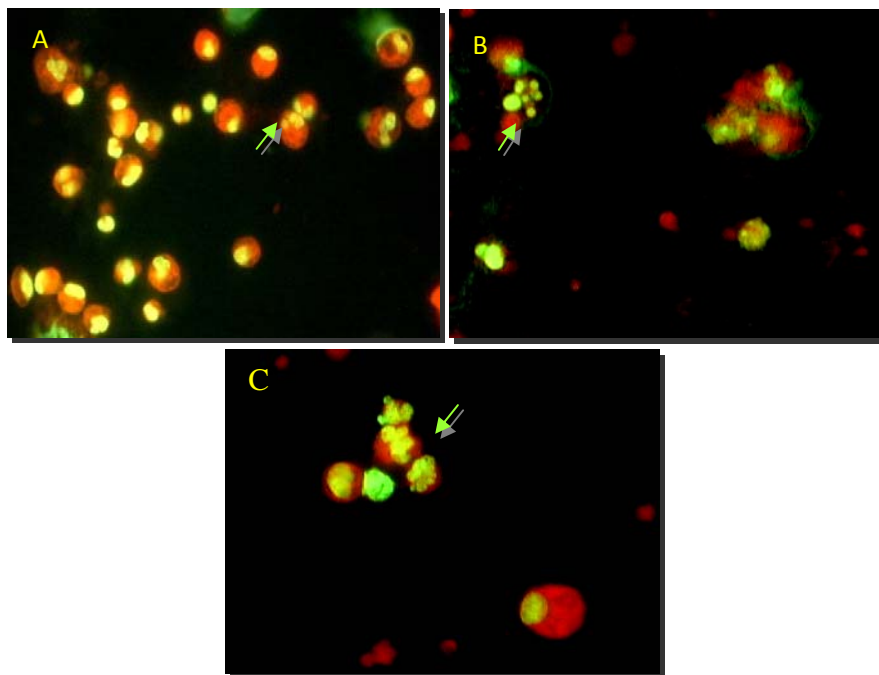


Figura 3. Fotomicrografia de cultura de Linfócitos T SBm7462-reativos. Células coradas com Acridina Laranja apresentando morfologia típica de apoptose (setas), A. Condensação da cromatina, B. Formação de corpos apoptóticos. C. Fragmentação nuclear. 40X. (Fonte: Irma Ximena Barbosa. Estudo *ex vivo* da apoptose induzida via TCR em linfócitos T de camundongos *Balb/c* imunizados com o peptídeo sintético SBm7462. *Tese Mestrado*).

Receptores de morte específicos da superfície celular recebem os estímulos e transmitem sinais apoptóticos, ativando rapidamente as caspases, causando eliminação da célula em horas (ASHKENAZI & DIXIT, 1998). Os receptores de morte pertencem à superfamília de receptores de TNF, que são definidos por domínios extracelulares ricos em cisteína. Os receptores de morte contêm sequências homólogas citoplasmáticas, denominadas domínios de morte, que permitem o acoplamento da maquinaria apoptótica (SMITH et al. 1995).

Os receptores de morte melhor caracterizados são: Fas (também chamado CD95 ou Apo-1) e TNFR1 (também chamado p55 ou CD120a) (SMITH et al., 1995). Outros receptores de morte são: CAR1, receptor de morte 3 (DR3, também chamado Apo3, WSL-1, TRAMP, ou LARD) (CHINNAIYAN et al., 1996), DR4 e DR5 (também chamado Apo2, TRAIL-R2, TRICK 2 ou KILLER). Os ligantes que ativam estes receptores são: CD95 ligante (CD95L); TNF e linfotóxina- α se unem a TNFR1; Apo3 ligante (Apo3L, também chamado TWEAK) liga com DR3 e Apo2 ligante (Apo2L, também chamado TRAIL) liga-se a DR4 e DR5. O ligante para CAR1 não é conhecido. Acredita-se que todos os ligantes formam trímeros ao se ligarem a seus receptores (ASHKENAZI & DIXIT, 1998).

O sistema Fas/FasL tem um papel importante mediando a deleção periférica de células T ativadas e o fim de uma resposta imune; a morte de células infectadas por vírus ou células cancerígenas por células T citotóxicas e por células "*Natural Killer*" (NK); e a morte de células inflamatórias em sítios imunologicamente privilegiados como olho, testículo e ovário (ASHKENAZI & DIXIT, 1998). O receptor Fas (CD95/APO-1) tem três domínios extracelulares

ricos em cisteína e um domínio de morte intracelular essencial para sinalização (PETER & KRAMMER, 1998). Este domínio intracitoplasmático tem 80 aminoácidos e é encontrado em todos os receptores de morte (ITOH & NAGATA, 1993). Estes receptores traduzem um sinal de morte que depende estritamente da integridade do domínio (TIBBETTS et al., 2003).

Uma característica da sinalização por Fas é o desenvolvimento de um complexo molecular de proteínas por ligações cruzadas de Fas com FasL *leucine zipper*. A estrutura formada é chamada complexo de sinalização induzindo morte (DISC) (KISCHKEL et al., 1995). A oligomerização de Fas cria uma conformação do receptor DD (Domínio de morte) que, por interações homologas, atrai o adaptador FADD (Domínio de morte associado ao Fas, também chamado MORT-1). FADD possui um sítio amino-terminal DED (Domínio executor de morte) pelo qual se une a caspase 8A/b (também chamado FLICE ou MACH) e CAP3. A pró caspase 8A/b cliva DISC em dois passos consecutivos levando à formação de caspase-8 ativada (MEDEMA et al., 1997) (figura 4).

A caspase-8 tem um papel central na apoptose induzida por Fas (DONEPUDI et al., 2003), já que ela é diretamente ativada pelo complexo molecular formado pelas ligações cruzadas de Fas/FasL ou DISC. Técnicas de marcação por afinidade têm revelado que a caspase-8 ativa as caspases 3 e 7 e que a caspase-3 pode ativar a caspase-6. As caspases 6 e 3 clivam proteínas ativas no núcleo celular (HIRATA et al., 1998). A caspase-8 pode também ser ativada diretamente por granzima B liberada de linfócitos T citolíticos, dando início à cascata caspase apoptótica (MEDEMA et al., 1997).

Caspases ativadas clivam substratos celulares responsáveis pela morfologia característica de apoptose e pela clivagem oligosômica do DNA (MARTIN & GREEN, 1995). Além de ativar as caspases efetadoras, a caspase 8 cliva o Bid, proteína citosólica pró-apoptótica da família Bax, originando um fragmento que se liga a proteína Bcl2, inibindo-a. Isso gera uma alteração da permeabilidade mitocondrial, favorecendo a liberação do citocromo C, proteína SMAC e AIF, que ativam caspase 9 ou as efetoras (AUTRET & MARTIN, 2010; LINDSAY et al. 2011).

O TNF é produzido por macrófagos ativados e células T em resposta a estímulos inflamatórios. Pela união ao seu receptor TNFR1 se ativam os fatores de transcrição NF- κ B e APO-1, levando a expressão de genes imunomoduladores e pró-inflamatórios (TARTAGLIA & GOEDDEL, 1992). O TNF também pode induzir apoptose através de TNFR1 raramente quando a síntese de proteínas for bloqueada, com a pré-existência de fatores celulares que suprimem os estímulos inflamatórios (ASHKENAZI & DIXIT, 1998).

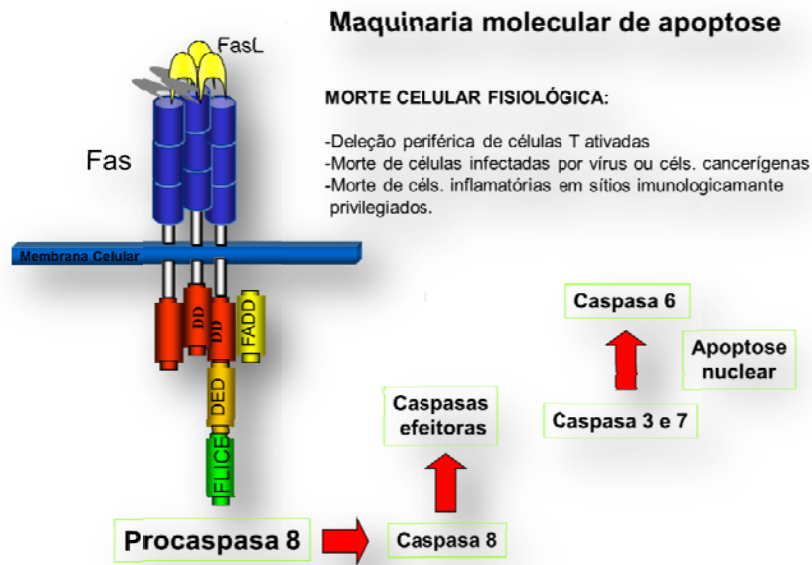


Figura 4. Representação esquemática da via apoptótica extrínseca através de receptor Fas.

O TNF trimeriza após a união ao TNFR1 induzindo associação dos domínios de morte. Em seguida um adaptador chamado TRADD (Domínio de morte associado ao TNFR) se liga a esses domínios de morte (HSU et al., 1996). TRADD funciona como uma plataforma adaptadora que recruta várias moléculas sinalizadoras utilizadas para a atividade do receptor, por exemplo, TNFR associado a Fator 2 (TRAF2) e Proteína Interatuando com Receptor (RIP), que estimulam vias que ativam NF- κ B e de JNK/AP-1, enquanto FADD medeia a ativação de apoptose (CHINNAIYAN et al., 1996; HSU et al., 1996) (Figura 5).

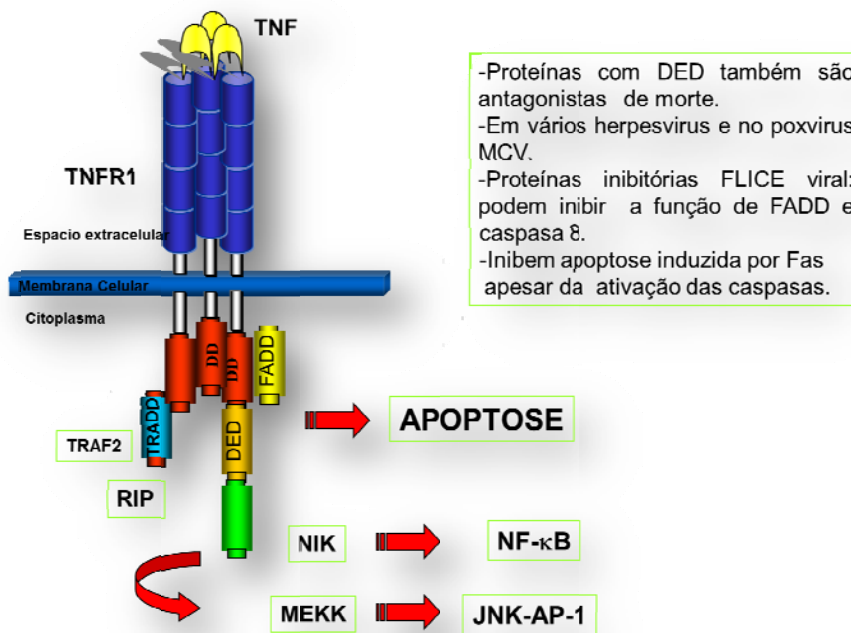


Figura 5. Representação esquemática da via apoptótica extrínseca através de receptor TNF.

A mitocôndria desempenha um papel primordial nas cascatas bioquímicas que levam a morte celular (DANIAL & KORSMEYER et al., 2004). Mecanismos de controle específicos para células eucarióticas ocorrem paralelamente com o desenvolvimento das maquinarias de morte celular baseado em efetores de origem bacteriana. Existe alguma similaridade entre proteínas bacterianas e mitocondriais em relação a sua função e vias de sinalização (LUCATTINI et al., 2004).

Esta organela não é somente o integrador central para a via intrínseca como também está crucialmente envolvida na via extrínseca em alguns tipos de células (SCAFFIDI et al., 1998). A via intrínseca é ativada em resposta a alterações

intracelulares, incluindo a falta de fatores de crescimento, diferenciação terminal, danos no DNA, estresse no retículo endoplasmático, dentre outros (AUTRET & MARTIN, 2010).

O passo essencial na apoptose regulada pela mitocôndria é a permeabilidade da membrana externa mitocondrial (OMM) acompanhado da perda do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), que é usado como um indicador de apoptose. A permeabilidade é seguida da liberação de citocromo C que ativam caspases, e um segundo ativador de caspase derivado da mitocôndria (SMAC também conhecido como DIABLO) dentro do citoplasma. Junto com o adaptador fator ativador de protease-apoptótica 1 (APAF 1), o citocromo C participa da montagem do complexo supramolecular conhecido como apoptossomo, que servirá como andaime para a ativação da cascata das caspases. SMAC neutraliza a atividade caspase inibitória de XIAP, assim, indiretamente permite o desenvolvimento da cascata de caspases (WANG, 2001; GREEN, 2005, RUDEL et al. 2010).

Os apoptossomos ativam a caspase 9 ou diretamente, as caspases efetadoras (GARCIA-SAEZ et al. 2010; WESTPHAL et al. 2011). As caspases 3, 6 e 7 ativam endonucleases, que clivam o DNA, e ativam outras proteases responsáveis pela degradação dos diferentes substratos celulares, resultando na morte da célula (LI & YUAN 2008; HUBER et al. 2011) (Figura 6).

A permeabilidade da membrana externa mitocondrial é hermeticamente controlada por membros da família de proteínas do Linfoma de células B 2 (Bcl-2). O proto-oncogene *bcl-2* foi originalmente descoberto no locus de imunoglobulinas como resultado de uma translocação cromossômica t(14;18) em linfoma folicular em humanos (TSUJIMOTO et al., 1989). Este gene codifica para proteínas

associadas à membrana que são localizadas na membrana mitocondrial e na membrana perinuclear (TSUJIMOTO & CROCE, 1985).

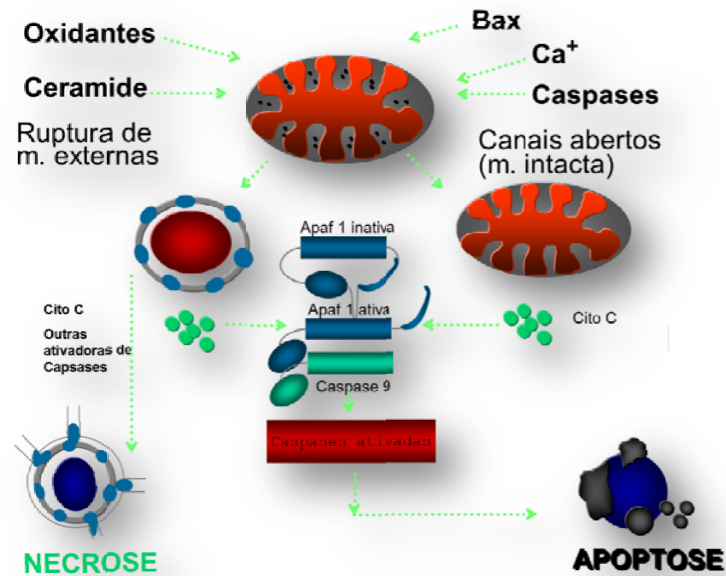


Figura 6: Representação esquemática da via intrínseca da apoptose. Diversos estímulos alteram a permeabilidade da membrana mitocondrial, levando a liberação de citocromo C para o citosol e a formação do apoptossomo. Caspase-9 ativa propaga a cascata proteolítica de eventos futuros de ativação de caspases efetoras.

A família Bcl-2 compreende membros pró apoptóticos e anti apoptóticos. Os membros altamente conservados da família com propriedades anti apoptóticas são Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 e A1 que contêm quatro domínios BH, dos quais o BH-1-BH-3 estruturalmente formam um pacote capaz de se ligar ao domínio BH3 de

outros membros da família. Diferente dos membros anti apoptóticos, os membros pró apoptóticos podem ser subdivididos pelo número de domínios BH que eles possuem. Os membros pró apoptóticos multi domínio mais conservados (Bax, Bak e Bok) possuem os domínios BH1, BH2 e BH3. Em contraste, os membros “BH3-only” (Bid, Bad, Bim, Bik, Noxa e Puma) contêm somente o domínio de morte BH3 e não tem seqüência conservada fora deste domínio (OPFERMAN & KORSMEYER, 2003, CHIPUK et al., 2010).

Membros como Bcl-2 e Bcl-xL localizam-se na membrana mitocondrial, regulando proteínas formadoras de poros e controlando a permeabilidade da mitocôndria. As pró-apoptóticas, como Bax formam homo e heterodímeros. A dimerização de Bax resulta em sua translocação (WESTPHAL et al. 2011) e inserção na membrana mitocondrial, inibindo as proteínas anti-apoptóticas, causando disfunção mitocondrial, aumento de sua permeabilidade e liberação dos fatores apoptóticos, como citocromo C, proteína SMAC e AIF (CHINNADURAI et al., 2008; CASTANIER & ARNOUIT 2010, CHIPUK et al., 2010; LINDSAY et al. 2011). Esses fatores induzem a cascata proteolítica das caspases, ativação de endonucleases, condensação da cromatina, e fragmentação do DNA, levando a morte celular (HACKER 2000; AUTRET & MARTIN 2010).

A interação de células de mamíferos com bactérias patogênicas resulta em uma variedade de respostas na célula infectada, incluindo internalização ou fagocitose da bactéria, liberação de citocinas, secreção de defensinas ou produção de radicais livres de oxigênio (GRASSMÉ et al., 2001). Porém, muitas bactérias desenvolveram mecanismos diferentes, igualmente eficazes para

manipular as vias de morte do hospedeiro e beneficiar sua proliferação (LUO 2011).

