

Simone Magela Moreira

T 636.089 69

M 838 e

2005



**ERLIQUIOSE MONOCÍTICA CANINA EXPERIMENTAL: AVALIAÇÃO DE  
PARÂMETROS CLÍNICOS, LABORATORIAIS E IMUNOLÓGICOS, ANTES E  
APÓS O CLORIDRATO DE TETRACICLINA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia

Orientadora: Profa. Lygia Maria Friche Passos

Co-Orientador: Dr. Olindo Assis Martins Filho

Belo Horizonte – MG  
Escola de Veterinária - UFMG  
2005

ESCOLA DE VETERINÁRIA  
BIBLIOTECA  
BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA  
-01/05/05  
DA UFMG  
1025905-08

370388

**M838e Moreira, Simone Magela, 1971-**

**Erliquiose monocítica canina experimental: avaliação de parâmetros clínicos, laboratoriais e imunológicos, antes e após o cloridrato de Tetraciclina / Simone Magela Moreira. – 2005.**

100 p. : il.

**Orientadora : Lygia Maria Friche Passos**

**Co-orientador: Olindo Assis Martins Filho**

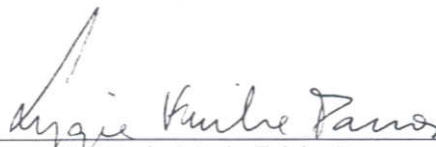
**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária**

**Inclui bibliografia**

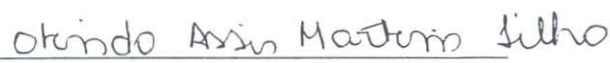
**1. Cão – Doenças – Tratamento – Teses. 2. Ehrlichia – Infecção - Teses. 3. Hematologia veterinária – Teses. I. Passos, Lygia Maria Friche. II. Martins Filho, Olindo Assis. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.**

**CDD – 636.708 96**

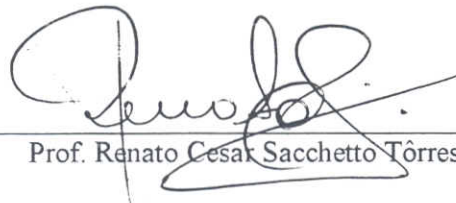
Tese defendida e aprovada em 29/03/2005, pela Comissão Examinadora constituída por:



Profa. Lygia Maria Friche Passos  
(Orientador)



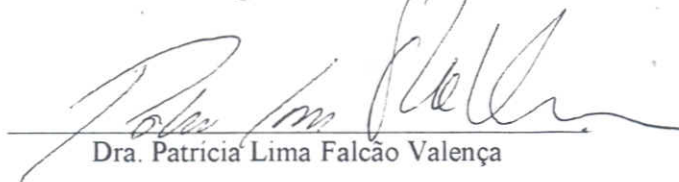
Dr. Olindo Assis Martins Filho



Prof. Renato Cesar Sacchetto Tôres



Profa. Rosângela Zacarias Machado



Dra. Patrícia Lima Falcão Valença

**Aos meus pais  
João e Nadir,  
pela vida, exemplos de valores inestimáveis  
e meios para correr atrás dos sonhos.  
Muitos dos quais sonhamos juntos...**

**Ao Felipe,  
por todo amor e compreensão dos últimos anos.**



## AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Lygia Maria Friche Passos, minha orientadora, pela amizade construída ao longo dos anos, por me receber como estagiária e posteriormente, acreditar e me orientar durante o mestrado e doutorado. Agradeço por tantos conselhos, ensinamentos que vão além das ciências convencionais e pelo constante apoio nas dificuldades encontradas nesse percurso.

Ao Dr. Olindo Assis Martins Filho, pela orientação firme e amizade acolhedora que se fizeram presentes durante o processo de doutoramento. Obrigada por ceder seu laboratório com toda a equipe de trabalho e a infra-estrutura física que possui. Nele conheci pessoas que serão sempre lembradas com muito carinho.

Ao Prof. Dr. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro, aquele que foi o meu orientador na "reta final", mas que me serviu de exemplo desde o início. Ao seu lado pude olhar a parasitologia e vislumbrar um horizonte de conhecimento ainda longínquo para mim, mas desde a descoberta, almejado...

Agradeço a Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado por ceder a amostra de *E. canis* e estar sempre disposta a compartilhar os conhecimentos adquiridos sobre a erliquiose canina.

Agradecimento especial ao colaborador Alexandre Barbosa Reis (Alex) pelos anticorpos monoclonais e por me iniciar nos estudos sobre a imunofenotipagem em cães.

Agradecimento especial à Profa. Cleuza, por disponibilizar o canil de experimentação para a execução deste trabalho. Obrigada pela compreensão ao permitir que alguns animais permanecessem além da data agendada, até que os futuros proprietários viessem busca-los.

À Camila, minha grande amiga de todas as horas. Obrigada por estar ao meu lado desde o mestrado, auxiliando-me em cada dificuldade, sempre prestativa e amorosa. Agradeço também em nome da Vitória, Manú, Tirso, Fabrício, Pretinha, Irmã do Forte, "Pobrinho", Chocolate, Forte, Pretinho e Pobrezinha. Com a sua ajuda e ética profissional, tornou a convivência com os animais e o experimento mais doce e alegre. Nós devemos muito a você...

À amiga Alcina Vieira, pela paciência típica dos grandes docentes ao me auxiliar nas punções de medula óssea e por se mostrar sempre prestativa nas coletas matutinas.

Às amigas da iniciação científica, Nayara, Ana Célia, Ana Paula e Julinha por auxiliarem nas diferentes etapas desse trabalho. Sempre me lembrarei das tardes sem almoço, discutindo um seminário ou outro tema interessante. Obrigada por tudo, que a vida de pesquisador que se inicia, seja repleta de êxitos.

Ao Marcos, colega de graduação que retornou ao meu convívio durante o doutorado, obrigada pela dedicação e carinho com que participou deste projeto. Agradeço por ainda trazer notícias do "Forte" e por intermediar o contato com a Raquel, sua esposa, que me ajudou quando o computador insistia em me atrapalhar.

À Taiza, também colega de graduação, que providenciou meios para aquecer os cães, durante os meses frios do experimento. Todos nós lhe agradecemos.

Aos amigos da UFMG, Bete (Fortaleza), Mercês, Cristian, Bete (Biologia), Lívio, Suely, Manuel, Prof. Júlio, Prof. Rubens e Alexis pela amizade e bom humor, característica marcante de nossos encontros. Agradecimentos especiais à Nadia, nossa insubstituível amiga e auxiliar nos domínios da informática, obrigada pela ajuda alegre e espontânea.

A todos os colegas do laboratório de Doença de Chagas do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) FIOCRUZ/MG pela amizade, agradável convívio, ajuda nas horas difíceis e pela oportunidade de aprender, trabalhando com vocês.

Aos funcionários da Escola de Veterinária da UFMG e do LADOC-CPqRR.

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

---

*“Os barcos estão seguros se permanecem no porto,  
mas não foram feitos para isto.”  
(Fernando Pessoa)*

**SUMÁRIO**

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
|          | <b>RESUMO</b> .....  | 15        |
|          | <b>ABSTRACT</b> .....  | 16        |
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b> .....  | <b>17</b> |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....   | <b>18</b> |
| 2.1      | AS ERLIQUIOSES .....   | 18        |
| 2.2      | O AGENTE E SEU VETOR .....   | 19        |
| 2.3      | A DOENÇA NO CÃO .....  | 21        |
| 2.4      | DIAGNÓSTICO LABORATORIAL .....   | 22        |
| 2.5      | O TRATAMENTO .....   | 23        |
| 2.6      | CÉLULAS SANGÜÍNEAS: NOVAS ABORDAGENS PARA A PESQUISA VETERINÁRIA .....             | 24        |
| 2.6.1    | Hematopoiese e produção de células com funções especializadas .....                | 24        |
| 2.6.2    | As subpopulações celulares .....   | 25        |
| 2.7      | OS ANTICORPOS MONOCLONAIS .....  | 26        |
| 2.7.1    | Marcadores de células T .....  | 27        |
| A)       | O antígeno CD5 .....   | 27        |
| B)       | O antígeno CD90 (Thy-1) .....  | 27        |
| C)       | O antígeno CD4 .....   | 27        |
| 2.7.2    | Marcadores de células B .....  | 28        |
| 2.7.3    | O antígeno comum de leucócitos: CD45 .....   | 28        |
| 2.7.4    | O Complexo de Histocompatibilidade Principal .....                                 | 28        |
| 2.7.5    | Marcadores de monócitos/macrófagos .....   | 29        |
| 2.8      | A CITOMETRIA DE FLUXO NA IMUNOFENOTIPAGEM .....                                    | 29        |
| <b>3</b> | <b>OBJETIVOS</b> .....   | <b>29</b> |
| 3.1      | OBJETIVO GERAL .....   | 29        |
| 3.2      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 29        |
| <b>4</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | <b>31</b> |
| 4.1      | AMOSTRA DE <i>Ehrlichia canis</i> .....  | 31        |
| 4.2      | ANIMAIS EXPERIMENTAIS .....  | 31        |
| 4.3      | INFECÇÕES EXPERIMENTAIS .....  | 33        |
| 4.3.1    | Reação de imunofluorescência indireta .....  | 33        |
| 4.4      | AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS-HEMATOLÓGICOS .....                           | 34        |
| 4.4.1    | Bioquímica clínica .....   | 34        |
| A)       | Dosagem de proteínas totais .....  | 34        |
| B)       | Análise da função renal .....  | 34        |
| 4.4.2    | Quadro Hematológico .....  | 34        |
| A)       | Hemograma completo .....   | 34        |
| 4.5      | AVALIAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DE LEUCÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO .....                 | 34        |
| 4.5.1    | Aspectos gerais da obtenção e preparo da suspensão de leucócitos circulantes ..... | 34        |
| 4.5.2    | Citometria de fluxo dos leucócitos sangüíneos .....                                | 34        |
| A)       | Marcação dos antígenos de superfície .....   | 34        |
| B)       | Análise convencional .....   | 34        |
| 4.6      | IMUNOFENOTIPAGEM DA MEDULA ÓSSEA CANINA .....                                      | 39        |
| 4.6.1    | Obtenção e preparo da suspensão de células da medula óssea .....                   | 39        |
| 4.6.2    | Fenotipagem das células medulares .....  | 41        |



|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 4.7      | TRATAMENTO DOS ANIMAIS INFECTADOS .....   | 43        |
| 4.8      | ANÁLISE ESTATÍSTICA .....   | 43        |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS</b> .....   | <b>43</b> |
| 5.1      | AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DURANTE A FASE AGUDA DA EMC .....  | 43        |
| 5.1.1    | Aspectos semiológicos na fase aguda da infecção experimental por <i>E. canis</i> .....  | 43        |
| 5.1.2    | Avaliação dos parâmetros bioquímicos-hematológicos durante a fase aguda da infecção experimental por <i>E. canis</i> .....  | 45        |
| 5.2      | ANÁLISE DOS ASPECTOS DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL E CELULAR DURANTE A FASE AGUDA DA EMC .....  | 46        |
| 5.2.1    | Reatividade de anticorpos anti- <i>E. canis</i> .....   | 46        |
| 5.2.2    | Dinâmica das alterações fenotípicas em leucócitos circulantes durante a fase aguda EMC .....  | 47        |
| A)       | Freqüência de linfócitos T circulantes .....  | 47        |
| B)       | Freqüência de linfócitos B circulantes .....  | 49        |
| C)       | Razão entre linfócitos T e B circulantes .....  | 49        |
| D)       | Freqüência de linfócitos T CD4+ circulantes .....   | 51        |
| E)       | Análise dos percentuais da população de monócitos (CD14+) circulantes .....   | 53        |
| F)       | Expressão do MHC-II e CD45R em linfócitos circulantes .....   | 53        |
| G)       | Freqüência de neutrófilos CD4+ circulantes .....  | 55        |
| 5.3      | CARACTERIZAÇÃO DO IMPACTO DA TERAPÊUTICA ETIOLÓGICA-ESPECÍFICA SOBRE PARÂMETROS CLÍNICO-LABORATORIAIS E IMUNOLÓGICOS DE CÃES EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS POR <i>E. canis</i> ..... | 57        |
| 5.3.1    | Parâmetros clínicos e laboratoriais antes e após o tratamento etiológico-específico da EMC .....  | 57        |
| 5.3.2    | Reatividade anti- <i>E. canis</i> antes e após o tratamento etiológico-específico da EMC .....  | 58        |
| 5.3.3    | Aspectos fenotípicos dos leucócitos do sangue periférico antes e após o tratamento etiológico-específico da EMC .....   | 59        |
| A)       | Freqüência de linfócitos T circulantes .....  | 59        |
| B)       | Freqüência de linfócitos B circulantes .....  | 59        |
| C)       | Razão entre linfócitos T e células B circulantes .....  | 61        |
| D)       | Freqüência de linfócitos T CD4+ circulantes .....   | 63        |
| E)       | Freqüência de monócitos circulantes .....   | 63        |
| F)       | Expressão do MHC e CD45R em linfócitos circulantes .....  | 65        |
| G)       | Freqüência de neutrófilos CD4+ circulantes .....  | 65        |
| 5.3.4    | Imunofenotipagem celular da medula óssea antes e após tratamento etiológico-específico da EMC .....   | 67        |
| A)       | Freqüência de Thy-1+ nas subpopulações de mononucleares .....   | 67        |
| B)       | Freqüência do MHC-II nas subpopulações de mononucleares .....   | 69        |
| C)       | Freqüência do CD45R nas subpopulações de mononucleares .....  | 69        |
| 5.4      | PRINCIPAIS ALTERAÇÕES LABORATORIAIS DE CÃES DURANTE A FASE AGUDA E APÓS O TRATAMENTO ETIOLÓGICO-ESPECÍFICO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR <i>E. canis</i> .....                       | 71        |
| <b>6</b> | <b>DISCUSSÃO</b> .....  | <b>74</b> |
| 6.1      | INFECÇÃO EXPERIMENTAL .....   | 75        |
| 6.2      | ALTERAÇÕES CLÍNICAS DA FASE AGUDA DA EMC EXPERIMENTAL .....   | 75        |
| 6.3      | ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS-HEMATOLÓGICAS DA FASE AGUDA DA EMC EXPERIMENTAL .....  | 76        |

|          |  |            |
|----------|--|------------|
| 6.4      | REATIVIDADE DE ANTICORPOS ANTI- <i>E. canis</i> DURANTE A FASE AGUDA DA EMC EXPERIMENTAL.....  | 77         |
| 6.5      | ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS EM LEUCÓCITOS CIRCULANTES DURANTE A FASE AGUDA DA EMC EXPERIMENTAL .....  | 78         |
| 6.6      | IMPACTO DA TERAPÊUTICA ETIOLÓGICA-ESPECÍFICA SOBRE PARÂMETROS CLÍNICO-LABORATORIAIS DE CÃES NA FASE AGUDA DA EMC EXPERIMENTAL.....                               | 83         |
| 6.7      | REATIVIDADE DE ANTICORPOS ANTI- <i>E.CANIS</i> APÓS TRATAMENTO ETIOLÓGICO-ESPECÍFICO DE CÃES NA FASE AGUDA DA EMC EXPERIMENTAL.....                              | 83         |
| 6.8      | IMPACTO DA TERAPÊUTICA ETIOLÓGICA-ESPECÍFICA SOBRE AS ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS DOS LEUCÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO DE CÃES NA FASE AGUDA DA EMC EXPERIMENTAL ..... | 83         |
| 6.9      | IMPACTO DA TERAPÊUTICA ETIOLÓGICA-ESPECÍFICA E IMUNOFENOTIPAGEM DA MEDULA ÓSSEA DE CÃES NA FASE AGUDA DA EMC EXPERIMENTAL.....                                   | 84         |
| <b>7</b> | <b>CONCLUSÕES .....</b>  | <b>86</b>  |
| <b>8</b> | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>   | <b>86</b>  |
|          | <b>ANEXO .....</b>   | <b>100</b> |

#### LISTA DE TABELAS

|          |  |    |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | Painel de Ac (s) monoclonais empregados na imunofenotipagem das células canina.....  | 34 |
| Tabela 2 | Avaliação dos parâmetros bioquímicos e enzimáticos em cães experimentalmente infectados com <i>E. canis</i> , durante a fase aguda e após o tratamento.....                    | 45 |
| Tabela 3 | Avaliação do eritrograma em cães durante a fase aguda e após o tratamento da infecção experimental com <i>E. canis</i> .....   | 45 |
| Tabela 4 | Avaliação hematológica do número de plaquetas e parâmetros da série branca em cães durante a fase aguda e após o tratamento da infecção experimental com <i>E. canis</i> ..... | 46 |
| Tabela 5 | Resultado da reação de imunofluorescência indireta dos soros de cães durante a fase aguda da infecção experimental com <i>E. canis</i> .....                                   | 46 |
| Tabela 6 | Avaliação dos parâmetros bioquímicos e enzimáticos após o tratamento etiológico-específico de cães experimentalmente infectados com <i>E. canis</i> ....                       | 57 |
| Tabela 7 | Avaliação do eritrograma após o tratamento etiológico-específico de cães experimentalmente infectados com <i>E. canis</i> .....  | 57 |



|          |   |    |
|----------|---|----|
| Tabela 8 | Avaliação hematológica do número de plaquetas e parâmetros da série branca após o tratamento etiológico-específico de cães experimentalmente infectados com <i>E. canis</i> ..... | 58 |
| Tabela 9 | Resultado da reação de imunofluorescência indireta dos soros de cães após o tratamento etiológico-específico da infecção experimental com <i>E. canis</i> .....                   | 58 |

---

**LISTA DE FIGURAS**

---

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Figura 1  | Cães adultos, mantidos em isolamento antes da infecção experimental por <i>Ehrlichia canis</i> .....  | 31 |
| Figura 2  | Controle das reações de imunofenotipagem.....   | 37 |
| Figura 3  | Seqüência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de populações celulares .....  | 37 |
| Figura 4  | Seqüência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de células de CD14+ .....  | 37 |
| Figura 5  | Modelos de histogramas unidimensionais (FL1 versus N.º de células).....   | 39 |
| Figura 6  | Modelos de gráficos para análise fenotípica da medula óssea .....   | 41 |
| Figura 7  | Cães no 30º dia após infecção experimental com <i>Ehrlichia canis</i> .....   | 43 |
| Figura 8  | Percentual médio de células CD5+ e Thy1+ em linfócitos circulantes de cães experimentalmente infectados por <i>E. canis</i> .....   | 47 |
| Figura 9  | Percentual médio de linfócitos B (IgM) circulantes de cães experimentalmente infectados por <i>E. canis</i> .....   | 49 |
| Figura 10 | Razão entre percentuais de linfócitos T e B circulantes de cães experimentalmente infectados com <i>E. canis</i> .....  | 51 |
| Figura 11 | Percentual médio de linfócitos T CD4+ circulantes de cães experimentalmente infectados por <i>E. canis</i> .....  | 51 |
| Figura 12 | Percentual médio de monócitos (CD14+) circulantes de cães experimentalmente infectados por <i>E. canis</i> .....  | 53 |
| Figura 13 | Canal médio de fluorescência (CMF) da expressão do MHC-II e do antígeno de membrana CD45R nos linfócitos circulantes de cães experimentalmente infectados por <i>E. canis</i> ..... | 55 |
| Figura 14 | Percentual médio de neutrófilos CD4+ circulantes de cães experimentalmente infectados por <i>E. canis</i> .....   | 55 |
| Figura 15 | Percentual médio de células CD5+ e Thy1+ em linfócitos circulantes, antes e após o tratamento etiológico-específico de cães .....   | 59 |

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Figura 16 | Percentual médio de linfócitos B (IgM+) circulantes, antes e após o tratamento etiológico-específico de cães experimentalmente infectados com <i>E. canis</i> .....   | 61 |
| Figura 17 | Razão entre percentuais de linfócitos T e B circulantes, antes e após o tratamento etiológico-específico de cães experimentalmente infectados com <i>E. canis</i> .....   | 61 |
| Figura 18 | Percentual médio de linfócitos T CD4+ circulantes, antes e após o tratamento etiológico-específico de cães experimentalmente infectados com <i>E. canis</i> .....   | 63 |
| Figura 19 | Percentual médio de monócitos (CD14+) circulantes antes e após o tratamento etiológico-específico de cães experimentalmente infectados com <i>E. canis</i> .....  | 63 |
| Figura 20 | Canal médio de fluorescência (CMF) da expressão do MHC-II e do antígeno de membrana CD45R nos linfócitos circulantes no sangue periférico, antes e após o tratamento etiológico-específico de cães experimentalmente infectados com <i>E. canis</i> ..... | 65 |
| Figura 21 | Percentual médio de neutrófilos CD4+ circulantes antes e após o tratamento etiológico-específico de cães experimentalmente infectados com <i>E. canis</i> .....   | 67 |
| Figura 22 | Percentual médio de células Thy-1+ em mononucleares imaturos e maduros da medula óssea de cães experimentalmente infectados por <i>E. canis</i> .....   | 67 |
| Figura 23 | Percentual médio de células MHC-II+ nos mononucleares imaturos e maduros da medula óssea de cães experimentalmente infectados por <i>E. canis</i> .....   | 69 |
| Figura 24 | Percentual médio de células CD45R+ nos mononucleares imaturos e maduros da medula óssea de cães experimentalmente infectados por <i>E. canis</i> .....  | 71 |

---

#### LISTA DE QUADROS

|          |   |    |
|----------|---|----|
| Quadro 1 | Quadro comparativo das principais alterações bioquímicas e enzimáticas, apresentadas por cães experimentalmente infectados por <i>E. canis</i> , durante a fase aguda e após o tratamento etiológico-específico .....   | 71 |
| Quadro 2 | Quadro comparativo das principais alterações hematológicas, apresentadas por cães experimentalmente infectados por <i>E. canis</i> , durante a fase aguda e após o tratamento específico .....                          | 73 |
| Quadro 3 | Quadro comparativo das principais alterações fenotípicas dos leucócitos circulantes, apresentadas por cães experimentalmente infectados por <i>E. canis</i> , durante a fase aguda e após o tratamento .....            | 73 |
| Quadro 4 | Quadro comparativo das principais alterações fenotípicas de células da medula óssea, apresentadas por cães experimentalmente infectados por <i>E. canis</i> , durante a fase aguda e após o tratamento específico ..... | 74 |



## RESUMO

Um dos focos atuais na pesquisa sobre erliquiose monocítica canina visa ao esclarecimento de alterações clínico-hematológicas, bem como, aos mecanismos imunológicos envolvidos na patogênese da doença. Na prática ambulatorial, observa-se que o tratamento, quando instituído durante a fase aguda, promove uma rápida recuperação do animal enfermo. Nesse contexto, foram realizadas infecções experimentais de 9 cães com *Ehrlichia canis* – amostra Jaboticabal - com a finalidade de analisar parâmetros clínicos, laboratoriais e imunológicos da fase aguda, bem como investigar o impacto do tratamento com 22 mg/Kg de Cloridrato de Tetraciclina, durante 22 dias, iniciado no 30º após a infecção. Os resultados mostram que a fase aguda foi caracterizada clinicamente pela presença de febre, palidez de mucosa, emagrecimento progressivo e aumento moderado dos linfonodos. A análise bioquímica-hematológica revelou uma queda nos níveis de creatinina e proteína total, com um aumento na concentração da enzima ALT, anemia, trombocitopenia e monocitose nos animais infectados. A avaliação da resposta imune no contexto *ex vivo*, através da fenotipagem de leucócitos do sangue periférico, demonstrou uma redução no percentual de linfócitos Thy-1+ durante um curto período da fase aguda inicial, acompanhada por uma progressiva queda no percentual de linfócitos T CD4+ que, ao final da fase aguda, apresentava-se significativamente reduzido. Nessa etapa, observou-se ainda um menor percentual de linfócitos MHC-II+ e CD45R+ circulantes. Por outro lado, houve um aumento no percentual de linfócitos B (IgM+) e células CD14+ durante toda a fase aguda o que corroborou a soroconversão verificada pela RIFI e a monocitose demonstrada nos hemogramas. Nos granulócitos observou-se um maior percentual de neutrófilos CD4+ após a infecção experimental. A resposta inicial ao tratamento foi caracterizada por uma rápida recuperação clínica com ganho de peso, aumento da atividade física e a evidente tendência ao restabelecimento dos índices bioquímicos-hematológicos com destaque para os monócitos que prontamente responderam à antibioticoterapia. Resposta também demonstrada por uma reversão aos índices normais da maioria das alterações imunofenotípicas observadas nos leucócitos durante a fase aguda. Conjuntamente, esses resultados demonstram que a infecção por *E. canis* promove importantes alterações que parecem atuar como um mecanismo de modulação da resposta imune, permitindo a persistência do agente e a instalação da fase aguda. O tratamento por sua vez, reverte tal quadro, sendo portanto, indicado para animais com erliquiose monocítica canina.

Palavras-Chaves: Erliquiose monocítica canina, hematologia, imunofenotipagem, *Ehrlichia canis*, cão.



## ABSTRACT

One of the main goals of research on canine monocytic ehrlichiosis has been to clarify the clinical and hematological alterations, as well the immunological mechanisms, involved on the pathogenesis of the disease. In the daily veterinary practice, it can be observed that treatments instituted during the acute phase promote fast improvement of the animal clinical conditions. In the present study, nine dogs were experimentally infected with *Ehrlichia canis* (Jaboticabal strain) and were treated with tetracycline hydrochloride (22 mg/Kg/per day) for 21 days, beginning at the thirtieth day after infection. Some clinical, hematological and immunological parameters were evaluated during the acute phase of the disease and after the treatment. In addition, their immune responses were evaluated before and after the treatment by cytometric analysis and cell phenotype (FACS) using monoclonal antibodies to cell surface markers for CD5, Thy-1, CD4, CD14, MHC II, CD45R, and IgM. The acute phase was clinically characterized by fever, pale mucous membranes, progressive weight loss and moderate lymphadenopathy. The biochemical-hematological analysis revealed decrease of creatinine and total protein concentrations along with anemia, thrombocytopenia, monocytosis and increased ALT enzyme concentration in the infected animals. The *ex vivo* immune response evaluation of peripheral blood leucocytes showed a percentile reduction of Thy 1+ lymphocytes during a short period of time at the beginning of the acute phase, accompanied by a progressive percentile reduction of T CD4+ lymphocytes, which was significantly reduced at the end of the acute phase. At this time, a decreased percentile of blood MHC-II+ and CD45R+ lymphocytes was observed. On the other hand, the percentage of B (IgM+) lymphocytes and CD14+ cells increased during the acute phase, corroborating with seroconversion, observed by the indirect fluorescent antibody test (IFAT), and monocytosis observed in blood examinations. A higher percentile of CD4+ neutrophils was observed in the granulocytic series after experimental infections. The initial response to the treatment was characterized by fast clinical recovery with weight gain and increased physical activity. There was an evident tendency to reestablish biochemical and hematological parameters, with monocytes responding immediately to the antibiotic treatment. Most parameters of immunofenotyping that were altered during the acute phase returned to normal, demonstrating the favorable response to the treatment. These results indicate that the *Ehrlichia canis* infection promotes important alterations, which seem to modulate the immune response, allowing persistence of the agent and the establishment of the acute phase. Treatment, on the other hand, results in restoration of immune condition and should be indicated in cases of canine monocytic ehrlichiosis.

*Keywords:* Canine monocytic ehrlichiosis, hematology, immunofenotyping, *Ehrlichia canis*, dog.

## 1- INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A erliquiose canina foi originalmente descrita por Donatien e Lestoquard em 1935 e, atualmente, é uma das doenças parasitárias emergentes mais importantes, diagnosticada em animais e seres humanos nas diferentes partes do mundo. Ocorre em áreas tropicais e subtropicais, associada à presença do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, seu principal vetor biológico (Groves et al., 1975). Várias espécies do gênero *Ehrlichia* podem causar infecções em cães, das quais *E. canis* é a mais freqüente e a que determina o quadro clínico mais grave com alta morbidade e variada mortalidade (Waner et al., 1995).