Tal manipulação pode ser obtida por direcionamento da atividade de uma ou mais proteínas essenciais do hospedeiro em cada etapa das vias apoptóticas. Por exemplo, muitos vírus codificam para proteínas que inibem especificamente a apoptose de células infectadas por interatuar diretamente com os membros pró-apoptóticos das proteínas BH3-only (ROULSTON et al., 1999; EVERETT & MCFADDEN, 2002).

Similarmente alguns patógenos bacterianos intracelulares obrigados, como a *Chlamydia trachomatis* e a *Rickettsia rickettsii*, inibem ativamente a apoptose (CLIFTON et al., 1998; FAN et al., 1998; RAJALINGAM et al., 2001). *Ehrlichia ewingii* atrasa a apoptose espontânea de neutrófilos por estabilizar o potencial de membrana mitocondrial (XIONG et al., 2008). Na ehrliquiose humana causada pela *Anaplasma phagocytophila* a inibição da apoptose de neutrófilos inclui inibição da perda do potencial de membrana mitocondrial, da translocação de Bax para a mitocôndria, da ativação de caspase 3 (GE et al., 2005; Ge et al., 2006) e do bloqueio de Fas (CD95/Apo-1) (BORJESSON et al., 2005; YOSHIIE et al., 2000). A *E. chaffeensis* é capaz de modular os inibidores de *NF-κB* e da apoptose (ZHANG et al., 2004), inibindo a apoptose nas células infectadas (RIKIHISA, 2006).

3. Referências Bibliográficas

ABARCA, K. et al. *Anaplasma platys* in dogs, Chile. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, n.9, p.1392-1395, 2007.

ADAMS, J. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. **Genes Development**, v. 17, n. 20, p. 2481-2495, 2003.

AGUIAR, D. et al. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, v.37, p.796-802, 2007a.

AGUIAR, D. et al. Prevalence of ehrlichia canis (Rickettsiales: *Anaplasmataceae*) in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: *Ixodidae*) ticks from Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 4, n. 1, p. 126-132, 2007b.

ANDEREG, P.; PASSOS, L. Erliquiose canina – Revisão. **Clinica Veterinária**, v. 4, n. 19, p. 31-38, 1999.

ASHKENAZI, A.; DIXIT, V. Death Receptors: signaling and modulation. **Science**, v. 281, p. 1305-1308, 1998.

AUTRET, A.; MARTIN, S. Bcl2 family proteins and mitochondrial fission/fusion dynamics. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, p. 1599-1606, 2010.

BANETH, G. et al. Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection. **Veterinary Microbiology**, v. 136, p. 321-325, 2009.

BELL, A.; PATEL, R. Areal-time combined polymerase chain reaction assay for the rapid detection and differentiation of *Anaplasma Phagocytophilum*, *Ehrlichia*

chaffeensis and *Ehrlichia ewingii*. **Diagnostic Microbiology Infection Disease**, v. 53, p. 301-306, 2005.

BENAVIDES, J.; RAMIREZ, F. Ehrlichiosis canina. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 16, p. 268-273, 2003.

BARBOSA, I.X.S. **Estudo ex vivo da apoptose induzida via TCR em linfócitos T de camundongos *Balb/c* imunizados com o peptídeo sintético SBm7462**. Tese Mestrado. Departamento de Veterinária. Universidade Federal de Viçosa. 120p. 2004.

BORIN, S. et al. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de *Ehrlichia* spp. Naturalmente infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 566-571, 2009.

BORJESSION, D. et al. Insights into pathogen immune evasion mechanisms: *Anaplasma phagocytophilum* fails to induce an apoptosis differentiation program in human neutrophils. **Journal of Immunology**, v. 174, p. 6364-6372, 2005.

BRANGER, S. et al. Evaluation of antibiotic susceptibilities of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Anaplasma phagocytophilum* by real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 4822-4828, 2004.

BULLA, C. et al. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Veterinary Research**, v. 35, n.1, p. 141-146, 2004.

CADMAN, H. et al. A comparison of the dot-blot enzyme linked immunoassay with immunofluorescence for detecting antibodies to *Ehrlichia canis*. **Veterinary Record**, v. 135, n. 15, p. 362, 1994.

CARLOS, R. et al. Freqüência de anticorpos anti- *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* e antígenos de *Dirofilaria immitis* em cães na microrregião Ilhéus – Itabuna, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 3, p. 117-120, 2007.

CARSTEN, G. et al. Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite-host interactions. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 10, p. 480-486, 2001.

CASTANIER, C.; ARNOUIT, P. Mitochondrial dynamics during apoptosis. **Medicine Sciences**, v. 26, p. 830-835, 2010.

CASTRO, M.B. et al. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Veterinary Parasitology**, v. 119, n. 1, p. 73-86, 2004.

CONTRERAS, S.; SANABRIA, E. **Determinación de pacientes positivos a *Ehrlichia canis* mediante prueba de inmunofluorescencia, comparada con diagnóstico clínico, lectura de extendido sanguíneo y cuadro hemático con recuento de plaquetas.** Trabajo de Grado. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia - Universidad Cooperativa de Colombia. 57p, 2006.

COSTA, J. O. et al. *Ehrlichia canis* infection in a dog in Belo Horizonte - Brazil. **Arquivos Escola de Veterinária UFMG**, v. 25, p. 199-200, 1973.

COSTA, Jr. et al. Sero-prevalence and risk indicators for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil. **The Veterinary Journal**, v. 174, n.3, p. 673-676, 2007.

CHINNADURAI, G.; et al. BNIP3 subfamily BH3-only proteins: mitochondrial stress sensors in normal and pathological functions. **Oncogene**, v. 27, s. 1, p. 114-127, 2008.

CHINNAIYAN, A. et al. Signal Transduction by DR3, a Death Domain-Containing Receptor Related to TNRF-1 and CD95. **Science**, v. 274, p. 990, 1996.

CHIPUK, J. et al. The BCL-2 family reunion. **Molecular Cell**, v. 37, p. 299-310, 2010.

CLIFTON, D. et al. NF-kappa B-dependent inhibition of apoptosis is essential for host cell survival during *Rickettsia rickettsii* infection. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 95, p. 4646-4651, 1998.

DANIAL, N.; KORSMEYER, S. Cell death: critical control points. **Cell**, v. 116, p. 205-219, 2004.

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 3-4, p. 173-185, 2008.

DAGNONE, A. Erliquiose nos animais e no homem. **Seminas Agrárias**, v. 22, n. 2, p. 191-201, 2001.

DAGNONE, A. et al. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in south Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 117, p. 285-290, 2003.

DAGNONE, A. et al. Molecular diagnosis of Anaplasmataceae organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, p. 20-25, 2009.

DE ALBORÁN, I. et al. Cell death during lymphocyte development and activation. **Seminars in Immunology**, v. 15, p. 125-133, 2003.

DeLEO, F. Modulation of phagocyte apoptosis by bacterial pathogens. **Apoptosis**, v. 9, p. 399-413, 2004.

DINIZ, P. et al. Serum cardiac troponin I concentration in dogs with ehrlichiosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 5, p. 1136-1143, 2008.

DONATEIN, A.; LESTOQUARD, F. Existence and Algeria d'une rickettsiade du chien. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v. 28, p. 418-419, 1935.

DONEPUDI, M. et al. Insights into the regulatory mechanisms for caspase-8 activation. **Molecular Cell**, v. 11, p. 543-549, 2003.

DONOVAN, M.; COTTER, T. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1644, n. 2-3, p. 133-147, 2004.

DOSEFF, A. Apoptosis: the sculptor of development. **Stem Cells and Development**, v. 13, p. 473-483, 2004.

DOYLE, C. et al. Detection of medically important *Ehrlichia* by quantitative multicolor TaqMan real-time polymerase chain reaction of the *dsb* gene. **The Journal of Molecular Diagnostic**, v. 7, p. 504-510, 2005.

DUMLER, J. 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 designations of *Ehrlichia equi* and HGE agent as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 2145-2165, 2001.

ELMORE S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, p. 495-516, 2007.

EVERETT, H.; McFADDEN, G. Poxviruses and apoptosis: a time to die. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 395-402, 2002.

FAN, T. et al. Inhibition of apoptosis in chlamydia-infected cells: blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 187, p. 487-496, 1998.

FRANK, J. R.; BREITSCHWERDT, E. Retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, n. 3, p. 194-201, 1999.

GAL, A. et al. Detection of *Ehrlichia canis* by PCR in different tissues obtained during necropsy from dogs surveyed for naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis. **The Veterinary Journal**, v. 175, p. 212-217, 2008.

GALLUZI, L. et al. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. **Cell Death and Differentiation**, v. 14, p. 1237-1243, 2007.

GAO, L-Y.; KWAIK, Y. The modulation of host cell apoptosis by intracellular bacterial pathogens. **Trends in Microbiology**, v. 8, p. 306-313, 2000.

GARCIA-SAEZ, A. et al. Permeabilization of the outer mitochondrial membrane by Bcl2 proteins. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 677, p. 91-105, 2010.

GE, Y. et al. *Anaplasma phagocytophilum* inhibits human neutrophil apoptosis via up regulation of bfl-1, maintenance of mitochondrial membrane potential and prevention of caspase 3 activation. **Cellular Microbiology**, v. 7, p. 29-38, 2005.

GE, Y.; RIKIHISA, Y. *Anaplasma phagocytophilum* delays spontaneous human neutrophil apoptosis by modulation of multiple apoptotic pathways. **Cellular Microbiology**. v. 8, p. 1406-1416, 2006.

GOMEZ, F. **Comparación de las técnicas IFAT y frotis sanguíneo para el diagnóstico de ehrlichiosis canina**. Trabajo de Grado - Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Cooperativa de Colombia, 129p. 2002.

GOKCE H.; WOLDEHIWET, Z. Production of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and reactive Nitrogen Intermediates by ovine peripheral blood leukocytes stimulated by *Ehrlichia (cytoecetes) phagocytophila*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 126, p. 202-211, 2002.

GRASSMÉ, H. et al. Molecular mechanisms of bacteria induced apoptosis. **Apoptosis**. v. 6, p. 441-445, 2001.

GREEN, D. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. **Cell**, v. 121, p. 671-674, 2005.

GREY, M. et al. Mitochondrial evolution. **Science**, v. 283, p. 1476-1481, 1999.

GROVES, M.G. et al. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). **American Journal of Veterinary Research**, v. 36, n. 7, p. 937-940, 1975.

HACKER, G. The morphology of apoptosis. **Cell and Tissue Research**, v. 301, n. 1, p. 5-17, 2000.

HARRUS, S. et al. Platelet dysfunction associated with experimental acute canine ehrlichiosis. **Veterinary Record**, v. 139, n. 12, p.290-293, 1996.

HARRUS, S. et al. Clinical manifestations of infectious canine cyclic

thrombocytopenia. **Veterinary Record**, v. 141, n. 10, p. 247-250, 1997.

HARRUS, S. et al. Canine monocytic ehrlichiosis: an update. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 19, p. 431-444, 1997.

HARRUS, S. et al. Acute blindness associated with monoclonal gammopathy induced by *Ehrlichia canis* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 78, n. 2, p. 155-160, 1998.

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

HENGARTNER, M. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-776, 2000.

HIBLER et al. Rickettsial Infections in Dogs. Part II. Ehrlichiosis and Infectious Cyclic Thrombocytopenia. **Compendium on continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 8, n. 2, p.106-114, 1986.

HIDALGO, M. et al. A survey of antibodies against *Rickettsia rickettsi* and *Ehrlichia chafeensis* in domestic animals from a rural area of Colombia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 6, p.1029-1030, 2009.

HUBER H. et al. Mathematical modeling of the mitochondrial apoptosis pathway. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1813, p. 608-615, 2011.

HUXSOLL, D. et al. Tropical canine pancytopenia. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 157, n. 11, p. 1627-1632, 1970.

HSU, H. et al. TRADD-TRAF2 and TRADD-FAAD interactions define two distinct

TNF receptor 1 signal transduction pathways. **Cell**, v. 84, p. 299-308, 1996b.

IQBAL, Z.; RIKIHISA, Y., Application of the polymerase chain reaction for the detection of *Ehrlichia canis* in tissue of dogs. **Veterinary Microbiology**, v. 42, p. 281-287, 1994.

ITOH, N.; NAGATA, S. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 10932-10937, 1993.

KERR, J. et al. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239-257, 1972.

KISCHKEL, F. et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. **EMBO Journal**, v. 14, p. 5579-5588, 1995.

KOMNENOU, A. et al. Ocular manifestations of natural canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 90 cases. **Veterinary Ophthalmology**, v. 10, p. 137-142, 2007.

LABARTHE, N. et al. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis* and *Borrelia burgdorferi* infection in Brazil. **Veterinary Therapeutics**, v. 4, p. 67-75, 2003.

LABRUNA, M.; PEREIRA, M. Carrapatos em cães no Brasil. **Clinica Veterinária**, v. 30, p. 24-32, 2001.

LANDES T.; MARTINOU, J. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the role of mitochondrial fission. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.

1813, p. 540-545, 2011.

LEIVA, M. et al. Ocular signs of canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study in dogs from Barcelona. Spain. **Veterinary Ophthalmology**, v. 8, p. 387-393, 2005.

LEWIS, G. E. et al. The brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* and the dog as experimental hosts of *Ehrlichia canis*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, n. 12, p. 1953-1955, 1977.

LI, J.; YUAN, J. Caspases in apoptosis and beyond. **Oncogene**, v. 27, p.6194-6206, 2008.

LILES, W. Apoptosis- role in infection and inflammation. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 3, n. 10, p. 165-170, 1997.

LINDSAY, J. et al. Bcl-2 proteins and mitochondria-specificity in membrane targeting for death. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1813, p. 532-539, 2011.

LUCATTINI, R. et al. Bacterial proteins predisposed for targeting to mitochondria. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, p. 652-658, 2004.

LUCKSCHANDER, N. et al. [Renal amyloidosis caused by *Ehrlichia canis*]. [Article in German]. **Schweizer Archiv Für Tierheilkunde**, v. 145, n. 10, p. 482-485, 2003.

LUO, Z-Q. Striking a balance: modulation of host cell death pathways by *Legionella pneumophila*. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 1-6, 2011.

MAHAN, S. et al. A preliminary study to evaluate the immune responses induced by immunization of dogs with inactivated *Ehrlichia canis* organisms. **The**

Onderstepoort Journal of Veterinary Research, v. 72, n. 2, p. 119-128, 2005.

MANNA, L. et al. First molecular characterization of a granulocytic *Ehrlichia* strain isolated from a dog in south Italy. **Veterinary Journal**, v. 167, p. 224-227, 2004.

McBride, J. et al. Kinetics of Antibody response to *Ehrlichia canis* immunoreactive proteins. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 5, p. 2516-2524, 2003.

McBride, J. et al. Molecular cloning of the gene for a conserved major immunoreactive 28-kilodalton protein of *Ehrlichia canis*: a potential serodiagnostic antigen. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, n. 3, p. 392-399, 1999.

McBRIDE. J. et al. PCR detection of acute *Ehrlichia canis* infection in dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 8, n. 4, p. 441-447, 1996.

MARSDEN, V.; STRASSER, A. Control of apoptosis in the immune system: Bcl2, BH3-Only proteins and more. **Annual Review of Immunology**, v. 21, p. 71-105, 2003.

MARTIN, S.; GREEN, D. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? **Cell**, v. 82, p. 349-352, 1995.

MEDEMA, J. et al. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). **EMBO Journal**, v. 16, p. 2794-2804, 1997a.

MELO, A. et al. Seroprevalence and risk factors to *Ehrlichia spp.* And *Rickettsia spp* In dogs from the Pantanal region Mato Grosso state, Brazil. **TicksTick-borne Disease**, v. 2, n. 4, 2011.

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

MOREIRA, S. et al. Retrospective study (1998 – 2001) on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, MG, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, p. 141-147, 2003.

MOREIRA, S. et al. Detection of *Ehrlichia canis* in bone marrow aspirates of experimentally infected dog. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 958-960, 2005.

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

NEER, T.M. Canine monocytic granulocytic ehrlichiosis. In: GREENE, C.E. (Ed) **Infectious Disease of the Dog and Cat**. 2 ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1998. p. 139-147.

NEER, T.M. & HARRUS, S. Canine monocytotropic ehrlichiosis and neorickettsiosis (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ruminantium*, *N. sennetsu*, and *N. risticii* infections). In Greene CE, editor. **Infectious disease of the dog and cat**. 3rd edition. St Louis (MO): Saunders Elsevier; 2006. p. 203-216.

NYINDO, M. et al. Cell-mediated and humoral immune responses of German Shepherd Dogs and Beagles to experimental infection with *Ehrlichia canis*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, n. 2, p. 250-254, 1980.

OLIVEIRA, D. et al. Anti- *Ehrlichia canis* antibodies detection by “Dot – ELISA” in naturally infected dog. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 9, n. 1. p. 1-5, 2000.

ORÍA, A. et al. Ophthalmic, hematologic and serologic findings in dogs with suspected *Ehrlichia canis* infections. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 15, n. 2, p. 94-97, 2008.

OPFERMAN, J.; KORSMEYER, S. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. **Nature Immunology**, v. 4, p. 410-415, 2003.

PANCIERA, R.; EWING, S. Confer AW. Ocular histopathology of ehrlichia infections in the dog. **Veterinary Pathology**, v. 38, n. 1, p. 43-46, 2001.

PARRADO, M.; VARGAS, C. **Asociación de los resultados de una prueba serológica (ELISA) y frotis sanguíneo en caninos con sintomatología compatible de Ehrlichiosis**. Trabajo de Grado - Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Universidad de los Llanos, 82p. 2002.

PEREZ, M. et al. Human Infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 110-117, 2006.

PETER, M.; KRAMMER, P. Mechanisms of CD95 (Apo-1/Fas) mediated apoptosis. **Current Opinion in Immunology**, v. 10, p. 545-551, 1998.

RAJALINGAM, K. et al. Epithelial cells infected with *Chlamydomphila pneumonia* (*Chlamydia pneumonia*) are resistant to apoptosis. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 7880-7888, 2001.

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

RISTIC, M.; HOLLAND, C. Canine ehrlichiosis. In: Woldehiwet Z, Ristic N. editors. **Rickettsial and chlamydial disease of domestic animals**. Oxford: Pergamon Press; p.169-186, 1993.

RIKIHISA, Y. et al. Analyses of *Ehrlichia canis* and a canine granulocytic *Ehrlichia* infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 143-148, 1992.

RIKIHISA, Y. *Ehrlichia* Subversion of host innate responses. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, p. 95-101, 2006.

RODRIGUEZ, R. et al. *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatan, Mexico: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 96, p. 239-243, 2003.

ROULSTON, A. et al. Viruses and apoptosis. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 577–628, 1999.

RUDEL, T. et al. Interactions between bacterial pathogens and mitochondrial cell death pathways. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 693-705, 2010.

SALVESEN, G.; RIEDL, S. Caspase mechanisms. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 615, p. 13–23, 2008.

SANTOS, F. et al. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. In dogs from Ribeirao Preto, Brazil. **The Veterinary Journal**, v. 179, n. 1, p. 145-148, 2009.

SCAFFIDI, C. et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. **EMBO Journal**, v. 17, p. 1675-1687, 1998.

SCOTT, F. et al. XIAP inhibits caspase 3 and 7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs. **EMBO Journal**, v. 24, p. 645–655, 2005.

SHAMAS-DIN A. BH3-only proteins: orchestrators of apoptosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1813, p. 508-520, 2011.

SIARKOU, V. et al. Sequence and phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene of *Ehrlichia canis* strains in dogs with clinical monocytic ehrlichiosis. **Veterinary Microbiology**. v. 125, p. 304-312, 2007.

SIRINGIREDDY, K.; GANTA, R. Multiplex detection of *Ehrlichia* and *Anaplasma* species pathogens in peripheral blood by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **The Journal of Molecular Diagnostic**, v. 7, p. 308-316, 2005.

SMITH, R. et al. Development of *Ehrlichia canis*, causative agent of canine ehrlichiosis, in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and its differentiation from a symbiotic *rickettsia*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 37, p. 119-126, 1976.

SMITH, M. et al. Involvement of the p53 tumor suppressor gene in repair of UV-type DNA damage. **Oncogene**, v. 10, p. 1053-1059, 1995.

SOUZA, B. et al. Prevalence of ehrlichia infection among dogs and ticks in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 2, p.89-93, 2010.

STICH, R.W. et al. Host surveys, ixodid tick biology and transmission scenarios as related to the tick-borne pathogen, *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**, v. 158, n. 4, p. 256-273, 2008.

TARTAGLIA, L., GOEDEL, D. Two TNF receptors. **Immunology Today**, v. 13, p. 151-153, 1992.

THORNBERRY, N.; LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. **Science**, v. 281, p. 1312-1316, 1998.

TIBBETTS, M. et al. The Death effector domain protein family: regulators of cellular homeostasis. **Nature Immunology**, v. 4, p. 404-409, 2003.

TSUJIMOTO, Y.; CROCE, C. Analysis of structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 83, p. 5214, 1985.

TSUJIMOTO, Y.; et al. Cloning of Chromosomes break point of neoplastic B cell with t(14:18) chromosome translocation. **Science**, v. 226, p. 1097, 1989.

UNVER, A. et al. Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39. p. 2788-2793, 2001.

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

UNVER, A. et al. An acute severe ehrlichiosis in a dog experimentally infected with a new virulent strain of *Ehrlichia canis*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, s. 1, p. 1-3, 2008.

VARGAS-HERNANDEZ, G. et al. Molecular and serological detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in dogs in Colombia. **Veterinary Parasitology**, v. 186, p. 254-260, 2011.

VAUX, D.; STRASSER, A. The molecular biology of apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 2239-2244, 1996.

VAUX, D. Apoptogenic factors released from mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1813, p. 546-550, 2011.

VERHAGEN, A. et al. Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs, *Genome Biology*, v. 2, p. 1-10, 2001.

VIERA, R. et al. Ehrlichiosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p.1-12, 2011.

VINASCO, J. et al. Molecular evidence of a new strain of *ehrlichia canis* from South America. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 2716-3271, 2007.

WAGNER, E. et al. Development of a p28-based PCR assay for *Ehrlichia chaffeensis*. **Molecular and Cellular Probes**, v. 18, p. 111-116, 2004.

WALKER, J. et al. Clinical and clinicopathologic findings in tropical canine pancytopenia. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 157, n. 1, p. 43-55, 1970.

WANG, X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. **Genes & Development**, v. 15, p. 2922-2933, 2001.

WANER, T. et al. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 69, n. 3-4, p. 307-317, 1997.

WANER, T. et al. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dog with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 1, p. 1-15, 2001.

WEN, B. et al. Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 7, p. 1852-1855, 1997.

WESTPHALD, et al. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1813, p. 521-531, 2011.

XIONG, Q. et al. *Ehrlichia ewingii* infection delays spontaneous neutrophil apoptosis through stabilization of mitochondria. **Journal of Infectious Diseases**, v.197, p.1110-1118, 2008.

YOSHIE, K. et al. Intracellular infection by the human granulocytic ehrlichiosis agent inhibits human neutrophil apoptosis. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 3, p. 1125-1133, 2000.

YU XUE-JIE et al. Restriction and expansion of *Ehrlichia* strain diversity. **Veterinary Parasitology**, v. 143, p. 337-346, 2007.

ZHANG, J. et al. Survival strategy of obligatory intracellular *Ehrlichia chaffeensis*: novel modulation of immune response and host cell cycles. **Infection and Immunity**, v. 72, p .498-507, 2004.

Objetivos

4. Objetivos

Os objetivos deste estudo serão apresentados sob a forma em com que foram desenvolvidos, bem como com os produtos daí gerados envolvendo um resumo expandido e dois trabalhos científicos, um publicado e outro submetido, em periódicos internacionais como segue especificado abaixo:

1. Comparar resultados obtidos em diferentes testes diagnósticos (hemogramas, observação de mórulas nos esfregaços de sangue periférico e de PBMC corados com Giemsa, RIFI em soro, *nested* PCR do sangue) após a infecção experimental com o isolado Jaboticabal da *E. canis*, e verificar qual a melhor alternativa para o diagnóstico na fase aguda da infecção (*Resumo expandido apresentado no XV ENAPAVE Encontro Nacional de Patologia Veterinária. I Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária. 26-30 de Setembro de 2011. Goiânia, Goiás. Brasil*).
2. Avaliar e quantificar morfometricamente a apoptose nas células do baço, linfonodos, fígado e rim de cães inoculados experimentalmente com *E. canis*, utilizando a reação de TUNEL e a imunohistoquímica para Bax e Bcl-2, pró e anti-apoptóticas, respectivamente, para se verificar o envolvimento da via intrínseca de apoptose. (Publicado em: *Ciência Rural, Santa Maria, v.42, n.8, p.1457-1463, agosto, 2012*);
3. Avaliar a expressão gênica de moléculas apoptóticas: Bax, Bcl-2, caspases 3, 8 e 9, mediante o uso do RT-PCR em tecidos como baço, linfonodos,

medula óssea, fígado, rim e coração para se elucidar o envolvimento das vias apoptóticas.

(Submetido ao *Veterinary Microbiology*, em Maio de 2013)

CAPITULO I

DIAGNÓSTICO DA EHRLIQUIOSE CANINA EXPERIMENTAL NA FASE AGUDA DA DOENÇA.

XV ENAPAVE Encontro Nacional de Patologia Veterinária. I Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária. 26-30 de Setembro de 2011. Goiânia, Goiás. Brasil.

Irma Ximena Barbosa Sanchez^{1,2}, Teresa de Jesus Oviedo Socarrás^{1,3},
Rosângela Zacarias Machado⁴, Anilton Cesar Vasconcelos⁵

¹ Doutoranda do Departamento de Patologia Geral/Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. E-mail: irxiba@hotmail.com, isanchez@ut.edu.co (autor correspondente).

² Professora do Departamento de Sanidade Animal, Laboratório de Patologias, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidad del Tolima Colômbia.

³ Professora da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de Córdoba, Colômbia.

⁴ Professora da Faculdade de Ciências Agrárias y Veterinárias (FCAV) Departamento de Patologia, Universidade Estadual Paulista, Julho de Mesquita Filho, campus Jaboticabal, São Paulo Brasil.

⁵ Professor do Departamento de Patologia Geral/Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

PALAVRAS-CHAVE: nPCR, RIFI, *E. canis*, Esmregaços sanguíneos, papa leucocitária

1. ABSTRACT

DIAGNOSIS OF ACUTE EXPERIMENTAL CANINE EHRLICHIOSIS

The canine monocytic ehrlichiosis is a bacterial disease caused by *Ehrlichia canis*, a gram negative, intracytoplasmic agent that infects lymphocytes and monocytes of dogs. The diagnosis of the infection is routinely based on clinical and hematological features, on the cytologic evaluation of blood smears, and by serological and molecular techniques. In order to correlate the results of different methods of diagnosis in acute phase of infection 4 clinically healthy male dogs aged between 6 and 8 months were inoculated intravenously with 3 mL of complete blood containing *E. canis* (Jaboticabal strain). 3 dogs with similar characteristics were inoculated with 3 mL of sterile saline solution to serve as

Controls. Weekly and 35 days post inoculation blood samples were taken to carry out smears, blood counts, immunofluorescence and nPCR. Animals were clinically examined daily and rectal temperature was measured. Infected animals become positive at 14 post-inoculation day for nPCR and at day 21 for IFA. Blood smears were negative for both groups on all dates. Therefore, the most reliable alternative for the early diagnosis of experimental canine ehrlichiosis in the acute phase is the nPCR.

KEYWORDS: nPCR, IFA, *E. canis*, Blood Smears, Buffy coat.

2. INTRODUÇÃO

A trombocitopenia tropical canina é uma zoonose bacteriana (RIKIHISA *et al.*, 1992) causada pela *Ehrlichia canis*, um microrganismo Gram negativo, intracitoplasmático obrigatório que pertence à Ordem *Rickettsiae*, Família *Anaplasmataceae* (DUMLER *et al.*, 2001), e infecta linfócitos e monócitos. O diagnóstico é rotineiramente baseado nas características clínicas e clínico-patológicas que não são muito específicas (HARRUS *et al.*, 1997a), na avaliação citológica em esfregaços sanguíneos de sangue periférico e/ou papa leucocitária (PBMC) (MILONAKIS *et al.*, 2003), na sorologia (RIFI, ELISA, Western immunoblotting) (MAHAN & KELLY, 2005), e em técnicas de biologia molecular (HARRUS & WANER, 2011). O objetivo deste trabalho foi comparar resultados obtidos em diferentes testes diagnósticos (hemogramas, observação de mórulas nos esfregaços de sangue periférica e de PBMC corados com Giemsa, RIFI em soro, nPCR do sangue completo) após a infecção experimental com o isolado Jaboticabal da *E. canis*, e verificar qual a melhor alternativa para o diagnóstico na fase aguda da infecção.

3. MATERIAL E METODOS

Sete cães SRD, clinicamente saudáveis, livres de carrapatos, com idades entre 6 e 8 meses, provenientes do canil experimental do Departamento de Patologia da FMVZ da Universidade Estadual Paulista (UNESP Jaboticabal), foram divididos em dois grupos com 4 (infectados) e 3 (controles) animais. Cada cão no grupo infectado foi inoculado via EV com 3 mL de sangue infectado por *E. canis* isolado Jaboticabal. No grupo controle os animais foram inoculados com 3 mL de PBS. Os cães foram mantidos sob condições de isolamento e de conforto ambiental, alimentados com ração comercial duas vezes ao dia e água *ad libitum*.

Amostras do sangue foram coletadas de todos os cães em tubos com e sem EDTA mediante venopunção cefálica ou jugular e também do sangue periférico na ponta da orelha de cada animal, no dia 0 e a cada sete dias até 35 dias. As amostras foram processadas para realização de hemogramas, para detecção de inclusões riquetsiais em células da papa leucocitária pela coloração de Giemsa, e para nPCR para *E. canis*. Amostras do sangue venoso foram congeladas em alíquotas de 300 µl em microtubos após a colheita e mantidos a -20°C até seu uso. Para a extração do DNA genômico, foi usado o *QIAamp™ DNA blood Mini Kit* (QIAGEN™, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA extraído do sangue foi identificado e armazenado a -20°C até seu uso. A sequência de oligonucleotídeos iniciadores ECC 5'- AGAACGAACGCTGGCGGCAAGC 3' e reverso ECB 5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA-3' foram usados para amplificar parte do gene 16S de *Ehrlichia*. Posteriormente, o produto foi submetido ao iniciador ECAN5 5'-CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA- 3' e à sequência reversa HE3 5'- TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT-3'

específicos para *E. canis*, conforme desenvolvido por MURPHY et al. (1998) e padronizado por NAKAGHI et al. (2008) e DAGNONE et al. (2009).

O soro foi submetido ao RIFI para *E. canis*. Os resultados obtidos foram submetidos a análise estatística (Programa *GraphPad InStat*) sendo realizados testes de correlação de *Pearson*, o Teste de *Tukey* para comparação de médias (programa *SAS/STAT*), e regressões para p até 10% com R^2 ajustado. Além disto, foi realizada análise de contingência e teste de qui-quadrado com nível de significância (α) em 0,05.

4. RESULTADOS

Nos hemogramas o número total de leucócitos diferiu para cada grupo e tempo: Os animais infectados tiveram menos leucócitos que no dia 0 nos dias 7, 14, 21, 28, e 35 pós-inoculação, sendo que os valores mais baixos foram encontrados nos dias 7 ($4,8 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$), 14 e 35 ($6,10 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$).

Tabela 1. Contagem de leucócitos (WBC) ($\times 10^3/\mu\text{L}^{-1}$) por tratamento e tempo

Tempo (dias)	0	7	14	21	28	35
Controle (1)	11,10 Aa	9,43 Aa	8,97 Aa	9,20 Aa	9,27 Aa	9,10 Aa
Inoculado (2)	11,20 Aa	4,80 Bc	6,10 Bbc	8,03 Ab	8,60 Aab	6,10 Bbc

*Letras maiúsculas diferentes na coluna diferem para o tratamento pelo Teste de Tukey $P \leq 0,05$

**Letras minúsculas diferentes nas linhas diferem no dia pelo Teste de Tukey $P \leq 0,05$

As regressões foram feitas para p até 10% e R^2 ajustado.

Tratamento 1, $R^2 = 82,4\%$ Tratamento 2 $R^2 = 95,77\%$

***Valores de referência canina (WBC): 6,0-18,0 ($\times 10^3/\mu\text{L}^{-1}$)

Tabela 2. Contagem de hemácias (x10E6/ μ L) por tratamento e tempo

Tempo (dias)	0	7	14	21	28	35
Controle (1)	7,8 Aa	7,6 Aa	7,45 Aa	7,25 Aa	7,46 Aa	7,28 Aa
Inoculado (2)	7,05 Ba	6,62 Ba	5,83 Bb	5,07 Bc	5,20 Bbc	5,54 Bbc

*Letras maiúsculas diferentes na coluna diferem para o tratamento pelo Teste de Tukey P \square 0,05

**Letras minúsculas diferentes nas linhas diferem no dia pelo Teste de Tukey P \square 0,05

As regressões foram feitas para p ate 10% e R² ajustado. Modelo quadrático.

Tratamento 1, R² = 57,77% Tratamento 2 R² = 95,30%

***Valores de referência canina (hemácias): 5,5-7,5 (X10E6/ μ L)

O número de hemácias foi sempre mais alto no grupo controle. Nos infectados os dias 14, 28 e 35 apresentaram valores estatisticamente iguais e no dia 21 o valor obtido para as hemácias foi mais baixo (5,07 x 10⁶ μ L⁻¹).

Tabela 3. Hematócrito (Ht) (%) por tratamento e tempo

Tempo (dias)	0	7	14	21	28	35
Controle (1)	53,47 Aa	51,8 Aa	51,16 Aa	49,97 Aa	51,43 Aa	50,20 Aa
Inoculado (2)	48,25 Aa	44,6 Ba	39,6 Bb	34,28 Bc	35,58 Bbc	37,72 Bbc

*Letras maiúsculas diferentes na coluna diferem para o tratamento pelo Teste de Tukey P \square 0,05

**Letras minúsculas diferentes nas linhas diferem no dia pelo Teste de Tukey P \square 0,05

As regressões foram feitas para p ate 10% e R² ajustado.

Tratamento 1, R² = 79,02% Tratamento 2 R² = 94,06

***Valores de referência canina (Ht): 37-55 (%)

As plaquetas estavam diminuídas nos infectados para todas as datas e o menor valor ocorreu no dia 14 após a inoculação (88,50 x 10³ μ L⁻¹). Os infectados mostraram positividade para *E. canis* por imunofluorescência a partir da terceira semana e por nPCR a partir da segunda semana PI.

Tabela 4. Contagem de plaquetas (x10E3/ μ L) por tratamento e tempo

Tempo (dias)	0	7	14	21	28	35
Controle (1)	310,67 Aa	288,33 Aa	223,67 Aa	281,00 Aa	299,67 Aa	274,33 Aa
Inoculado (2)	325,75 Aa	210,00 Ab	88,50 Bbc	105,25 Bc	90,25 Bc	98,00 Bc

*Letras maiúsculas diferentes na coluna diferem para o tratamento pelo Teste de Tukey P \leq 0,05

**Letras minúsculas diferentes nas linhas diferem no dia pelo Teste de Tukey P \leq 0,05

As regressões foram feitas para p ate 10% e R² ajustado.