Apesar de sua extensa distribuição e inúmeras pesquisas realizadas, a patogenia da erliquiose canina não está completamente esclarecida. Após um variável período de incubação ocorrem as primeiras manifestações clínicas, sendo reconhecidas três fases da doença: aguda, subclínica e crônica, dificilmente diferenciadas nos casos de ocorrências naturais. Seguindo à infecção, os organismos se multiplicam nas células mononucleares, propagando-se para o fígado, baço, linfonodos, medula óssea e pulmões (Harrus et al., 1998). Normalmente, agentes como as *Ehrlichias* estabelecem longo estado de portador cujo exato mecanismo não é totalmente conhecido para nenhuma riquetsia (Waner et al., 2001).

Variações no período de incubação da doença, apresentação clínica e resposta ao tratamento podem estar associadas a diferenças nas amostras do parasita, dose infectante e susceptibilidade apresentada por alguns cães. O tratamento na fase aguda é primordial para um melhor prognóstico clínico (McBride et al., 2001). De acordo com Woldehiwet e Ristic (1993), as tetraciclina demonstram maior eficácia contra *E. canis*, sendo a duração da terapia extremamente importante. Para os cães que respondem adequadamente à terapia, observa-se a completa remissão dos sintomas clínicos e alterações

hematológicas de 24 a 72 horas após o início do tratamento.

Evidências clínicas e experimentais indicam que o vetor, o parasito e fatores relacionados ao hospedeiro influenciam a evolução e o resultado das infecções parasitárias. A incapacidade do hospedeiro vertebrado para controlar a infecção está aparentemente ligada a dois fatores principais: a habilidade da *Ehrlichia* para escapar dos efeitos microbicidas dos macrófagos (Wells e Rikihisa, 1988) e a menor imunidade protetora do hospedeiro, visto que alguns animais imunocompetentes podem eliminar o parasito, sem apresentar a doença (Woldehiwet e Ristic, 1993). A relação entre *E. canis* e suas células alvo, monócitos e macrófagos é fundamental; pois, contrariamente à sua função natural, essas células falham na eliminação do agente que permanece parasitando-as (Ganta et al., 2002). A resposta do organismo à invasão envolve primordialmente sua capacidade de reconhecer o invasor como um estranho. Isso depende da interação entre moléculas microbianas e moléculas presentes na superfície de células especializadas que são capazes de enviar sinais a outras células e destruir direta ou indiretamente o intruso. As respostas da fase aguda iniciam-se com a apresentação de antígenos e muitos microorganismos possuem estratégias que regulam esses eventos tendo como foco a prevenção do processamento antigênico e diminuição da sinalização célula-célula (Abbas, 2002).

Nesse aspecto, a análise da anatomia molecular da superfície celular canina é de acentuada importância, principalmente quando o parasita intracelular obrigatório se especializou na infecção de células apresentadoras de antígenos. O estudo através da citometria de fluxo é uma tecnologia relativamente recente, que permite avaliar de maneira precisa diferentes marcadores na superfície da célula e uma série de moléculas associadas às funções imunorreguladoras. Em outras áreas, a imunofenotipagem é amplamente utilizada para o diagnóstico, prognóstico e



monitoramento de pacientes após o tratamento de várias doenças. Nos últimos anos, a aplicação clínica da citometria de fluxo tem trazido importantes contribuições para a avaliação de imunopatologias e neoplasias hematológicas também na medicina dos animais de companhia (Tompkins et al., 1991; Chabanne et al., 2000; Culmsee et al., 2001; Culmsee e Nolte, 2002).

A erliquiose canina vem sendo considerada como uma das principais enfermidades infecciosas do país (Oliveira et al., 2000; Szabó et al., 2001; Moreira et al., 2003) e novos estudos sugerem que alterações no sistema imunológico encontram-se relacionadas à patogenia da doença. Dessa forma, o conhecimento do repertório celular presente no sangue periférico e na medula óssea dos cães durante a fase aguda da infecção, bem como sua representação após o tratamento específico, apresenta-se como uma ferramenta de pesquisa que visa contribuir para o esclarecimento de alguns mecanismos imunorreguladores envolvidos na dinâmica da interação celular durante a doença, com potencial importância na avaliação da eficácia em diferentes protocolos terapêuticos.

## 2- REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1- AS ERLIQUIOSES

As erliquioses são doenças causadas por patógenos, que historicamente eram reconhecidos como organismos intermediários entre vírus e bactérias. Hoje, definidas como bactérias gram-negativas, apresentam ampla distribuição mundial, com focos endêmicos e alguns surtos epidêmicos associados a vetores artrópodes.

O aumento na prevalência das doenças transmissíveis por carrapatos pode estar associado a uma maior proximidade dos animais domésticos e do homem com os hospedeiros selvagens, ao invadirem seu habitat, já que os carrapatos evoluíram essencialmente como ectoparasitas de animais selvagens e apenas uma minoria de

espécies é capaz de parasitar hospedeiros diferentes. Desequilíbrios ambientais e alterações nas populações selvagens podem causar um aumento surpreendente do número local de carrapatos, favorecendo o encontro com hospedeiros naturais e acidentais como o homem e animais domésticos (Shaw et al., 2001). Atualmente, estão entre os principais veiculadores de patógenos (vírus, bactérias, protozoários e helmintos) com importância crescente, sendo suplantados apenas pelos mosquitos como vetores de enfermidades para o homem (CDC, 2003).

A emergência das erlíquias remonta ao início do século XX, com o surgimento de doenças graves e economicamente importantes nos bovinos, passa pela *Ehrlichia canis* em cães infestados por carrapatos na Argélia e chega aos dias atuais quando novos casos acometem seres humanos, além dos animais. Erliquiose monocítica canina (EMC) é uma doença de ocorrência mundial, causada por *E. canis*, uma bactéria gram-negativa intracelular, cocobacilar pleomórfica, visível à microscopia óptica comum. Apresenta grande incidência em áreas tropicais e subtropicais concorrendo com a presença do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, seu principal vetor biológico (Groves et al., 1978). Um importante avanço nos estudos sobre EMC iniciou-se após um desastre epizootico que resultou em mais de 300 mortes entre os cães militares americanos deslocados para a Guerra do Vietnã (Huxsol et al., 1970). O quadro súbito e pancitopênico deu origem ao termo "Pancitopenia Tropical Canina", atualmente destinado à síndrome com graves alterações medulares e comprometimento imunológico, de ocorrência ainda pouco estudada. Na maioria dos cães afetados, os sintomas são inespecíficos e menos graves, sendo comum a permanência de animais parasitados por vários anos, principalmente nas regiões onde a erliquiose é endêmica (Waner et al., 2001).

A EMC é considerada, desde 1992, uma doença de importância zoonótica pela Organização Pan-americana da Saúde (Benenson, 1992). Inicialmente, o carrapato



*R. sanguineus* foi apontado como vetor da bactéria para os humanos. Posteriormente, com o advento de técnicas moleculares para o diagnóstico, a extensa maioria dos casos foi associada a infecções por *E. chaffeensis*, agente da erliquiose monocítica humana (EMH), cujo principal vetor, nos Estados Unidos, é o carrapato *Amblyomma americanum*, encontrado no cervo da cauda branca (*Odocoileus virginianus*), hospedeiro natural da riquetsia (Dumler, 1996). Porém, na Venezuela, atuais ocorrências são atribuídas a um agente que difere da *E. chaffeensis* e se aproxima da *E. canis*, sendo considerado uma nova cepa ou subespécie dessa última, capaz de infectar o ser humano (Perez et al., 1996). Unver et al. (2001) demonstraram que a amostra de *E. canis* observada em casos humanos é também encontrada em cães e carrapatos *R. sanguineus*, sugerindo o forte potencial zoonótico da transmissão envolvendo o cão.

No Brasil, a erliquiose canina foi descrita pela primeira vez em Belo Horizonte –MG (Costa et al., 1973) e um recente estudo retrospectivo dos animais atendidos no Hospital Veterinário da UFMG, demonstrou um aumento no número de diagnósticos na região a partir do ano 2000 (Moreira, 2003). Na cidade de Londrina, Dagnone et al. (2003) demonstraram que um em cada cinco cães com trombocitopenia e parasitados por carrapatos apresentam positividade na PCR para *E. canis*. Labarthe et al. (2003) demonstraram que aproximadamente 20% dos cães atendidos em clínicas veterinárias e hospitais de vários estados do Sudeste, Sul, Centro Oeste e Nordeste do país encontram-se infectados por *E. canis*. De uma forma geral, as doenças causadas pelo gênero *Ehrlichia* têm despertado grande interesse científico e de saúde pública nos últimos anos. A ausência de políticas ambientais têm promovido uma expansão populacional de vetores, proporcionando condições favoráveis à ocorrência de doenças, especialmente aquelas veiculadas pelos carrapatos para os homens e animais domésticos (Magnarelli, 1996). Campanhas preservacionistas associadas à escassez de estudos sobre doenças tidas como “exóticas” colocam em risco a sociedade, o

que se reflete em casos cada vez mais freqüentes de riquetsioses, que passam a ocorrer também nos grandes centros e parques urbanos (Lemos et al., 1996).

## 2.2 - O AGENTE E SEU VETOR

Várias espécies de *Ehrlichias* têm sido descritas em cães natural e experimentalmente infectados. Dentre todas, *E. canis* é a que determina, segundo vários estudos, o quadro clínico mais grave com alta morbidade e variada mortalidade (Rikihisa, 1991; Dumler et al., 2001).

Descrito em 1935 por Donatien e Lestoquard em um cão com febre alta e intensamente infestado por carrapatos, o agente da EMC foi primeiramente denominado *Rickettsia canis* (Donatien e Lestoquard, 1935). A distinção científica do gênero *Ehrlichia* foi estabelecida em 1945 em homenagem ao microbiologista alemão Paul Ehrlich o que conduziu à sua renomeação como *Ehrlichia canis*. Em 2001 foi proposta uma reclassificação entre os membros da ordem *Rickettsiales* e algumas espécies organizadas em diferentes grupos genéricos – genogrupos (Dumler, 2001). Taxonomicamente, o agente da EMC é atualmente classificado:

Ordem: *Rickettsiales*

Família: *Anaplasmataceae*

Gênero: *Ehrlichia*

Espécie: *E. canis*

Outros patógenos isolados freqüentemente em cães, como *Anaplasma platys* (antes *E. platys*) sofreram modificações e encontram-se distanciados no delineamento filogenético do grupo das erlíquias. Com grandes similaridades antigênicas e estruturais, são pertencentes ao mesmo genogrupo I: *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* e *E. ruminantium* (Dummler et al., 2001). De acordo com Feng e Walker (2004), tendo em vista a proximidade entre os componentes de um genogrupo, os avanços obtidos no conhecimento sobre uma das espécies devem ser considerados ao se estudar os demais membros.



Previamente, infecções por espécies de erliquias eram consideradas hospedeiro-específicas. *E. canis* era encontrada somente em canídeos infectados e *E. chaffeensis*, infectando humanos e alguns cervídeos específicos (Breitschwerd et al., 1998b). Recentemente, fatos como o isolamento de uma cepa similar a *E. canis* em um homem na Venezuela (Perez et al., 1996) e amostras de *E. chaffeensis* diagnosticadas como causa de graves manifestações clínicas em cães naturalmente infectados (Dawson et al., 1996), resultaram em um novo olhar sobre o cão e sua crescente relação com a saúde pública.

Experimentalmente, o carrapato *Dermacentor variabilis* foi capaz de transmitir *E. canis* (Johnson et al., 1998); porém, o principal transmissor é o carrapato *R. sanguineus* (Ewing, 1969; Groves et al., 1975; Lewis Jr. et al., 1977; Inokuma et al., 2000). No Brasil são relatadas 55 espécies de carrapatos agrupadas em nove gêneros (Guimarães et al., 2001). A imensa maioria das espécies (cerca de 80-90%) parasita exclusivamente os animais silvestres. O *R. sanguineus*, hoje presente em todos os continentes do planeta, parasita primordialmente o cão doméstico (Szabó et al., 1995). É um carrapato trioxeno que após as mudanças de estádios, realizadas no ambiente, procura o hospedeiro vertebrado para uma nova fase de parasitismo. Sua alimentação consiste de sangue (hematofagia), além de linfa e restos tissulares presentes na pele. Pode permanecer fixado por dias ou semanas, quando secreta uma saliva com substâncias anticoagulantes e vasoativas que facilitam a ingestão sangüínea e diminuem as reações de defesa do organismo no sítio de fixação (Labruna, 2004).

No ciclo da *E. canis*, o vetor se infecta nos estádios de larva e ninfa ao ingerir sangue, contendo a riquetsia, de um hospedeiro previamente infectado. O cão é o único hospedeiro primário conhecido para os três estádios parasitários do carrapato (larva, ninfa e adultos), e cuja presença é fator condicional ao estabelecimento de uma população em determinado local (Szabó et

al., 1995). Originário da região afro-tropical, sua distribuição cosmopolita se deve às migrações humanas nas quais os cães acompanhavam seus donos (Labruna, 2004). Embora haja relatos de *R. sanguineus* em outras espécies animais, com alguns representantes da fauna silvestre como o lobo-guará (*Chrysocyon brachurus*) e o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), deve-se salientar que não basta apenas a presença do vertebrado para o estabelecimento de uma população de artrópodos, que dependerá primordialmente, do meio ambiente e dos hábitos do hospedeiro no ecossistema, os quais devem ser favoráveis à sobrevivência e desenvolvimento das fases de vida livre. *R. sanguineus* é um carrapato de hábitos nidícolas (do latim *nidi* = ninho; *cola* = que permanece); portanto, passa as fases de vida livre nas habitações ou locais de repouso de seu hospedeiro e, quando esse encontra-se no interior do abrigo, desprende-se ao final de um repasto sangüíneo, a fim de garantir que o estágio subsequente não tenha dificuldade para se alimentar novamente (Labruna, 2004).

No carrapato, *E. canis* se multiplica na glândula salivar, intestino e hemócitos (Smith et al., 1976), não havendo migração para os ovários, o que impede a transmissão transovariana do agente (Groves et al. 1975). Após as mudanças de estádios, durante o crescimento e desenvolvimento, o *R. sanguineus* permanece infectado até a fase adulta, na qual pode veicular a doença para outros animais por até 155 dias (Neer, 1998).

Algumas espécies de riquetsias são patogênicas para os carrapatos, levando a reduções na ovoposição, viabilidade dos ovos ou sobrevida de cada estágio (Burgdorfer e Brinton, 1975; Niebylski et al., 1999). Nesses casos, a manutenção dos patógenos na natureza dependerá não somente da transmissão transovariana (o que não ocorre com *E. canis*) e sobrevivência transestadial, mas da presença de reservatórios vertebrados que funcionem como amplificadores horizontais da riquetsia na população de carrapatos (Labruna, 2004b). Estudos experimentais



demonstram que um carrapato infectado por uma espécie de *Rickettsia* torna-se incapaz de manter e transmitir outra (Macaluso et al., 2002). Em cães, acredita-se que agentes como *A. platys* e *E. canis* sejam transmitidos pelo mesmo vetor (Kordick et al., 1999), já que a co-infecção é freqüente. Porém, pouco se sabe sobre a dinâmica da infecção por diferentes espécies de patógenos em uma mesma população de *R. sanguineus*, sua importância na ocorrência de novos casos, assim como a localização da doença em relação à distribuição geográfica da população do vetor.

As interações entre o agente e seu vetor são dinâmicas e muito complexas em uma relação parasitária. Muitos parasitas coevoluíram com seus vetores ou hospedeiros por milhares de anos, permitindo que ambos desenvolvessem importantes mecanismos adaptativos. *R. sanguineus* possui em sua saliva componentes com propriedades imunossupressoras que promovem uma polarização da resposta do hospedeiro vertebrado para um perfil Th2, representado pelo aumento de IL-4, IL-10 e TGF-beta, além da inibição das citocinas IL-2, IL-12 e IFN-gama (Ferreira et al., 1998;1999 e 2003) frente aos seus antígenos. Esse efeito do parasitismo por carrapatos pode exercer um papel crucial na transmissão de patógenos por esse vetor (Castro, 2004a).

### 2.3- A DOENÇA NO CÃO

A erliquiose monocítica canina é uma doença multissistêmica caracterizada por sintomatologia complexa, que difere no tipo, duração, intensidade e ocorrência de acordo com fase clínica e variações antigênicas do agente (Breitschwerd et al., 1998b).

Apesar da extensa distribuição geográfica e inúmeras pesquisas realizadas, sua patogenia e os mecanismos que desencadeiam a maior parte das alterações laboratoriais e anatomopatológicas não estão completamente esclarecidos. Após um período de incubação de 8 a 20 dias, ocorrem as primeiras manifestações clínicas da doença causada por *E. canis*, que é caracterizada por três estágios: fase aguda,

que dura de duas a quatro semanas, fase subclínica na qual o cão permanece persistentemente infectado por anos sem exibir sinais clínicos; e por último, a fase crônica que, em muitos cães, conduz a uma doença progressiva devido à hipoplasia de medula com prognóstico desfavorável (McBride et al., 2001).

Na fase aguda, o agente se multiplica nas células mononucleares sangüíneas, propagando-se para órgãos hematopoiéticos e os principais sintomas são febre, linfadenopatia, hepatomegalia e esplenomegalia. A febre intensa (até 42°C) nos animais infectados ocorre provavelmente devido à liberação de pirógenos e substâncias antigênicas do parasito, uma vez que a resposta humoral específica pode ser detectada precocemente. A linfadenopatia e a esplenomegalia sugerem a participação da imunidade mediada por células, refletindo uma reação exagerada do organismo na tentativa de compensar a resposta humoral não efetiva (Castro, 2004a).

As alterações hematológicas mais comuns são a anemia, normalmente normocítica normocrômica, e a trombocitopenia. As proteínas séricas também sofrem variações no curso da doença, podendo apresentar hipoalbuminemia, hiperglobulinemia e hipergamaglobulinemia. A hiperglobulinemia pode ser monoclonal ou policlonal. Quando monoclonal, leva às conseqüências da hiperviscosidade como a cegueira, raramente relatadas na erliquiose. A policlonal, freqüentemente encontrada, apresenta pobre correlação entre o aumento da concentração das  $\gamma$ - globulinas e os títulos de anticorpos específicos. Assim, observa-se que *E. canis* induz a produção de anticorpos inespecíficos, fenômeno observado em outras patologias nas quais há um estímulo antigênico prolongado e ineficácia da resposta humoral. Há também, nos primeiros dias, aumento da proteína C-reativa ( $\beta$ - globulina), a indicar uma resposta de proteínas, além do aumento das  $\alpha$ - globulinas, possivelmente em função das lesões e infiltrados teciduais (Harrus et al., 1999).



O cão que sobrevive à fase aguda ou aqueles tratados inadequadamente permanecem portadores do agente, apresentando um quadro subclínico cuja estimulação antigênica prolongada determina injúrias e alterações imunológicas, que os conduzem à fase crônica, caracterizada por uma aplasia de medula e pancitopenia (Woody e Hoskins, 1991).

#### 2.4- DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Como os sintomas da erliquiose canina são na maioria das vezes inespecíficos, dificultando o diagnóstico clínico, os testes laboratoriais tornam-se essenciais para se confirmar a infecção (McBride et al., 2001). Avanços nas técnicas de diagnóstico relacionam-se com o aumento do número de casos, maiores conhecimentos sobre a doença e sua expansão geográfica.

Nos diagnósticos diretos, a presença do parasito pode ser confirmada pela visualização de mórulas no citoplasma de mononucleares circulantes. É uma técnica de pouca sensibilidade devido à baixa parasitemia que raramente ultrapassa 1% das células infectadas, mais freqüentes na fase aguda (Cadman et al., 1994). Experimentos visando à detecção de antígenos plasmáticos mostraram-se limitados, pois sua detecção deu-se entre 15 e 20 dias PI (Waner et al., 1996). Contudo, os antígenos permanecem por um período de tempo variável, sendo por isso, ineficientes para o diagnóstico da doença.

O diagnóstico através do isolamento e multiplicação *in vitro* da *E. canis* se deu inicialmente, por meio do cultivo primário de monócitos sangüíneos de cães parasitados (Ristic et al., 1972). Posteriormente, foi obtido após adição de sangue infectado sobre cultura primária de monócitos provenientes de cão saudável (Hemelt et al., 1980). Essas técnicas, devido à dificuldade de manejo e baixa repetitividade, não foram largamente adotadas. O desenvolvimento de uma linhagem contínua a partir de um histiocitoma canino, denominada DH82, possibilitou a aplicação do isolamento como método de diagnóstico sendo considerado de ótima sensibilidade. Porém, essa técnica

é laboriosa, de custos elevados, exige técnicos experientes, além do longo período necessário para adaptação e visualização das primeiras formações intracelulares (14 a 34 dias), que a inviabiliza como técnica rotineira para diagnóstico de casos agudos (Wen et al., 1997). Além disso, requer testes adicionais para caracterização do isolado e definição específica do agente etiológico. Apesar dos importantes progressos obtidos com o desenvolvimento do cultivo *in vitro*, poucos laboratórios têm utilizado consistentemente esse método, (McBride et al., 2001).

A técnica do PCR (Polymerase Chain Reaction) tem sido reportada como mais sensível que o isolamento em cultura de células (McBride et al., 1996). Foi utilizada por Iqbal e Rikihisa (1994) na pesquisa de *E. canis* na corrente sangüínea e tecidos sendo considerada melhor para o diagnóstico na fase aguda inicial da doença. Mostrou-se ideal para a identificação de animais infectados e posterior caracterização das amostras (Massung et al., 1998), trazendo avanços para o diagnóstico, tratamento e investigações epidemiológicas da erliquiose canina. Porém, requer treinamento especializado e seu custo ainda é elevado para aplicação na rotina clínica.

Dentre os métodos indiretos, a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) vem sendo aplicada com sucesso desde sua padronização (Ristic et al., 1972) e, até a atualidade, é a técnica mais utilizada devido à sua simplicidade, confiabilidade e bom custo-benefício (McBride et al., 2001). Os antígenos utilizados geralmente são procedentes de cultivo celular, comercializados mundialmente. Como todo teste sorológico, apresenta limitações: os anticorpos das classes IgM e IgG são detectáveis somente a partir da primeira semana após a infecção (PI), alguns animais apresentam soroconversão somente aos 28 dias PI (Woody e Hoskins, 1991) e as reações cruzadas observadas entre *E. canis*, *E. chaffeensis* e *E. ewingii*, comprometem a especificidade do teste (McBride et al., 1996). Outro ponto importante é que os títulos sorológicos



obtidos podem variar em função das diferenças na produção do antígeno, dos reagentes, subjetividade na titulação final e outras condições do teste. Contudo, apesar de não diferenciar as fases da doença ou assegurar a eliminação do patógeno após o tratamento - já que os cães permanecem reativos por longo período após o contato com a riquetsia -, a RIFI detecta a prevalência da exposição ao agente, aspecto fundamental para as pesquisas com infecção experimental e inquéritos sorológicos (Wen et al., 1997).

As medidas gerais de controle, em função da complexidade da doença, devem ser divididas em várias frentes de ação direcionadas aos cães doentes, aos portadores assintomáticos, ao artrópode vetor e aos casos humanos. O variado número de espécies de *Ehrlichia* que infectam cães e o persistente aumento no número de casos, associados às dificuldades no combate ao vetor têm levado os médicos veterinários a adotar diferentes estratégias para controlar a doença.

## 2.5- O TRATAMENTO

Premissa verdadeira, o tratamento da doença ainda na fase aguda é primordial para um melhor prognóstico clínico (McBride et al., 2001). Em um primeiro momento, a terapia antibiótica para a erliquiose canina envolveu o uso de penicilinas e sulfonamidas, com pouco sucesso (Ewing, 1969). O dipropionato de imidocarb (5 a 7 mg/Kg em aplicações intervaladas por 14 dias) foi utilizado para tratar cães com infecções conjuntas de *Ehrlichia* e *Babesia*, obtendo resultados variados, além de graves reações adversas que contraindicaram seu uso (Price e Dolan, 1980). Em uma única aplicação (5 mg/Kg) foi considerada segura e efetiva por Adeyanju e Aliu (1982), no tratamento da erliquiose (84%), babesiose (96%) e infecções combinadas (60%). Porém, apesar da progressiva recuperação clínica, 10% dos animais que apresentaram melhora demonstraram parasitas na corrente sanguínea, 6 semanas após a terapia. Outra droga descrita é o cloranfenicol, citado como

uma possível droga; porém, interfere diretamente na síntese do grupo heme, e seu uso acaba sendo evitado nos animais anêmicos (Woldehiwet e Ristic, 1993).

Importantes estudos demonstram a eficácia terapêutica do Cloridrato de tetraciclina (Adawa et al., 1992; Bartsch e Greene., 1996; Davidson et al., 1978; Price e Dolan, 1980) e Doxiciclina (Bartsch e Greene., 1996; Iqbal e Hikihisu, 1994; Ristic et al., 1972; Van Heerden e Immelman, 1979), mas a atuação de outros derivados desses compostos na eliminação da *E. canis* permanece controversa (Bartsch e Greene, 1996; Breitschwerd et al., 1998a). De acordo com Woldehiwet e Ristic (1993), o Cloridrato de tetraciclina é considerada a droga de escolha para o tratamento da EMC, porém, a duração da terapia é ponto crucial para a eliminação da erliquia. Nos animais que respondem à terapia, recomenda-se três a quatro semanas. Cães com sinais clínicos leves, contagem normal de leucócitos ou cães na fase aguda inicial demonstram dramática recuperação nos parâmetros clínicos e hematológicos 24-48 horas após o início da terapia (McBride et al., 1996). A completa regeneração da medula óssea demora em torno de 120 dias após o tratamento, mesmo com a recuperação clínica precoce e suposta eliminação do agente. Os animais na fase crônica, que normalmente respondem mais lentamente, necessitam de tratamentos prolongados, podendo ser necessárias mais que semanas para se eliminar a riquetsia. A diferença no tempo de resposta das infecções aguda e crônica suporta a teoria de que a forma crônica aplástica teria uma patogênese diferente daquela do tipo agudo (Amyx et al., 1971).

O tempo decorrido até a recuperação clínica e hematológica após a terapia pode, segundo Walker et al. (1970), levar o veterinário a algumas indicações quanto ao estágio da doença em um animal afetado. Essa resposta é avaliada pela melhora nos sinais clínicos, que pode ocorrer antes da recuperação na resposta hematológica. De acordo com Burhles et al. (1975), a citologia da medula óssea não é ideal para se prever o prognóstico após o tratamento.



Contudo, cães com maior celularidade óssea tendem a responder mais rapidamente. Cães podem morrer durante a fase inicial da terapia por hemorragia ou complicações infecciosas. E alguns, cronicamente infectados, podem exigir suporte terapêutico constante até sua recuperação, após vários meses (Burhles et al., 1974; Troy et al., 1980).

As tetraciclinas constituem uma família de produtos naturais e semi-sintéticos derivados de diferentes espécies de *Streptomyces* spp. que atuam inibindo a síntese das proteínas bacterianas. Agentes basicamente bacteriostáticos, apresentam atividade frente à grande variedade de microorganismos, ativos contra bactérias gram-negativas e positivas, o que os converteu em um grupo de antibióticos de uso habitual em seres humanos, nos animais e em algumas áreas da agricultura como promotores de crescimento. Atualmente, a indicação em seres humanos é cada vez menor, enquanto na veterinária, seguem ainda freqüentemente utilizados. São considerados para a Organização Mundial de Saúde (OMS) como medicamento de produção essencial, sendo proibida em 2003 sua utilização na União Européia, como promotores de crescimento, devido a evidências de que esse ato contribua para o surgimento de cepas resistentes (OMS, 2003).

Sabe-se que as tetraciclinas inibem a síntese protéica por impedirem a associação aminoácidos-tRNA no ribossomo bacteriano. Nas bactérias gram-negativas, como *E. canis*, as TC atravessam a membrana externa através dos canais de porina OmpF e OmpC como cátions positivamente carregados, provavelmente magnésio-tetraciclina. Esse complexo íon-antibiótico se acumula no periplasma e, posteriormente, dissocia-se liberando a tetraciclina sem carga, capaz de se difundir por transporte ativo através da membrana citoplasmática. Dentro do citoplasma, as moléculas de TC se ligam ao ribossomo, inibindo o crescimento bacteriano por atividade bacteriostática (Jimenez, 1976).