Tratamento 1, R² = 57,77% Tratamento 2 R² = 95,30%

***Valores de referência canina (plaquetas): 180-400 (X10E3/ μ L)

Os esfregaços sanguíneos e o PBMC foram negativos para todas as leituras e todos os tempos. O grupo controle apresentou negatividade para *E. canis* em todos os testes realizados. Houve alta associação entre os resultados obtidos na técnica RIFI e a evolução por dias. Semelhantes resultados foram obtidos para nPCR e evolução dos dias. Não houve discordância entre os testes RIFI e nPCR no entanto o nPCR mostrou ser mais precoce que a RIFI.

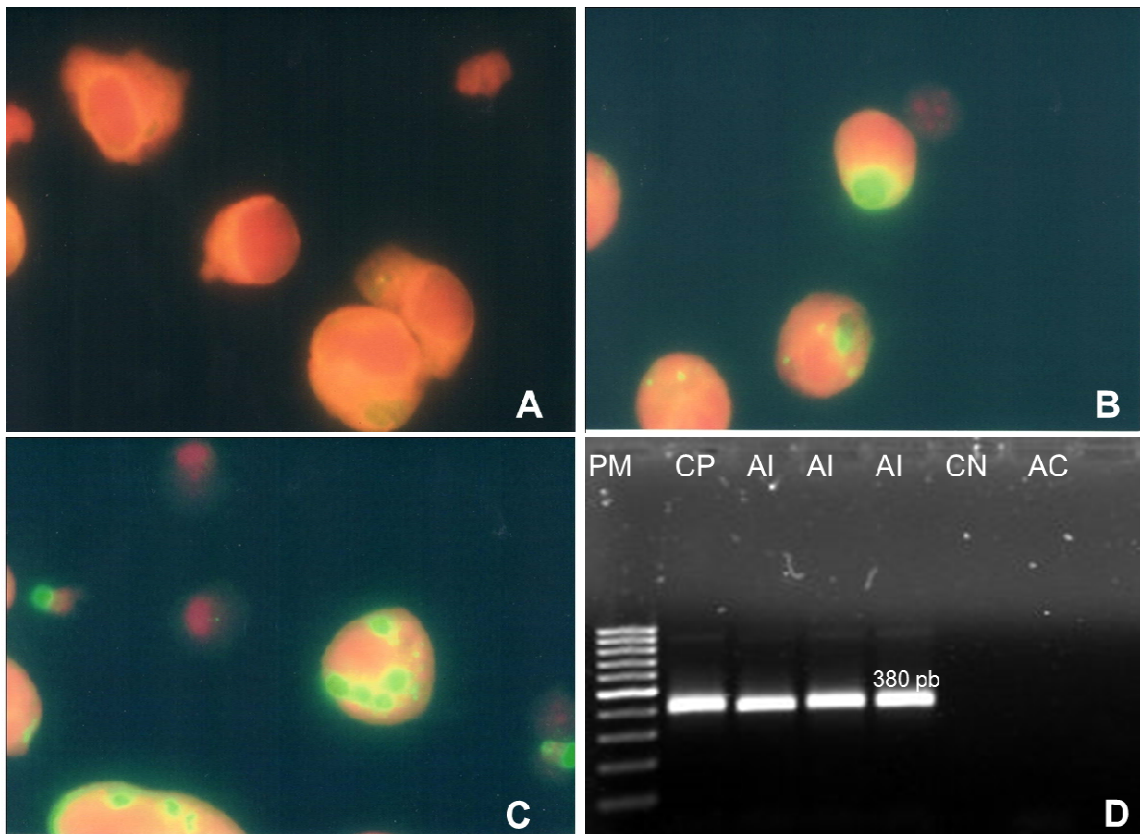


Figura 1. Diagnóstico de *E.canis* por RIFI e nPCR. A, B, C. Microfotografias da técnica de RIFI em células DH82 para identificação de *E.canis*. A. Controle Negativo. B. Controle positivo. C. Animal do grupo Inoculado, 21 dias pós inoculação. Notem-se as mórulas de *E.canis* em verde fluorescente nos monócitos. **D.** Eletroforese em Gel de Agarose de nPCR do DNA extraído do sangue periférico de animais controle e animais inoculados com *E.canis* isolado Jaboticabal 14 dias pós-inoculação. A eletroforese foi desenvolvida sobre gel de agarose 1 %, com 1X de TAE; por 1,10 h a 100V, com 8 µl de cada amostra. Presença de bandas fortes indica positividade ao agente (380 pb). (PM: peso molecular 100 pb, AI: Animal Inoculado, 15 dias pós Inoculação. CP: controle positivo, CN: controle negativo. AC: Animal Controle).

5. DISCUSSÃO

O diagnóstico de ehrliquiose monocítica canina aguda tem atraído a atenção de diferentes pesquisadores. Neste trabalho os sintomas clínicos clássicos como febre alta, anorexia, letargia e perda de peso nos animais experimentalmente infectados coincidem com os achados hematológicos de leucopenia e trombocitopenia, tal como descrito por HARRUS *et al.*, 1997b. Entretanto tais sintomas são inespecíficos e outros agentes podem causar as mesmas alterações hematológicas o que indica a necessidade de testes diagnósticos que complementem as informações obtidas na clínica e garantam um diagnóstico definitivo numa etapa inicial da doença. O uso de esfregaços sanguíneos e de PBMC para o diagnóstico por observação direta do agente não foi convincente, já que estas técnicas demandaram muito tempo para sua análise e não mostraram confiabilidade ao se comparar com técnicas sorológicas e moleculares, mostrando discordância importante. Assim, a técnica de *nested* PCR foi o teste confirmatório definitivo mais precoce e confiável da doença na fase aguda da infecção, seguido da técnica de RIFI.

6. CONCLUSÃO

Existem diferentes métodos laboratoriais para o diagnóstico de erliquiose monocítica canina (citologia, hematologia, sorologia, PCR, Cultura), mas o melhor método para a detecção precoce da infecção por *Ehrlichia canis* ainda na fase aguda da doença em cães domésticos é o nPCR.

7. AGRADECIMENTOS

CNPq, FAPEMIG, FAPESP

8. REFERÊNCIAS

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

DUMLER, J.S. 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 designations of Ehrlichia equi and HGE agent as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.51, p. 2145-2165, 2001.

HARRUS, S., KASS, P., KLEMENT, E., WANER, T. Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. **Veterinary Record**. v. 141, p.360-363, 1997a.

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

MAHAN, S., KELLY, P., MAHAN, S.M. A preliminary study to evaluate the immune responses induced by immunization of dogs with inactivated *Ehrlichia canis* organisms. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**. v. 72, p.119-128, 2005.

MURPHY, G., EWING, S., WHITWORTH, L., FOX, J., KOCAN, A. et al. A molecular and serologic survey of Ehrlichia canis, Ehrlichia chaffeensis, and Ehrlichia ewingii in dogs and ticks from Oklahoma. **Veterinary Parasitology**. v. 79, p. 325-339, 1998.

MYLONAKIS, M., KOUTINAS, A., BILLINIS, C., LEONTIDES, L., KONTOS, V., PAPADOPOULUS, U., RALLIS, T., FYTIANOU, A. Evaluation of cytology in the diagnostic of acute canine monocytic ehrlichiose (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. **Veterinary Microbiology**. v. 91, p.197-204, 2003.

NAKAGHI, A., MACHADO, R., TINUCCI, M., ANDRE, M., BALDANIL, C. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. **Ciência Rural**. v. 38, p. 766-770, 2008.

RIKIHISA, Y., EWING, S., FOX J., SIREGAR, A., PASARIB, F., MALOLE, M.
Analyses of *Ehrlichia canis* and a canine granulocytic Ehrlichia infection. **Clinical
Microbiology**. v. 30, p. 143–148, 1992.

CAPITULO II

**APOPTOSE NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE CÃES DOMÉSTICOS COM
*EHRlichia canis***

Ciência Rural, Santa Maria, v.42, n.8, p.1457-1463, ago, 2012

ISSN 0103-8478

Irma Ximena Barbosa Sanchez I,III Teresa de Jesus Oviedo Socarrás II,III Miguel
Ladino Silva IV, Nubia Braga Pereira III, Rosangela Zacarias Machado V, Anilton
Cesar Vasconcelos III

**APOPTOSIS IN EXPERIMENTAL INFECTION WITH EHRlichia canis IN
DOMESTIC DOGS**

Recebido para publicação 03.11.11 Aprovado em 04.04.12 Devolvido pelo autor
04.06.12. CR-6282

I Laboratorio de Patologías, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ),
Universidad del Tolima (UT), Altos de Santa Helena, 7652000, Ibagué, Tolima,
Colombia. E-mail: isanchez@ut.edu.co. Autor para correspondência.

II Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia,
Universidad de Córdoba (UCO), Montería, Colombia.

III Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas (ICB),
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil.

IV Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias
e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, SP,
Brasil.

V Departamento de Patologia Veterinária, FCAV, UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

1. RESUMO

A Erliquiose canina é uma zoonose causada pela *Ehrlichia canis*, bactéria Gram negativa de distribuição mundial. Alguns cães com erliquiose se tornam portadores assintomáticos enquanto outros desenvolvem uma doença aguda com morte rápida. A apoptose pode ser importante na eliminação de patógenos intracelulares, podendo, nas infecções por *Ehrlichia sp.* e *Anaplasma sp.*, ocorrer modulação da apoptose celular para prolongar a sobrevivência desses organismos. Para avaliação do papel da apoptose na erliquiose canina, sete cães foram distribuídos em dois grupos. No Grupo inoculado, realizou-se a infecção por via intravenosa com sangue infectado com *E. canis* (isolado Jaboticabal), sendo realizada a inoculação com PBS estéril nos animais pertencentes ao Grupo Controle. Semanalmente e até 35 dias pós-inoculação, amostras de sangue foram coletadas e submetidas a n-PCR e reação de imunofluorescência (RIFI) para confirmação da infecção. No 36º dia pós-inoculação, os animais foram eutanasiados, sendo as amostras de baço, linfonodo, rim e fígado coletadas e processadas para as técnicas de TUNEL e imunohistoquímica (Bcl-2, Bax). Verificou-se pela n-PCR que os animais inoculados se tornaram positivos para *E. canis* a partir da segunda semana. Pela RIFI, verificou-se animais com sorologia positiva a partir da terceira semana pós-inoculação. No grupo controle, todos os testes realizados foram negativos para *E. canis*. Apesar da reação de TUNEL mostrar maior incidência de apoptose no Grupo Inoculado, sendo o baço e os linfonodos os órgãos que apresentaram maior marcação, os resultados da imunohistoquímica para Bcl-2 e Bax indicam que a via intrínseca de apoptose não é importante nos órgãos analisados.

Palavras-chave: apoptose, *Ehrlichia canis*, n-PCR, RIFI, TUNEL, Bcl-2, Bax.

2. ABSTRACT

Some dogs infected with *Ehrlichia canis* become asymptomatic while others develop an acute illness followed by quick death. Apoptosis may be an important mechanism for elimination of intracellular pathogens. Also, *Ehrlichia* sp. And *Anaplasma* sp. can modulate apoptosis to extend their survival.

To evaluate the role of apoptosis in canine ehrlichiosis, 7 dogs were assigned into 2 groups, one with 4 animals inoculated intravenously with blood infected with *Ehrlichia canis* (Jaboticabal isolate) and a control with 3 dogs, inoculated with sterile PBS. Blood samples were collected weekly and 35 days post-inoculation to confirm the infection by nPCR and immunofluorescence. Thirty-six days after inoculation the animals were euthanized and samples from spleen, lymph nodes, kidney and liver were collected to carry out the TUNEL technique and immunohistochemistry (Bcl-2, Bax). Inoculated animals became positive for *E. canis* by nPCR already in the second week and by immunofluorescence in the third week after inoculation. The control group showed negative for *E. canis* in all tests. The TUNEL reaction showed a higher incidence of apoptosis in the inoculated group, with stronger labeling in the spleen and lymph nodes. The results of immunohistochemistry for Bcl-2 and Bax suggest that the intrinsic pathway of apoptosis is not important in the analyzed organs.

Key words: apoptosis, *Ehrlichia canis*, n-PCR, IFA, TUNEL, Bcl-2, Bax.

3. INTRODUÇÃO

A trombocitopenia tropical canina é causada por *Ehrlichia canis*, bactéria Gram negativa, intracitoplasmática obrigatória (MANNA et al., 2004; YU XUE-JIE et al., 2007) da ordem *Rickettsiales* e família *Anaplasmataceae* (DUMLER et al., 2001), sendo encontrada no citoplasma dos mononucleares dos cães infectados, com transmissão pela picada do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* infectado (LABRUNA & PEREIRA, 2001; MELO et al., 2011).

Essa bactéria apresenta genoma mundialmente bem conservado, visto o gene 16S rRNA ser 99,9 a 100% idêntico nos diferentes isolados das Américas do Sul e do Norte e da Ásia (SIARKOU et al., 2007). AGUIAR et al. (2007), comparando o genótipo de uma cepa isolada no ano de 1993 na cidade de Jaboticabal, estado de São Paulo, Brasil, com a sequência Norte-Americana/Oklahoma disponível no GeneBank sob o registro M73221.1, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/M73221.1>) considerada padrão mundial para o diagnóstico sorológico, encontraram 100% de similaridade entre elas.

A resposta imunológica não se encontra ainda bem caracterizada em cães infectados pela *E. canis* (HESS et al., 2006). Cães infectados e assintomáticos provavelmente ocorrem devido à tolerância ou à inadequada defesa imunológica (RIKIHISA, 2006). Por outro lado, a apoptose tem importante papel na regulação da resposta imunológica e na eliminação e infecção de patógenos intracelulares (GRASSMÉ et al., 2001). A célula infectada pode sofrer apoptose na presença de vários agentes, embora alguns patógenos sejam capazes de inibi-la (DELEO, 2004). Estudos recentes têm demonstrado que os gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma* possuem sofisticados mecanismos de evasão do sistema imune inato. Na infecção

por *Anaplasma phagocytophila*, verifica-se inibição da apoptose espontânea de neutrófilos humanos através do bloqueio de Fas (CD95/Apo-1) (BORJESSON et al., 2005). Em comparação, na infecção por *Ehrlichia chaffeensis*, observa-se a capacidade de modulação da ação de inibidores da NF- κ B e da apoptose (ZHANG et al., 2004), inibindo a apoptose nas células infectadas (RIKIHISA, 2006).

O presente trabalho avaliou e quantificou a apoptose nas células do baço, linfonodos, fígado e rim de cães inoculados experimentalmente com *E. canis*, utilizando a reação de TUNEL para a sua detecção. Além disso, utilizou-se da imunohistoquímica para as moléculas Bax e Bcl-2, pró e anti-apoptóticas, respectivamente, para se verificar o envolvimento da via intrínseca.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se a amostra de *E. canis* isolado Jaboticabal, obtida no ano de 1993 e mantida na forma de sangue congelado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), em Jaboticabal, estado de São Paulo (MACHADO, R.Z., dados não publicados).

4.1 Animais experimentais

Sete cães sem raça definida (SRD), provenientes e mantidos no Canil de Experimentação da UNESP, Campus Jaboticabal, clinicamente saudáveis e livres de carrapatos, com idades entre seis a oito meses, foram aleatoriamente alocados em dois grupos: um de quatro (G I - Inoculado) e outro de três animais (G II -

Controle). Cada cão no G I foi inoculado via endovenosa com 3ml de sangue infectado (cepa Jaboticabal), e em cada animal do G II foi injetado via intravenosa com 3ml de PBS estéril. Todos os animais foram acompanhados por 35 dias após a aplicação, mantidos em isolamento sob condições controladas de temperatura ambiente, sendo alimentados com ração comercial duas vezes ao dia e recebendo água *ad libitum*. Do nascimento até o início do experimento, todos os animais foram mensalmente submetidos à coleta de fezes para o diagnóstico e tratamento de parasitas intestinais. Uma semana antes da inoculação experimental, os animais foram submetidos a coletas de sangue para testes sorológicos (Reação de Imunofluorescência Indireta - RIFI), para confirmação de ausência de infecção ou contato prévio com *Babesia canis*, *Leishmania* spp. e *E. canis*. Os animais e o canil receberam aplicação de carrapaticida mensal e quinzenalmente, respectivamente.

4.2 Coleta de amostras sanguíneas

Amostras do sangue venoso foram coletadas de todos os cães em tubos com e sem EDTA (Becton Dickinson, Meylan, França), mediante venopunção cefálica ou jugular no dia 0 (antes da inoculação) e a cada sete dias, até os 35 dias pós-inoculação. Essas amostras foram utilizadas para a detecção de inclusões em células mononucleares do sangue periférico (*peripheral blood mononuclear cell*, PBMC) pela coloração de Rosenfeld e para a extração de DNA a ser submetido a n-PCR para diagnóstico de *E. canis*. Os soros obtidos foram utilizados para realização da RIFI para diagnóstico de *E. canis*.

4.3 Amostras de tecidos

Trinta e seis dias após a inoculação, os animais de ambos os grupos foram eutanasiados por super-dosagem de tiopental sódico 7,5% (75mg kg⁻¹), sendo coletadas e processadas amostras de baço, fígado, rim e linfonodos para a reação de TUNEL (*Terminal deoxinucleotidil transferase Uracil Nick End Labeling*) e de imunohistoquímica para a detecção da presença de Bax e Bcl-2. As imagens obtidas da técnica de TUNEL foram submetidas à morfometria para quantificação do índice apoptótico em analisador de imagens (Image Pro-Plus versão 4.5.0.29 para Windows®, Media Cybernetics Inc, EUA).

4.4 Avaliações de apoptose

Determinação do índice apoptótico em amostragem

A quantificação da apoptose foi feita em amostras de baço, fígado, rim e linfonodos de animais dos grupos I e II, submetidas à reação de TUNEL, sendo o índice apoptótico obtido pela fórmula: Índice apoptótico (IA)= (n° de células TUNEL positivo/ n° de células totais) x 100.