Todas as espécies de erlíquias sobrevivem e se replicam no interior de inclusões citoplasmáticas ligadas à membrana da célula hospedeira. Barnewall et al. (1997) demonstraram que *E. chaffeensis* reside em um endossomo primário que não se funde ao lisossomo. Esse bloqueio seletivo da fusão entre a inclusão contendo a erlíquia e o lisossomo é uma condição obrigatória para a sobrevivência intracelular, também na infecção por *E. risticii* observada por Wells e Rikihisa (1988). A proteína bacteriana responsável pelo bloqueio não é conhecida, mas observa-se um significativo aumento na fusão do lisossomo com as inclusões contendo erlíquias, induzido pela tetraciclina. E acredita-se que a diminuição ou ausência de proteínas estruturais da parede celular pode alterar propriedades iônicas ou hidrofóbicas da superfície externa do organismo e afetar potenciais interações entre a bactéria e o endossomo (Barnewall et al., 1997).

As tetraciclinas são administradas principalmente por via oral e a presença de compostos contendo ferro no estômago ou outros medicamentos pode interferir na sua absorção. São difundidas amplamente por todos os tecidos e líquidos corporais devido à sua grande lipossolubilidade, sendo eliminadas principalmente pela urina, bile, podendo acumular-se nos dentes, ossos e articulações. A resistência apresentada por algumas bactérias e a chegada de novos antibióticos têm diminuído grande parte das indicações iniciais das TC. Porém, seguem eficazes no tratamento da erliquiose e uma gama de outras infecções humanas e animais.

## 2.6- CÉLULAS SANGÜÍNEAS: NOVAS ABORDAGENS PARA A PESQUISA VETERINÁRIA

### 2.6.1- Hematopoiese e a produção de células com funções especializadas

A produção de células sangüíneas inicia-se fora do corpo no saco embrionário. Posteriormente, o fígado e o baço tornam-se os maiores órgãos hematopoiéticos passando, a partir da segunda metade do desenvolvimento fetal, a ser a medula óssea



o mais importante sítio de produção de células sangüíneas nos mamíferos. O microambiente hematopoiético é composto por uma complexa rede de células que formam o estroma, células acessórias e uma matriz extracelular de macromoléculas que respondem a estímulos específicos para a proliferação das células precursoras. Proliferação essa que, por não ocorrer espontaneamente, requer a presença de fatores estimulantes do crescimento, os quais podem ser produzidos localmente na medula óssea ou transportados dos tecidos periféricos via corrente sangüínea. As células hematopoiéticas co-expressam em sua superfície receptores para os variados estímulos, modificando o tipo predominante em função do estágio de diferenciação celular (Meyer e Harvey, 1998).

Cães são importantes espécies veterinárias e têm sido usados como modelos experimentais nas pesquisas sobre transplantes autólogos e alogênicos de células-tronco (Ladiges et al., 1990; Wagner e Storb, 1996). Contudo, estudos complexos sobre a hematopoiese canina sofrem limitações comuns aos modelos animais de grande porte, quer sejam: comercialização de um restrito painel de reagentes específicos, informações insuficientes sobre o fenótipo de progenitores, linhagens comuns e sucessiva diferenciação são vistas em escassas publicações (Faldyna et al., 2003). Em um trabalho pioneiro, Klein et al. (1983) quantificaram as células formadoras de colônias no feto e cão recém-nascido. Os resultados desse estudo indicaram que, de modo similar a outras espécies, o fígado fetal e a medula óssea após o nascimento representam sucessivos centros formadores de sangue na ontogenia primária canina.

#### 2.6.2- As subpopulações celulares

Moléculas na superfície de células hematopoiéticas desempenham um importante papel no seu desenvolvimento e função, servindo como objetos de crescentes avanços no conhecimento sobre o sistema imune.

A diferenciação imunológica dos leucócitos em subpopulações celulares ocorre com a ajuda de antígenos de membrana, os quais são expressos conforme os estágios de maturação. Porém, poucos antígenos têm sua distribuição restrita a determinadas linhagens celulares e muitos desses marcadores fenotípicos exibem uma larga distribuição dentre as células circulantes. Assim, uma análise multi-paramétrica faz-se necessária para se restringir os diferentes tipos celulares. A utilização de anticorpos contra esses antígenos conduziu a um novo entendimento da defesa imunológica e doenças correlacionadas. Além disso, a exata diferenciação e quantificação dessas células sangüíneas encontrou utilização mais adiante, favorecendo também os diagnósticos e prognósticos na rotina clínica (Lai et al., 1998).

Os linfócitos são um dos cinco tipos de células brancas circulantes do sangue animal. Constituem uma população heterogênea de células que se diferenciam uma das outras em função da origem, tempo de vida, áreas de escolha nos órgãos-alvo, estruturas da superfície e função (Meyer e Harvey, 1998). Embora possuam características comuns como tamanho, complexidade interna e relação núcleo-citoplasma, essas muitas vezes não são suficientes para se determinar a linhagem ou o papel exercido pela célula analisada (Rainer et al., 1995).

Os linfócitos T (células T) originam-se das células linfóides da medula óssea e migram para a maturação no timo (Starr et al., 2002). São caracterizados pela expressão de um complexo receptor de células T (TCR), formado por duas diferentes cadeias de polipeptídeos glicosilados, os heterodímeros  $\alpha\beta$  e por uma série de componentes menores, as cadeias invariáveis CD3  $\gamma$ ,  $\delta$  e  $\epsilon$ , e os homodímeros  $\zeta\zeta$ . As subunidades  $\alpha\beta$  estão envolvidas nas ligações do complexo de histocompatibilidade maior (MHC), enquanto o CD3 e as cadeias  $\zeta$  são cruciais para os sinais de tradução (Caplan e Baniyash, 2000; Feito et al., 2002; Kellermann et al., 2002). A superfície de cada célula T



apresenta centenas de TCR idênticos. Nos textos de imunologia são reconhecidos dois tipos de células T que diferem no seu TCR: Células T Alfa/Beta ( $\alpha\beta$ ) e Gama/Delta ( $\gamma\delta$ ). A especificidade é obtida pela combinação dos segmentos gênicos que codificam partes desses seus receptores. Posteriormente, as células  $\alpha\beta$  podem ser subdivididas em linfócitos T funcionalmente diferentes, baseados na expressão dos marcadores CD4 e CD8, como sendo T auxiliar (Th) e T citotóxico, respectivamente (Feito et al., 2002).

Os linfócitos B se originam, maturam e diferenciam-se na medula óssea (Meyer e Harvey, 1998), sendo os responsáveis pela resposta humoral do sistema imune. Para a produção de anticorpos, proliferam-se e diferenciam-se em células plasmáticas interagindo com antígenos e células T CD4+ (Parker, 1993).

Algumas moléculas reconhecidas no imunodiagnóstico de patologias humanas, têm desempenhado um importante papel na medicina veterinária (Cobbold e Metcalfe, 1994; Byrne et al., 2000). Contudo, poucas pesquisas visam esclarecer as variações encontradas nas diferentes espécies. Nos cães, os valores de referência para subtipos de linfócitos periféricos em animais saudáveis têm sido publicados para um número limitado de raças por Greeley et al. (1996), Byrne et al. (2000), Culmsee (2001 e 2002), Faldyna et al. (2001) e Toman et al. (2002). Estudos similares foram realizados em outros animais domésticos como gatos (Tompkins et al., 1991; English et al., 1994; Sellon et al., 1996) e eqüinos (McFarlane et al., 2001), mas ainda representam pouco diante das ferramentas atuais.

## 2.7- OS ANTICORPOS MONOCLONAIS

As referidas moléculas de superfície, reconhecidas pelos anticorpos monoclonais, são chamadas de antígenos, uma vez que podem ser produzidos anticorpos contra elas, ou designadas como marcadores, porque identificam e discriminam diferentes populações celulares. De acordo com a nomenclatura internacional, um marcador

que identifique uma linhagem ou um estágio particular, que tenha uma estrutura definida e seja reconhecido por um grupo de monoclonais é chamado CD (*Cluster of Differentiation*) (Abbas, 2002).

Anticorpos monoclonais (mAc) representam uma poderosa ferramenta para se detectar marcadores fenotípicos na superfície de células hematopoiéticas (Grindem, 1996; Grindem et al., 1998; Moore et al., 1992). No início, um reduzido número de mAc espécie-específicos restringia significativamente o uso da imunofenotipagem na medicina veterinária. Posteriormente, enquanto para diferentes espécies como o homem, o camundongo, o rato, o suíno e o bovino, uma seqüência de anticorpos contra diferenciações antigênicas encontrava-se definida há mais tempo, para o cão, esses estudos demoraram a se iniciar.

Em 1993, o "First International Canine Leukocyte Antigen Workshop – CLAW (Cobbold e Metcalfe, 1994) foi conduzido com o objetivo de identificar antígenos de leucócitos caninos e mAc que reconhecessem antígenos homólogos, classificando-os por analogia de acordo com a nomenclatura dos CD humanos e murinos. Desde então, reações cruzadas entre os anticorpos contra linfócitos humanos e animais domésticos vêm sendo relatadas em várias publicações (Greenlee et al., 1987; Chabanne et al., 1994; Schuberth et al., 1998; Culmsee, 2001). Atualmente, monoclonais são produzidos contra uma variedade de antígenos das células linfóides circulantes, mas há ainda poucos disponíveis para se identificar os vários estágios da diferenciação mielóide, eritróide e megacariocítica na medula óssea canina (Grindem, 1996; Weiss, 2001b).

Novas pesquisas associadas ao aumento dos mAc disponíveis comercialmente para animais de companhia têm contribuído para estabelecer a imunofenotipagem como um atrativo e importante meio de estudos no campo da imunologia clínica (Tompkins et al., 1990; Gebhard e Carter, 1992; Moore et al., 1992). Porém, deve ser considerada no trabalho com cães a análise precisa dos antígenos detectados e as características



funcionais das células que os expressam. Avaliações importantes para que se possa afirmar com segurança que, também para o cão, há determinada equivalência com outras espécies, incluindo a humana.

#### 2.7.1- Marcadores de células T

##### A) O antígeno CD5

O antígeno CD5/Ly-1 é uma glicoproteína de 67 kDa que aparece nos estágios iniciais de desenvolvimento dos linfócitos T e é abundantemente expresso na superfície de todas as células T maduras. Sua expressão nos linfócitos B e o papel na separação das linhagens dessas células são ainda controversos. É um marcador fenotípico usado na identificação e localização de células T em tecidos, numeração das células T CD5+ no sangue periférico e em algumas desordens linfoproliferativas (Williams, 1997).

Nos cães, os anti-CD5 reagem com células T específicas (Williams, 1997; McKenzie e Fahre, 1981) e são, em comparação com o anti-Thy-1, preferidos por Cobbold e Metcalfe (1994) como marcadores de células T circulantes. Essa preferência se dá em função da expressão de Thy-1 também encontrada em monócitos e granulócitos. Em contraste ao visto em humanos e roedores, apenas Chabanne et al. (1995) mencionaram a existência de células B caninas apresentando o antígeno CD5 no sangue periférico; sendo descrito como um "Pan marcador" de células T por diversos outros autores (Cobbold e Metcalfe, 1994; Rabanal et al., 1995; Williams, 1997; Byrne et al., 2000).

##### B) O antígeno CD90 (Thy-1)

Thy-1 é uma pequena glicoproteína, membro da superfamília das imunoglobulinas com peso molecular entre 20 e 40 kDa e ancorada via GPI (glicosilfosfatidilinositol) na membrana celular. Sua distribuição tecidual pode variar dentro de uma mesma espécie e ser marcadamente diferente entre espécies (Henniker, 2001). Em humanos, Thy-1 ou

CD90 é encontrado em alguns linfócitos T e B, fibroblastos, células endoteliais, neurais, em um subtipo de células CD34+ na medula óssea, cordão umbilical e fígado fetal; estando ausente nos timócitos (Ritter et al., 1983; Seeger et al., 1982; Tiveron et al., 1992). Nos camundongos, a expressão é vista nos linfócitos periféricos, no sistema nervoso e timócitos, mas ausente nas células da medula óssea. Os ratos expressam Thy-1 nos timócitos e em mais de 40% das células da medula óssea, mas não nos linfócitos do sangue periférico (Henniker, 2001). Em cães, o antígeno de superfície Thy-1 é uma glicoproteína de 20-30 kDa, expresso por monócitos, granulócitos e linfócitos T (Cobbold e Metcalfe, 1994). Nas últimas décadas, assim como para os humanos, vem sendo citado como um marcador hematopoiético de células-tronco caninas (Prendergast et al., 1986; Neuner et al., 1997; Faldyna et al., 2003).

##### C) O antígeno CD4

Nos linfócitos dos mamíferos, CD4 e CD8 são glicoproteínas expressas em subpopulações de células T excludentes mutuamente, as quais mostram padrões distintos de restrições ao MHC. Em todas as espécies já estudadas, as moléculas de CD4 são monômeros de peso molecular similar, variando entre 55-65 kD (Parners, 1989). A distribuição do CD4 tem sido mais estudada em humanos que em qualquer outra espécie devido ao seu papel como receptor para o vírus da imunodeficiência do tipo 1, sendo expresso em timócitos, células T periféricas, monócitos, macrófagos teciduais, certas células dendríticas - incluindo células de Langerhans, neurônios e em algumas células da glia (Maddon, et al., 1987).

A variabilidade entre espécies, quanto à distribuição de CD4, é especialmente evidente nas linhagens fagocíticas mononucleares e células dendríticas. Por exemplo, a expressão pode ser detectada em macrófagos de ratos, mas não nos camundongos (Crocker et al., 1987). Os monócitos dos felinos não expressam CD4 (Ackley et al., 1990) e nos cães, a molécula



é expressa nos timócitos, células T periféricas e macrófagos da zona marginal esplênica. Monócitos sangüíneos, macrófagos da polpa vermelha e células de Langerhans cutâneas caninas não possuem essa molécula na superfície celular. Nessa espécie destaca-se ainda uma característica em particular: a quase totalidade dos neutrófilos sangüíneos (97%) expressam CD4 em uma densidade equivalente à expressa pelos linfócitos T, de uma forma sem precedente em outras espécies mamíferas (Moore et al., 1992).

#### 2.7.2 Marcadores de células B

Células B podem ser identificadas pela expressão de imunoglobulinas na superfície (SmIg) como as IgM e IgD que são expressas tanto por linfócitos convencionais (B-2) quanto por não convencionais (B-1) (Lai et al., 1998). Essa subdivisão tem sido proposta baseada na expressão de CD5. Linfócitos B1 humanos apresentam CD5 em sua superfície, enquanto linfócitos B2 estariam ausentes desta expressão. Outros epitópos como CD19, CD20, CD21 e CD22 também permitem diferenciar linhagens e subtipos de células B (Rabanal et al., 1995; Shaw et al., 1998).

#### 2.7.3 Antígeno comum de leucócitos: CD45

O antígeno CD45, uma proteína transmembrana formada por uma longa cadeia de aminoácidos que é tida como a maior das tirosinofosfatases associadas às células hematopoiéticas, ausente apenas em plaquetas e eritrócitos (Thomas e Lefrançois, 1988; McNeill et al., 2004). É uniformemente distribuída na membrana plasmática e enriquece regiões de contato entre células T e B, constituindo aproximadamente 10% das moléculas que são expressas na superfície celular. De alta expressão nas células hematopoiéticas, indubitavelmente, exerce um papel regulador na ativação de linfócitos T (Altin e Sloan, 1997; Katz, 2003).

Ocorre em múltiplas isoformas que variam de tamanho e peso molecular determinados pelos domínios extracelulares codificados

por exons (referidos como A, B, C) alternativamente unidos ("spliced") para formar até oito diferentes produtos protéicos. A expressão de isoformas específicas pode ser vista em vários estágios da diferenciação hematopoiética normal (Virts et al., 1997), e determinada célula pode expressar uma ou mais isoformas em sua superfície (Katz, 2003). Diversos mAc que reconhecem membros individuais têm se mostrado úteis para estudar a distribuição e as funções das proteínas CD45. As isoformas expressas em um grupo restrito de tipos de células são designadas CD45R – complexo CD45R (Abbas, 2002).

#### 2.7.4 O complexo de Histocompatibilidade Principal

O Complexo de histocompatibilidade principal (MHC) é uma região de genes altamente polimórficos, cujos produtos são expressos nas superfícies de uma variedade de células. Quando o MHC de diferentes mamíferos é comparado, algumas regiões parecem ser bem conservadas e outras diferenciam-se extremamente. Como resultado, o arranjo e o número de *loci* variam entre espécies. Primordialmente, existem dois tipos de produtos do gene MHC, designados como moléculas de classe I e classe II. O nome coletivo dado às proteínas produzidas pelo MHC também varia entre as espécies. Nos humanos, são chamadas de HLA (antígenos leucocitários humanos), nos cães são DLA, nos coelhos, RLA, nos bovinos de BoLA e assim por diante (Tizard, 2002).

Antígenos MHC-I caninos têm sido estudados por diferentes técnicas sorológicas (Doveren et al. 1986), enquanto informações sobre MHC-II presentes nos linfócitos ainda são limitadas. Porém, nos animais domésticos, assim como nos humanos, os genes MHC exercem um papel central nas respostas imunes, proporcionando um sistema de sinalização que indica a presença de peptídeos derivados de proteínas estranhas (Yuhki et al., 1989; Van der Zijpp e Egberts, 1989; Abbas, 2000).



### 2.7.5 Marcadores de monócitos/macrófagos

Alguns monoclonais podem ser utilizados para se determinar a distribuição e função de macrófagos teciduais em camundongos. Outros porém, produzem reações inespecíficas em células como eosinófilos e células dendríticas (McGarry and Stewart, 1991). Por sua vez, o CD14 é extensivamente reconhecido como o melhor marcador para a população de macrófagos/monócitos humanos. Entretanto, nos camundongos, o nível de expressão utilizando-se um mAc anti-CD14 foi baixo ou não detectável em monócitos sanguíneos (Lai et al., 1998). Já nos cães, reconhece-se uma importante expressão de CD14 por monócitos/macrófagos (Weiss, 2003).

### 2.8- A CITOMETRIA DE FLUXO NA IMUNOFENOTIPAGEM

O uso da citometria de fluxo nos laboratórios clínicos tem crescido substancialmente na última década. É um método através do qual são mensuradas múltiplas características ópticas e fluorescentes de células que seguem enfileiradas em um fluxo líquido (Brown e Wittwera, 2000). Propriedades físicas, como tamanho e complexidade interna, podem ser aferidas quando o *laser* é disparado contra uma única célula e o padrão de refração e reflexão produzido, é recebido por um conjunto de espelhos internos do aparelho. Na análise computacional do citômetro de fluxo, cada célula de uma amostra aparece individualizada como um ponto representado em um gráfico de coordenadas tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) (Weiss, 2002a).

Anticorpos conjugados a fluorocromos e ligados a diferentes componentes internos (citocinas, DNA) ou a proteínas na superfície são excitados quando atingidos pelo *laser* e podem ser utilizados para a fenotipagem destas células. A avaliação do fenótipo celular com mAc e citometria de fluxo é uma técnica multiparamétrica (qualitativa e quantitativa), precisa na identificação de células sanguíneas (Winnicka et al., 2002).

No estudo da medula óssea canina, sua complexidade celular tem sido um impedimento para avaliação da hematopoiese normal ou alterada. O uso de anticorpos bem caracterizados contra marcadores antigênicos, em combinação com os parâmetros da citometria de fluxo permitem uma análise comparativa das células (Loken et al., 1987; Faldyna et al., 2003). A aquisição de antígenos de superfície durante a maturação celular promove um meio não somente de separar diferentes linhagens, mas também de distinguir variações na maturação entre células de uma mesma origem (Shah et al., 1998).

Nos últimos anos, dentre outros usos, a citometria de fluxo vem sendo rotineiramente aplicada na medicina humana como um dos métodos de referência para análise de leucemias e linfomas (Culmsee et al., 2001). Na veterinária, tem emergido como a maior das novas tecnologias e é agora um componente essencial nos laboratórios clínicos. As aplicações potenciais são diversas, necessitando, contudo, de padronizações e cuidadosa análise específica (Weiss, 2002).

## 3- OBJETIVOS

### 3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar parâmetros clínico-laboratoriais e imunológicos, antes e após o tratamento etiológico da fase aguda da erliquiose monocítica canina experimental.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar parâmetros clínico-laboratoriais durante a fase aguda da EMC;
- Analisar aspectos da resposta imune humoral e celular durante a fase aguda da EMC;
- Caracterizar o impacto da terapêutica etiológica-específica sobre parâmetros clínico-laboratoriais e imunológicos de cães experimentalmente infectados por *E. canis*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRA DE *Ehrlichia canis*

Para a infecção experimental foi utilizada a amostra de *E. canis*, isolada de um cão naturalmente infectado em Jaboticabal (Machado et al., 1993). Essa amostra tem sido mantida no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária da UFMG e encontra-se criopreservada em nitrogênio líquido (Moreira, 2001).

### 4.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Para o presente estudo foram utilizados 12 cães (6 machos e 6 fêmeas), SRD, dos quais 11 foram mantidos em isolamento desde os 30 dias de vida e um, chamado de cão doador, foi introduzido ao grupo, já adulto. Os animais permaneceram no canil experimental da Escola de Veterinária (CEPA-UFMG) até o término do experimento, quando então encontravam-se com 14 meses de vida (Figura 1).



Figura 1 - Cães adultos, mantidos em isolamento antes da infecção experimental por *Ehrlichia canis*

Na fase inicial, foram submetidos à coleta de fezes para o diagnóstico de parasitas intestinais e coleta de sangue para testes sorológicos através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para *Babesia canis* e *E. canis*. Todos os animais foram tratados com anti-helmíntico (Drontal Plus<sup>®</sup>) na dose de 1/2 comprimido para cada 5 Kg de peso vivo (PV), além de receber a aplicação de carrapaticida (Font Line<sup>®</sup> - Top Spot) na dose de 1 ampola por animal. Após a quarta dose do anti-helmíntico, novo exame de fezes foi realizado, para certificar-se da eficácia do tratamento. Após confirmação da sorologia negativa para hemoparasitas, os animais foram remanejados de acordo com o sexo e

temperamento, identificados em fichas de registros individuais. Durante todo o período, os cães receberam água e ração comercial (Croc<sup>®</sup> baby e adulto) *ad libitum*, aplicação mensal do carrapaticida Front Line<sup>®</sup> e o canil foi pulverizado quinzenalmente com carrapaticida (Triatox<sup>®</sup>). Ao final do experimento, após tratamento e recuperação clínica, os cães foram doados a criadores previamente selecionados.

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFMG (registro n.º 035/03).



#### 4.3 INFECÇÕES EXPERIMENTAIS

Inicialmente, objetivando a multiplicação do agente e padronização dos inóculos para as infecções experimentais, o cão doador foi inoculado por via intravenosa, com 10 mL de sangue total, da amostra de *E. canis*/Jaboticabal. Diariamente, foi submetido a exame clínico e exame microscópico de esfregaços do sangue periférico (borda externa da orelha) corados pelo método de Giemsa e examinados em microscópio óptico, sob imersão, para pesquisa de mórulas de *E. canis* no interior de leucócitos mononucleares. Ao ser constatada a parasitemia, cão doador foi contido pela aplicação intramuscular de maleato de acepromazina na dose de 0,03 mg/kg. Após 10 minutos, as amostras de sangue foram colhidas em tubos vacutainer® com anticoagulante (EDTA), através da punção da veia jugular. Em seguida, 5 mL de sangue total fresco foi inoculado, por via intravenosa, em cada um dos nove animais experimentais. Dois cães não receberam o inóculo sendo mantidos como sentinelas da infecção experimental.

Diariamente, os onze cães foram submetidos a exames clínicos e exames microscópicos de esfregaços sangüíneos corados pelo Giemsa. Nos dias 0,15, 30 e 55 PI foram colhidas amostras de sangue, em tubos vacutainer®, com e sem anticoagulante, para a realização da imunofenotipagem, análise bioquímica-hematológica e sorológica.

Amostras de material da medula óssea foram colhidos aos 15, 30 e 55 pós infecção (PI) para que punções anteriores não interferissem nas avaliações dos perfis fenotípicos. A punção, na epífise tibial, foi realizada com os cães sob anestesia geral com tiopental sódico (Thionembatal®), a uma concentração de 2,5%, diluído em solução fisiológica estéril, para uma concentração final de 25mg/mL. Após sedação e anestesia, foram realizadas a tricotomia e assepsia local para que aproximadamente 3 mL do sangue medular de cada cão fosse obtido a partir da punção

aspirativa, utilizando-se de uma seringa de 10 mL previamente rinsada em EDTA 2%.

##### 4.3.1 Reação de Imunofluorescência Indireta

Para os testes sorológicos utilizou-se o kit comercial (MegaScreen FLUOREHRLICHIA canis. Mega color Diagnostik GmbH) para a detecção de anticorpos anti-*Ehrlichia canis*. O kit é composto por 10 lâminas de vidro com 12 poços demarcados com Teflon®, contendo macrófagos caninos (linhagem de células DH82) fixados e aproximadamente 20-30% parasitados com *E. canis* na forma de mórulas citoplasmáticas características. O kit contava ainda com o conjugado, controles positivo e negativo prontos para uso e um frasco com fluido de montagem. Os soros dos cães foram diluídos em PBS nas concentrações de 1:50, 1:100, 1:150. Para cada diluição a ser testada, um volume de 20 µL foi adicionado em um poço previamente identificado para referência futura e incubado por 30 minutos em câmara úmida à 37°C. Cada lâmina, continha um soro-controle negativo e um controle positivo. Após incubação, a lâmina foi gentilmente rinsada sob leve pressão permanecendo posteriormente, por 5 minutos em PBS, sendo este passo repetido por duas vezes. A seguir, após escorrer o líquido sobreposto, uma gota (20 µL) do conjugado foi acrescida em todos os poços, repetindo-se o período de incubação, porém, ao abrigo da luz. Decorrido este prazo, nova lavagem foi feita como na etapa anterior e após a montagem, procedeu-se à leitura em microscópio de fluorescência, no aumento 400X, sendo comparadas a intensidade visual e aparência das inclusões de cada poço com às dos controles positivo e negativo.

De acordo com recomendações do fabricante, soros com reatividade na diluição a partir de 1:50 foram considerados positivos para *E. canis*.



#### 4.4 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS-HEMATOLÓGICOS

##### 4.4.1 Bioquímica clínica

###### A) Dosagem de Proteínas Totais

As proteínas totais nos soros foram avaliadas pelo método colorimétrico, técnica do Biureto (Gornal et al., 1949) e as leituras realizadas em espectrofotômetro (CELM E-225D) em 510 nm.

###### B) Análise da função renal

As dosagens séricas de uréia, creatinina e alanina amino transferase (ALT) foram realizadas pelo método cinético a 37°C, com leitura por ultravioleta (UV). Proteínas totais foram quantificadas pelo método colorimétrico. Todas as leituras foram feitas no aparelho COBAS Mira4.

##### 4.4.2 Quadro hematológico

###### A) Hemograma completo

O quadro hematológico dos animais foi avaliado através do hemograma completo, pela técnica convencional de contagem de hemácias e leucócitos (Dace e Lewis, 1984) em contador automático de célula (CELM CC 510).

#### 4.5 AVALIAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DE LEUCÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO

A avaliação da resposta *ex vivo* através da citometria de fluxo, foi realizada de acordo com Reis (2001) com algumas modificações.

A citometria de fluxo é uma metodologia que utiliza um sistema ótico eletrônico, que avalia a emissão de fluorescência e dispersão de raios *laser* incidentes sobre uma célula, permitindo a análise de três parâmetros celulares: tamanho (FSC – Forward Scatter), granulosidade ou complexidade interna (SSC – Side Scatter) e fluorescência.

##### 4.5.1 Aspectos gerais da obtenção e preparo da suspensão de leucócitos circulantes

Da amostra de sangue colhido em EDTA de cada animal retirou-se 1 mL que foi transferido para um tubo Falcon de 15 ml, fundo em V. Ao tubo, adicionou-se PBS pH 7,2 / 3% SFB (Soro Fetal Bovino - GIBCO, USA) e, em seguida, o material foi centrifugado a 600 g, por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuscitado em PBS pH 7,2 / 3% SFB e novamente centrifugado. Após as lavagens, o sobrenadante foi descartado e ao sedimento homogeneizado, adicionou-se lentamente solução de lise (Facs lysing solution Becton Dickinson), sob agitação, até um volume final de 13 mL, com o objetivo de lisar as células anucleadas. O material permaneceu em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente e posteriormente, foi centrifugado a 630 g por 10 minutos na mesma temperatura. Após duas lavagens com PBS pH 7,2, o precipitado foi ressuscitado até completar 1 mL com solução PBS pH 7,2.

Antes de iniciar o protocolo de imunofenotipagem era realizado um teste de controle através de uma leitura no citômetro com uma amostra da suspensão de células. Para isto, 30 µL da suspensão celular foi adicionado à 200 µL de solução fixadora para citometria - MaxFAXFix (10,0 g/L de paraformaldeído, 10,2 g/L de cacodilato de sódio e 6,65 g/L de cloreto de sódio, pH 7,2), em tubo (Falcon 2054) específico para citometria de fluxo (FacScan - Becton Dickinson, USA). Este teste permitiu o ajuste para 1.500 eventos/segundo por tubo, além de avaliar antecipadamente a qualidade do perfil celular da amostra após a lise.

##### 4.5.2 Citometria de fluxo dos leucócitos sanguíneos

###### A) Marcação dos antígenos de superfície

Para a imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico, foram utilizados

anticorpos monoclonais específicos anti-receptor de células caninas (Tabela 1). À exceção dos anticorpos anti-CD14 Cy-5 (Cycrome - fluorescência tipo 3) e anti-IgM FITC (isotiocianato de fluoresceína - fluorescência tipo 1), os demais monoclonais eram puros, ou seja, não estavam marcados com fluorocromos, sendo necessária a utilização de um

conjugado para sua revelação. Para isto, empregou-se um anticorpo secundário anti-rato marcado com FITC. Foi analisado apenas um tipo de célula por tubo, pois o fato de a maioria dos anticorpos serem revelados pelo mesmo fluorocromo (tipo1), impossibilitou a quantificação de expressões simultâneas de diferentes antígenos em uma mesma amostra.

Tabela 1 – Pannel de Ac (s) monoclonais empregados na imunofenotipagem das células caninas

| Anticorpos monoclonais | Diluição | Hospedeiro | Clone              | Isotipo | Células alvo                        |
|------------------------|----------|------------|--------------------|---------|-------------------------------------|
| Anti CD 5              | 1:800    | Rato       | YKIX322.3          | IgG2a   | Células T                           |
| Anti Thy-1             | 1:800    | Rato       | YKIX337.217        | IgG2b   | Células T, monócitos e granulócitos |
| Anti IgM FITC          | 1:100    | Camundongo |                    | IgG1    | Células B                           |
| Anti CD 4              | 1:12.500 | Rato       | YKIX302.9          | IgG2a   | Células T helper e neutrófilos      |
| Anti MHC II            | 1:200    | Rato       | YKIX334.2          | IgG2b   | Células T e B                       |
| Anti CD 45R            | 1:200    | Rato       | YKIX753.22.2       | IgG2b   | Complexo CD45R, Leucócitos          |
| Anti CD 14             | 1:200    | Camundongo | TUK4               | IgG2a   | Monócitos                           |
| Anti Rat IgG FITC      | 1:100    | Coelho     | Policlonal Rat IgG | -       | Controle isotípico                  |

Todos os anticorpos foram produzidos pela SEROTEC Ltda. (Oxford – England).

Antes da fenotipagem, os anticorpos monoclonais primários foram previamente diluídos em PBS/ 10% SFB (FACSDil), conforme tabela 1. Da suspensão celular obtida após lise das células anucleadas, retirou-se 30 $\mu$ L que foram acondicionados em tubos de poliestireno, capacidade de 5 mL, fundo em "U" (LIMBRO, INC Biomedicals, Inc. Aurora, Ohio), identificados para a análise de cada marcador. Após serem acrescidas de 30 $\mu$ L de cada anticorpo, as amostras foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida as células foram lavadas com PBS, centrifugadas à 650 g por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 60 $\mu$ L do anticorpo secundário, policlonal (exceto quando se utilizou monoclonais anti-CD14 e anti-IgM FITC), que permaneceu incubado por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após incubação, realizaram-se duas lavagens em PBS e após a segunda centrifugação, foram acrescidos 200 $\mu$ L de

MaxFaxFix para estabilizar a reação até o momento da leitura.

Os monócitos e linfócitos B do sangue periférico foram avaliados através de um processo simples de marcação direta empregando-se anticorpos monoclonais anti-CD14 e anti-IgM caninos já conjugados a fluorocromos. A marcação se fez em tubos contendo 30 $\mu$ L do anticorpo diluídos em FACSDil, acrescentando-se 30  $\mu$ L de sangue total colhidos em EDTA. Após incubação por 30 minutos ao abrigo da luz, as amostras foram submetidas à duas lavagens e centrifugações à 650 g com PBS. O sobrenadante final foi descartado e à suspensão de células, adicionados 200 $\mu$ L de MaxFaxFix para leitura no citômetro.

#### B) Análise convencional

A análise foi realizada utilizando-se um citômetro de fluxo (FACSCalibur – Becton Dickinson USA). A identificação das



populações celulares de interesse, bem como a determinação do valor percentual de populações e subpopulações celulares, foram realizadas utilizando-se o programa Cell-Quest. A seqüência de procedimentos adotados para a obtenção dos dados através da citometria de fluxo é demonstrada de forma esquemática nas figuras a seguir. A cada etapa do experimento, foram analisados inicialmente os três controles das reações para cada amostra: o controle de células, importante na padronização da qualidade do perfil celular, o controle isotópico que detecta a ocorrência de reações cruzadas e o controle do conjugado (Figura 2), referência para o posicionamento do ponto de corte utilizado em todas as análises subseqüentes daquele indivíduo.

Para a análise da expressão dos antígenos de superfície linfocitária, o primeiro passo consistiu na identificação da população de linfócitos. Para isso, foram utilizados gráficos de distribuição pontual nos quais a população de interesse ocupa uma região característica após ajustes de ganhos de seu tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) (Figura 3A). Após a seleção da região de interesse (R1) o percentual de subpopulações celulares dentro da população selecionada foi obtido em gráficos bidimensionais de distribuição pontual com coordenadas de fluorescência 1 (FL1) *versus* fluorescência 2 (FL2) (Figura 3B). Este gráfico tipo "dot-plot" permite identificar o percentual de células

fluorescentes para um determinado fenótipo de marcação, quantificado através da estatística de quadrantes incluída no programa.

Para a avaliação da população de monócitos utilizou-se um gráfico de intensidade de fluorescência tipo 3 *versus* número de células totais (Figura 4A). O corte foi posicionado considerando-se a população celular positiva para o marcador CD14, o que permitiu obter-se o percentual equivalente a população de monócitos reativos dentro da população de leucócitos totais (Figura 4B).

Também foram avaliados alguns marcadores que se expressam de forma constitutiva na superfície celular. Para isto foi utilizada a estratégia de análise por meio de Canal Médio de Fluorescência (CMF), que representa a intensidade total de luz emitida pela excitação do fluorocromo indiretamente ligado à superfície celular. Esta estratégia objetiva ampliar a sensibilidade na detecção das possíveis variações na expressão durante as diferentes fases do experimento. A intensidade de fluorescência foi avaliada através de histogramas unidimensionais para os marcadores MHC de classe II (Figura 5A) e o complexo CD45R (Figura 5B).

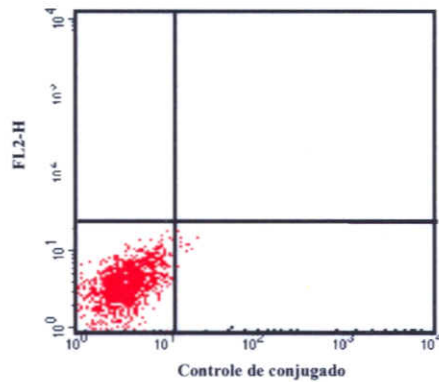


Figura 2. Controle da reação de imunofenotipagem. Foram utilizados gráficos bidimensionais de distribuição pontual (FL1 versus FL2) para se demonstrar o controle de conjugado, referência para a aferição das reações fenotípicas.

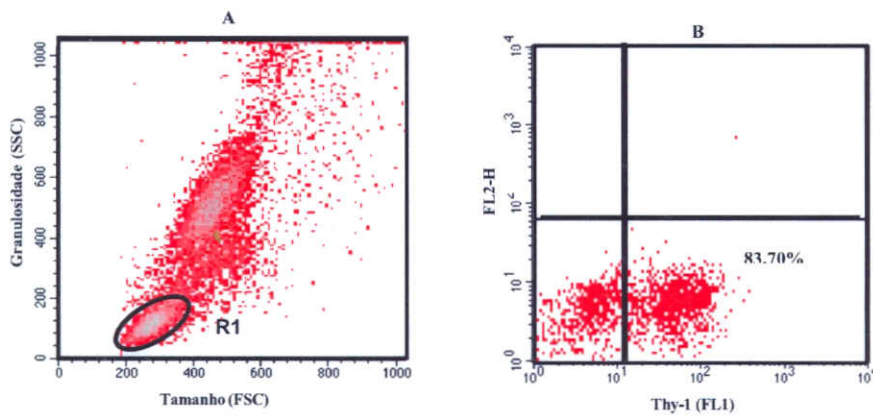


Figura 3. Seqüência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de populações celulares. (A) Seleção da população linfocitária -R1, utilizando-se gráfico de distribuição pontual FSC x SSC; (B) Gráficos com coordenadas FL1 x FL2 são utilizados para avaliar a intensidade de fluorescência apresentada pelas células presentes em R1.

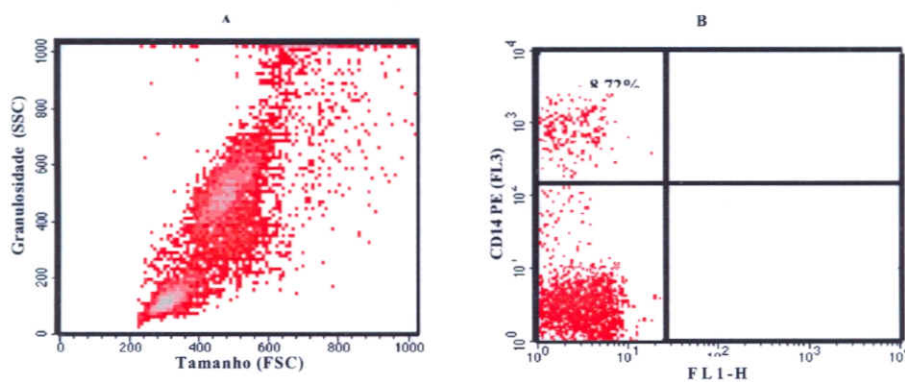


Figura 4. Seqüência de procedimentos utilizados para análise dos percentuais de CD14+. (A) gráfico de distribuição pontual FSC x SSC da população específica (*ungated*); (B) Gráfico de distribuição pontual FL3 versus FL1, utilizado para avaliar a população de monócitos presentes no sangue periférico.

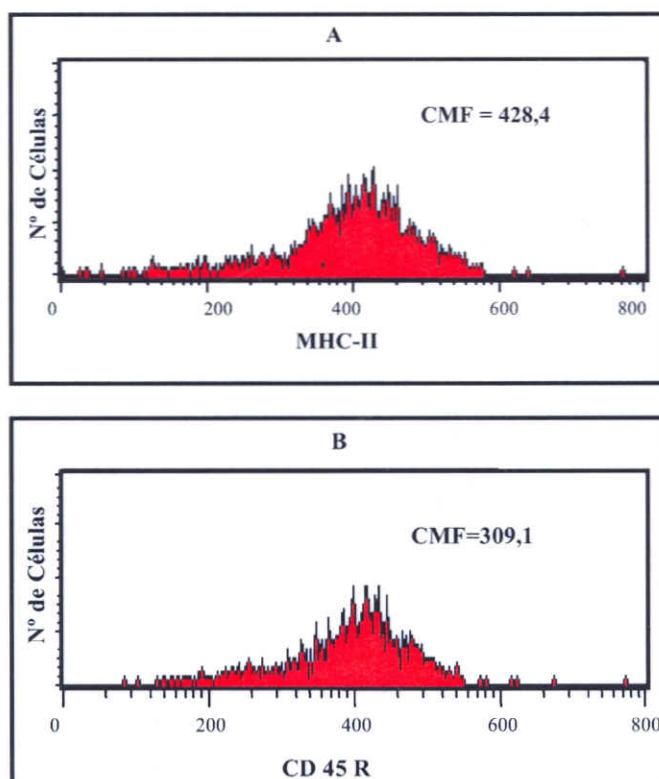


Figura 5. Modelos de histograma unidimensional (FL1 versus Nº de células). Gráfico utilizado para avaliar a intensidade de fluorescência do MHC de classe II e do complexo CD45R expressos na superfície das células presentes na região de linfócitos.

#### 4.6 IMUNOFENOTIPAGEM DA MEDULA ÓSSEA CANINA

##### 4.6.1 Obtenção e preparo da suspensão de células da medula óssea

Do material colhido na punção da medula óssea, após homogeneização, retirou-se 1 mL que após filtragem em tela para tecidos, foi submetido a duas lavagens sucessivas em PBS pH 7,2 e centrifugação à 1800 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente, com o objetivo de se retirar partículas de gordura que comprometeriam a leitura e análise. Após as lavagens, realizou-se a lise das células anucleadas conforme executado para o sangue periférico. Em seguida, foram realizadas duas novas lavagens em PBS pH 7,2 e o precipitado foi ressuscitado para 1 mL com solução PBS pH 7,2.

Antes de se iniciar o protocolo de imunofenotipagem, foi realizada uma leitura no citômetro para controle de qualidade da suspensão celular, a qual permitiu ajustar o número de eventos para 30.000/tubo e avaliar a qualidade do perfil da amostra.

Para a marcação fenotípica das células da medula óssea foram utilizados os anticorpos monoclonais Thy-1, MHC-II e CD45R na mesma diluição empregada na fenotipagem do sangue periférico (Tabela 1), além do conjugado que promoveu a revelação já que, como dito anteriormente, estes anticorpos não são previamente marcados com fluorocromos.



#### 4.6.2- Fenotipagem das células medulares

A aquisição e análise da medula óssea canina pelo citômetro de fluxo, foi realizada conforme descrito por Faldyna et al. (2003) e Weiss et al. (2000), com algumas modificações.

Para a fenotipagem, utilizaram-se 50 $\mu$ L da suspensão celular que foram adicionados a cada tubo identificado que continha 50  $\mu$ L do anticorpo primário previamente diluído. Após incubação de 30 minutos à temperatura ambiente, e duas lavagens com PBS, adicionou-se 50 $\mu$ L do conjugado, permanecendo ao abrigo da luz e à temperatura ambiente por mais um período de 30 minutos para que se efetivasse a ligação. Após duas lavagens com PBS, foi acrescido ao precipitado, 200 $\mu$ L de MaxFaxFix para leitura no citômetro.

Para a análise das populações mononucleares, utilizou-se da estratégia denominada análise reversa (ou "back gate"), onde a seleção das populações de interesse (R1) e (R2) foi realizada em gráficos bidimensionais de distribuição pontual da fluorescência 1 (FL1) *versus* granulosidade (SSC) (Figura 6A). Um gráfico adicional de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC), na modalidade multicolor, foi empregado para garantir a localização da população selecionada (Figura 6B), conforme descrito pelos autores citados. A análise do percentual de expressão de cada marcador na população selecionada foi determinada em histogramas unidimensionais, onde se obteve o percentual de população positiva para cada marcador de superfície celular.

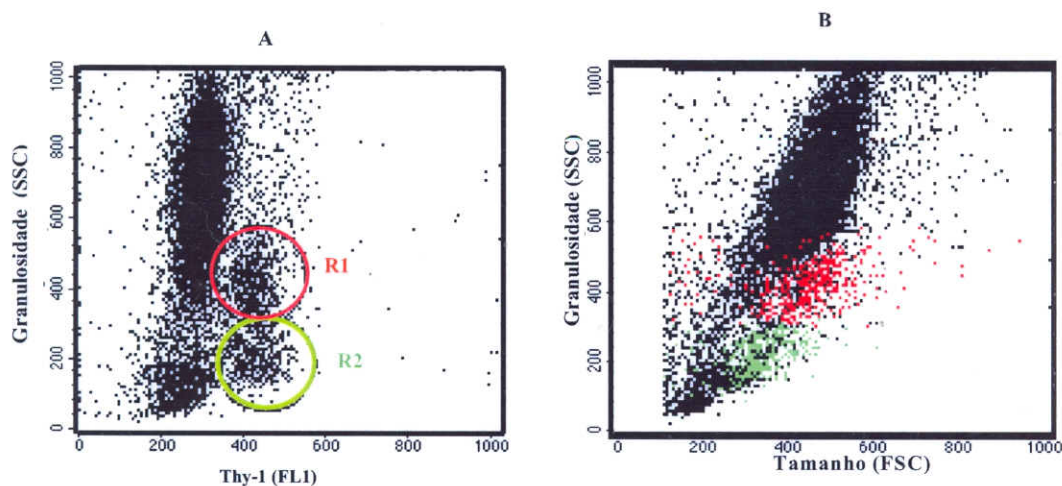


Fig.6- Modelos de gráficos utilizados para análise fenotípica da medula óssea. Análise da expressão do marcador Thy-1 em células mononucleares da medula óssea utilizando-se a estratégia de análise reversa ("back gate"). O primeiro passo constituiu-se na seleção das populações celulares de interesse em gráficos de coordenadas fluorescência 1 (FL1) *versus* granulosidade (SSC) (A). A seleção da população de interesse foi confirmada através do gráfico de distribuição pontual de tamanho-FSC *versus* granulosidade-SSC (B).

#### 4.7- TRATAMENTO DOS ANIMAIS INFECTADOS

Os animais foram tratados, a partir do 30º dia PI, com cápsulas de Cloridrato de Tetraciclina formuladas para dosagens individuais de 22 mg/Kg PV, administradas por via oral, de 8/8 horas, durante 21 dias (Woldehiwet e Ristic, 1993). A dose foi ajustada de acordo com o peso apresentado no primeiro dia de tratamento e oferecida junto à ração pastosa comercial (Bonny®) para todos os cães, exceto para os dois animais não-infectados (sentinelas) que recebiam, no mesmo horário, uma porção do patê puro.

Durante o tratamento, os cães foram monitorados de acordo com os parâmetros já estabelecidos para a fase aguda (item 4.3).

#### 4.8- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nas comparações das análises obtidas pelo programa *Cell Quest* foi empregado o teste T de Student e a normalidade dos dados verificada pela ANOVA. Os valores de uréia, proteínas totais e ALT sofreram transformação logarítmica para que se adequassem à análise de variância. Os valores de creatinina não apresentaram normalidade e a análise foi realizada pelo teste não paramétrico de Wilcoxon. Para os cálculos estatísticos utilizou-se o programa GraphPadPrism (GraphPad Software Inc.), versão 4.0.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DURANTE A FASE AGUDA DA EMC

#### 5.1.1 Aspectos semiológicos na fase aguda da infecção experimental por *E. canis*

Dos nove cães inoculados com *E. canis*, amostra Unesp/Jaboticabal, as primeiras alterações clínicas foram observadas a partir do décimo dia PI quando um cão apresentou ligeiro aumento dos linfonodos superficiais e febre no décimo segundo dia PI. Nesse animal, a presença de mórulas no citoplasma de monócitos foi detectada através de esfregaços sangüíneos no décimo segundo dia PI. Nenhum outro sintoma foi observado neste animal até o término do tratamento. Os demais cães apresentaram febre ( $41,5 \pm 1,3^{\circ}\text{C}$ ) entre o décimo terceiro e décimo quinto dias PI. Outros sinais clínicos observados foram: palidez de mucosas, acentuado emagrecimento, aumento moderado dos linfonodos, diarreia e opacidade com queda de pêlos (Figuras 7A e 7B). Três animais (33%) desenvolveram esplenomegalia palpável no decorrer dos 30 dias de infecção. Mórulas do parasito foram encontradas esporadicamente no citoplasma de monócitos somente durante o período febril em todo o grupo experimental. Em alguns monócitos foram observadas inclusões sugestivas dos estágios preliminares às mórulas de *E. canis*, sugerindo a multiplicação do agente na corrente sangüínea.



Figura 7- Cães no 30º dia após infecção experimental com *Ehrlichia canis*. (1) Animal apresentando acentuado emagrecimento, (2) Animal caquético, com escaras e lesões ulcerativas de decúbito.



5.1.2. Avaliação dos parâmetros bioquímicos-hematológicos durante a fase aguda da infecção experimental por *E. canis*

Os resultados da avaliação bioquímica dos cães experimentalmente infectados por *E. canis* durante a fase aguda estão representados na tabela 2.

Após a infecção experimental com *E. canis* os valores de uréia não variaram estatisticamente em relação ao dia zero. Já creatinina e proteínas totais apresentaram uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) na concentração aos 30 dias PI. Os valores da enzima alanino amino transferase (ALT), ao final da fase aguda, encontravam-se significativamente ( $p < 0,05$ ) elevados, em relação ao dia zero.

Na tabela 3 são demonstrados os resultados dos parâmetros hematológicos da série vermelha (eritrograma) avaliados nos mesmos períodos. A análise estatística indica uma acentuada anemia nos animais após a infecção experimental, determinada

por uma queda no número de hemácias, hematócrito ( $p < 0,0001$ ) e hemoglobina ( $p < 0,001$ ).

Os resultados dos parâmetros hematológicos relativos à série branca e à contagem de plaquetas, durante a fase aguda da erliquiose canina experimental estão na tabela 4.

A análise do número de plaquetas demonstrou uma redução intensa e estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ) no 30º dia PI em relação ao dia zero. O leucograma revelou dentre os granulócitos, um aumento ( $p < 0,05$ ) no número de neutrófilos bastonetes no 30º dia PI em relação ao dia zero. Contrariamente, o número de neutrófilos segmentados apresentou uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) após a infecção experimental. Sobre a linhagem agranulocítica, destaca-se o aumento significativo ( $p < 0,001$ ) no número de monócitos aos 30 dias PI quando comparado ao dia zero.

Tabela 2 – Avaliação dos parâmetros bioquímicos e enzimáticos em experimentalmente infectados com *E. canis*, durante a fase aguda.

| Parâmetros Bioquímicos               | Fases da Infecção (N=9) |                         |
|--------------------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                                      | Dia Zero                | 30 dias PI              |
| Uréia (mg/dL) <sup>log</sup>         | 1,59 ± 0,1              | 1,46 ± 0,2              |
| Creatinina (mg/dL)                   | 0,8 ± 0,1               | 0,6 ± 0,1 <sup>a</sup>  |
| Proteína Total (g/dL) <sup>log</sup> | 0,82 ± 0,1              | 0,66 ± 0,1 <sup>a</sup> |
| ALT (U/L) <sup>log</sup>             | 1,45 ± 0,2              | 1,62 ± 0,4 <sup>a</sup> |

Os resultados são expressos como média dos valores ± desvio padrão. (log)= Valores transformados para avaliação estatística (Transformação logarítmica). PI= Pós infecção, ALT= alanino amino transferase; N= número de animais avaliados. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontram-se representadas pela letra a, em relação ao dia zero.

Tabela 3 – Avaliação do eritrograma em cães durante a fase aguda da infecção experimental com *E. canis*.

| Parâmetros Hematológicos               | Fases da Infecção (N=9) |                               |
|--|-------------------------|-------------------------------|
|  | Dia Zero                | 30 dias PI                    |
| Hemácias ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ ) | <b>6,2 ± 0,7</b>        | <b>4,9 ± 0,8<sup>a</sup></b>  |
| Hemoglobina (g/dL)                     | 14,0 ± 0,9              | 11,8 ± 0,4 <sup>a</sup>       |
| Hematócrito (%)                        | <b>41,5 ± 6,2</b>       | <b>33,8 ± 6,8<sup>a</sup></b> |

Os resultados estão expressos como média dos valores absolutos ± desvio padrão. N= número de cães avaliados em cada fase. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,001$ ) encontram-se representadas pela letras a, em relação ao dia zero. Diferenças com  $p < 0,0001$  são representadas pelos números em negrito



Tabela 4 – Avaliação hematológica do número de plaquetas e parâmetros da série branca em cães durante a fase aguda da infecção experimental com *E. canis*.

| Parâmetros Hematológicos                  | Fases da Infecção (N=9) |                               |
|---|-------------------------|-------------------------------|
|   | Dia Zero                | 30 dias PI                    |
| Plaquetas ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )   | <b>368 ± 83,2</b>       | <b>223 ± 51,7<sup>a</sup></b> |
| Leucócitos ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )  | 10,0 ± 0,4              | 10,4 ± 0,2                    |
| Granulócitos                              | 8,4 ± 1,1               | 7,6 ± 1,8                     |
| Neutrófilos ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ ) | 8,1 ± 1,0               | 7,3 ± 1,6                     |
| N. bastonetes                             | 0,2 ± 0,7               | 0,9 ± 0,7 <sup>a</sup>        |
| N. segmentados                            | 7,9 ± 0,3               | 6,4 ± 0,9 <sup>a</sup>        |
| Eosinófilos ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ ) | 0,2 ± 0,1               | 0,3 ± 0,2                     |
| Agranulócitos                             | 1,9 ± 0,4               | 2,3 ± 0,6                     |
| Linfócitos ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )  | 1,7 ± 0,4               | 1,9 ± 0,5                     |
| Monócitos ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )   | <b>0,2 ± 0,0</b>        | <b>0,4 ± 0,1<sup>a</sup></b>  |

Os resultados estão expressos como média dos valores absolutos ± desvio padrão. N= número de cães avaliados em cada fase. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontram-se representadas pela letra a, em relação ao dia zero. Diferenças com  $p < 0,001$  são representadas pelos números em negrito.

## 5.2 ANÁLISE DOS ASPECTOS DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL E CELULAR DURANTE A FASE AGUDA DA EMC

### 5.2.1 Reatividade de anticorpos anti-*E. canis*

Na tabela 5 são apresentados os resultados do teste sorológico (RIFI) para detecção de

anticorpos anti-*E. canis* durante o experimento.

No início, dia zero, todos os animais apresentaram-se negativos, sendo considerados sem contato prévio e livres do agente. Aos 15 dias PI um cão apresentou reação sorológica positiva com o título 1:50 e os demais foram diagnosticados como sorologicamente positivos aos 30 dias PI.

Tabela 5- Resultado da reação de imunofluorescência indireta dos soros de cães durante a fase aguda da infecção experimental com *E. canis*.

| Animais | Título Final |           |           |
|---------|--------------|-----------|-----------|
|         | Dia Zero     | Dia 15 PI | Dia 30 PI |
| 01      | Negativo     | Negativo  | 1:50      |
| 02      | Negativo     | Negativo  | 1:50      |
| 03      | Negativo     | Negativo  | 1:50      |
| 04      | Negativo     | Negativo  | 1:50      |
| 05      | Negativo     | Negativo  | 1:50      |
| 06      | Negativo     | 1:50      | 1:150     |
| 07      | Negativo     | Negativo  | 1:50      |
| 08      | Negativo     | Negativo  | 1:50      |
| 09      | Negativo     | Negativo  | 1:50      |

### 5.2.2 Dinâmica das alterações fenotípicas em leucócitos circulantes durante a fase aguda da EMC

#### A) Frequência de linfócitos T circulantes

A análise fenotípica dos linfócitos T foi realizada com o emprego dos anticorpos monoclonais Anti CD5 e Anti Thy-1 caninos. A figura 8A mostra o resultado do percentual de linfócitos T CD5+ na população de linfócitos totais do sangue periférico de cães durante a infecção experimental com *E. canis*. A análise estatística dos resultados não demonstrou diferença estatística entre o dia zero ( $56,48 \pm 6,18$ ), 15º dia PI ( $53,27 \pm 11,31$ ) e 30º dia PI ( $55,80 \pm 10,87$ ).