4.5 Marcações *in situ* para detecção de apoptose pela reação de TUNEL

Utilizou-se *kit* comercial para a detecção da fragmentação do genoma (*TdT-FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit*, Calbiochem®, EUA). Lâminas carregadas positivamente (CMS-2, Amitel®, Brasil), contendo as secções das amostras dos órgãos coletados foram processadas de acordo com as instruções do fabricante. Quantificou-se o número de células mononucleares positivas à

reação de TUNEL no número mínimo de campos achados para cada amostra, como descrito por MORO et al. (2003), sendo o resultado expresso em porcentagem (IA) para cada órgão.

4.6 Reação imunohistoquímica com o anticorpo anti-Bax

Para a reação com o anticorpo anti-Bax, seguiu-se o protocolo utilizado por RODRIGUES et al. (2011). As lâminas foram incubadas em xilol, seguidas de lavagem em série decrescente de etanol (100%, 90%, 80% e 70%) e PBS 1x. Para a recuperação antigênica, utilizou-se ácido cítrico 10 mM pH 6.0 em banho úmido por 20 minutos a 95°C. Para o bloqueio da peroxidase endógena, foi utilizado *Peroxidase block (Peroxidase Detection System, Novocastra™, Inglaterra)* por 15 minutos, em temperatura ambiente, sendo as lâminas enxaguadas em PBS e a seguir incubadas com anticorpo primário anti-Bax (*Polyclonal Rabbit Anti-Human Bax, Dako®, Dinamarca*) na diluição de 1:1.000, durante toda a noite em temperatura ambiente. A seguir, foram lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo secundário biotilado (*Peroxidase Detection System, Novocastra™, Inglaterra*) por uma hora em temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram enxaguadas com PBS, seguida da aplicação de Streptoavidina-HRP (*Peroxidase Detection System, Novocastra™, Inglaterra*) em câmara úmida por 30 minutos, à temperatura ambiente. Para a revelação, utilizou-se *DAB Chromogen* na diluição de 1:20 por 5 minutos. Como contra-coloração, foi utilizada hematoxilina de Mayer's por 15 segundos.

4.7 Reação imunohistoquímica com o anticorpo anti-Bcl-2

Empregou-se o mesmo protocolo, utilizando-se como anticorpo primário anti-Bcl-2 (*Monoclonal mouse anti-human BCL2 Oncoprotein clone 124*, Dako®, Dinamarca) na diluição de 1:200. Além disso, a solução de recuperação antigênica foi trocada por Tris EDTA pH 8,0 (Tris HCL 0,152g, Tris Base 1,094g, EDTA 3,36g em 1000ml de água destilada), conforme recomendado pelo fabricante.

4.8 Nested-PCR

Amostras do sangue venoso foram congeladas em alíquotas de 300 µl em microtubos após a colheita e mantidos a -20°C até seu uso. Para a extração do DNA genômico, foi usado o *QIAamp™ DNA blood Mini Kit* (QIAGEN™, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA extraído foi identificado e armazenado a -20°C até seu uso. A sequência de oligonucleotídeos iniciadores ECC 5'- AGAACGAACGCTGGCGGCAAGC 3' e reverso ECB 5'- CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA-3' foram usados para amplificar parte do gene 16S de *Ehrlichia*. Posteriormente, o produto foi submetido ao iniciador ECAN5 5'- CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA- 3' e à sequência reversa HE3 5'- TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT-3' específicos para *E. canis*, conforme desenvolvido por MURPHY et al. (1998) e padronizado por NAKAGHI et al. (2008) e DAGNONE et al. (2009).

4.9 Análise estatística dos resultados obtidos

Os resultados da RIFI e da n-PCR foram submetidos a testes de correlação de Pearson (Instat, Versão 5, GraphPad, EUA) e ao teste de Tukey para comparação de médias e regressões para P até 10% com R2 ajustado (SAS/STAT, SAS,

EUA). Além disso, foi realizada análise de contingência e teste de qui-quadrado. Os resultados obtidos na reação de TUNEL foram avaliados quanto à distribuição Gaussiana pelo teste de Shapiro-Wilk. Quando apresentavam distribuição normal, utilizou-se teste t não pareado, sendo os resultados apresentados como média \pm erro padrão. Quando os resultados não se enquadravam na curva de Gauss, foi aplicado o teste *Mann Whitney* (não paramétrico) e apresentados como mediana e amplitude. Valores de $P < 0,005$ foram considerados significativos.

5. RESULTADOS

Os animais infectados mostraram positividade para *E. canis* por n-PCR a partir da segunda semana pós inoculação (PI) e por imunofluorescência a partir da terceira semana, sendo o PBMC negativo para todas as leituras. O grupo controle apresentou negatividade em todos os testes realizados. A n-PCR mostrou ser mais precoce na detecção dos animais infectados com *E. canis* do que com as demais técnicas empregadas neste estudo.

5.1 Técnica de TUNEL e imunohistoquímica para a detecção de moléculas Bcl-2 e Bax

Houve marcação para a fragmentação genômica *in situ* nos tecidos estudados nos dois grupos, reconhecida pela presença de grumos pardo amarronzados intranucleares. A marcação por TUNEL foi sempre maior nos tecidos dos animais inoculados do que nos controles (Figura 1). Não foi observada marcação histoquímica no rim em nenhum dos animais dos grupos testados, sendo que os

órgãos dos animais inoculados que mostraram marcação mais intensa e difusa foram o baço e os linfonodos (Figura 1B, 1D).

5.2 Índices apoptóticos

No baço, o grupo inoculado apresentou maior índice apoptótico (mediana = 7,02 variando de 1,471 a 15,02) que o grupo controle (mediana = 2,085, variando de zero a 4,889), com $p < 0,0001$ (*Mann Whitney*). Nos linfonodos, o grupo inoculado apresentou maior índice apoptótico (mediana = 6,508, variando de 0,85 a 18,29) que o grupo controle (mediana = 1,843, variando de zero a 3,902), com $P < 0,0001$. No fígado, o grupo inoculado também apresentou maior índice apoptótico (mediana = 2,198, variando de zero a 6,667) que o grupo controle (mediana = 0,9804, variando de zero a 3,902), com $P < 0,0001$.

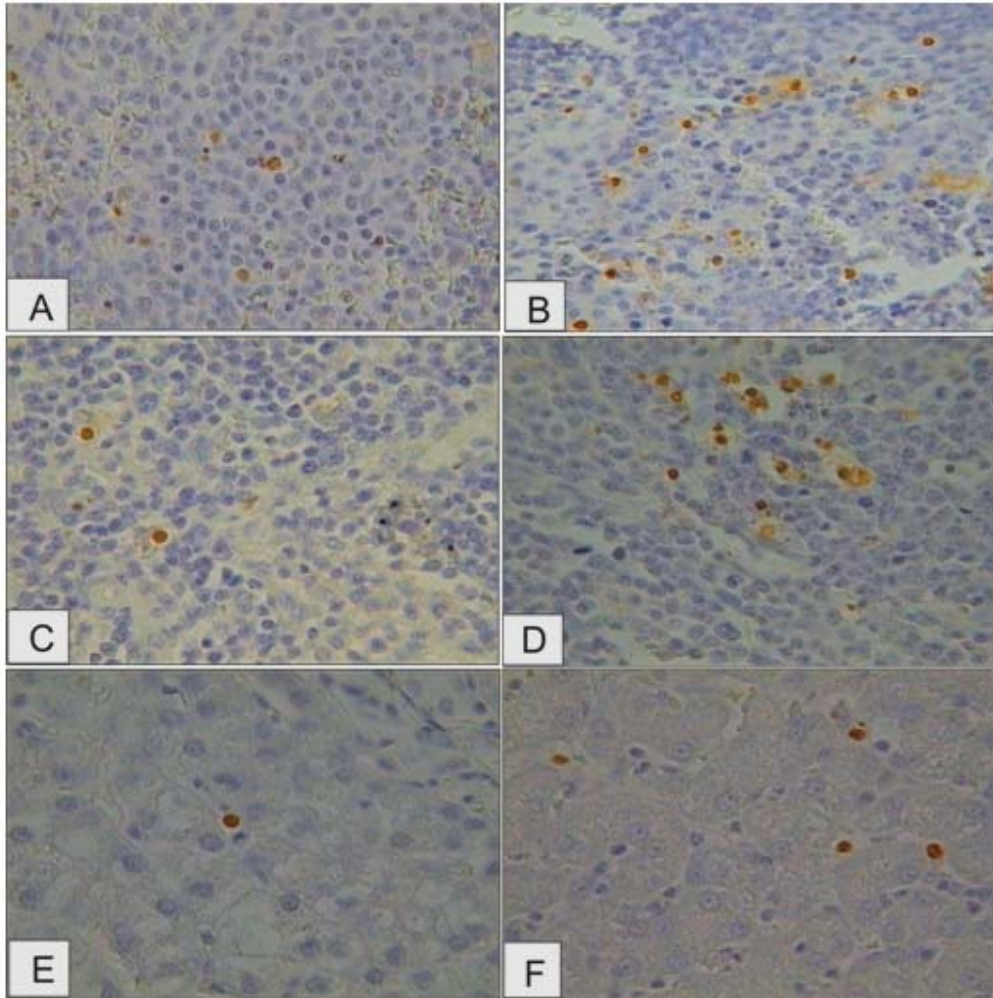


Figura 1 - Técnica de TUNEL. A, C e E. Fotomicrografias mostrando células TUNEL positivas em amostras de baço, linfonodo e fígado de animal do grupo controle, respectivamente (40X). B, D e F. Fotomicrografias mostrando células TUNEL positivas em amostras de baço, linfonodo e fígado de animal do grupo inoculado, respectivamente (40x). Notam-se núcleos condensados e com grumos castanho-amarronzados, caracterizando as células positivas à reação de TUNEL (com fragmentação do genoma), realizada em secções incluídas em parafina com diaminobenzidina (marrom) como cromógeno e contra-coloração com hematoxilina. ×400.

5.3 Técnicas imunohistoquímicas

Nas lâminas tratadas com anticorpos anti- Bax e anti-Bcl-2, células dos órgãos avaliados exibiram grumos castanho-amarronzados no citoplasma e núcleo (Figura 2), evidenciando marcações positivas para proteínas pró-apoptóticas (Bax) e anti-apoptóticas (Bcl-2) presentes tanto nos animais do grupo inoculado, quanto nos animais do grupo controle. O baço, o linfonodo e o fígado de animais do Grupo Inoculado apresentaram marcação de Bcl-2 mais intensa e mais difusa do que de Bax. No Grupo Controle, verificou-se maior marcação de Bax. No rim também houve maior expressão de Bcl-2 no grupo inoculado. Diferentemente dos outros órgãos, não foi detectada marcação para Bax nas células renais.

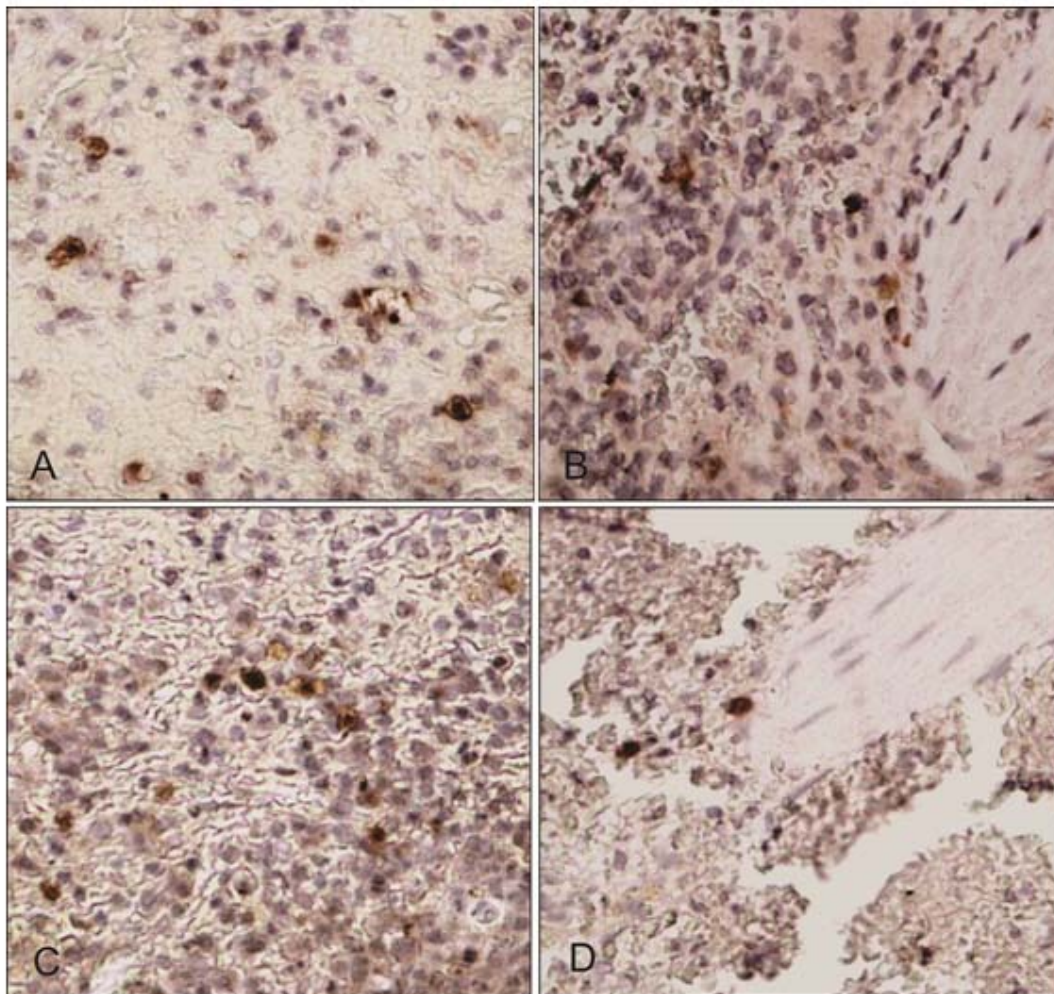


Figura 2 - Imunohistoquímica para detecção de Bcl-2 (A e B) e Bax (C e D): A e C. Fotomicrografias de amostras de baço de animal do grupo controle (40X) e B e D de animal do grupo inoculado (40x). Notam-se grumos castanho-amarronzados no citoplasma e núcleo, caracterizando as células positivas, expressando a proteína anti-apoptótica Bcl2 e pró-apoptótica Bax, em secções incluídas em parafina com diaminobenzidina (marrom) como cromógeno e contra-coloração com hematoxilina.

6. DISCUSSÃO

A escassez de informação específica sobre apoptose na infecção com a *E. canis* e as referências em outras infecções similares (GE et al., 2005; GE & RIKIHISA, 2006; XIONG et al., 2008) parecem indicar que a *E. canis* também utilize os mecanismos de apoptose em células mononucleares na progressão da infecção. Para se testar essa hipótese, utilizaram-se, neste trabalho, duas técnicas bastante difundidas na avaliação e quantificação da apoptose: TUNEL (GAVRIELI, 1992) e imunohistoquímica para a detecção das moléculas pró e anti-apoptóticas, Bax (GE & RIKIHISA, 2006) e Bcl-2 (SPRICK & WALCZAK, 2004), respectivamente.

Os resultados obtidos neste estudo indicam que, na fase aguda da doença da doença a *E. canis*, ocorre aumento da apoptose nas células de baço, linfonodos e fígado, aumentando-se ao mesmo tempo a imuno-marcação da proteína anti-apoptótica Bcl 2. A apoptose aqui detectada e quantificada pela técnica de *TUNEL* ocorre mais intensamente nas células mononucleares. A maior marcação imunohistoquímica de Bcl-2 do que de Bax nos animais do grupo inoculado com *E. canis*, observada neste estudo, indica que a via intrínseca não é tão importante. A apoptose de células infectadas em nosso estudo pode estar associada à modulação da resposta inflamatória e à resposta imunológica celular do hospedeiro à *E. canis*. Assim, é provável que a via extrínseca seja a mais importante nessas circunstâncias, visto que a estimulação de receptores de morte com seus ligantes (Fas, TNF- α) permite a ativação de moléculas iniciadoras da apoptose como a caspase 8 (DONEPUDI et al., 2003). SCHEEL-TOELLNER et al. (2004) demonstraram que o *A. phagocytophila*, causador da ehrliquiose granulocítica humana, inibe as vias extrínseca e intrínseca na apoptose

espontânea de neutrófilos. GE et al. (2005) concluíram que essa infecção inibe a ativação de caspase 3 em neutrófilos humanos. Também foi observado o bloqueio da morte celular programada de neutrófilos humanos induzida por Fas (CD95/Apo-1) na infecção por *A. phagocytophilum* (BORJESSON et al., 2005), sendo sugerido por GE & RIKIHISA (2006) que Bax é regulada a nível pós-translacional na infecção por este agente. XIONG et al. (2008) demonstraram que a infecção com *Ehrlichia ewingii* atrasa a apoptose espontânea de neutrófilos caninos por estabilização do potencial de membrana mitocondrial. Em outra espécie deste gênero, *E. chaffeensis*, causadora da ehrliquiose monocítica humana, verifica-se ser esta capaz de inibir *NF-κB* e apoptose, alterando a expressão de ciclinas e de cinase dependentes de ciclinas e prolongando a sobrevivência do patógeno e da sua célula hospedeira (ZHANG et al., 2004; RIKIHISA, 2006). A resposta imune de tipo TH-1 com produção de INFγ- TNF-α e Il-2 gera imunidade celular, importante na resposta contra as ehrliquias (HARRUS et al., 1999). Muitos dos patógenos intracelulares podem estimular ou inibir apoptose (GRASSMÉ et al., 2001). Nesse contexto, é importante reconhecer que as vias da sinalização da apoptose são classificadas em via extrínseca (receptores de morte) e via intrínseca (mitocondrial), ativando a cascata de caspases e induzindo a morte celular (SPRICK & WALCZAK, 2004). Os resultados de imunohistoquímica para Bcl-2 e Bax aqui apresentados indicam que a via intrínseca de apoptose não é importante nos órgãos analisados. Além disso, os resultados obtidos com base na inoculação *in vivo* por *E. canis* e enfocando a ocorrência de apoptose e a imunomarcagem de moléculas pró e anti apoptose em órgãos como linfonodo, baço, fígado e rim, quando revistos concomitantemente

com a literatura científica disponível, apontam para uma situação em que o agente infeccioso tem duas opções: necrosar as células do hospedeiro e obter mais prontamente os nutrientes que precisa para propagar, enfrentando a seguir a reação do hospedeiro, ou irritar menos as células do hospedeiro, causando apoptose e não necrose, de maneira a obter os nutrientes mais lentamente, com isso minimizando as reações do hospedeiro e evadindo-se da resposta inflamatória. Assim, a inflamação, se adequadamente ativada, eliminaria ou, no mínimo, dificultaria a colonização por essa bactéria, confirmando que o agente etiológico mais bem sucedido é aquele que, apesar de patogênico, consegue o que necessita para sua sobrevivência num ambiente de tolerância, sem induzir uma reação no hospedeiro que prejudicaria sua persistência.

7. AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

8. COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

O presente trabalho está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal e biossegurança (Parecer CETEA/UFMG no 216/09, 10 de março de 2010).

9. REFERENCIAS

AGUIAR, D. et al. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, v.37, p.796-802, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782007000300030>. Acesso em: 26 março. 2012. doi: 10.1590/S0103-84782007000300030

BORJESSON, D. et al. Insights into pathogen immune evasion mechanisms: *Anaplasma phagocytophilum* fails to induce an apoptosis differentiation program in human neutrophils. **Journal of Immunology**,v.174, p.6364-6372, 2005. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/content/174/10/6364.long>. Acesso em: 26 março. 2012. doi: não disponível.

DAGNONE, A. et al. Molecular diagnosis of Anaplasmataceae organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, p. 20-25, 2009. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612009000400004&lng=en&nrm=iso&tlng=en.<http://dx.doi.org/10.4322/rbpv.01804004>. Acesso em: 26 março. 2012. doi: 10.4322/rbpv.01804004

DELEO, F. Modulation of phagocyte apoptosis by bacterial pathogens. **Apoptosis**, v.9, p.399-413, 2004. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/p95g77r5576gw854/>. Acesso em: 26 março. 2012. doi: 10.1023/B:APPT.0000031448.64969.fa

DONEPUDI, M. et al. Insights into the regulatory mechanisms for caspase-8 activation. **Molecular Cell**, v.11, p.543-549, 2003. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276503000595>. Acesso em: 26 março. 2012. Doi:10.1016/S1097-2765(03)00059-5

DUMLER, J. 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 designations of **Ehrlichia equi** and HGE agent as subjective synonyms of **Ehrlichia phagocytophila**. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.2145-2165, 2001. Disponível em: <http://ijs.sgmjournals.org/content/51/6/2145.full.pdf+html>. Acesso em: 23 março. 2012. doi: não disponível.

GAVRIELI, Y. et al. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **Journal of Cell Biology**, v.119, p.493-501, 1992. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2289665/pdf/jc1193493.pdf>. Acesso em: 26 março. 2012. doi: 0021-9525/92/11/493/9

GE, Y. et al. **Anaplasma phagocytophilum** inhibits human neutrophil apoptosis via upregulation of bfl-1, maintenance of mitochondrial membrane potential and prevention of caspase 3 activation. **Cellular Microbiology**, v.7, p.29-38, 2005. Disponível em: [:http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1462-5822.2004.00427.x/pdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1462-5822.2004.00427.x/pdf). Acesso em: 26 março. 2012. doi:10.1111/j.1462-5822.2004.00427

GE, Y.; RIKIHISA, Y. **Anaplasma phagocytophilum** delays spontaneous human neutrophil apoptosis by modulation of multiple apoptotic pathways. **Cellular Microbiology**. v.8, p.1406-1416, 2006. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1462-5822.2006.00720.x/pdf>. Acesso em: 26 março. 2012. doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00720.x

GRASSMÉ, H. et al. Molecular mechanisms of bacteria induced apoptosis. **Apoptosis**, v.6, p.441-445, 2001. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/q63g1n87223v3114/> Acesso em: 26 março. 2012. doi: 10.1023/A:1012485506972

HARRUS, S. et al. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.2745-2749, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC85367/pdf/jm002745.pdf>. Acesso em: 26 março. 2012. doi: 0095-1137/99/\$04.00+0

HESS, P. et al. Experimental *Ehrlichia canis* infection in the dog does not cause immunosuppression. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.109, p.117-125, 2006. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242705002539>. Acesso em 26 março. 2012. doi: [10.1016/j.vetimm.2005.07.027](https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.07.027)

LABRUNA, M.; PEREIRA, M. Carrapatos em cães no Brasil. **Clinica Veterinária**, v.30, p.24-32, 2001. Disponível em: http://www.revistaclinicaveterinaria.com.br/v1/edicoes_ver.php?ver=30 Acesso em 26 março. 2012. doi: não disponível.

MANNA, L. et al. First molecular characterization of a granulocytic *Ehrlichia* strain isolated from a dog in South Italy. **Veterinary Journal**,v.167, p.224-227, 2004. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023304000516>. Acesso em: 26 março. 2012. doi:10.1016/j.tvjl.2004.02.008

MELO,A. et al. Seroprevalence and risk factors to *Ehrlichias* pp. And *Rickettsia* spp. In dogs from the Pantanal Region of Mato Grosso State, Brazil. **Ticks Tick-borne Disease.** 2011, Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877959X11000689> Acesso em: 26 março. 2012. doi:10.1016/j.ttbdis.2011.09.007

MORO,L. Et al. Apoptosis in canine distemper. **ArchivesofVirology**, v.148, p.153-164, 2003. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/crhye9gx2g1kkpdl/>. Acesso em 26 março. 2012. doi: 10.1007/s00705-002-0903-6

MURPHY, G. et al. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Ehrlichia ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. **Veterinary Parasitology**, v.79, p. 325-339, 1998. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401798001794> Acesso em: 26 março. 2012. doi:10.1016/S0304-4017(98)00179-4

NAKAGHI,A. et al. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. **Ciência Rural**, v. 38,p. 766-770, 2008. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782008000300027&script=sci_arttext. Acesso em: 26 março. 2012. doi: 10.1590/S0103-84782008000300027

RIKIHISA, Y. *Ehrlichia* Subversion of host innate responses. **Current Opinion in MicroBiology**, v.9, p.95-101, 2006. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527405001979>. Acesso em: 26 março. 2012. doi:10.1016/j.mib.2005.12.003

RODRIGUES, L. et al. Caspase -3/caspase-8, bax and bcl2 in pulps of human primary teeth with physiological root resorption. **International Journal of Paediatric Dentistry**. v.22, p. 52-59, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Caspase%20-3%2Fcaspace-8%2C%20bax%20and%20bcl2%20in%20pulp%20of%20human%20primary%20teeth%20with%20physiological%20root%20resorption>. Acesso em: 22 de março. 2012. doi10.1111/j.1365-263X.2011.01157.x. Epub 2011 Aug 8.

SCHEEL-TOELLNER, D. et al. Reactive oxygen species limit neutrophil life span by activating death receptor signaling. **Blood**,v.104, p.2557-2564, 2004. Disponível em: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/104/8/2557.full.pdf+html>.

Acesso em: 26 março. 2012. doi:10.1182/blood-2004-01-0191

SIARKOU, V. et al. Sequence and phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene of **Ehrlichia canis** strains in dogs with clinical monocytic ehrlichiosis. **Veterinary Microbiology**. v.125, p.304-312, 2007. Disponível em:

□<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113507002684>□. Acesso em: 26 março. 2012. doi:10.1016/j.vetmic.2007.05.021

SPRICK, M.; WALCZAK, H. The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1644, p.125-132, 2004. Disponível em:

□<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488903001794>□. Acesso em 26 março. 2012. doi:10.1016/j.bbamcr.2003.11.002

XIONG, Q. et al. **Ehrlichia ewingii** infection delays spontaneous neutrophil apoptosis through stabilization of mitochondria. **Journal of Infectious Diseases**,

v.197, p.1110-1118, 2008. Disponível em:
□<http://jid.oxfordjournals.org/content/197/8/1110.long>□. Acesso em: 26 março.

2012. doi: 10.1086/533457

YU XUE-JIE et al. Restriction and expansion of *Ehrlichia* strain diversity.
Veterinary Parasitology,v.143, p.337-346,2007. Disponível em:

□<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401706004900>□. Acesso em: 26 março. 2012. doi:10.1016/j.vetpar.2006.08.027

ZHANG, J. et al. Survival strategy of obligatory intracellular *Ehrlichia chaffeensis*: novel modulation of immune response and host cell cycles. **Infection and Immunity**, v.72, p.498-507, 2004. Disponível em:

<http://iai.asm.org/content/72/1/498.full>. Acesso em: 26 março. 2012. doi: 10.1128/IAI.72.1.498-507.2004

CAPITULO III

Artigo submetido ao *Veterinary Microbiology*, Mayo 2 de 2013 sob o N°. VETMIC-D-13-8222.

1 **Gene expression of Bax, Bcl-2, Caspases 3, 8 and 9 in spleen, lymph node,**
2 **bone marrow, liver and kidneys from dogs experimentally infected with**
3 ***Ehrlichia canis***

4 Irma Ximena Barbosa-Sanchez^{a,b,*}, Daniel Meneses-Souza^c, Teresa de Jesus
5 Oviedo-Socarrás^{b,d}, Rosangela Zacarias-Machado^e, Ricardo Toshio Fujiwara^c,
6 Anilton Cesar Vasconcelos^b

7 ^a Laboratorio de Patologías, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia,
8 Universidad del Tolima, 7652000, Altos de Santa Helena, Ibagué, Tolima,
9 Colombia.

10 ^b Laboratório de Apoptose, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal
11 de Minas Gerais, 31270-901, Campus Pampulha. Belo Horizonte, Minas Gerais,
12 Brazil.

13 ^c Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos, Instituto de Ciências
14 Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Campus
15 Pampulha. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

16 ^d Departamento de Ciencias Pecuarias, Universidad de Córdoba, 230002,
17 Montería, Córdoba, Colombia.

18 ^e Laboratório de Inmunoparasitologia, Departamento de Patologia, Faculdade de
19 Ciências Agrarias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julho de
20 Mesquita Filho” Campus de Jaboticabal, 14884-900, São Paulo, Brazil.

21 *Corresponding autor at: Universidad del Tolima, Departamento de Sanidad
22 Animal, FMVZ. Cra. 1 Calle 42, 7652000, Santa Helena, Ibagué, Tolima,
23 Colombia. Tel. fax.: + 57 8 2772042. E-mail address: isanchez@ut.edu.co
24 (I.X.Barbosa).

25 **Abstract**

26 Infectious agents may interact with multiple regulatory systems, inducing or
27 inhibiting apoptosis in host cells. Modulation of cell death may facilitate survival of
28 the pathogens and allow their proliferation and dissemination. Some *Ehrlichia spp.*
29 and *Anaplasma spp.* can modulate apoptosis and contribute distinctively to the
30 progression or regression of the lesions. To evaluate the role of apoptosis in
31 Canine Monocytic Ehrlichiosis, 7 dogs were assigned into 2 groups, one with 4
32 animals inoculated with *Ehrlichia canis* (GI) and a control with 3 dogs, inoculated
33 with sterile PBS (GII). Blood samples were collected weekly and 35 days post-
34 inoculation to confirm the infection by nested polymerase chain reaction (nPCR)
35 and immunofluorescence (IFA). Thirty-six days after inoculation the animals were
36 euthanized and samples from spleen, lymph nodes, bone marrow, liver and kidney
37 were collected to measure the mRNAs of Bax, Bcl-2, Caspase 3, Caspase 8 and
38 Caspase 9, important molecules involved in apoptosis, by real-time polymerase
39 chain reaction (RT-PCR). Inoculated animals became positive for *E. canis* by
40 nPCR already in the second week and by immunofluorescence in the third week
41 after inoculation. The control group showed negative for *E. canis* in all tests. Both
42 pro and anti-apoptotic genes evaluated in this study showed higher expression in
43 tissues of the inoculated group than in the control group, except bone marrow.
44 Conclusion: in the acute phase of the experimental disease, *Ehrlichia canis*
45 modulates apoptosis in different ways in distinct tissues. Therefore apoptosis has a
46 role in the progression of canine monocytic ehrlichiosis.

47 **Keywords:** Apoptosis, Bax, Bcl-2, Caspases, *Ehrlichia canis*, Real-time PCR

48 **1. Introduction**

49 Canine monocytic ehrlichiosis is a cosmopolitan zoonotic bacterial disease, caused
50 by *Ehrlichia canis*, a Gram negative bacteria (Yu et al., 2007) of the order
51 *Rickettsiales* and family *Anaplasmataceae* (Dumler et al., 2001), found in
52 cytoplasm of mononuclear cells of infected dogs, and transmitted by the bite of
53 infected *Rhipicephalus sanguineus* (Dantas, 2008). The canine monocytic
54 ehrlichiosis is highly prevalent in tropical and subtropical regions due to geographic
55 distribution of vector (Andereg and Passos, 1999).

56 The interaction of mammalian cells with pathogenic bacterial results in a variety of
57 responses in the infected cell, including internalization or phagocytosis of bacteria,
58 release of cytokines, secretion of defensins or production of oxygen free radicals
59 (Grassmé et al., 2001). Studies have shown that many bacteria have developed
60 different mechanisms to handle the cell death and benefit their proliferation (Luo,
61 2011). Apoptosis is a physiological type of cell death, programmed, characterized
62 by structural and functional modifications in the cell (Kerr et al., 1972). It is a silent
63 death, where the cell is stimulated to trigger mechanisms that result in death,
64 without inducing inflammatory reactions (Elmore, 2007). The signaling pathways of
65 apoptosis are classified into extrinsic (death receptor pathway) and intrinsic
66 pathway (mitochondrial pathway), activating the cysteine aspartic acid-specific
67 proteases (caspases) cascade and inducing internucleosomal degradation of the
68 genomic DNA and cell death (Sprick and Walczak, 2004).

69 In this context, apoptosis may contribute distinctively to the progression (Das et al.,
70 1999) or regression (Huang et al., 1998) of the lesions. The infectious agent may
71 interact with multiple regulatory systems inducing or inhibiting apoptosis in host
72 cells, during cell infection. Modulation of apoptosis may facilitate cell survival of

73 the pathogens and allow their proliferation and dissemination, acting as a Trojan
74 horse, inhibiting the immune response (Carmen and Sinai, 2007).

75 Infected cells may also undergo apoptosis and limit dissemination of the agent
76 (DeLeo, 2004). The genera *Ehrlichia* and *Anaplasma* have developed
77 sophisticated mechanisms of evasion of the innate immune system. *Anaplasma*
78 *phagocytophila* inhibits human neutrophil spontaneous apoptosis, allowing the
79 bacterium sufficient time to develop intracellular microcolonies, by blocking Fas
80 (CD95/Apo-1) (Borjesson et al., 2005).

81 *Ehrlichia chaffeensis* is capable of modulating NF- κ B inhibitors (Zhang et al.,
82 2004), inhibiting apoptosis in infected monocytes and granulocytes, prolonging
83 their survival and the replication of the agents (Rikihisa, 2006).

84 Considering that little is known on apoptotic pathways responsible for the
85 modulation of *E. canis*, and that apoptosis is involved in the modulation of infection
86 in several intracellular bacterial organisms, studies aiming to elucidate the role of
87 apoptosis in the acute canine monocytic ehrlichiosis should be prioritized.

88 In this study, dogs were inoculated with *E. canis* and we measured the mRNAs of
89 Bax, Bcl-2, Caspase 3, Caspase 8 and Caspase 9 important molecules involved in
90 apoptosis by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR), in samples of spleen,
91 lymph node, bone marrow, liver and kidneys. To our knowledge this is the first
92 attempt to elucidate how the apoptotic process is modulated by *E. canis* and how it
93 influences the development of infection.

94 **2. Materials and Methods**

95 *2.1 Sample of Ehrlichia canis*

96 We used the Jaboticabal strain of *Ehrlichia canis*, which was obtained in 1993,
97 whose genome showed 100% similarity to Oklahoma strain (GeneBank M73221),
98 considered worldwide standard for serological diagnosis (Aguiar et al., 2008).
99 Several different studies had already used this strain (Castro et al., 2004; Faria et
100 al., 2011; Sanchez et al., 2012).

101 2.2 Experimental Animals

102 Seven mongrel dogs, clinically healthy and free of ticks, aged among six and eight
103 months, were randomly assigned into two groups: GI, Inoculated - with four dogs
104 and GII, Control -with three dogs. Each dog was inoculated intravenously with 3 ml
105 of either infected blood (strain Jaboticabal) in GI or sterile PBS in GII. All animals
106 were followed for 35 days after application, kept in isolation under controlled
107 temperature, being fed with commercial feed twice by day and given water *ad*
108 *libitum*. From birth to the beginning of the experiment, all animals were submitted
109 monthly to collection of feces for the diagnosis and treatment of intestinal
110 parasites. One week before inoculation, blood samples were taken for serological
111 tests (Reaction Indirect Immunofluorescence - IFA) and confirmation the absence
112 of infection or previous contact with *Babesia canis*, *Leishmania spp.* and *E. canis*.

113 This study is in accordance with the International Guiding Principles for Biomedical
114 Research Involving Animals as issued by the Council for the International
115 Organizations of Medical Sciences and was submitted and approved by a local
116 Ethics Committee (CETEA / UFMG # 216/09 in March 10, 2010).