A figura 8B mostra os resultados dos valores percentuais de linfócitos Thy-1+ na população de linfócitos totais do sangue periférico durante a fase aguda da erliquiose monocítica canina. A análise estatística dos resultados mostrou que 15 dias após a infecção experimental ( $47,57 \pm 8,56\%$ ) observa-se uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) no percentual de expressão deste marcador em relação aos dias zero ( $62,70 \pm 11,50\%$ ) e 30 PI ( $59,60 \pm 12,17\%$ ). Não são observadas diferenças estatísticas quando comparadas as médias dos percentuais do 30º dia PI e o dia zero.

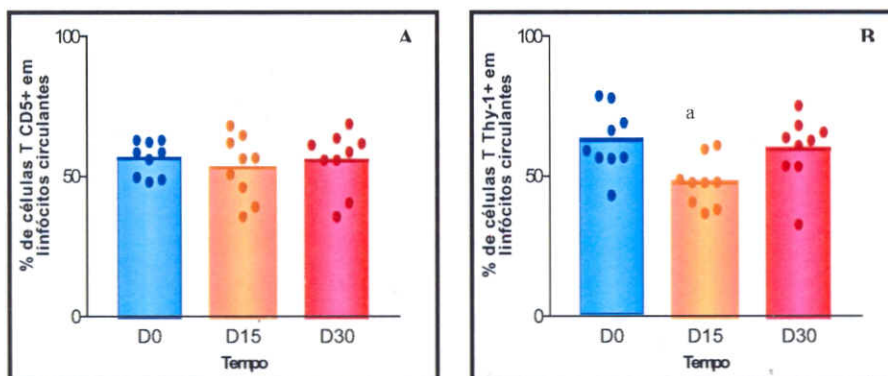


Figura 8 - Percentual médio de células CD5+ (A) e Thy1+ (B) em linfócitos circulantes de cães experimentalmente infectados por *E. canis*. As etapas do experimento são representadas por D0, correspondendo ao dia zero e D15 e D30, aos 15º e 30º dia pós infecção, respectivamente. Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontram-se representadas pelas letras: a = em relação ao dia zero. Método estatístico utilizado – ANOVA seguido por Teste-t de Student.



## B) Frequência de linfócitos B circulantes

A população de linfócitos B circulantes foi identificada com a utilização de anticorpos monoclonais anti IgM canina. Os percentuais médios de linfócitos B (IgM+) na população de linfócitos totais do sangue periférico de cães experimentalmente

infectados com *E. canis* estão na figura 9. Os resultados demonstram que após a infecção experimental, o percentual de linfócitos B (IgM+) aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) no 15º dia PI ( $43,22 \pm 12,10$ ) mantendo-se elevado no 30º dia PI ( $44,25 \pm 12,18$ ) em relação ao dia zero ( $30,59 \pm 11,52$ ).

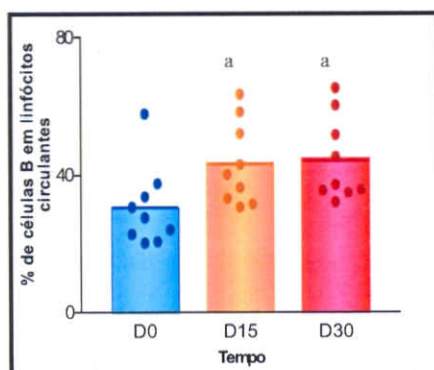


Figura 9 - Percentual médio de linfócitos B (IgM+) circulantes de cães experimentalmente infectados por *E. canis*. As etapas do experimento são representadas por D0 correspondente ao dia zero e D15 e D30, aos 15º e 30º dia pós infecção, respectivamente. Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontram-se representadas pela letra: a = em relação ao dia zero. Método estatístico utilizado – ANOVA seguido por Teste-t de Student

## C) Razão entre linfócitos T e B circulantes

As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos anti-CD5 (A) e Thy-1 (B) para a marcação dos linfócitos T e anti-IgM canina para a identificação das células B. A figura 10A mostra a razão entre o percentual de linfócitos T (CD5+) e linfócitos B (IgM+) significativamente maior no dia zero ( $2,05 \pm 0,64$ ) em relação aos 15

dias PI ( $1,33 \pm 0,47$ ) e 30 dias PI ( $1,33 \pm 0,41$ ).

Na figura 10B são representados os percentuais da razão entre os linfócitos T (Thy-1+) e linfócitos B (IgM+). Os resultados demonstram de forma semelhante, uma diminuição a partir do 15º dia PI ( $1,18 \pm 0,40$ ) que se manteve no 30º dia PI ( $1,46 \pm 0,49$ ) em relação ao dia zero ( $2,32 \pm 0,39$ ).

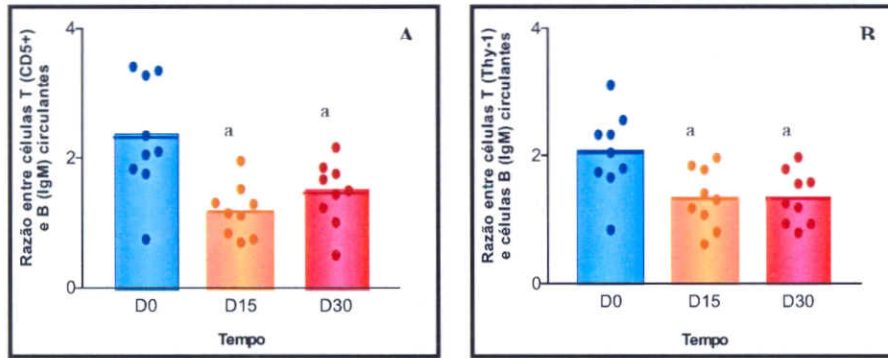


Figura 10- Razão entre percentuais de linfócitos T e B circulantes de cães experimentalmente infectados com *E. canis*. As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos anti-CD5 (A) e Thy-1 (B) para a marcação dos linfócitos T e anti-IgM canina para a identificação das células B. As etapas do experimento são representadas por D0 correspondente ao dia zero e D15 e D30, aos 15° e 30° dia pós infecção, respectivamente. Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontram-se representadas pela letra: a= em relação ao dia zero. Método estatístico utilizado – ANOVA seguido por Teste-t de Student

D) Frequência de linfócitos T CD4+ circulantes

A figura 11 demonstra o percentual de células T CD4+ na população de linfócitos circulantes durante a fase aguda da infecção experimental com *E. canis*. A

análise estatística dos resultados demonstrou que após a infecção houve uma redução gradual e significativa ( $p < 0,05$ ) no percentual destas células a partir do 15° dia PI ( $28,91 \pm 5,92$ ) com acentuada queda no 30° dia PI ( $24,86 \pm 3,88$ ), em relação ao dia zero ( $37,46 \pm 7,02$ ).

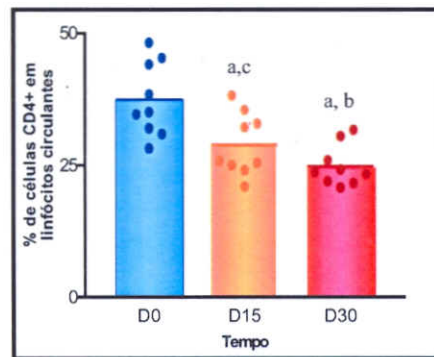


Figura 11- Percentual médio de linfócitos T CD4+ circulantes de cães experimentalmente infectados por *E. canis*. As etapas do experimento são representadas por D0 correspondente ao dia zero e D15 e D30, aos 15° e 30° dia pós infecção, respectivamente. Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontram-se representadas pelas letras: a = em relação ao dia zero, b = em relação aos 15 dias PI e c = em relação ao 30° dia PI. Método estatístico utilizado – ANOVA seguido por Teste-t de Student.



E) Análise dos percentuais da população de monócitos (CD14+) circulantes.

Na figura 12 são representados os percentuais de monócitos (CD14+) na população de leucócitos totais do sangue periférico de animais durante a fase aguda

experimental da erliquiose monocítica canina. A análise dos resultados revelou que após a infecção com *E. canis* houve um aumento significativo ( $p < 0,0001$ ) dos monócitos no 15º dia PI ( $4,58 \pm 1,0$ ) que se manteve elevado até o 30º dia PI ( $5,36 \pm 1,22$ ), em relação ao dia zero ( $1,79 \pm 0,58$ ).

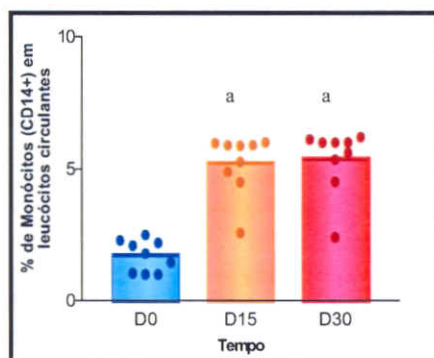


Figura 12 - Percentual médio de monócitos (CD14+) circulantes de cães experimentalmente infectados por *E. canis*. As etapas do experimento são representadas por D0 correspondente ao dia zero e D15 e D30, aos 15º e 30º dia pós infecção, respectivamente. Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,0001$ ) encontram-se representadas pela letra: a = em relação ao dia zero. Método estatístico utilizado – ANOVA seguido por Teste-t de Student.

F) Expressão do MHC-II e CD45R em linfócitos circulantes

A figura 13A representa a análise através do canal médio de fluorescência, da expressão do MHC-II na população de linfócitos do sangue periférico, avaliada durante a fase aguda da infecção experimental com *E. canis*. A análise dos dados revelou que no 30º dia PI ( $309,1 \pm 51,8$ ) houve uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) da expressão em relação ao dia zero ( $356,3 \pm 23,1$ ).

A expressão do complexo CD45R é demonstrado na figura 13B que representa a análise através do canal médio de fluorescência dos linfócitos circulantes nos animais experimentalmente infectados com *E. canis*. Os resultados demonstram uma significativa diminuição ( $p < 0,05$ ) no 30º dia PI ( $428,4 \pm 50,2$ ) em relação ao dia zero ( $477,2 \pm 26,3$ ) e ao 15º dia PI ( $491,5 \pm 60,6$ ).

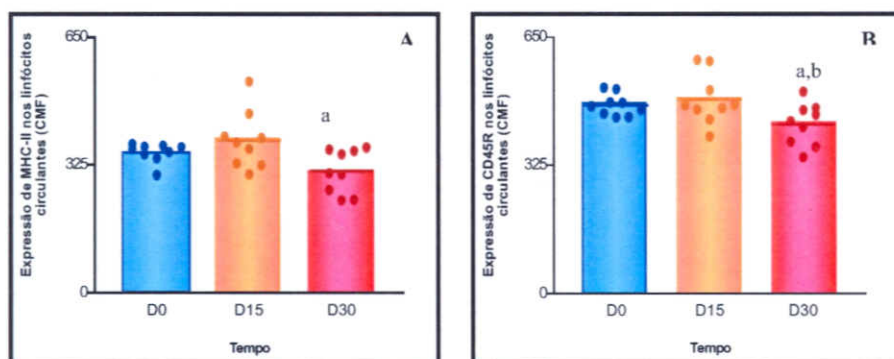


Figura 13 – Canal médio de fluorescência (CMF) da expressão do MHC-II (A) e do antígeno de membrana CD45R (B) nos linfócitos circulantes de cães experimentalmente infectados por *E. canis*. As etapas do experimento são representadas por D0 correspondente ao dia zero e D15 e D30, aos 15º e 30º dia pós infecção, respectivamente. Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontram-se representadas pela letra: a = em relação ao dia zero e b = em relação ao 15º dia pós infecção. Método estatístico utilizado – ANOVA seguido por Teste-t de Student.

G) Frequência de neutrófilos CD4+ circulantes

A figura 14 demonstra o percentual de neutrófilos CD4+ em cães experimentalmente

infectados com *E. canis*. A análise estatística dos resultados demonstrou uma maior ( $p < 0,05$ ) expressão no 30º dia PI ( $81,55 \pm 8,78$ ) em relação ao dia zero ( $65,33 \pm 15,73$ ).

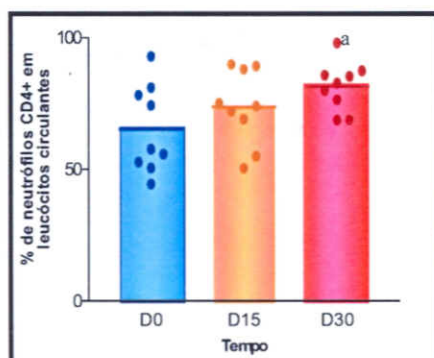


Figura 14 - Percentual médio de neutrófilos CD4+ circulantes de cães experimentalmente infectados por *E. canis*. As etapas do experimento são representadas por D0 correspondente ao dia zero e D15 e D30, aos 15º e 30º dia pós infecção, respectivamente. Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontram-se representadas pela letra: a = em relação ao dia zero. Método estatístico utilizado – ANOVA seguido por Teste-t de Student.



5.3 CARACTERIZAÇÃO DO IMPACTO DA TERAPÊUTICA ETIOLÓGICA-ESPECÍFICA SOBRE PARÂMETROS CLÍNICO-LABORATORIAIS E IMUNOLÓGICOS DE CÃES EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS POR *E. canis*

5.3.1- Parâmetros clínicos e laboratoriais antes e após o tratamento etiológico-específico da EMC

Os primeiros sinais de recuperação clínica foram observados após 48 h do início da terapia. Os animais apresentaram aumento do apetite, maior atividade física e resposta positiva aos estímulos externos. Não houve a ocorrência de diarreias durante o tratamento e o aspecto geral dos animais, como a queda de pêlos e escaras de decúbito rescindiram rapidamente. Ao final da terapia, todos os animais encontravam-se sem alterações palpáveis nos órgãos abdominais.

Os parâmetros bioquímicos, para avaliação do impacto do tratamento são demonstrados

na tabela 6. Após o tratamento observa-se uma significativa ( $p < 0,05$ ) elevação nos níveis de uréia e creatinina em relação ao 30º dia PI. A concentração de proteína total demonstrou ligeiro aumento, mas permaneceu estatisticamente menor que a encontrada no dia zero. Os valores da enzima ALT reduziram significativamente após a terapia, mas permaneceram maiores que os do dia zero.

Na tabela 7 são demonstrados os resultados dos parâmetros hematológicos da série vermelha (eritrograma) avaliados após o tratamento. Apesar de uma tendência à elevação, os valores não diferiram estatisticamente aos do 30º dia PI e permaneceram inferiores aos do dia zero.

Os resultados dos parâmetros hematológicos relativos à série branca e à contagem de plaquetas, antes e após o tratamento da fase aguda da erliquiose canina experimental estão na tabela 8.

Tabela 6 – Avaliação dos parâmetros bioquímicos e enzimáticos após o tratamento etiológico-específico de cães experimentalmente infectados com *E. canis*.

| Parâmetros Bioquímicos               | Fases da Infecção (N=9) |                         |
|--------------------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                                      | 30 dias PI              | Pós Tratamento          |
| Uréia (mg/dL) <sup>log</sup>         | 1,46 ± 0,2              | 1,62 ± 0,3 <sup>c</sup> |
| Creatinina (mg/dL)                   | 0,6 ± 0,1               | 1,2 ± 1,2 <sup>c</sup>  |
| Proteína Total (g/dL) <sup>log</sup> | 0,66 ± 0,1              | 0,69 ± 0,1              |
| ALT (U/L) <sup>log</sup>             | 1,62 ± 0,4              | 1,55 ± 0,1 <sup>c</sup> |

Os resultados são expressos como média dos valores ± desvio padrão. (log)= Valores transformados para avaliação estatística (Transformação logarítmica). PI= Pós infecção, ALT= alanino amino transferase; N= número de animais avaliados. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontram-se representadas pela letra: c, em relação aos 30 dias PI. Método estatístico utilizado – ANOVA seguido por Teste-t de Student.

Tabela 7 – Avaliação do eritrograma após o tratamento etiológico-específico de cães experimentalmente infectados com *E. canis*

| Parâmetros Hematológicos               | Fases da Infecção (N=9) |                |
|--|-------------------------|----------------|
|  | 30 Dias PI              | Pós Tratamento |
| Hemácias ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ ) | 4,9 ± 0,8               | 4,9 ± 1,3      |
| Hemoglobina (g/dL)                     | 11,8 ± 0,4              | 12,0 ± 3,7     |
| Hematócrito (%)                        | 33,8 ± 6,8              | 35,01 ± 10,1   |

Os resultados estão expressos como média dos valores absolutos ± desvio padrão. N= número de cães avaliados em cada fase. Não houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre as fases comparadas. Método estatístico utilizado – ANOVA seguido por Teste-t de Student.

Tabela 8 – Avaliação hematológica do número de plaquetas e parâmetros da série branca após o tratamento etiológico-específico de cães experimentalmente infectados com *E. canis*

| Parâmetros Hematológicos                  | Fases da Infecção (N=9) |                             |
|---|-------------------------|-----------------------------|
|   | 30 dias PI              | Pós Tratamento              |
| Plaquetas ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )   | 223 $\pm$ 51,7          | 262 $\pm$ 67,5 <sup>c</sup> |
| Leucócitos ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )  | 10,4 $\pm$ 0,2          | 8,8 $\pm$ 0,9               |
| Granulócitos                              | 7,6 $\pm$ 1,8           | 6,7 $\pm$ 1,4               |
| Neutrófilos ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ ) | 7,3 $\pm$ 1,6           | 6,4 $\pm$ 1,3               |
| N. bastonetes                             | 0,9 $\pm$ 0,7           | 0,03 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup> |
| N. segmentados                            | 6,4 $\pm$ 0,9           | 6,4 $\pm$ 1,2               |
| Eosinófilos ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ ) | 0,3 $\pm$ 0,2           | 0,3 $\pm$ 0,1               |
| Agranulócitos                             | 2,3 $\pm$ 0,6           | 1,6 $\pm$ 0,5               |
| Linfócitos ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )  | 1,9 $\pm$ 0,5           | 1,4 $\pm$ 0,5               |
| Monócitos ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )   | 0,4 $\pm$ 0,1           | 0,2 $\pm$ 0,0               |

Os resultados estão expressos como média dos valores absolutos  $\pm$  desvio padrão. N= número de cães avaliados em cada fase. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontram-se representadas pelas letras: c, em relação aos dias 30 dias PI. Método estatístico utilizado – ANOVA seguido por Teste-t de Student.

Após o tratamento, observa-se uma recuperação demonstrada pelo aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no número de plaquetas em relação à fase aguda. O leucograma revelou uma diminuição ( $p < 0,05$ ) no número de leucócitos totais quando comparado ao do 30º dia PI. Esta queda foi verificada principalmente na contagem dos bastonetes, linfócitos e monócitos. O índice de monócitos foi o que respondeu mais rapidamente ao tratamento, tornando-se semelhante àquele encontrado no dia zero.

#### 5.3.2- Reatividade anti-*E. canis* antes e após o tratamento etiológico-específico da EMC

Os resultados do teste sorológico (RIFI) para detecção de anticorpos anti-*E. canis* após o tratamento da EMC são demonstrados na tabela 9, observando-se um aumento significativo na produção de anticorpos em relação ao 30º dia PI.

Tabela 9- Resultado da reação de imunofluorescência indireta dos soros de cães após o tratamento etiológico-específico da infecção experimental com *E. canis*.

| Animais | Título Final |                |
|---------|--------------|----------------|
|         | Dia 30 PI    | Pós Tratamento |
| 01      | 1:50         | 1:150          |
| 02      | 1:50         | 1:150          |
| 03      | 1:50         | 1:150          |
| 04      | 1:50         | 1:150          |
| 05      | 1:50         | 1:150          |
| 06      | 1:150        | 1:150          |
| 07      | 1:50         | 1:150          |
| 08      | 1:50         | 1:150          |
| 09      | 1:50         | 1:150          |



### 5.3.3 Aspectos fenotípicos dos leucócitos do sangue periférico antes e após o tratamento etiológico-específico da EMC

#### A) Frequência de linfócitos T circulantes

A análise fenotípica dos linfócitos T foi realizada com o emprego dos anticorpos monoclonais Anti CD5 e Anti Thy-1 caninos. As figuras 15A e 15B mostram os resultados

dos percentuais de células T CD5+ (A) e Thy-1+ (B) na população de linfócitos totais do sangue periférico antes e após o tratamento específico da erliquiose monocítica canina. A análise estatística dos resultados demonstrou não haver diferenças estatísticas nos percentuais de células CD5+ ( $55,80 \pm 10,87$ ) e Thy-1+ ( $59,60 \pm 12,17$ ) entre o 30º dia PI e após o tratamento (CD5=  $65,08 \pm 2,4$  e Thy-1=  $66,16 \pm 14,84$ ).

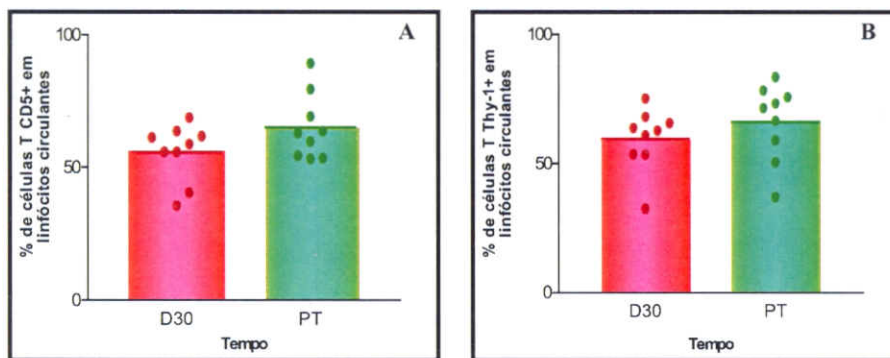


Figura 15 - Percentual médio de células CD5+ (A) e Thy1+ (B) em linfócitos circulantes, antes e após o tratamento etiológico-específico de cães experimentalmente infectados com *E. canis*. As etapas do experimento D30 e PT representam o 30º dia pós infecção e pós-tratamento, respectivamente. Não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as etapas avaliadas. Método estatístico utilizado – ANOVA seguido por Teste-t de Student.

#### B) Frequência de linfócitos B circulantes

A população de linfócitos B circulantes foi identificada com a utilização de anticorpos monoclonais anti IgM canina. Os percentuais médios de linfócitos B (IgM+) na população de linfócitos totais do sangue

periférico de cães experimentalmente infectados com *E. canis* e seu percentual após o tratamento estão representados na figura 16. Os resultados demonstram que o aumento verificado no 30º dia PI ( $44,25 \pm 12,18$ ) se manteve após o tratamento ( $44,19 \pm 11,96$ ) sem diferença estatística entre as fases.

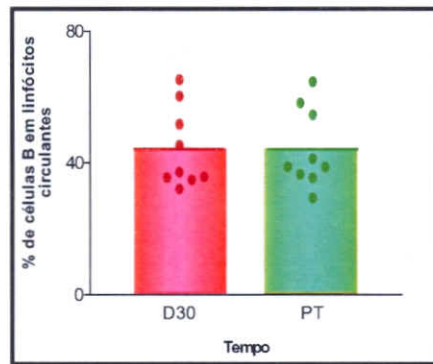


Figura 16 - Percentual médio de linfócitos B (IgM+) circulantes, antes e após o tratamento etiológico-específico de cães experimentalmente infectados com *E. canis*. As etapas do experimento D30 e PT representam o 30º dia pós infecção e pós-tratamento, respectivamente. Não houve diferença significativa entre as etapas avaliadas. Método estatístico utilizado – ANOVA seguido por Teste-t de Student.

C) Razão entre linfócitos T e células B circulantes

As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos anti-CD5 (A) e Thy-1 (B) para a marcação dos linfócitos T e anti-IgM canina para a identificação das células B. A figura 17A mostra a razão entre o percentual de linfócitos T (CD5+) e linfócitos B (IgM+) sem diferença significativa entre os dias 30 PI ( $1,33 \pm 0,41$ ) e após o tratamento ( $1,57 \pm 0,53$ ). Porém,

estes índices foram inferiores aos observados no dia zero demonstrado anteriormente.

Na figura 17B são representados os percentuais da razão entre os linfócitos T (Thy-1+) e linfócitos B (IgM+). Os resultados demonstram de forma semelhante, não haver diferença estatística entre o 30º dia PI ( $1,46 \pm 0,49$ ) e após o tratamento ( $1,64 \pm 0,61$ ), com os índices também inferiores ao dia zero.

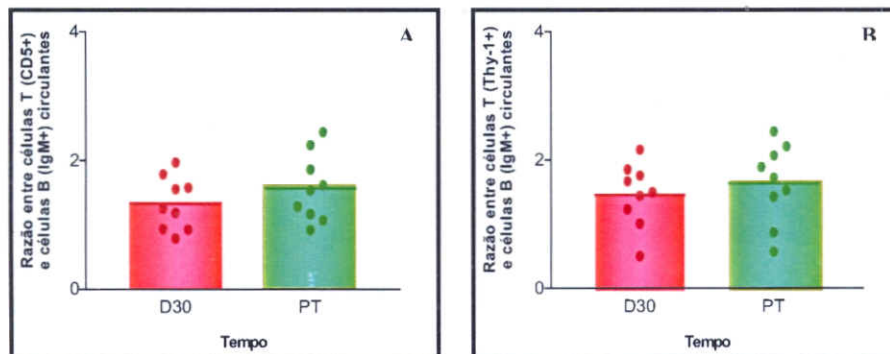


Figura 17- Razão entre percentuais de linfócitos T e B circulantes, antes e após o tratamento etiológico-específico de cães experimentalmente infectados com *E. canis*. As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos anti-CD5 (A) e Thy-1 (B) para a marcação dos linfócitos T e anti-IgM canina para a identificação das células B. As etapas do experimento D30 e PT representam o 30º dia pós infecção e pós-tratamento, respectivamente. Não houve diferença significativa entre as etapas avaliadas. Método estatístico utilizado – ANOVA seguido por Teste-t de Student.



D) Frequência de linfócitos T CD4+ circulantes

A figura 18 demonstra o percentual de células T CD4+ na população de linfócitos circulantes durante a fase aguda e após o tratamento de cães experimentalmente

infectados com *E. canis*. A análise estatística dos resultados demonstrou que após o tratamento ( $30,35 \pm 6,39$ ) verificou-se um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) desse percentual, em relação ao 30º dia PI ( $24,86 \pm 3,88$ ).

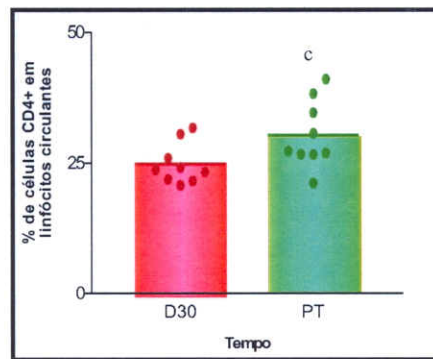


Figura 18- Percentual médio de linfócitos T CD4+ circulantes, antes e após o tratamento etiológico-específico de cães experimentalmente infectados com *E. canis*. As etapas do experimento D30 e PT representam o 30º dia pós infecção e pós-tratamento, respectivamente. Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontram-se representadas pela letra: c= em relação ao 30º dia PI. Método estatístico utilizado – ANOVA seguido por Teste-t de Student

E) Frequência de monócitos circulantes

Na figura 19 são representados os percentuais de monócitos (CD14+) na população de leucócitos totais do sangue periférico de animais após o tratamento

etiológico-específico da erliquiose monocítica canina. A análise dos resultados revelou uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ) após o tratamento ( $1,79 \pm 0,63$ ) em relação ao 30º dia PI ( $5,36 \pm 1,22$ ).

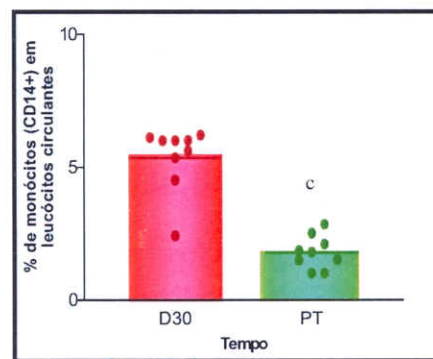


Figura 19 - Percentual médio de monócitos (CD14+) circulantes antes e após o tratamento etiológico-específico de cães experimentalmente infectados com *E. canis*. As etapas do experimento D30 e PT representam o 30º dia pós infecção e pós-tratamento, respectivamente. Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,001$ ) encontram-se representadas pela letra: c = em relação ao 30º dia pós infecção. Método estatístico utilizado – ANOVA seguido por Teste-t de Student.

F) Expressão do MHC-II e CD45R em linfócitos circulantes

A figura 20A representa a análise através do canal médio de fluorescência, da expressão do MHC-II na população de linfócitos circulantes em cães experimentalmente infectados com *E. canis* avaliados antes e após o tratamento etiológico-específico. A análise dos dados revelou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da expressão do MHC de classe II após a antibioticoterapia ( $350,5 \pm 24,1$ ) em relação ao 30º dia PI ( $309,1 \pm$

51,8), tornando-se estatisticamente semelhante ao encontrado no dia zero.

A expressão do complexo CD45R é demonstrado na figura 20B que representa a análise através do canal médio de fluorescência dos linfócitos circulantes nos animais infectados com *E. canis*. Os resultados não demonstram diferença estatística entre o 30º dia PI ( $428,4 \pm 50,2$ ) e após o tratamento específico ( $459,9 \pm 37,5$ ).

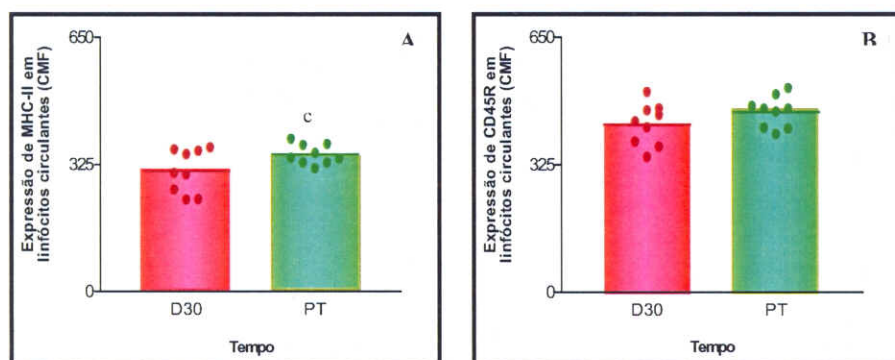


Figura 20 – Canal médio de fluorescência (CMF) da expressão do MHC-II (A) e do antígeno de membrana CD45R (B) nos linfócitos circulantes no sangue periférico, antes e após o tratamento etiológico-específico de cães experimentalmente infectados com *E. canis*. As etapas do experimento D30 e PT representam o 30º dia pós infecção e pós-tratamento, respectivamente. Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontram-se representadas pela letra: c = em relação ao 30º dia pós infecção. Método estatístico utilizado – ANOVA seguido por Teste-t de Student.

G) Frequência de neutrófilos CD4+ circulantes

A figura 21 demonstra o percentual de neutrófilos CD4+ antes e após o tratamento de cães experimentalmente infectados com

*E. canis*. A análise estatística dos resultados demonstrou uma redução significativa ( $p < 0,001$ ) desta expressão após o tratamento ( $53,38 \pm 8,66$ ), em relação ao 30º dia PI ( $81,55 \pm 8,78$ ).



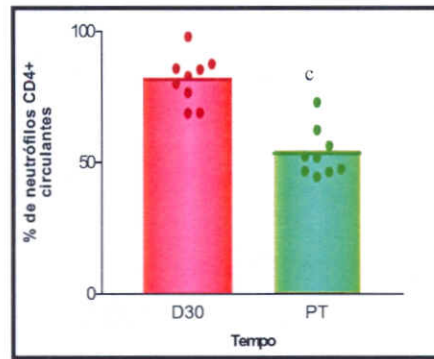
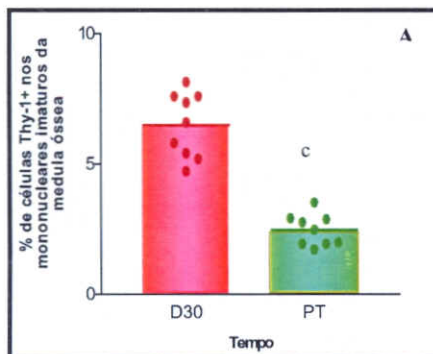


Figura 21 - Percentual médio de neutrófilos CD4+ circulantes antes e após o tratamento etiológico-específico de cães experimentalmente infectados com *E. canis*. As etapas do experimento D30 e PT representam o 30º dia pós infecção e pós-tratamento, respectivamente. Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,001$ ) encontram-se representadas pela letra: c = em relação ao 30º dia pós infecção. Método estatístico utilizado – ANOVA seguido por Teste-t de Student.

#### 5.3.4 Imunofenotipagem celular da medula óssea antes e após tratamento etiológico-específico da EMC

##### A) Freqüência de células Thy-1+ nas subpopulações de mononucleares

A figura 22A representa o percentual de células Thy-1+ na população de mononucleares imaturos da medula óssea de cães com EMC experimental. A análise estatística dos dados revelou um percentual significativamente menor ( $p < 0,001$ ) de células Thy-1+ após o tratamento ( $2,46 \pm 0,60$ ), em relação ao 30º dia PI ( $6,49 \pm 1,24$ ).



O percentual de células mononucleares maduras Thy-1+ é demonstrado na figura 22B. Os resultados também demonstram uma queda ( $p < 0,05$ ) nessa subpopulação após o tratamento ( $4,59 \pm 1,28$ ), em relação ao 30º dia PI ( $5,86 \pm 0,69$ ).

A comparação dos percentuais de Thy-1+ entre as duas subpopulações celulares demonstrou que, após o tratamento, a freqüência de células Thy-1+ foi significativamente maior entre os mononucleares maduros da medula óssea. Não houve diferença estatística, no 30º dia PI, entre os agrupamentos celulares.

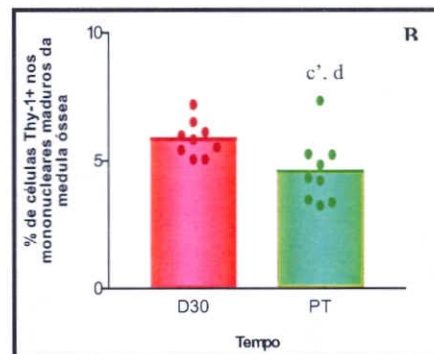


Figura 22 – Percentual médio de células Thy-1+ em mononucleares imaturos (A) e maduros (B) da medula óssea de cães experimentalmente infectados por *E. canis*. As etapas do experimento D30 e PT representam o 30º dia pós infecção e pós-tratamento, respectivamente. Diferenças estatisticamente significativas encontram-se representadas pelas letras: c = em relação ao 30º dia PI e d = em relação ao pós tratamento nas células imaturas. E, c' = em relação ao 30º dia PI nas células maduras. Método estatístico utilizado – ANOVA seguido por Teste-t de Student.

B) Freqüência de células MHC-II+ nas subpopulações de mononucleares

A figura 23A representa a média do percentual de células MHC-II+ na população mononuclear imaturos da medula óssea de cães com EMC experimental. A análise estatística dos dados revelou que após o tratamento ( $3,23 \pm 0,78$ ) houve uma redução ( $p < 0,05$ ) do percentual, em relação ao 30º dia PI ( $6,03 \pm 1,95$ ).

O percentual de células MHC-II+ na população de mononucleares maduros é representado na figura 23B que demonstra

não haver diferença estatística entre as análises do 30º dia PI ( $4,76 \pm 1,42$ ) e após o tratamento ( $6,05 \pm 1,63$ ) etiológico-específico contra *E. canis*.

A comparação dos percentuais de MHC-II+ entre as duas subpopulações celulares demonstrou, após o tratamento, uma freqüência significativamente maior de células MHC-II+ entre os mononucleares maduros. No 30º dia PI, não houve diferença estatística entre os percentuais de mononucleares MHC-II+ imaturos e maduros.

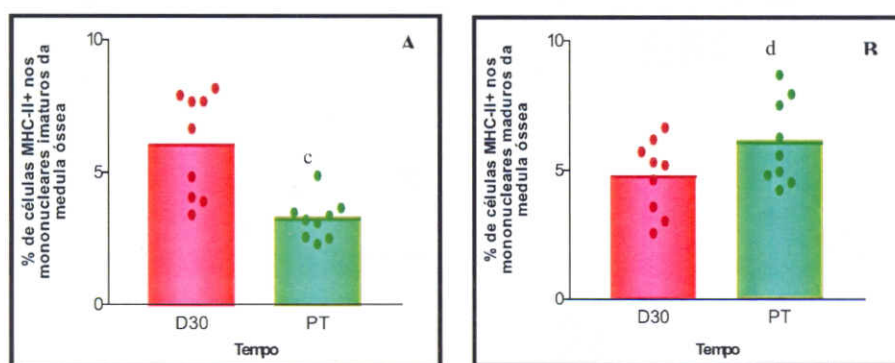


Figura 23 – Percentual médio de células MHC-II+ nos mononucleares imaturos (A) e maduros (B) da medula óssea de cães experimentalmente infectados por *E. canis*. As etapas do experimento D30 e PT representam o 30º dia pós infecção e pós-tratamento, respectivamente. Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontram-se representadas pelas letras: c = em relação ao 30º dia PI e d = em relação ao pós-tratamento nas células imaturas. Método estatístico utilizado – ANOVA seguido por Teste-t de Student.

C) Freqüência de células CD45R+ nas subpopulações de mononucleares

A figura 24A representa a análise do percentual de células CD45R+ na população de mononucleares imaturos da medula óssea de cães experimentalmente infectados com *E. canis*, avaliados antes e após tratamento. A análise dos dados revelou não ter havido diferença estatística após o tratamento ( $5,24 \pm 2,14$ ), em relação ao 30º dia PI ( $7,60 \pm 1,77$ ).

O percentual de células maduras CD45R+ é

demonstrado na figura 24B que representa a análise dos mononucleares da medula óssea em cães com EMC experimental. Os resultados demonstram aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) após o tratamento ( $6,27 \pm 1,33$ ) em relação ao 30º dia PI ( $4,55 \pm 1,77$ ).

A comparação estatística das duas subpopulações em cada etapa do experimento, revelou que no 30º dia PI o percentual de células CD45R+ foi significativamente ( $p < 0,01$ ) menor entre os mononucleares maduros.



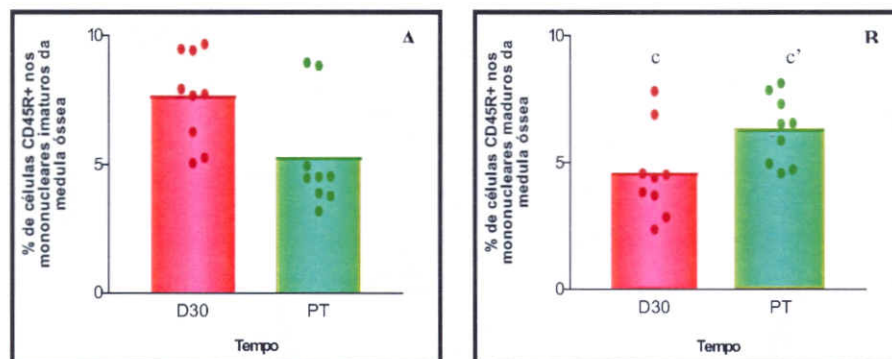


Figura 24 – Percentual médio de células CD45R+ nos mononucleares imaturos (A) e maduros (B) da medula óssea de cães experimentalmente infectados por *E. canis*. As etapas do experimento D30 e PT representam o 30º dia pós infecção e pós-tratamento, respectivamente. Diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,01$ ) encontram-se representadas pelas letras: c = em relação ao 30º dia PI das células imaturas e c' = em relação ao 30º dia PI das células maduras. Método estatístico utilizado – ANOVA seguido por Teste-t de Student.

#### 5.4 PRINCIPAIS ALTERAÇÕES LABORATORIAIS E IMUNOFENOTÍPICAS DE CÃES DURANTE A FASE AGUDA E APÓS O TRATAMENTO ETIOLÓGICO-ESPECÍFICO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *E. canis*,

##### Parâmetros bioquímicos

|            | 30 dias PI      | Pós tratamento      |
|------------|-----------------|---------------------|
| INFEÇÃO    | ↓Creatinina     | Creatinina (Normal) |
|            | ↓Proteína Total | ↓Proteína Total     |
|            | ↑ALT            | ↑ALT                |
| TRATAMENTO |                 |                     |

Quadro 1 – Quadro comparativo das principais alterações bioquímicas e enzimáticas, apresentadas por cães experimentalmente infectados por *E. canis*, durante a fase aguda e após o tratamento etiológico-específico. A orientação das setas indica a elevação ou diminuição de um dado parâmetro em relação ao dia zero, enquanto o tamanho da seta representa a grandeza desta alteração.

### Parâmetros hematológicos

|          | 30 dias PI | TRATAMENTO | Pós tratamento     |
|----------|------------|------------|--------------------|
| INFECCÃO | ↑Anemia    |            | ↑Anemia            |
|          | ↓Plaquetas |            | ↓Plaquetas         |
|          | ↑Monócitos |            | Monócitos (Normal) |

Quadro 2 – Quadro comparativo das principais alterações hematológicas, apresentadas por cães experimentalmente infectados por *E. canis*, durante a fase aguda e após o tratamento específico. A orientação das setas indica a elevação ou diminuição de um dado parâmetro em relação ao dia zero, enquanto o tamanho da seta representa a grandeza desta alteração.

### Fenótipo de leucócitos circulantes

|          | 15 dias PI                   | 30 dias PI                  | TRATAMENTO | Pós tratamento               |
|----------|------------------------------|-----------------------------|------------|------------------------------|
| INFECCÃO | <b>Linfócitos</b>            |                             |            | <b>Linfócitos</b>            |
|          | ↓Thy-1 <sup>+</sup>          | Thy-1 <sup>+</sup> (Normal) |            | Thy-1 <sup>+</sup> (Normal)  |
|          | ↓CD4 <sup>+</sup>            | ↓CD4 <sup>+</sup>           |            | ↓CD4 <sup>+</sup>            |
|          | MHC-II <sup>+</sup> (Normal) | ↓MHC-II <sup>+</sup>        |            | MHC-II <sup>+</sup> (Normal) |
|          | CD45R <sup>+</sup> (Normal)  | ↓CD45R <sup>+</sup>         |            | CD45R <sup>+</sup> (Normal)  |
|          | ↑IgM <sup>+</sup>            | ↑IgM <sup>+</sup>           |            | ↑IgM <sup>+</sup>            |
|          | <b>Monócitos</b>             |                             |            | <b>Monócitos</b>             |
|          | ↑CD14 <sup>+</sup>           | ↑CD14 <sup>+</sup>          |            | CD14 <sup>+</sup> (Normal)   |
|          | <b>Neutrófilos</b>           |                             |            | <b>Neutrófilos</b>           |
|          | CD4 <sup>+</sup> (Normal)    | ↑CD4 <sup>+</sup>           |            | CD4 <sup>+</sup> (Normal)    |
|          | <b>IMUNOSSUPRESSÃO ?</b>     |                             |            | <b>RECUPERAÇÃO</b>           |

Quadro 3 – Quadro comparativo das principais alterações fenotípicas dos leucócitos circulantes, apresentadas por cães experimentalmente infectados por *E. canis*, durante a fase aguda e após o tratamento específico. A orientação das setas indica a elevação ou diminuição de um dado parâmetro em relação ao dia zero, enquanto o tamanho da seta representa a grandeza desta alteração.



## Fenótipo de células da medula óssea

| TRATAMENTO DA FASE AGUDA | Pós Tratamento                    |                                    |
|--------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
|                          | <i>Mononucleares imaturos</i>     | <i>Mononucleares maduros</i>       |
|                          | ↓Thy-1 <sup>+</sup>               | ↓Thy-1 <sup>+</sup>                |
|                          | ↓MHC-II <sup>+</sup>              | MHC-II <sup>+</sup> (sem variação) |
|                          | CD45R <sup>+</sup> (sem variação) | ↑CD45R <sup>+</sup>                |

Quadro 4 – Quadro comparativo das principais alterações fenotípicas de células da medula óssea, apresentadas por cães experimentalmente infectados por *E. canis*, durante a fase aguda e após o tratamento específico. A orientação das setas indica a elevação ou diminuição de um dado parâmetro em relação ao 30º dia após a infecção, enquanto o tamanho da seta representa a grandeza desta alteração.

## 6- DISCUSSÃO

Membros do gênero *Ehrlichia*, incluindo *E. canis* persistem, após a infecção, no hospedeiro vertebrado por longos períodos de tempo. A relação entre *E. canis* e sua célula alvo, os monócitos e macrófagos, é crítica; já que, contrariamente à sua função natural, essas células não conseguem eliminar o agente e permanecem infectadas por um mecanismo de evasão que não está completamente esclarecido (Ganta et al., 2002). Infecções persistentes com *E. canis* têm sido documentadas em cães por um período de 3 a 5 anos (Iqbal et al., 1994; Harrus et al., 1998). Acredita-se que mecanismos desencadeados logo após a penetração na célula hospedeira sejam os responsáveis por modificações no microambiente e favoreçam a permanência intracelular do agente (Barnewall e Rikihisa, 1994). Assim, estudos que contribuam para elucidar a resposta canina durante a fase aguda da infecção com *E. canis* são úteis para o conhecimento das estratégias de evasão utilizadas por essa e outras riquetsias monocíticas.

A erliquiose monocítica canina (EMC) tornou-se uma das mais importantes doenças infecciosas em diferentes partes do mundo, com freqüentes relatos no Brasil. Apesar de sua extensa distribuição, pouco se sabe sobre a imunopatogenia deste agente; informações necessárias para diagnóstico, tratamento, prognóstico e prevenção da doença associada a *E. canis*. Recentes pesquisas demonstram alterações da resposta imune nos cães com EMC (Waner et al., 2001; Harrus et al., 2003; Castro et al., 2004), mas as condições e características dessas respostas no curso da doença ainda permanecem obscuras, e pouco se sabe sobre as modificações imunológicas advindas com o tratamento empregado na prática clínica.

Assim, este trabalho visa demonstrar alterações clínicas, bioquímico-hematológicas dos animais, o perfil imunofenotípico dos leucócitos circulantes e de populações mononucleares da medula óssea durante a fase aguda da infecção experimental com *E. canis*. Além disso, avalia a resposta inicial ao tratamento, de modo a somar informações para futuros

estudos referentes a doença, prognósticos e novas terapias.

#### 6.1- INFECÇÃO EXPERIMENTAL

O método utilizado para inoculação da *E. canis* foi o mesmo empregado em trabalho anterior (Moreira, 2003) e mostrou-se eficiente na reprodução da doença. Após a infecção experimental, a presença do parasito foi confirmada em todos os animais através da visualização de estruturas características, as mórulas, no citoplasma de monócitos sangüíneos corados pelo Giemsa. Elias (1991) descreve a pesquisa de mórulas como um bom método para o diagnóstico da doença. Esta visualização direta do parasito na corrente sangüínea foi também utilizado por Burr (1982), permitindo diagnosticar infecções simultâneas com outros hemoparasitas. O exame direto porém, é um método com alta especificidade mas de pouca sensibilidade devido ao baixo parasitismo e curto período de parasitemia.

#### 6.2 ALTERAÇÕES CLÍNICAS DA FASE AGUDA DA EMC EXPERIMENTAL

Durante o experimento, todos os animais inoculados apresentaram febre, exibindo os primeiros sinais clínicos entre o décimo e décimo quinto dia pós infecção (PI). O surgimento da febre e o início dos sintomas coincidiu com o período encontrado por Davoust et al. (1991). Outras infecções experimentais descritas na literatura demonstram variações no período de incubação da doença, podendo estar associadas a diferenças nas amostras do parasita, dose infectante e variações na susceptibilidade apresentadas por alguns cães (Nyindo et al., 1980; Perez et al., 1996; Unver et al., 2001; McBride et al., 2003; Castro, 2004).

A febre constitui um dos eventos não específicos da fase aguda, resultante da produção de IL-1 pelos macrófagos, que eleva o nível do termostato (hipotálamo), ocasionando em aumento da temperatura corporal (Schalm, 1975). Algumas bactérias como *Streptococcus pneumoniae* (agente causal da pneumonia, meningite e outras doenças) e *Treponema pallidum* (agente da

sífilis) não sobrevivem a temperaturas acima de 40°C, mas muitos outros micróbios permanecem vivos e até se reproduzem a temperaturas acima de 45°C. Sob o ponto de vista microbiológico, podemos dizer que a resistência a altas temperaturas constitui uma resposta evolutiva dos microorganismos a uma reação imune primitiva. Sem esquecer que a melhor resposta de alguns componentes do sistema imune se dá sob temperaturas mais elevadas (Tizard, 2002). Não se conhecem os efeitos da temperatura sobre o ciclo da *E. canis*, mas há vários estudos nos quais a evidente parasitemia coincide com o pico febril. No presente experimento também, em todos os cães infectados as mórulas somente foram visualizadas quando a temperatura corporal encontrava-se elevada.

Outros sintomas clínicos mais freqüentes, exibidos pelos animais no decorrer da infecção foram: palidez de mucosas, emagrecimento progressivo, aumento moderado dos linfonodos, diarreia e opacidade com queda de pêlos. A anemia e lesões gástricas decorrentes de ulcerações são citadas por Ewing (1969), Reardon e Pierce (1981), Troy e Forrester (1990) e Hoskins (1991) como causas para a palidez de mucosas e emagrecimento, comuns nos cães com erliquiose aguda. Segundo Kuhen e Gaunt (1985), a linfadenomegalia está presente em 27% dos casos e um percentual ainda maior é o apresentado por Reardon e Pierce (1981) quando no mesmo período que o deste experimento, 75% dos cães com EMC encontravam-se com nódulos linfáticos aumentados. Hildebrant et al., 1973) e Castro et al. (2004) demonstraram que as alterações estruturais e aumento de volume dos linfonodos são resultantes de uma plasmocitose e hiperplasia folicular devidas, possivelmente, à diferenciação de linfócitos B em células efectoras refletindo uma resposta humoral frente ao parasita. Essa patogênese pode ser também atribuída como causa da esplenomegalia, encontrada em 33% dos animais deste estudo, já que, segundo os autores anteriores, o aumento na celularidade é responsável pelas alterações no baço e linfonodos. A diarreia e queda de



pêlos são citadas por Ewing (1969), mas Nyindo et al. (1980) afirmam serem achados inconstantes.

### 6.3 ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS-HEMATOLÓGICAS DA FASE AGUDA DA EMC EXPERIMENTAL

Muitos animais iniciaram o experimento com a concentração sérica de uréia ligeiramente aumentada; o que, de acordo com Meyer e Harvey (1998) pode, nas espécies carnívoras e onívoras, ser devida à uma dieta rica em proteína ou hemorragia no trato gastrointestinal. A diminuição observada durante a fase aguda, reforça a hipótese alimentar, num período de queda no consumo de ração confirmada pela observação clínica e perda de peso apresentada pelos cães infectados. O nível de creatinina não é, segundo os mesmos autores, marcadamente influenciado pela dieta ou hemorragias intestinais e sim, conseqüente ao metabolismo músculo-esquelético. Assim, a diminuição durante a fase aguda da infecção experimental pode ser conseqüente da acentuada debilidade muscular.

A concentração de proteínas totais no soro dos animais reduziu-se significativamente após a infecção experimental. Este dado pode parecer estranho, já que no mesmo período houve o estímulo antigênico e produção de gama-globulinas. Contudo, é preciso lembrar que uma das principais alterações séricas encontrada na erliquiose canina é a hipoalbuminemia, não mensurada no presente estudo. Este predominante achado pode ser conseqüência de edemas inflamatórios, perdas sangüíneas ou diminuição na produção hepática de proteínas (Harrus et al., 1996). Isto porque a produção de albumina pelo fígado pode ser regulada pela pressão osmótica e com o aumento no título de anticorpos, baixa concentração protéica atua como um mecanismo regulatório, mantendo a pressão e prevenindo o aumento da viscosidade sangüínea (Harrus et al., 1999). Além disso, uma diminuição na síntese de proteínas é encontrada em cães com leve doença hepática concorrente (Reardon e Pierce, 1981), que no presente

estudo, sugere estar presente, visto o aumento na concentração de ALT apresentado pelos animais após a infecção experimental. A existência de nódulos produzidos pela proliferação de células reticuloendoteliais associadas aos vasos sangüíneos no fígado de cão acometido pela erliquiose, representa uma resposta à presença do parasito no endotélio dos vasos e, provavelmente, tais nódulos exercem injúrias mecânicas ou circulatórias nos hepatócitos com conseqüente aumento do ALT.

Durante a fase aguda observou-se uma diminuição acentuada na série vermelha dos componentes sangüíneos. A anemia é, segundo Waddle e Littman (1988), um dos achados hematológicos mais freqüentes, cuja etiologia não está totalmente esclarecida. Acredita-se que a retirada das hemácias se dê através de uma reação imunológica de hipersensibilidade do tipo II (Hildebrant et al., 1973) na qual a eritrofagocitose opsonizada com anticorpos é reforçada por Hoskins (1991) ao afirmar que animais com erliquiose canina podem apresentar positividade ao teste de Coomb's direto, levando à certa confusão com o diagnóstico de anemia hemolítica imunomediada. Uma diminuição no eritrograma pode, nos casos graves, advir da supressão da eritropoiese e marcante hipoplasia de medula óssea, o que normalmente é acompanhada por uma pancitopenia (Hibbler et al., 1986).

Em todos os animais, após a infecção experimental, demonstrou-se uma significativa queda no número de plaquetas. De acordo com Harrus et al. (1999), a trombocitopenia é considerada a anormalidade mais comum e consistente dos cães natural ou experimentalmente infectados por *E. canis*. Alguns mecanismos são propostos e parecem atuar de forma desigual nas diferentes fases da doença. Na fase aguda, a patogênese inclui o aumento do consumo de plaquetas devido à vasculite e processos inflamatórios no endotélio dos vasos (Kakoma et al., 1977; Hibbler et al., 1986), aumento do seqüestro esplênico (Pierce et al., 1977) e destruição imunológica, resultando em uma diminuição



da meia-vida de 9 para 2 dias (Smith et al., 1975). Anticorpos anti plaquetários (AAP) são detectados nos primeiros 20 dias pós infecção e o seu surgimento, às vezes anterior aos anticorpos contra erlíquias pode ser devido a semelhanças entre antígenos erlíquiais e auto-antígenos; ou podem os AAP surgirem após a liberação de estruturas antigênicas subsequente à maciça destruição de plaquetas por mecanismos não imunológicos. A participação do complemento é evidenciada pela diminuição de seus componentes verificada em cães com trombocitopenia. A depleção parcial do soro de cães infectados reduziu substancialmente a gravidade da trombocitopenia. Outra ação dos AAP pode ocorrer mesmo quando o número dos trombócitos ainda se encontra normal, promovendo a disfunção plaquetária quando da associação destes auto-anticorpos com glicoproteínas da sua superfície. Essa ação é evidenciada pela concordância do pico de produção dos AAP e o máximo da perda da função plaquetária. Além disso, um "fator de inibição da migração plaquetária", isolado e caracterizado, parece desempenhar um papel no seqüestro e estase plaquetária, reduzindo a contagem no sangue periférico (Pierce et al., 1977).

O leucograma dos animais apresentou variações significativas após a infecção experimental. Dentre os granulócitos, destaca-se a neutropenia, devido primordialmente à queda no número de segmentados. Woody e Hoskins (1991) afirmam que essa alteração está presente em 25% dos cães com erliquiose aguda. A patogênese da neutropenia permanece desconhecida, mas assim como para as plaquetas, é possível, segundo Waner et al. (1997), que o efeito sobre os neutrófilos possa também ter uma base imunomediada. O autor nota ainda que o resultado da *E. canis* sobre os neutrófilos durante a fase aguda é mantido durante a fase subclínica e aumenta na fase crônica, quando a pancitopenia é uma alteração proeminente. No presente estudo, observa-se, após a infecção, um aumento das formas imaturas (bastonetes) liberadas pela medula óssea, indicando que esta encontra-se responsiva

às variações sangüíneas. O número de linfócitos não apresentou variações significativas durante a fase aguda da infecção experimental. Esse fato difere do comumente visto nas erliquioses (Caldwell et al., 1995) e a literatura não apresenta justificativas para este fato.