117 2.3 Collection of blood samples

118 Samples of venous blood were collected from all dogs in tubes with and without
119 EDTA (Becton Dickinson, Meylan, France) by cephalic or jugular venipuncture on

120 day 0 (before inoculation) and every seven days until 35 days post inoculation.
121 These samples were used for extraction of DNA to be subjected to the n-PCR
122 diagnostic of *E. canis*. Sera obtained were used for IFA for carrying out the
123 diagnosis of *E. canis*.

124 2.4. *Nested-PCR*

125 Samples of venous blood were frozen in aliquots of 300 µl in microtubes after
126 harvest and kept at -20 ° C until use. For the extraction genomic DNA, we used the
127 *QIAamp™ DNA blood Mini Kit* (QIAGEN™, USA) according to the manufacturer's
128 instructions. The extracted DNA was identified and stored at -20° C until use.

129 The used oligonucleotides sequences were described previously by Sanchez et al.
130 (2012). ECC 5'-AGAACGAACGCTGGCGGCAAGC-3' and reverse ECB 5'-
131 CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA-3' were used to amplify part of the 16S gene of
132 *Ehrlichia*. Subsequently, the product was subjected to the initiator ECAN5 5'-
133 CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA-3' and reverse the sequence HE3 5'-
134 TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT-3' Specific *E. canis*.

135 2.5 *Tissue samples collection, extraction of total RNA and synthesis of first strand* 136 *cDNAs*

137 Thirty-six days after inoculation, animals from both groups were euthanized with
138 7.5% sodium thiopental (75 mg/kg body weight) and submitted to post mortem
139 examination. Samples of spleen, lymph nodes, bone marrow, liver, kidney and
140 heart were taken and stored at -80°C until required for RNA extraction. About 20
141 mg of each tissue were homogenized and treated with the *Nucleospin® RNA II Kit*
142 (Macherey-Nagel, Germany) according to the manufacturer's recommendations.
143 cDNAs were synthesized from 1.0 µg of total RNA, using the *High-Capacity cDNA*

144 *Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, USA) with RT Random primers
145 according to the manufacturer's instruction and stored at -20°C until used.

146 *2.6 primers for gene evaluation*

147 Specific primers for Caspases 3, 8, 9, Bcl-2 and Bax were designed using
148 sequences obtained in GeneBank by Del Puerto et al. (2010). For PCR controls,
149 primers were designed with the aid of Gene Runner version 3.05 (Hasting Software
150 Inc. 2004) using specific canine sequences from GeneBank
151 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). The sequences of primers employed are
152 listed in Table 1. The primers were synthesized by Eurofins MWG operon
153 (Huntsville, Al, USA) and reconstituted in nuclease free water.

154 *2.7 Real-Time PCR*

155 q-PCR was performed on an ABI Prism 7500 DNA Sequence Detection System
156 using SYBR Green PCR Master Mix (PE Applied Biosystems, Foster City, CA,
157 USA), with 100 mM of each primer and cDNA diluted to 1:10. The samples were
158 incubated at 95°C for 10 min and then submitted to 40 cycles of 95°C for 15 s and
159 60°C for 1 min, during which time fluorescence data were collected. Three replicate
160 analyses were performed, and the amount of target RNA was normalized with
161 respect to the endogenous controls (housekeeping) genes GAPDH and β -Actin.
162 Finally, each quantitative PCR (q-PCR) run was performed with two internal
163 controls assessing both potential genomic DNA contamination (no reverse
164 transcriptase added) and purity of the reagents used (no cDNA added). The
165 specificity of PCR products was confirmed by the single peak dissociation curves.
166 Data were expressed according to the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method using the mean value of the
167 ΔCt of the control group as the calibrator (Bustin et al., 2009). After normalization,

168 the expression levels of genes in the inoculated group were considered up-
169 regulated or down-regulated compared to expression levels in the control group.
170 Likewise was analyzed, the expression levels of genes between tissues at the
171 animals of group inoculated for each apoptotic molecule.

172 *2.8 Statistical analysis*

173 Statistical analyses of the PCR results were performed with the aid of GraphPad
174 Prism software package version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).
175 Mann Whitney Test was used for between group comparative studies, and
176 analyzes expression levels of transcripts of the pro- and anti-apoptotic genes in
177 bone marrow spleen, lymph node, heart liver and kidney. Differences were
178 considered significant when p were ≤ 0.05 .

179 **3. Results**

180 Infected animals were all positive for *E. canis* by n-PCR from the second week post
181 inoculation (PI) and by immunofluorescence from the third week, and negative the
182 by PBMC for all readings. The control group showed negativity in all tests. The n-
183 PCR was more effective in early detection of infected animals than the other
184 techniques employed in this study.

185 Results of Real-time PCR, accessing the values of gene expression of pro and
186 anti-apoptotic molecules in different tissues were summarized in Figure 1. Bone
187 marrow genes expression appeared always lower in inoculated animals than in
188 controls. Also, spleen expression to Bax and Bcl-2 looked lower in inoculated
189 animals than in controls. Heart and liver apparently showed higher gene
190 expression in inoculated animals than in controls, regardless of the molecule

191 evaluated Bax, Bcl-2, or Caspases either 3, 8 or 9. Kidney samples also indicated
192 higher gene expression in inoculated than in controls, except to Caspase 8.
193 However, significant differences were detected only when bone marrow was
194 contrasted to spleen, heart and liver, which showed higher expression of Bax gene.
195 Also, bone marrow showed lower expression of Bcl-2 gene than spleen, lymph
196 node, heart and kidney. When bone marrow was contrasted to spleen and heart, it
197 showed a lower expression of Caspase 3. Besides, bone marrow showed lower
198 expression of Caspase 8 when contrasted to spleen, heart and liver and lower
199 expression of Caspase 9 when contrasted to heart. Bcl-2 expression was higher in
200 kidney than in heart. Caspase 9 expression was higher in heart than in spleen and
201 lymph node.

202 **4. Discussion**

203 Our results show that genes involved in apoptosis modulation are expressed
204 during the pathogenesis of the infection with *E. canis*, which agree with previous
205 study that demonstrated the morphological evidence of apoptosis in the acute
206 phase of the disease (Sanchez et al., 2012). Apoptosis may contribute to the
207 regulation of immune responses induced by pathogens and different etiological
208 agents have developed a variety of strategies to modulate apoptosis of the host
209 cell (Ashida et al., 2011).

210 We have demonstrated, for the first time that both the intrinsic and extrinsic
211 pathways of apoptosis are simultaneously active in animal tissues during the acute
212 phase of the experimental Canine Monocytic Ehrlichiosis. Both pro and anti-
213 apoptotic genes evaluated in this study had higher expression in tissues of the

214 inoculated group than in the control group, which indicates that *E. canis* can
215 modulate their expression.

216 Bone marrow had the lowest levels of gene expression in infected animals,
217 regardless of the evaluated molecule Bax, Bcl-2, or Caspases either 3, 8 or 9. That
218 could be interpreted as an evidence of bone marrow depletion, low cell adhesion
219 molecule expression and immunosuppression, which is classically described in
220 literature (Stich et al., 2008).

221 Spleen of infected dogs showed a high expression of Caspase 3 indicating an
222 increased apoptosis, since this is an important effector enzyme in cell death, as
223 demonstrated by Li and Yuan (2008) and Huber et al. (2011). Active Caspase 3
224 will activate endonucleases and other proteases responsible for degradation of the
225 genomic DNA and of other cellular substrates, resulting in cell death. It is important
226 to state that apoptosis is also an usual and natural event in the spleen, considering
227 the immune and hemocatheretic functions of this organ. This helps to explain the
228 higher expression of Bax and Bcl-2, important in intrinsic pathway, in tissues of the
229 control animals, when compared to infected ones, although the results were
230 considered low in both infected and control animals, when compared to other
231 studied molecules (Autret and Martin, 2010). Thus, terminal differentiation and
232 cell senescence, as well as oxidative stress, may be involved with activation of
233 intrinsic pathway of apoptosis in natural hemocatheresis (Shi et al., 1996; Haslett,
234 1997; Fadeel & Kagan, 2003) By the other hand, increased apoptosis in infected
235 animals, as indicated by high caspase 3 expression, is presumably associated with
236 *E. canis* infection and extrinsic pathway, despite the low expression of Caspase 8.
237 Nonetheless Scheel-Toellner et al. (2004) and Ge et al. (2005) demonstrated *that*

238 *A. phagocytophilum*, the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis,
239 modulates both the extrinsic and intrinsic pathways in spontaneous apoptosis of
240 neutrophils.

241 Caspase 3 was the molecule more expressed in lymph nodes of infected animals,
242 as compared to controls. Also, the ratio between Bax and Bcl-2 in lymph nodes of
243 infected animals was apparently higher than in controls, indicating a role of intrinsic
244 pathway. Also the association of both Caspase 3 and 8 reveals that the extrinsic
245 pathway is important.

246 Heart extracted RNAs showed higher expression of Bax and Bcl-2 genes than in
247 bone marrow, and the ratio Bax/Bcl-2 was suggestive of apoptosis by intrinsic
248 pathway, which can be interpreted as more related to oxidative stress and aging.
249 Besides that, caspase 8 was also highly expressed when compared to controls
250 indicating a role in progression of Ehrlichiosis. However, the myocardial fibers are
251 classified as permanent or post mitotic cells and thus unlikely to undergo apoptosis
252 which may be confirmed by the low expression of Caspase 3. Some studies show
253 that *E. canis* may cause myocardial damage (Diniz et al., 2008), although little
254 information is available and the mechanism of cell damage has not been
255 elucidated yet.

256 Apoptosis was increased in liver as evidenced by high expression of the Caspase
257 3, and the positive ratio between Bax and Bcl-2 was indicative of intrinsic pathway.
258 On the other hand the high expression of Caspase 8 in this organ also
259 characterizes the importance of the extrinsic pathway.

260 Caspase 3 was expressed in kidney, leading to the apoptotic event. Apparently it
261 was more associated to the extrinsic than to intrinsic pathway, since the expression

262 of Bax was lower than the expression of Bcl-2, indicating blockade of the intrinsic
263 pathway, despite the low expression of Caspase 8. Bcl-2 family regulates the
264 caspase cascade via modulation of mitochondrial membrane permeability in a level
265 transcriptional (Cori and Adams, 2002). Bcl-2 anti-apoptotic members holds the
266 mitochondrial membrane permeability, not allowing the release of apoptotic factors
267 such as cytochrome c, Smac or HtrA2 (Tsujimoto, 2003) blocking further caspase
268 activation.

269 Caspase 3 was well expressed in most of the studied tissues and is not directly
270 activated by apoptotic stimuli, but depends on the proteolytic activity of other
271 initiator caspases such as Caspase 8 (Stennicke et al., 2000). In this study, we
272 have found an increased expression of Caspase 8 as compared to caspase 9.
273 Caspase 8 is activated by cell surface death receptors, including Fas, TNF and
274 granzyme B receptors (Medema et al., 1997). They activate caspases within
275 seconds, causing rapid elimination of apoptotic cells (Ashkenazi and Dixit, 1998).
276 Caspase 8 can also cleave Bid, a cytosolic pro-apoptotic protein, yielding a
277 fragment that binds to Bcl-2 protein, inhibiting it and favoring the release of
278 cytochrome C, SMAC and AIF proteins (Autret and Martin, 2010). Such cross talk
279 may also occur in Canine Ehrlichiosis since both apoptotic pathways seem to be
280 activated in tissues.

281 In conclusion we found that in the acute phase of the experimental disease,
282 *Ehrlichia canis* modulates apoptosis in different ways in distinct tissues, increasing
283 Caspase 3 expression, either by extrinsic pathway via Caspase 8 or by
284 mitochondrial intrinsic pathway, related to the Bax/Bcl-2 ratio. Apoptosis has a role
285 in the progression of the disease, although its involvement as a mechanism of

286 immune evasion and dissemination or as a protective factor against *E. canis* is still
287 to be elucidated.

288 **5. Conflict of interest statement**

289 No competing financial interests exist.

290 **6. Acknowledgments**

291 This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas
292 Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
293 Superior (CAPES); Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e
294 Tecnológico (CNPq) and Universidad del Tolima of Colombia (UT).

295 **7. References**

296 Ashida H., Mimuro H., Ogawa M., Kobayashi T., Sanada T., Kim M., Sasakawa C.,
297 2011. Cell death and infection: a double-edged sword for host and pathogen
298 survival. *J. Cell. Biol.* 12, 931-942.

299 Aguiar, D.M., Hagiwara, M.K., Labruna, M.B., 2008. In vitro isolation and molecular
300 characterization of an *Ehrlichia canis* strain from São Paulo, Brazil. *Braz. J.*
301 *Microbiol.* 39, 489-493.

302 Andereg, P.I., Passos, L.M., 1999. Eriquiose canina-Revisão. *Rev. Clin. Vet.* 4,
303 31-38.

304 Ashkenazi, A., Dixit, V.M., 1998. Death Receptors: signaling and modulation.
305 *Science.* 281, 1305-1308.

306 Autret, A., Martin, S.J., 2010. Bcl2 family proteins and mitochondrial fission/fusion
307 dynamics. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 1599-1606.

308 Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M.,
309 Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T.,

310 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative
311 Real-Time PCR Experiments. Clin. Chem. 55, 611-622.

312 Borjesson, D.L., Kobayashi, S.D., Whitney, A.R., Voyich, J.M., Argue, C.M., DeLeo,
313 F.R. 2005. Insights into pathogen immune evasion mechanisms: *Anaplasma*
314 *phagocytophilum* fails to induce an apoptosis differentiation program in human
315 neutrophils. J. Immunol. 174, 6364-6372.

316 Carmen, J.C., Sinai, A.P., 2007. Suicide prevention: disruption of apoptotic
317 pathways by protozoan parasites. Mol. Microbiol. 64, 904-916.

318 Castro, M.B., Machado, R.Z., Aquino, L.P.C.T., Alessi, A.C., Costa, M.T., 2004.
319 Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and
320 immunopathological findings. Vet. Parasitol. 119, 73-86.

321 Cory, S., Adams, J.M., 2002. The Bcl-2 Family: regulators of the cellular life-or-
322 switch. Nat. Rev. Cancer. 2, 647-656.

323 Dantas-Torres, F., 2008. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille,
324 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. Vet. Parasitol. 152, 173-185.

325 Das, G., Vohra, H., Rao, K., Saha, B., Mishra, G.C., 1999. *Leishmania donovani*
326 infection of a susceptible host results in CD4+ T-cell apoptosis and decreased Th1
327 cytokine production. Scand. J. Immunol. 49, 307-310.

328 DeLeo, F.R., 2004. Modulation of phagocyte apoptosis by bacterial pathogens.
329 Apoptosis. 9, 399-413.

330 DelPuerto, H.L., Martins, A.S., Moro, L., Milsted, A., Alves, F., Braz, G.F.,
331 Vasconcelos, A.C., 2010. Caspase-3/-8/-9, Bax and Bcl-2 expression in the
332 cerebellum, lymph nodes and leukocytes of dogs naturally infected with canine
333 distemper virus. Genet. Mol. Res. 9, 151-161.

334 Diniz, P.P., Morais, H.S., Breitschwerdt, E.B., Schwartz, D.S., 2008. Serum cardiac
335 troponin I concentration in dogs with ehrlichiosis. J. Vet. Intern. Med. 22, 1136-
336 1143.

337 Dumler, J.S., Barbet, A.F., Bekker, C.P.J., Dasch, G.A., Palmer, G.H., Ray, S.C.,
338 Rikihisa, Y., Rurangirwa, F.R., 2001. Reorganization of genera in the families
339 *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of
340 some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia*
341 with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of
342 *Ehrlichia equi* and HGE agent as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*.
343 Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51, 2145-2165.

344 Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol. Pathol.
345 35, 495-516.

346 Fadeel B, Kagan VE. 2003. Apoptosis and macrophage clearance of neutrophils:
347 regulation by reactive oxygen species. Redox Rep.8(3),143-150.

348 .Faria, J.L., Munhoz, T.D., João, C.F., Vargas-Hernández, G., André, M.R.,
349 Wanderson Pereira, W.A., Machado, R.Z., Tinucci-Costa, M., 2011. *Ehrlichia canis*
350 (Jaboticabal strain) induces the expression of TNF- α in leukocytes and splenocytes
351 of experimentally infected dogs. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 20, 71-74.

352 Ge, Y., Yoshiie, K., Kuribayashi F., Lin, M., Rikihisa, Y., 2005. *Anaplasma*
353 *phagocytophilum* inhibits human neutrophil apoptosis via upregulation of bfl-1,
354 maintenance of mitochondrial membrane potential and prevention of caspase 3
355 activation. Cell. Microbiol. 7, 29-38.

356 Grassmé, H., Jendrossek, V., Gulbins, E., 2001. Molecular mechanisms of
357 bacteria induced apoptosis. Apoptosis. 6, 441-445.

358 Haslett C. 1997. Granulocyte apoptosis and inflammatory disease. Br Med
359 Bull.;53(3):669-83.

360 Huang, F.P., Xu, D., Esfandiari, E.O., Sands, W., Wei, X.Q., Liew, F.Y., 1998. Mice
361 defective in Fas are highly susceptible to *Leishmania major* infection despite
362 elevated IL-12 synthesis, strong Th1 responses, and enhanced nitric oxide
363 production. J. Immunol. 160, 4143-4147.

364 Huber, H.J., Duesmann, H., Wenus, J., Kilbride, S.M., Prehn, J.H., 2011.
365 Mathematical modeling of the mitochondrial apoptosis pathway. Biochim. Biophys.
366 Acta. 1813, 608-615.

367 Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: a basic biological
368 phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br. J. Cancer. 26,
369 239-257.

370 Li, J., Yuan, J., 2008. Caspases in apoptosis and beyond. Oncogene. 27, 6194-
371 6206.

372 Liles, W.C., 1997. Apoptosis- role in infection and inflammation. Curr. Opin. Infect.
373 Dis. 3, 165-170.

374 Luo, Z.Q., 2011. Striking a balance: modulation of host cell death pathways by
375 *Legionella pneumophila*. Front. Microbiol. 2, 1-6.