Um exacerbado aumento no número de monócitos foi observado após a infecção experimental. As causas para este fenômeno não estão claras e de acordo com Meyer e Harvey (1998) a monocitose encontra-se normalmente associada a quadros inflamatórios agudos e crônicos. Acredita-se que a vasculite, vista de maneira generalizada em vários órgãos e sistemas de cães infectados por *E. canis*, possua um papel importante no curso da doença, como proposto por Simpson (1974). Recente pesquisa realizada por Sly et al. (2003) ao avaliar estratégias para a sobrevivência intracelular da *E. chaffeensis*, demonstraram a inibição da apoptose *in vitro* como um importante mecanismo que favorece o parasitismo. A apoptose é um componente da defesa inata que previne a proliferação de bactérias internalizadas. Bactérias intracelulares normalmente crescem muito lentamente e necessitam de vários dias para a replicação. Assim, sabe-se que *M. tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis*, *Rickettsia rickettsii* e *Anaplasma phagocytophilum*, *Brucella abortus* e agora o agente da erliquiose monocítica humana apresentam diferentes mecanismos para inibir a apoptose celular durante os estágios iniciais de infecção, o que garante tempo para o crescimento no interior da célula hospedeira (Sly et al., 2003). Esse fato não foi pesquisado para *E. canis* e a influência desta inibição em um modelo vivo precisa ser avaliada, assim como sua influência sobre a monocitose.

#### 6.4 REATIVIDADE DE ANTICORPOS ANTI-*E. canis* DURANTE A FASE AGUDA DA EMC EXPERIMENTAL

Em função das limitações do diagnóstico direto, pela visualização de mórulas na circulação sangüínea, a confirmação da exposição de cães ao agente *E. canis* utiliza métodos indiretos que detectam a presença



de anticorpos específicos. No presente estudo, utilizando a RIFI, a produção de anticorpos específicos foi demonstrada em todos os cães infectados aos 30 dias PI. O kit utilizado no teste é recomendado para a detecção e semi quantificação de anticorpos da classe IgG contra *E. canis*. De acordo com estudos experimentais, nas primeiras semanas após infecção, os anticorpos produzidos pertencem às classes IgM e IgA. Quanto à IgG, que em alguns animais pode ser encontrada num período inicial (Iqbal e Rikihisa, 1994), normalmente inicia seu aumento a partir da terceira semana de infecção (McBride et al., 1996).

No presente estudo, um único animal apresentou título sorológico de 1: 150 aos 30 dias PI, indicando uma resposta humoral precoce. Nos demais, o título máximo observado na fase aguda foi de 1:50, valor inferior aos relatados em outras infecções experimentais (Buhles et al., 1974; Cadman et al., 1994). Vários fatores podem contribuir para a variação dos títulos de anticorpos. De acordo com Harrus et al (2002), diferenças na reatividade entre os testes sorológicos podem ser atribuídas ao antígeno, já que foram comprovadas formas variantes e grande polimorfismo nos fragmentos de restrição entre isolados, sendo sugerido que rápidas mudanças evolutivas, como recombinações genéticas possam ser as causas da variação antigênica entre *E. canis* de diferentes regiões geográficas (Keysary et al., 1985; Hegarty, 1997). Outro fator que influencia os títulos sorológicos e a soroconversão é a dose infectante utilizada na experimentação com erlíquia. De acordo com Rikihisa et al. (1992), o surgimento inicial de IgG depende da quantidade de organismos viáveis a qual o cão é exposto; o que foi comprovado por Iqbal et al. (1994a) que, ao utilizar como inóculo *E. canis* mantidas em cultivo celular, no qual o número de unidades infecciosas é muito grande, detectou anticorpos IgG no terceiro dia após inoculação.

O papel dos anticorpos contra as riquetsias não está claro. Buhles et al. (1974) afirmam que a resposta humoral não confere uma imunidade protetora, tendo em vista que animais cronicamente infectados com

elevados títulos de anticorpos, repentinamente adoecem e morrem. Além disso, a imunização utilizando *E. canis* inativada induz a uma resposta com altos níveis de anticorpos; entretanto, após desafio, apresentam manifestações clínicas de forma fulminante quando comparadas aos animais controles não imunizados (Woldehiwet e Ristic, 1993). Do mesmo modo, a transferência passiva de soro contendo altos títulos de anticorpos, não confere proteção ao desafio com *E. canis* (Waner et al., 2001).

#### 6.5 ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS EM LEUCÓCITOS CIRCULANTES DURANTE A FASE AGUDA DA EMC EXPERIMENTAL

Os resultados do estudo dos leucócitos sangüíneos nos animais durante a fase aguda da EMC demonstram alterações das populações imunofenotípicas que refletem a complexidade do processo infeccioso.

O percentual médio de linfócitos circulantes CD5+ não apresentou variações significativas durante a fase aguda. Nos cães, a expressão de CD5 em linfócitos B (Chabanne et al., 1995) é controversa. A função do CD5 nas células T também não é muito clara, tendo sido reportado em humanos como liberadora de sinais diretos de ativação ou co-estimulatórios, similares aos CD2, CD4, CD6 e CD28; além de induzir o fluxo de Ca<sup>2+</sup> intracelular, aumentar a resposta mitogênica, a secreção e a expressão do receptor de IL-2 e poder ainda se ligar ao antígeno CD72 da célula B desempenhando um papel sinalizador na colaboração entre linfócitos T e B (Burgess et al., 1992). Novas pesquisas deverão ser conduzidas para a dupla marcação CD3+/CD5+ e CD21+/CD5+, visando esclarecer a expressão em subpopulações e seu efeito sobre os processos infecciosos caninos.

A análise dos linfócitos dos animais infectados revelou uma redução nas células T Thy-1+ circulantes no início da fase aguda, aos 15 dias PI. Apesar do conhecimento sobre a estrutura, pouco se sabe comparativamente sobre seu papel *in-vivo* nas respostas imunes (Gunter et al.,



1987). A função e o(s) ligante(s) para Thy-1 permanecem desconhecidos, porém está claro, em humanos e camundongos, que a molécula Thy-1 é capaz de traduzir sinais que podem ativar linfócitos T (Haeryfar et al., 2003) e que células Thy-1<sup>-</sup> (negativas) do sangue periférico mostram diminuição nas respostas linfoproliferativas. Além disso, parece alterar notadamente a adesão célula-célula, na ligação entre linfócitos e células epiteliais ou APC (Haeryfar e Hoskin, 2004). Esses fatos sugerem que nos animais deficientes de Thy-1, as respostas imunes dependentes de células T estejam diminuídas (Beissert et al., 1998). No presente estudo, o período em torno do 15º dia PI representou o fim da incubação e início da multiplicação da *E. canis* nas células sangüíneas verificado pela presença de mórulas nos esfregaços. O efeito da molécula Thy-1 sobre organismos riquetsiais não foi ainda descrito e a diminuição deste marcador nessa fase inicial do processo de invasão celular pode representar um dos mecanismos prévios da modulação da bactéria sobre o sistema imune canino.

Em nosso estudo, foi observada uma elevação no percentual de linfócitos B, verificada através do marcador de imunoglobulina de superfície (IgM). Essa resposta é esperada em cães com infecção aguda por *E. canis*, já que apresentam aumento da atividade de células B, evidenciada pela produção de anticorpos específicos. Essa elevação, apresentada no início da fase aguda, manteve-se estável até o 30º dia PI. Resultado aparentemente contraditório com a noção de hipergamaglobulinemia e elevada produção de Ig(s) de diversas classes e subclasses vista em muitos trabalhos. Porém, as respostas produtoras de anticorpos aos antígenos protéicos requerem a cooperação entre os linfócitos B específicos e linfócitos T auxiliares. No reconhecimento desses antígenos estranhos, a maioria das células T auxiliares é constituída de CD4<sup>+</sup> (Abbas, 2002). Como veremos mais adiante, durante a infecção experimental, a concomitante redução dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> poderia estar promovendo uma limitação à proliferação dos linfócitos B. Outro argumento para explicar a ausência de um grande número

desses linfócitos no sangue periférico é que a síntese de Ig(s) específicas pelas células plasmáticas estaria ocorrendo principalmente nos linfonodos e folículos esplênicos (Castro, 2004), com poucas células circulantes. Reis (2001) considera que no processo de transformação dos linfócitos B em plasmócitos há uma alteração no tamanho, que pode promover um deslocamento da população celular nos gráficos de FSC *versus* SSC com conseqüente redução dessas células na região de linfócitos.

A análise da razão T/B permite uma visão globalizada da relação entre o estímulo à resposta celular e humoral. Na infecção experimental por *E. canis* verifica-se uma queda dessa razão durante toda a fase aguda, evidenciada tanto na marcação com Thy-1 quanto com CD5 para a quantificação dos linfócitos T. As respostas celulares orquestradas pelas células T são consideradas fundamentais para a imunidade contra patógenos intracelulares (Kaufmann, 1993; Schaible et al., 1999). O resultado da razão T/B demonstra uma polarização para a resposta humoral, o que parece ser necessário para o estabelecimento da infecção.

Através da imunofenotipagem por citometria de fluxo, foi possível observar uma redução no percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> durante a erliquiose experimental. Resultados semelhantes foram descritos por Frank e Breitschwerdt (1999) e Heeb et al. (2003). Muita atenção tem sido dada ao papel das células CD4<sup>+</sup> nas infecções por patógenos mononucleares. Os linfócitos T auxiliares expressam moléculas CD4 e reconhecem peptídeos antigênicos em associação às moléculas MHC de classe II na superfície das células apresentadoras de antígenos (APC) (Forman, 1984). Linfócitos T CD4<sup>+</sup> são ativados pela interação com as APC e secretam uma variedade de citocinas que desempenham um importante papel na ativação dos linfócitos B, linfócitos T CD8<sup>+</sup>, macrófagos e outras células envolvidas na resposta imune. Dependendo do tipo de citocina produzida, as células T CD4<sup>+</sup> podem ser subdivididas em Th-1 que produzem IL-2, interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e



outros promotores da resposta imune celular; ou Th-2 que por sua vez produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, citocinas que promovem a síntese de anticorpos pelas células B na resposta imune humoral (Balkwill e Burke, 1989). Dessa forma, linfócitos T auxiliares promovem e regulam as respostas imunes do organismo, sendo sua deficiência responsável por inúmeros distúrbios ao sistema imunológico (Abbas, 2002).

Estudo realizado por Bitsaktsis et al. (2004) indicou que a proliferação das células T CD4+ com produção de IFN- $\gamma$  foi capaz de induzir atividade microbicida em macrófagos de camundongos infectados com *Ehrlichia*. Estudos prévios demonstraram que mecanismos clássicos envolvendo células CD4 e citocinas do tipo I levam à geração da imunidade celular, componente predominante da resposta contra organismos erlíquias, na qual o IFN- $\gamma$  é a chave moduladora (Harrus et al., 1999). Outras pesquisas concordam que anticorpos podem reduzir a expansão de erlíquias (Winslow et al., 2000; Li et al., 2001) mas para a completa supressão é necessária a presença de células T CD4+ funcionais (Ganta et al., 2002).

Em camundongos, há relatos de algumas populações de linfócitos T CD4+ que não expressam Thy-1 e se caracterizam por produzirem altos títulos de IL-4 e não produzirem IFN- $\gamma$  durante estimulação *in vitro*, uma resposta característica de células Th2. O significado desses subtipos celulares nas situações patológicas associadas à resposta Th2 não foi investigada (Cerasoli et al., 2001). No presente estudo, a impossibilidade de dupla marcação impediu que fosse avaliada a co-expressão de Thy-1 nas células CD4+.

Uma característica interessante nos estudos dos leucócitos caninos é a ocorrência incomum de moléculas do MHC-II em diferentes tipos de células (Deeg et al., 1982). No presente estudo essa distribuição foi confirmada pela marcação de linfócitos não estimulados antes da infecção experimental (dia zero), também descrita

por outros pesquisadores (Doveren et al., 1985; Dirscherl et al., 1995; Pappalardo et al., 2001; Reis, 2001). Há uma forte evidência que em cães, como visto nos felinos e eqüinos (Doveren et al., 1986; Monos et al., 1989; Rideout et al., 1990), existam pelo menos dois subtipos de MHC-II, um dos quais é constitutivamente expresso nas células T e B (Cobbold e Metcalfe, 1994). Esse subtipo pode promover um polimorfismo adicional, necessário para a função imune normal, já que nos caninos e felinos, somente um produto do gene MHC de classe I é expresso (Van der Feltz e Ploegh, 1984; Doveren et al., 1986; Yuhki et al., 1989). Um surpreendente resultado foi o efeito da *E. canis* sobre a expressão do MHC-II nos linfócitos circulantes, sendo demonstrada uma redução significativa na segunda quinzena PI. Ligantes fisiológicos e possíveis efeitos do receptor MHC-II sobre a função imunológica dos linfócitos são ainda desconhecidos. No presente estudo, a redução na expressão da molécula MHC-II nos linfócitos circulantes sugere que a modulação negativa do marcador pode estar correlacionada à diminuição na capacidade de apresentação de peptídeos do parasita às células T CD4 que também se encontram reduzidas durante a fase aguda do experimento. Não foi possível determinar o percentual de células CD4+/MHC-II+, por terem sido os anticorpos primários revelados pelo mesmo conjugado, o que impediu a separação pelo citômetro. A provável modulação do parasita sobre essa variação é corroborada pelo aumento dos índices visto após o tratamento. De acordo com Doveren et al. (1985), linfócitos caninos após estimulação *in vitro* pela lectina, demonstraram forte reação com anticorpos anti-MHC-II, semelhante ao apresentado por outras espécies como o homem e o camundongo, nos quais a presença do antígeno MHC-II nos linfócitos periféricos aumenta após estimulação.

A importância desta molécula na infecção por erlíquia foi estudada por Ganta et al. (2002) que verificaram a rápida eliminação da *E. chaffeensis* nos camundongos com MHC funcional, enquanto os transgênicos, com ausência do gene para MHC-II,



apresentaram uma infecção persistente, sugerindo que moléculas MHC-II funcionais são essenciais para a eliminação do agente infeccioso. Reis (2001), no estudo de diferentes formas clínicas da leishmaniose, demonstrou que linfócitos de cães assintomáticos apresentavam maior expressão do marcador MHC-II que animais com outras formas da doença, sugerindo uma associação entre o MHC dos linfócitos e os demais eventos responsáveis pela ausência de manifestações clínicas.

A avaliação da expressão do complexo CD45R na população de linfócitos, após infecção experimental por *E. canis*, revelou uma significativa redução durante a fase aguda. O CD45, uma glicoproteína integrante da membrana da superfície celular, desempenha um papel essencial na ativação antígeno-específica da célula T (Leitenberg et al., 1996). Sua expressão tem sido usada como um marcador da diferenciação e maturação de linfócitos e, em alguns casos, têm-se estabelecido eventos que resultam da modificação na expressão das isoformas (Abbas, 2000). Jacobsen et al. (2000) encontraram forte associação entre a esclerose múltipla e alterações na expressão do CD45 em linfócitos humanos. Pacientes com diagnóstico clínico de doenças como Alzheimer e demência mostraram baixos níveis de CD45RA e aumentado número de CD45R0 (Tan et al., 2002). De acordo com Tezuka et al. (1998), linfócitos de crianças com infecções crônicas apresentaram 10% a mais de CD45R0 que crianças livres de infecções. Em camundongos, CD45 é o principal alvo das terapias com globulinas anti-linfócitos (Fecteau et al., 2001) usadas para prevenir a rejeição de enxertos e de acordo com Lazarovits et al. (1996), o monoclonal CD45RB sozinho foi o responsável por reprimir a rejeição ao alo-enxerto em um camundongo modelo para transplantes de órgãos.

Uma tentativa de se estabelecer um significado funcional para os isotipos foi realizada por Cobbold e Metcalfe (1994) ao verificarem que células T "naive" e células T do tipo I, que secretam IFN- $\gamma$ , expressam CD45RA+; enquanto células produtoras de

IL-4 (células do tipo 2) expressam predominantemente CD45R0, fenótipo que representa a célula T ativada ou de memória (Moore et al., 1990). Dessa forma, a quantificação dos linfócitos T do sangue periférico expressando CD45RA versus CD45R0 pode ser usada para monitorar o status da doença e resposta à terapia (Marth et al., 1994). Nos animais domésticos, há uma carência de informações sobre o marcador e seus padrões isotípicos. A evidente redução na expressão do CD45R+ pelos linfócitos de cães experimentalmente infectados por *E. canis* precisa ser investigada e novas pesquisas diferenciar qual isotipo é responsável por essa diminuição e seu possível papel na patogênese da EMC.

Observamos em nosso estudo um aumento significativo no percentual de monócitos (células CD14+) circulantes após a infecção experimental com *E. canis*. Esse aumento vai ao encontro dos valores apresentados pelo hemograma. Conforme analisado nas alterações hematológicas, as causas da monocitose não estão claras, mas acredita-se que possam estar relacionadas a processos inflamatórios, frequentes na EMC.

A glicoproteína CD14, além de marcador de monócitos/macrófagos, funciona como um receptor para endotoxinas LPS em humanos e camundongos. Animais transgênicos, super expressando CD14 mostram aumento na liberação de citocinas como TNF- $\alpha$ , aumento de moléculas de superfície, incluindo as de adesão e uma maior susceptibilidade ao choque endotoxêmico (Gregory e Devitt, 1999). De forma contrária, a deficiência do CD14 conduz a uma dramática redução nos níveis de bacteremia após desafio com *E. coli*, sugerindo um papel para o CD14 na disseminação de organismos gram-negativos (Takeuchi et al., 1999). Nesse contexto, nenhum estudo demonstra a correlação entre o aumento de células CD14+ na circulação sangüínea e a multiplicação da *E. canis* no organismo.

Inferência ao papel desempenhado pelos monócitos na erliquiose pode ser obtida



pela co-expressão CD14 e MHC-II, já que o MHC-II constitui uma molécula que se liga aos peptídeos antigênicos para apresentação às células T e serve como um sinal de tradução que regula a função dos macrófagos (Matsuyama et al., 1993). Infelizmente, a dupla-marcação não foi efetuada nesse estudo, mas Harrus et al. (2003) demonstraram haver uma reduzida expressão das moléculas do MHC-II em células DH82 (macrófagos) após internalização *in vitro* da *E. canis*. Vachier et al (1998), após a infecção de células endoteliais bovinas com *E. ruminantium*, demonstraram queda na expressão tanto do MHC de classe I quanto do de classe II. Empregando a mesma amostra de *E. canis* utilizada em nosso estudo, Castro (2004) verificou uma significativa redução na expressão de moléculas MHC-II entre células mononucleares do baço e linfonodos de cães experimentalmente infectados, entretanto, não determinou se esta redução se deu primordialmente na expressão dos linfócitos ou macrófagos. A redução na expressão nos monócitos pode refletir no impedimento da ativação das proteínas tirosina kinase, proteína kinase C, fosfolipase citosólica A2 e síntese do óxido nítrico. Essa via de sinalização afeta a apresentação de antígenos, a adesão célula-célula, produção de citocinas, reação humoral, mudanças de isotipos das Ig e atividade anti-riquetisial (Feng e Walker, 1993) ocasionando alterações em toda a resposta imune frente a um patógeno.

A expressão de CD4 por neutrófilos caninos não encontra precedente em outras espécies mamíferas (Moore et al., 1992). O percentual de expressão encontrado nos animais antes da infecção experimental por *E. canis* foi inferior ao descrito na literatura, nas quais 97% dos neutrófilos apresentavam esse marcador. A dessemelhança nos resultados pode estar relacionada à diferença nos anticorpos monoclonais utilizados, à diferentes metodologias de separação da população de interesse ou relacionar-se a diferenças raciais dos animais experimentais. Anormalidades nos marcadores de superfície dos neutrófilos podem indicar a presença de graves desordens

granulocíticas. Porém, algumas variáveis devem ser consideradas para uma apropriada interpretação de dados humanos obtidos por citometria de fluxo: certos antígenos possuem grande estoque intracelular (CD10, CD11b, CD13, CD16) e a separação das células por gradiente de densidade pode mobilizá-los e aumentar a expressão na superfície; a pré-incubação à 37°C pode afetar a expressão do CD35, enquanto a suspensão em meio livre de soro parece estar associada com menor percentual de CD16 na superfície. Neutrófilos em apoptose poderão aumentar a expressão de alguns antígenos, como o CD13 e diminuir outros como CD15 e CD16 na superfície (Elghetany, 2002). Não se conhece a influência do método utilizado no presente estudo sobre antígenos de neutrófilos caninos.

Durante a infecção por *E. canis* observou-se um aumento da expressão de CD4 pelos granulócitos. O papel do CD4 nos neutrófilos é um enigma à luz do atual conhecimento sobre sua função em linfócitos que inclui a atuação como receptor para regiões não polimórficas das moléculas de MHC-II (Moore et al., 1992). Porém, a molécula CD4 canina, comparada com outras espécies incluindo o homem, apresenta uma composição distinta no segundo domínio que inclui três novos sítios de glicosilação (Milde et al., 1993) sugerindo que uma função imune diferente pode ser mediada através desta molécula nos cães (Dirscherl et al., 1995). A importância imunológica do aumento no percentual de expressão do CD4 pelos neutrófilos durante a erliquiose canina não está claro. Se há uma relação com outras alterações fenotípicas dos leucócitos, com a queda dos segmentados ou aumento dos bastonetes demonstrados no hemograma dos cães com erliquiose, precisa ainda ser investigado.

Os resultados aqui apresentados, sugerem que alterações no fenótipo de células circulantes podem estar relacionadas a mecanismos imunomoduladores, possivelmente importantes para a persistência e patogênese da *E. canis*. Como a distribuição e expressão de marcadores como CD4 e MHC-II são



diferentes no cão, daquelas apresentadas pelo homem, de acordo com Dirscherl et al. (1995), a resposta imune canina pode ser regulada de uma maneira espécie-específica, e essas diferenças devem ser consideradas quando se compara efeitos de processos infecciosos nas funções imunológicas entre cães e outras espécies.

#### 6.6 IMPACTO DA TERAPÊUTICA ETIOLÓGICA-ESPECÍFICA SOBRE PARÂMETROS CLÍNICO-LABORATORIAIS DE CÃES NA FASE AGUDA DA EMC EXPERIMENTAL

Todos os animais responderam prontamente à antibióticoterapia. A melhora clínica foi evidenciada após 48h do início do tratamento, também observada por McBride et al. (1996), e anterior à recuperação hematológica, corroborada por Walker et al. (1970). Com a introdução do tratamento, observou-se um aumento no consumo de ração, ganho de peso e maior atividade física, o que provavelmente, elevou os níveis de uréia e creatinina que encontravam-se baixos devido à debilidade muscular. A elevação na concentração de proteína total e queda nos níveis de ALT parecem estar relacionadas à hipótese de recuperação da lesão hepática presente na fase aguda.

Após o tratamento observou-se uma tendência à recuperação nos parâmetros hematológicos da série vermelha. Dois animais não responderam prontamente, o que reduziu a média do grupo e diferenciou estatisticamente esta fase do dia zero. O efeito do tratamento sobre a recuperação das alterações no eritrograma é confirmado por Woody e Hoskins (1991) e Woldehiwet e Ristic (1993). Sobre o número de plaquetas, destaca-se uma benéfica resposta inicial ao tratamento, com aumento significativo apresentado por todos os cães. Houve redução no número de bastonetes, enquanto o número de segmentados não respondeu prontamente, o que explica a manutenção da neutropenia, mesmo após a terapia antibiótica. A contagem de monócitos foi o índice dentre os leucócitos que melhor respondeu ao tratamento. Sua rápida e significativa recuperação, sugere

uma ação direta do parasitismo sobre o número de células circulantes.

De maneira geral, as alterações clínico-hematológicas encontradas nos cães após a infecção foram normalizadas após a instituição do tratamento. De acordo com Woldehiwet e Ristic (1993), dentre todas as bases testadas, as tetraciclina e seus derivados demonstraram maior eficácia contra *E. canis* e outras erliquioses animais, podendo o cão eliminar o parasito (Iqbal e Rikihisa, 1994; Woldehiwet e Ristic, 1993).

#### 6.7 REATIVIDADE DE ANTICORPOS ANTI-E.CANIS APÓS TRATAMENTO ETIOLÓGICO-ESPECÍFICO DE CÃES NA FASE AGUDA DA EMC EXPERIMENTAL

Após o tratamento, observou-se um aumento no título máximo de anticorpos que, em todos os animais foi de 1:150. Essa foi uma variação esperada, já que a tetraciclina induz a uma maior atividade microbicida dos macrófagos parasitados ao favorecer a fusão do lisossomo com as inclusões contendo erlíquias (Barnewall et al., 1997), acentuando a apresentação de estruturas antigênicas e conseqüente estimulação imune. O animal, após eliminar a *E. canis*, apresenta completo declínio dos níveis de anticorpos dentro de nove a doze meses (Woldehiwet e Ristic, 1993; Iqbal e Rikihisa, 1994). De acordo com Hoskins et al. (1983), o tratamento de cães com EMC e graves alterações associadas à hiperviscosidade sangüínea promove a redução da viscosidade e completa remissão dos sintomas, possivelmente devido à queda nos níveis de IgG1 que são reduzidos à metade logo após o término da terapia. Similar diminuição também foi observada por Buhles et al. (1974) e Huxoll et al. (1970).

#### 6.8 IMPACTO DA TERAPÊUTICA ETIOLÓGICA-ESPECÍFICA SOBRE AS ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS DOS LEUCÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO DE CÃES NA FASE AGUDA DA EMC EXPERIMENTAL

Após o tratamento, observou-se variações significativas no fenótipo dos leucócitos



circulantes, corroborando a hipótese de que as alterações da fase aguda representam a ação do parasita sobre a resposta imune do cão hospedeiro. Aumento nos percentuais de células T CD4+, linfócitos MHC-II+ e CD45R+ após o tratamento sugere que a terapia reduz a modulação negativa presente no 30º dia PI e pode correlacionar-se ao aumento da capacidade fisiológica de apresentação e reconhecimento de peptídeos do parasita às células T. Outro efeito benéfico do tratamento foi a redução no percentual de monócitos circulantes e o fim da monocitose observada durante a infecção. Estes resultados confirmam a idéia de que a monocitose auxilia na propagação do agente. Sobre o percentual de neutrófilos CD4+, o tratamento conduziu à uma significativa queda em relação ao observado na fase aguda. Também sobre esta molécula, pouco se sabe sobre sua função, mas variações observadas após a infecção por *E. canis* e o tratamento sugerem a influência do parasito sobre a expressão do CD4+ por neutrófilos.

#### 6.9 IMPACTO DA TERAPÊUTICA ETIOLÓGICA-ESPECÍFICA E IMUNOFENOTIPAGEM DA MEDULA ÓSSEA DE CÃES NA FASE AGUDA DA EMC EXPERIMENTAL

Neste trabalho, foi demonstrada a expressão de determinantes antigênicos nas células da medula óssea canina e avaliado o impacto do tratamento com tetraciclina sobre o perfil fenotípico apresentado após a infecção experimental com *E. canis*. O cão é considerado um modelo animal pré-clínico para o desenvolvimento de estratégias no transplante humano de medula óssea (Ladiges et al., 1990). Porém, enquanto muito progresso é obtido na caracterização de células humanas e murinas, informações a respeito da medula canina são limitadas. Recentes aplicações e avanços no uso de células-tronco, aumentam o interesse e certamente resultarão em um maior número de publicações referentes a esta espécie animal.

Na EMC, após a multiplicação inicial nos leucócitos circulantes, ocorre a migração da

bactéria para órgãos hematopoiéticos como baço, fígado e linfonodos, que servem como sítios primários de crescimento (Ewing, 1969; Reardon e Pierce, 1981; Harrus et al., 1998). Em estudo anterior (Moreira, 2001), o parasitismo na medula óssea foi sugerido pelo encontro de estruturas compatíveis com formas iniciais da *E. canis* no citoplasma de células mielóides, quando o sangue periférico encontrava-se "virtualmente livre" do agente. A importância local do parasitismo e a confirmação da medula como centro de proliferação após a parasitemia, devem ser investigadas em pesquisas futuras. Contudo, alterações na celularidade são achados freqüentes em cães nas diferentes fases da doença (Hildebrandt et al., 1973; Hoskins et al., 1983; Woody e Hoskins, 1991; Harrus et al., 1998;). A utilização da citometria de fluxo para análise da medula óssea, vem sendo o objeto de estudos de várias publicações. Porém, nenhuma inferência sobre os perfis relacionados à processos infecciosos caninos foi ainda descrita, sendo este trabalho pioneiro na abordagem.