376 Medema J.P., Scaffidi, C., Kischkel, F.C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer,
377 P.H, Peter, M.E., 1997. FLICE is activated by association with the CD95 death-
378 inducing signaling complex (DISC). EMBO J. 16 2794-2804.

379 Rikihisa, Y. 2006. *Ehrlichia* Subversion of host innate responses. Curr. Opin.
380 Microbiol. 9, 95-101.

381 Shi J, Fujieda H, Kokubo Y, Wake K. 1996. Apoptosis of neutrophils and their
382 elimination by Kupffer cells in rat liver. *Hepatology*. 24(5):1256-63.

383 Sanchez, I.X.B, Socarrás, T.J.O., Silva, M.L., Pereira, N.B., Machado, R.Z.,
384 Vasconcelos, A.C., 2012. Apoptose na infecção experimental de cães domésticos
385 com *Ehrlichia canis*. *Ciênc. Rural*. 42, 1457-1463.

386 Scheel-Toellner, D., Wang, K., Craddock, R., Webb, P.R., McGettrick, H.M., Assi,
387 L.K., Parkes, N., Clough, L.E., Gulbins, E., Salmon, M., Lord, J.M., 2004. Reactive
388 oxygen species limit neutrophil life span by activating death receptor signaling.
389 *Blood*. 104, 2557-2564.

390 Sprick, M., Walczak, H., 2004. The interplay between the Bcl-2 family and death
391 receptor-mediated apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta*. 1644, 125-132.

392 Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., 2000. Caspases- controlling intracellular signals
393 by protease zymogen activation. *Biochim. Biophys. Acta*. 1477, 299-306.

394 Stich, R.W., Schaefer, J.J., Bremer, W.G., Needham, G.R., Jittapalapong, S.,
395 2008. Host surveys, ixodid tick biology and transmission scenarios as related to the
396 tick-borne pathogen, *Ehrlichia canis*. *Vet. Parasitol.* 158, 256-273.

397 Tsujimoto, Y. 2003. Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the
398 mitochondria. *J. Cell. Physiol.* 195, 158-167.

399 Yu, X.J., McBride, J.W., Walker, D.H., 2007. Restriction and expansion of *Ehrlichia*
400 strain diversity. *Vet. Parasitol.* 143, 337-346.

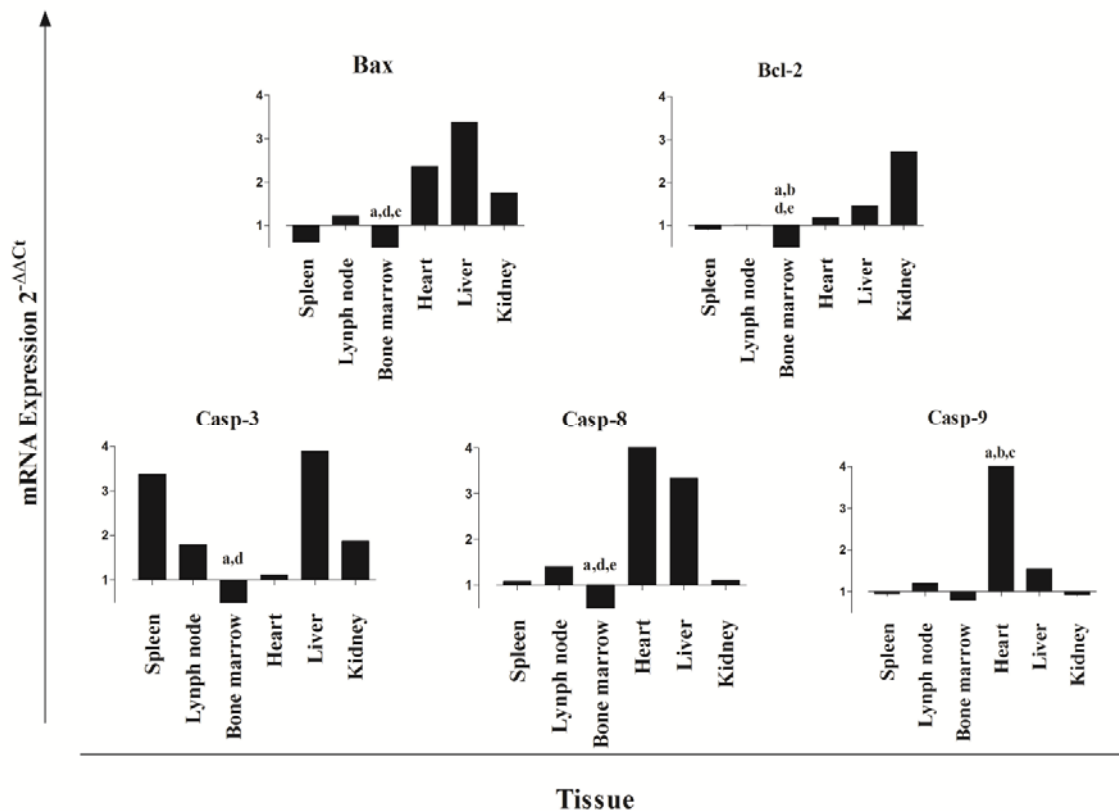
401 Zhang, J.Z., Sinha, M., Luxon, B.A., Yu, X.J., 2004. Survival strategy of obligatory
402 intracellular *Ehrlichia chaffeensis*: novel modulation of immune response and host
403 cell cycles. *Infect. Immun.* 72, 498- 507.

404

405 Table 1

406 Sequences of primers used for quantification of the expression of apoptosis related
407 target genes, and housekeeping gene GAPDH and β -Actin, by real-time PCR. F:
408 forward primer, R: reverse primer

Gene	Primer sequence (5' - 3')	Product length (bp)	Size (nt)
GAPDH			
F	TTC CAC GGC ACA GTC AAG	115	20
R	ACT CAG CAC CAG CAT CAC		20
β -ACTIN			
F	CTT CTA CAA CGA GCT GCG CG	307	20
R	TCA TGA GGT AGT CGG TCA GG		20
CASP 3			
F	TTC ATT ATT CAG GCC TGC CGA GG	83	24
R	TTC TGA CAG GCC ATG TCA TCC TCA		24
CASP 8			
F	ACA AGG GCA TCA TCT ATG GCT CTG A	70	25
R	CCA GTC AAG TAA GAG GTC AGC TCA T		25
CASP 9			
F	TCA GTC ACG TCT GTG TTC AGG AGA	97	24
R	TTG TTG ATG ATG AGG CAG TAG CCG		24
BAX			
F	TTC CGA GTG GCA GCT GAG ATG TTT	79	24
R	TGC TGG CAA AGT AGA AGA GGG CAA		24
BCL2			
F	CAT GCC AAG AAG GAA ACA CCA GAA	76	24
R	GTG CTT TGC ATT CTT GGA TGA GGG		24



409

410 **Figure 1**

411 Expression of Bax, Bcl-2, Caspase-3, Caspase-8 and Caspase-9 messenger RNA
 412 in spleen, lymph node, bone marrow, liver and kidney from dogs experimentally
 413 infected with *Ehrlichia canis*. Data are plotted as medians of $2^{\Delta\Delta Ct}$ (where Ct is the
 414 threshold cycle). Value one in Y axis represent the median to that parameter in
 415 Controls, to express up-regulation or down-regulation of apoptotic genes in
 416 inoculated animals (black bars), as compared to control group. Significant
 417 differences ($p \leq 0,05$) between tissues in infected animals are indicated by the
 418 letters: “a”, when spleen from infected animals were different from that organ
 419 represent by in graph, “b” to lymph nodes, “c” to bone marrow, “d” to heart, “e” to
 420 liver , and “f” to kidney, and so on, respectively for each comparison.

CONCLUSÕES GERAIS

A técnica de nPCR foi o teste confirmatório definitivo mais precoce e confiável da doença experimental causada pela *Ehrlichia canis* na fase aguda da infecção, seguido da técnica de RIFI.

Na fase aguda da doença de *E. canis*, ocorre aumento da apoptose nas células de baço, linfonodos e fígado, aumentando-se ao mesmo tempo a imunomarcagem da proteína anti-apoptótica Bcl 2.

A apoptose de células infectadas em nosso estudo pode estar associada à modulação da resposta inflamatória e à resposta imunológica celular do hospedeiro à *E. canis*.

A medula óssea apresentou os menores níveis de expressão de genes em animais infectados, independentemente da molécula avaliada Bax, Bcl-2, ou seja caspases 3, 8 ou 9. Isso poderia ser interpretado como uma evidência do esgotamento da medula óssea, baixa expressão de moléculas de adesão celular e imunossupressão.

Na fase aguda da doença experimental, *Ehrlichia canis* modula a apoptose em diferentes formas em diferentes tecidos, comprovado pelo aumento da expressão da caspase 3, seja extrínseca através de caspase 8, ou por via intrínseca mitocondrial, relacionada com a relação Bax/Bcl-2.

A apoptose desempenha um papel na progressão da doença, seja com a sua participação como um mecanismo de evasão imune ou como um fator de proteção contra *E. canis*, fatos que ainda estão por ser elucidados.

PERSPECTIVAS

Empregar a técnica de qRT-PCR para identificar outras moléculas envolvidas na apoptose como o Bid, Fas, TNFRs, Smac, a fim de, reavaliar as vias de sinalização da apoptose presentes na ehrliquiose monocítica canina e esclarecer a predominância de uma ou outra.

Avaliar a expressão gênica de citocinas pro- e antiinflamatórias em vários tempos durante a fase aguda da doença e assim correlacionar estes valores com os achados de expressão gênica de moléculas apoptóticas em biopsias de baço e linfonodo coletadas nos mesmos tempos.

Realizar ensaios imunohistoquímicos para Caspase 3, Caspase 8 e Caspase 9, em diferentes tecidos com anticorpos específicos para a espécie.

Realizar estudos moleculares *in vitro* identificando as diferentes vias apoptóticas, em culturas de células mononucleares inoculadas com *Ehrlichia canis*.

ANEXOS

1. Quantificação do RNA total extraído (Nanodrop)

As amostras de RNA total foram dosadas utilizando o equipamento “Nanodrop N1000” (Thermo Scientific, Wilmington, USA)

2. Transcrição reversa (síntese da 1ª fita de DNA complementar - cDNA)

A primeira fita de cDNA, foi sintetizada utilizando o kit “High Capacity cDNA Reverse Transcription kit” (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. Para isso, adicionou-se em um tubo de 0,2 mL com tampa redonda (“domed cap”), 1 µg de RNA total presente em um volume final máximo de 10 µL. Posteriormente, foi adicionado 10 µL do mix de transcrição reversa em cada tubo de 0,2 mL contendo RNA, e posteriormente, os tubos foram colocados no termociclador Veriti™ Thermal Cycler (PE Applied Biosystems) nas seguintes condições: 1 ciclo de 10 minutos a 25°C, 1 ciclo de 120 minutos a 37°C, 1 ciclo de 15 segundos a 85°C e 1 ciclo de 5 minutos a 10°C, consecutivamente. Após o término da etapa anterior, os tubos foram retirados do termociclador e armazenados a temperatura de -20°C até o momento da amplificação da etapa de PCR em tempo real.

3. Avaliação da curva de dissociação dos iniciadores

A curva de dissociação dos iniciadores foi realizada no intuito de averiguar a ocorrência de possíveis amplificações inespecíficas. Ao final dos 40 ciclos de PCR realizados para amplificação gênica é adicionada uma etapa na qual a

temperatura aumenta gradualmente de 60°C á 95°C, mantendo-se por 15s em cada temperatura, durante o qual é feita a leitura da emissão de fluorescência. Na medida em que os produtos gerados por PCR desnaturam com o aumento da temperatura, o sinal fluorescente emitido pelo SYBR™ Green é reduzido. O gráfico resultante permite verificar se há um ou mais produtos de PCR presentes em cada reação devido a diferenças de Tm entre produtos de PCR com diferente número e composição de bases de cada *amplicon*. As curvas de dissociação referentes aos genes avaliados estão mostradas abaixo na Figura 1.

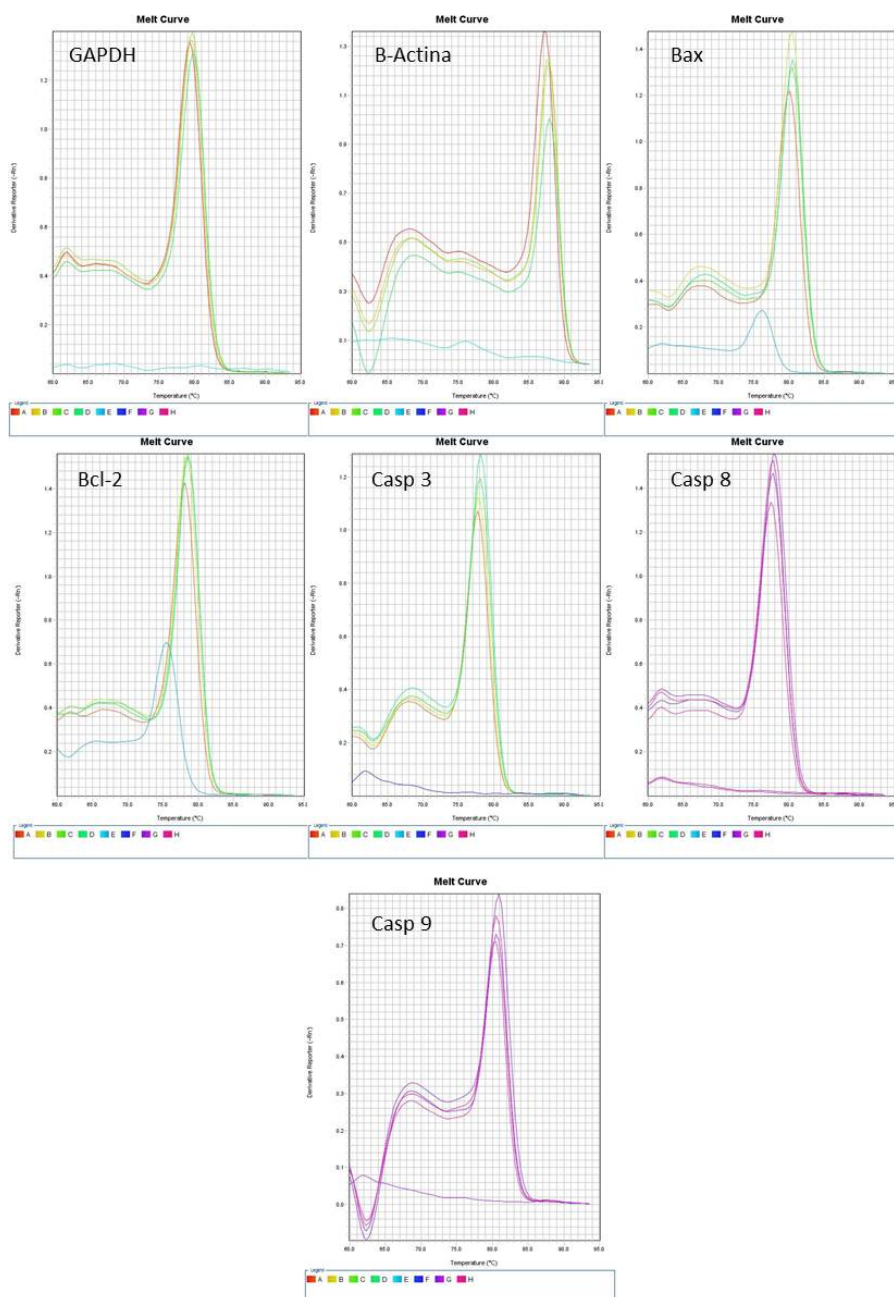


Figura 1

Curva de dissociação referente aos iniciadores GAPDH, β -Actina, Bax, Bcl-2, Casp 3, Casp 8, Casp 9. No eixo X está representada a temperatura de dissociação do amplicon gerada pela reação de PCR e no eixo Y a derivada do valor de emissão de fluorescência.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- CETEA -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 216/2009**, relativo ao projeto intitulado "***Apoptose na patogenia da infecção experimental com Erlichia canis em órgãos hemolinfopoiéticos de cães domésticos***", que tem como responsável(is) **Anilton Cesar Vasconcelos**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **10/ 03/2010**.

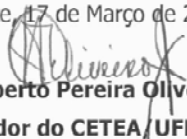
Este certificado expira-se em **10/ 03/ 2015**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 216/2009**, related to the project entitled "***Apóptosis in pathogenesis of the experimental infection with Erlichia canis in hemolymphopoietic organs in dogs***", under the supervisors of **Anilton Cesar Vasconcelos**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **March 10, 2010**.

This certificate expires in **March 10, 2015**.

Belo Horizonte, 17 de Março de 2010.


Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)

Submission Confirmation for Veterinary Microbiology

De: ees.vetmic.0.20ee59.cfl38abe@eesmail.elsevier.com en nombre de VETMIC
(vetmic@elsevier.com)

Enviado: jueves, 02 de mayo de 2013 01:15:10 a.m.

Para: irxiba@hotmail.com

Title: Gene expression of Bax, Bcl-2, Caspases 3, 8 and 9 in spleen, lymph node, bone marrow, liver and kidneys from dogs experimentally infected with Ehrlichia canis

Dear Mrs. Barbosa Sanchez,

Your submission has been received by the journal
Veterinary Microbiology.

You will be able to check on the progress of your paper by logging onto the Elsevier Editorial Systems as an Author using the following information:

<http://ees.elsevier.com/vetmic/>

Your username is: irxiba@hotmail.com

If you need to retrieve password details, please go to:

http://ees.elsevier.com/VETMIC/automail_query.asp.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Editorial Office Staff
Veterinary Microbiology