De acordo com Weis (2002), amostras da medula óssea canina analisadas em gráficos de FSC versus SSC, podem ter suas populações celulares identificadas e quantificadas. Uma seleção realizada por Faldyna et al. (2003) dividiu as células medulares em três grandes grupos: os granulócitos (células polimorfonucleares) destacam-se por formar uma população distinta com altos valores de granulosidade (SSC) enquanto células mononucleares, no gráfico de FSC versus SSC, encontram-se divididas em duas subpopulações, uma de maior e outra de menor granulosidade (Figura 5B). Nestas regiões, segundo a distribuição anteriormente realizada por Weiss (2002), as células mielóides imaturas estariam representadas pela população de maior granulosidade, sendo os linfócitos e células maduras encontrados na região de granulosidade mais baixa. Porém, sem a utilização de marcadores linhagens-específicos, a diferenciação entre os grupos celulares, como os linfócitos que se sobrepõem às células eritróides ocupando a mesma região no gráfico, nem sempre é possível (Weiss, 2001b). Por isso, para a



seleção das células de interesse, no presente estudo foram utilizados anticorpos monoclonais com especificidade previamente conhecida para a população de mononucleares (Weiss, 2001a; Faldyna et al., 2003).

Na fase aguda da infecção experimental por *E. canis*, o percentual de células Thy-1+ não diferiu estatisticamente entre as subpopulações de mononucleares maduros e imaturos, confirmando-o como um fenótipo primitivo, encontrado nos estágios hematopoiéticos iniciais (Prendergast et al., 1986; Neumer et al., 1997; Faldyna et al., 2003), que se mantém até a fase linfocitária madura (Weis, 2001). Dentre os mononucleares imaturos, a alta percentagem de células Thy-1+, no 30º dia PI, pode retratar a ocorrência de um estímulo à proliferação hematopoiética, já que o envolvimento dessa glicoproteína na diferenciação celular foi confirmado por Mayani e Lansdorp (1994) que após bloquearem sua ação, viram diminuído o número de células formadoras de colônias, particularmente aquelas com alto potencial proliferativo. A frequência de células maduras também encontrava-se, aos 30 dias PI, acima da considerada normal por Weiss (2001), que afirmou representarem os linfócitos, 0-2% das células da medula óssea canina. A ausência de amostras do dia zero não permitiu a comparação com valores apresentados antes da infecção. Contudo, após o tratamento, a significativa redução no percentual de ambas as subpopulações de mononucleares, sugere a influência do processo infeccioso sobre as variações nas populações Thy-1+. O efeito do tratamento foi maior sobre as células imaturas, o que parece lógico ao considerarmos que, após a eliminação do agente, houve uma redução das alterações hematológicas decorrentes da erliquiose canina, diminuindo o estímulo a hematopoiese compensatória.

Antígenos MHC-II têm sido relatados em todas as células linfóides da medula óssea e dessa forma, parecem ser um pan-marcador de linfócitos; além de estarem presentes nos monócitos/macrófagos medulares (Weiss, 2001). Assim como

ocorrido com o antígeno Thy-1, a análise após o tratamento dos cães experimentalmente infectados revelou uma significativa redução no percentual de células MHC-II+ dentre os mononucleares imaturos. O percentual comparativamente maior do 30º dia PI diverge daquela modulação negativa vista nos linfócitos circulantes durante a infecção. Esse fato sugere que a diminuição no percentual de linfócitos MHC-II+ sanguíneos possa estar ocorrendo por um mecanismo de atuação local e, se dependente da presença do parasito, este não deve ter invadido a medula óssea. Corroborando esta hipótese, o percentual de células linfóides maduras MHC-II+ não apresentou variações significativas entre a fase aguda e após o tratamento.

A separação e quantificação do percentual de monócitos MHC-II+ não foi realizada, já que, a dupla marcação com MHC-II/ CD14 não fez parte do presente estudo.

A expressão do complexo CD45R na medula óssea é freqüentemente utilizado para se acompanhar o processo de maturação e diferenciação celular. Muitas informações encontram-se disponibilizadas sobre camundongos e humanos, mas sobre a medula óssea canina, também para este marcador, as informações são escassas. Durante a infecção experimental com *E. canis* observou-se, no 30º dia PI, um percentual dicotômico entre as populações de células CD45R+ maduras e imaturas. O maior percentual de células CD45R+ imaturas pode ser resultado de um estímulo à maturação de células linfóides, já que nos humanos, um aumento quantitativo na expressão deste marcador parece anteceder o surgimento de outras moléculas fenotípicas como CD3, CD19, correspondentes aos estágios maduros de diferentes linhagens (Shah et al., 1988). Dentre as células CD45R+ maduras, a significativa elevação após o tratamento, faz-nos acreditar que, no 30º dia PI, possa ter ocorrido uma queda na frequência dessas células devido ao estabelecimento da infecção. Isso, de acordo com Ledbetter et al. (1985), representaria uma resposta positiva, favorável ao processo de ativação



dos linfócitos T maduros, já que durante a ativação das células T humanas, observa-se uma redução na expressão do CD45R.

Devido à grande heterogeneidade das populações celulares, um estudo ideal das células da medula óssea necessita de que um grande número de características sejam analisadas simultaneamente, o que não foi possível no presente experimento.

Após o término desse estudo sobre as alterações, nos leucócitos circulantes e em células da medula óssea canina, decorrentes da infecção por *E. canis*, torna-se explícita a necessária continuidade, com a utilização de um painel mais amplo de anticorpos monoclonais, que inclua a metodologia de dupla marcação, e vise responder às inúmeras perguntas que ainda demandam respostas mais abrangentes.

## 7 CONCLUSÕES

- ◆ O estabelecimento da fase aguda na EMC experimental é inicialmente caracterizado por alterações fenotípicas dos leucócitos sangüíneos com a redução no percentual de linfócitos Thy-1+, acompanhada por uma progressiva queda no percentual de células T CD4+ e aumento no percentual de linfócitos B (IgM+) e monócitos (CD14+) circulantes.
- ◆ A manutenção da fase aguda é evidenciada por uma diminuição dos elementos da resposta celular, com acentuada queda na subpopulação de linfócitos T CD4+, MHC-II+ e CD45R+, indicando uma perda fisiológica na habilidade de reconhecimento antigênico e conseqüente imunossupressão. Nessa fase, observa-se o aumento no percentual de neutrófilos CD4+ e permanência dos elevados percentuais de linfócitos B (IgM+) e monócitos (CD14+).
- ◆ O tratamento dos animais com 22mg/Kg de Cloridrato de Tetraciclina oferecidos de 8/8 h, durante 22 dias é eficaz na recuperação clínica e normalização das principais alterações bioquímica-

hematológicas e fenotípicas dos leucócitos circulantes, presentes na fase aguda da EMC.

- ◆ Variações no percentual de células Thy-1+, MHC-II+ e CD45R+ da medula óssea podem funcionar como marcadores de prognóstico terapêutico nos animais tratados contra a erliquiose monocítica canina.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, K.A.; LICHTMAM, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia Celular e Molecular**. 4 ed. Rio de Janeiro: Revinter Ltda., 2002. 554p.
- ACKLEY, C.D.; HOOVER, E.A.; COOPER, M.D. Identification of a CD4 homologue in the cat. **Tissue Antigens**, n. 35, p. 92-98, 1990.
- ADAWA, D.A.Y.; HASSAN, A.Z.; ABDULLAH, S.U. et al. Clinical trial of long-acting oxytetracycline and piroxicam in the treatment of canine ehrlichiosis. **Vet. Q.**, n.15, p.118-120, 1992.
- ADEYANJU, B.J.; ALIU, Y.O. Chemotherapy of canine ehrlichiosis and babesiosis with imidocarb dipropionate. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, n.18, p.827-830, 1982.
- ALTIN, J.G.; SLOAN, E.K. The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation. **Immunol. Cell Biol.**, v.75, n.5, p.430-445, 1997.
- AMYX, H.L.; HUXSOLL, D.L.; ZEILER, D.C. et al. Therapeutic and prophylactic value of tetracycline in dogs infected with the agent of tropical canine pancytopenia. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, n.159, p.1428-1432, 1971.
- BAHIA, D.M.M.; YAMAMOTO, M.; CHAUFFAILLE, M.L.L.F. et al. Aberrant phenotypes in acute myeloid leukemia: a high frequency and clinical significance. **Haematologica**, v.86, n.8, p.801-806, 2001.
- BALKWILL, F.R.; BURKE, F. The cytokine network. **Immunol Today**, v.10, n.9, p.299-304, 1989.

- BARNEWALL, R.E.; RIKIHISA, Y. Abrogation of gamma interferon-induced inhibition of *Ehrlichia chaffeensis* infection in human monocytes with iron transferrin. **Infect. Immun.**, n.62, p.4804-4810, 1994.
- BARTSCH, R.C.; GREENE, R.T. Post-therapy antibody titers in dogs with ehrlichiosis: follow-up study on 68 patients treated primarily with tetracycline and/or doxycycline. **J. Vet. Intern. Med.**, n.10, p.271-274, 1996.
- BEISSERT, S.; HE, H.T.; HUEBER, A.O. et al. Impaired cutaneous immune responses in Thy-1-deficient mice. **J. Immunol.** n.161, p.5296-5302, 1998.
- BENENSON, A.S. Ehrlichiosis. In: *El control de las enfermedades transmisibles en el hombre*. 15 ed. Washington D.C: Organizacion Mundial de Salud, p. 115-17, 1992.
- BITSAKTSIS, C.; HUNTINGTON, J.; WINSLOW, G. Production of IFN-gamma by CD4 T cells is essential for resolving ehrlichia infection. **J Immunol.** v.172, n.11, p.6894-901, 2004.
- BREITSCHWERDT, E. B., HEGARTY, B.C., HANCOCK, S.I. Doxycycline hyclate treatment of experimental canine ehrlichiosis followed by challenge inoculation with two *Ehrlichia canis* strains. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.42, n.2, p.362-368, 1998a.
- BREITSCHWERDT, E. B., HEGARTY, B.C., HANCOCK, S.I. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *E. equi*, *E. ewingii* or *Bartonella vinsonii*. **J. Clin. Microbiol.**, v.36, n.9, p.2645-51, 1998b.
- BROWN, M.; WITTEWERA, C. Flow cytometry: Principles and clinical applications in hematology. **Clin. Chemistry**, v.46, p.1221-1229, 2000.
- BROW, W.C.; MCGUIRE, T.C.; ZHU, D. et al. Highly conserved regions of the immunodominant major surface protein 2 of the genogroup II ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale* are rich in natural derived CD4+ T lymphocyte epitopes that elicit strong recall responses. **J. Immunol.** n.166, p.1114-1124, 2001.
- BUHRLES, W.C.; HIXSOL, D.L.; HILDEBRANDT, P.K. Tropical canine pancytopenia: role of aplastic anaemia in the pathogenesis of severe disease. **J. Comp. Pathol.**, n.85, p.511-521, 1975.
- BUHRLES, W.C.; HUXSOLL, D.L.; RISTIC, M. Tropical canine pancytopenia: clinical, hematologic, and serologic response of dogs to *Ehrlichia canis* infection, tetracycline therapy, and challenge inoculation. **J. Infect. Dis.** n.130, p.357-367, 1974.
- BURGDORFER, W.; BRINTON, L.P. Mechanisms of transovarial infection of spotted fever rickettsiae in ticks. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.266, p.61-72, 1975.
- BURGESS, K. E.; YAMAMOTO, M.; PRASAD, K.V.S. et al. CD5 acts as a tyrosine kinase substrate within a receptor complex comprising T-cell receptor  $\zeta$  chain/CD3 and protein-tyrosine kinases p56<sup>lck</sup> and p59<sup>fyn</sup>. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.89, p.9311-15, 1992.
- BYRNE, K.M.; KIN, H.W.; CHEW, B.P. et al. A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and feline blood lymphocytes. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.73, p.167,182, 2000.
- BYRON, B.; OBWOLO, M.; BARBET, A.F.; MAHAN, S.M. A polarized Th1 type immune response to *Cowdria ruminantium* infection is detected in immune DBA/2 mice. **J. Parasitol.** n.86, p.983-992, 2000.
- ADMAN, H.F. et al. Comparison of the dot-blot enzyme linked immunoassay with immunofluorescence for detecting antibodies to *Ehrlichia canis*. **Vet. Rec.**, v.135, n.15, p.362-368, 1994.



- CALDWELL, C.; EVERETT, E.; McDONALD, D.; et al. Lymphocytosis of gamma7delta T cells in human ehrlichiosis. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.103, p.761-766, 1995.
- CAPLAN, S., BANİYASH, M. Searching for significance in TCR-cytoskeleton interactions. **Immunol. Today**, v.21, n.5, p.223-28, 2000.
- CASTRO, M.B. **Caracterização imunoistoquímica das células mononucleares em lesões observadas na infecção aguda experimental em cães por *Ehrlichia canis***. 2004, 76p. (Tese, Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Unesp, Jaboticabal.
- CDC – Center for Disease Control and Prevention. **Emergence of the Ehrlichioses**. Disponível em <http://www.medscape.com/govmt/CDC/EID>. Acesso em: 24/04/2003.
- CERASOLI, D.M.; KELSOE, G.; SARZOTTI, M. CD4<sup>+</sup>Thy-1<sup>-</sup> thymocytes with a Th-type 2 cytokine response. **Int. Immunol.** v.13, n.1, p.75-83, 2001.
- CHABANNE, L.; MARCHAL, T.; KAPLANSKI, C. et al. Screening of 78 monoclonal antibodies directed against human leucocyte antigens for cross-reactivity with surface markers on canine lymphocytes. **Tissue Antigens**, v.43, p.202-205, 1994.
- CHABANNE, L.; FOURNEL, C.; CAUX, C. et al. Abnormalities of lymphocyte subsets in canine lupus erythematosus. **Autoimmunity**, v.22, p.1-8, 1995.
- CHABANNE, L.; BONNEFONT, C.; BERNAUD, J.; RIGAL, D. Clinical applications of flow cytometry and cell immunophenotyping to companion animals (dog and cat). **Methods Cell Sci.**, v.22, p.199-207, 2000.
- COBBOLD, S.; METCALFE, S. Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: Summary of the First International Canine Leukocyte Antigen Workshop (CLAW). **Tissue Antigens**, v.43, p.137-154, 1994.
- COSTA, J.O. et al. *Ehrlichia canis* infection in dog in Belo Horizonte – Brazil. **Arq. Esc. Vet. UFMG**, Belo Horizonte, v.25, n.2, p.199-200, 1973.
- CROCKER, P.R.; JEFFERIES, W.W.; CLARK, S.J. et al. Species heterogeneity in macrophage expression of the CD4 antigen. **J. Exp. Med.**, n.166, p.163-167, 1987.
- CULMSEE, K.; SIMON, D.; MISCHKE, R.; NOLTE, I. Possibilities of flow cytometric analysis for immunophenotypic characterization of canine lymphoma. **J. Vet. Med.**, n.47, p.199-206, 2001.
- CULMSEE, K.; NOLTE, I. Flow cytometry and its application in small animal oncology. **Methods Cell Sci.**, n.24, p.49-54, 2002.
- DACE, J.; LEWIS, S. **Practical Hematology**. 6 ed., Churchill Livingstone, London, p. 453, 1984.
- DAGNONE, A.S.; MORAIS, H.S.; VIDOTTO, M.C.; JOJIMA, F.S.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. **Vet. Parasitol.** v.117, n.4, p.285-290, 2003.
- DAVIDSON, D.E.; DILL, G.S.; TINGPALAPON, M. et al. Prophylactic and therapeutic use of tetracycline during an epizootic of ehrlichiosis among military dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, n.172, p.697-700, 1978.
- DAVOUST, B.; PARZY, D.; VIDOR, E.; HASSELOT, N.; MARTET, G. Ehrlichiose canine experimentale: étude clinique et thérapeutique. **Rev. Méd. Vét.**, n.167, p.33-40, 1991.

- DAWSON, J.E.; ANDERSON, B.E.; FISHBEIN, D.B. et al. Isolation and characterization of an *Ehrlichia* sp. From a patient diagnosed with human ehrlichiosis. **J. Clin. Microbiol.**, v.29, p.2741-45, 1991a.
- DAWSON, J.E.; RIKIHISA, Y.; EWING, S.A.; FISHBEIN, D.B. Serologic diagnosis of human ehrlichiosis using two *Ehrlichia canis* isolates. **J. Infect. Dis.**, v.163, p.564-67, 1991 b.
- DAWSON, J.E.; BIGGIE, K.L.; WARNER, C.K. et al. Polymerase chain reaction evidence of *Ehrlichia chaffeensis*, na etiologic of human ehrlichiosis, in dogs from southeast Virginia. **Am. J. Vet. Res.**, n.57, p.1175-1179, 1996.
- DAWSON, J. E., WARNER, C. K., EWING, S. A. et al. Fingerprinting of *Ehrlichia* species by repetitive element PCR. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 57, p. 109-114, 1997.
- DEEG, H.J.; WULFF, J.C.; DEROSE, S. et al. Unusual distribution of Ia-like antigens on canine lymphocytes. **Immunogenetics**, n.16, p.445-457, 1982.
- DIRSCHERL, P.; BEISKER, W.; KREMMER, E. et al. Immunophenotyping of canine bronchoalveolar and peripheral blood lymphocytes. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, n.48, p.1-10, 1995.
- DONATIEN, A., LESTOQUARD, F. Existence en Algérie d'une Rickettsia du chien. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, v.28, p.408-9, 1935.
- DOREVEN, R.F.C.; BUURMAN, W.A.; SCHUTTE, B. et al. Class II antigens on canine T lymphocytes. **Tissue Antigens**, n.25, p.255-265, 1985.
- DOREVEN, R.F.C.; VAN DER LINDEN, C.J.; SPONKEN, E.E.M. et al. Canine MHC-class II antigens on B and T lymphocytes. **Tissue Antigens**, n.27, p.87-95, 1986.
- DUMLER, J.S. Human ehrlichiosis: Clinical. Laboratory, epidemiologic, and pathologic considerations. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RICKETTSIAE AND RICKETTSIAL DISEASES, Vth, 1996, Bratislava. **Proceedings of...** Bratislava: Slovak Academy of Sciences, [s.n.], 1996, p.287-302.
- DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P.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*, description of six new species combinations and designations of *Ehrlichia equi* and "HGE agent" as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocitophila*. **Inst. J. Syst. Evol. Microbiol.**, n.6, p.2145,65, 2001.
- ELGHETANY, M.T. Surface antigen changes during normal neutrophilic development: a critical review. **Blood Cell Mol. Dis.**, n.28, v.2, p.260-274, 2002.
- ELIAS, E. Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusion bodies or morulae of *E. canis*. **J. Small Anim. Pract.**, v.33, p.540-543, 1991.
- ENGLISH, R.V.; NELSON, P.; JOHNSON, C.M. et al. Development of clinical disease in cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. **J. Inf. Dis.**, v.170, p.543,552, 1994.
- EWING, S.A. Canine Ehrlichiosis. **Adv. Vet. Sci. Comp. Med.**, v.13, p.331-53, 1969.
- FALDYNA, M.L.; KNOTIGOVÁ, L.P.; TOMANN, M. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs – a flow cytometric study. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.82, p.23-37, 2001.
- FALDYNA, M.; SINKORA, J.; KNOTIGOVA, P. et al. Flow cytometric analysis of bone marrow leukocytes in neonatal dogs. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v.95, p.165-176, 2003.



- FECTEAU, S.; BADASONNA, G.P.; FREITAS, A. CLTA-4 up-regulation plays a role in tolerance mediated by CD45. *Nature-immunology*, v.2, p.58-63, 2001.
- FEITO, M.J.; JIMENEZ-PERIANEZ, A.; OJEDA, G. et al. The TCR/CD3 complex: molecular interactions in a changing structure. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, v.50, p.263-272, 2002.
- FENG, H.M.; WALKER, D.H. Mechanisms of immunity to *Ehrlichia muris*: a model of monocytotropic ehrlichiosis. *Infect. Immun.*, v.72, n.2, p.966-971, 2004.
- ERREIRA, B.R.; SILVA, J.S. Saliva of *Rhipicephalus sanguineus* tick impairs T cell proliferation and IFN-gamma-induced macrophage microbicidal activity. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.64, n.3, p.279-293, 1998.
- FERREIRA, B.R.; SILVA, J.S. Successive tick infestations selectively promote a T-helper 2 cytokine profile in mice. *Immunology*, v.96, n.3, p.434-439, 1999.
- FERREIRA, B.R.; SZABÓ, M.P.J.; CAVASSANI, K.A. et al. Antigens from *Rhipicephalus sanguineus* ticks elicit potent cell-mediated immune responses in resistant but not in susceptible animals. *Vet. Parasitol.*, v.115, n.1, p.35-48, 2003.
- FORMAN, J. T cells, the MHC, and function. *Immunol Rev.*, v.81, p.203-219, 1984.
- FRANK, J.R.; BREITSCHWERDT, E.B. A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. *J. Vet. Intern. Med.*, v.13, n.3, p.194-201, 1999.
- GANTA, R.R.; WILKERSON, M.J.; CHENG, C. et al. Persistent *Ehrlichia chaffeensis* infection occurs in the absence of functional major histocompatibility complex class II genes. *Infect. Immun.*, v.70, p. 380-388, 2002.
- GEBHARD, D.H.; CARTER, P.B. Identification of canine T-lymphocyte subsets with monoclonal antibodies. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.33, p.187-199, 1992.
- GORNAL, A.G.; BARDAWILI, C.J.; DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, v.177, p.751-766, 1949.
- GREENLEE, P.G.; CALVANO, S.E.; QUIMBY, F.W.; HURVITZ, A.I. Investigation of cross-reactivity between commercially available antibodies directed against human, mouse, and rat lymphocyte surface antigens and surface markers on canine cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.15, p.285-296, 1987.
- GREELEY, E.H.; KEALY, R.D.; BALLAM, J.M. et al. The influence of age on the canine immune system. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, n.55, p.1-10, 1996.
- GREGORY, C.D.; DEVITT, A. CD14 and apoptosis. *Apoptosis*, n.4, v.1, p.11-20, 1999.
- GRINDEM, C.B.; STEVENS, J.B.; PERMAN, V. Morphological classification and clinical and pathologic characterization of spontaneous leukemia in 17 dogs. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, n.21, p.219-226, 1985.
- GRINDEM, C.B. Blood cell marker. *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.*, v.26, p.1043-1064, 1996.
- GRINDEM, C.B.; PAGE, R.L.; AMMERMAN, B.E. et al. Immunophenotypic comparison of blood and lymph node from dogs with lymphoma. *Vet. Clin. Pathol.*, v.27, p.16-20, 1998.
- GROVES, M.G.; DENNIS, G.L.; AMYX, H.L.; HUXSOLL, D.L. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). *Am. J. Vet. Res.*, n.7, p.937-40, 1975.

- GUIMARÃES, J.H.; TUCCI, E.C.; BARROS-BATTESTI, D.M. **Ectoparasitas de importância veterinária**. Ed: Plêiade, São Paulo. 213p.
- GUNTER, K.C.; GERMAIN, R.N.; KROCZEK, R.A. et al. Thy-1-mediated T-cell activation requires co-expression of CD3/Ti complex. **Nature**, n.326, p.505-508, 1987.
- HAERYFAR, S.M.; AL-ALWAN, M.M.; MADER, J.S. et al. Thy-1 signaling in the context of costimulation provided by dendritic cells provides signal 1 for T cell proliferation and cytotoxic effector molecule expression, but fails to trigger delivery of the lethal hit. **J. Immunol.**, n.171, p.69-77, 2003.
- HAERYFAR, S.M.; HOSKINS, D.W. Thy-1: more than a mouse pan-T cell marker. **J. Immunol.** v.173, n.6, p.3581-3588, 2004.
- HARRUS, S.; WANER, T.; AVIDAR, Y., et al. Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. **Vet. Parasitol.**, n.66, p.241-249, 1996.
- HARRUS, S.; WANER, T.; AIZENBERG, I. et al. Ehrlichial DNA amplification from dogs, thirty four months post-infection with *E. canis*. **J. Clin. Microbiol.**, n.36, p.73-76, 1998.
- HARRUS, S.; WANER, T.; BARK, H. et al. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, n.9, p.2745-2749, 1999.
- HARRUS, S.; WANER, T.; FRIEDMANN-MORVINSKI, D. et al. Down-regulation of MHC class II receptors of DH82 cells, following infection with *Ehrlichia canis*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, n. 96, p.239-143, 2003.
- HEEB, H.L.; WILKERSON, M.J.; CHUN, R.; GANTA, R.R. Large granular lymphocytosis, lymphocyte subset inversion, thrombocytopenia, dysproteinemia, and positive *Ehrlichia* serology in a dog. **J Am Anim Hosp Assoc.**, v.39, n.4, p.379-384, 2003.
- HEGARTY, B.C.; LEVY, G.L.; GAGER, R.F.; BREITSCHWERDT, E.B. Immunoblot analysis of the immunoglobulin G response to *Ehrlichia canis* in dogs: an international survey. **J. Vet. Diagn. Invest.**, n.9, p.32-38, 1997.
- HEMELT, I.E.; LEWIS, G.E.; HUXSOLL, D.L.; STEPHENSON, E.H. Serial propagation of *Ehrlichia canis* in primary canine peripheral blood monocyte cultures. **Cornell Vet.**, v.70, p.37-42, 1980.
- HENNIKER, A.J. CD90. **J. Biol. Regul. Homeost. Agents.** n.15, p.392-393, 2001.
- HIBBLER, C.O.S.; HOSKINS, J.D.; GREENE, C.E. Rickettsial infections in dogs Part II: Ehrlichiosis and Infectious Cyclic Trombocytopenia. **Comp. Cont. Edu.**, v.8, n.2, p.106-113, 1986.
- HILDEBRANDT, P.K.; HUXOLL, D.L.; WALKER, J.S. et al. Pathology of Canine Ehrlichiosis (Tropical Canine Pancytopenia). **Am. J. Vet. Res.**, v.34, n.10, p.1309-20, 1973.
- HOSKINS, J.D.; BARTA, O.; ROTHSMITT, J. Serum hyperviscosity syndrome associated with *Ehrlichia canis* infection in a dog. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, n.9, p.1011-1012, 1983.
- HOSKINS, J.D. Ehrlichial diseases of dogs: diagnosis and treatment. **Canine Pract.**, v.16, n.3, p.13-21, 1991.
- HUXOLL, D.L.; HIDEBRANDT, P.K. NIMS, R.M. et al. Tropical canine pancytopenia. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, n.157, p.1627-1632, 1970.
- HYUN, B.H.; STEVENSON, A.J.; HANAU, C.A. Fundamentals of bone marrow examination. **Hematol. Oncol. Clin. North. Am.**, n.8, p.651-654, 1994.
- INOKUMA, H.; OHNO, K.; ONISHI, T. Is the detection of anti-*Rhipicephalus sanguineus* (Rs24) antibodies a valuable epidemiological tool of ticks infestation in dogs? **Vet. Res.**, v.31, n.3, p.365-369, 2000.



- IQBAL, Z.; CHAICHANASIRIWITHAYA, W.; RIKIHISA, Y. Comparison of PCR with other testes for the early diagnosis of canine ehrlichiosis. **J. Clin. Microbiol.**, n.32, p.1658-1662, 1994.
- IQBAL, Z., RIKIHISA, Y. Reisolation of *Ehrlichia canis* from blood and tissues of dogs after doxycycline treatment. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, n. 7, p. 1644-49, 1994.
- JACOBSEN, M.; SCHWEE, D.; ZEIGLER, A. et al. A point mutation in PTPRC is associated with the development of multiple sclerosis. **Nature-Genetics**, v.23, n.4, p.495-499, 2000.
- JOHNSON, E.M.; EWING, S.A.; BARKER, R.W. et al. Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) by *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). **Vet Parasitol.**, v.74, n.2-4, p.277-288, 1998.
- KAKOMA, I. et al. Autologus lymphocyte mediated cytotoxicity against monocyte in canine ehrlichiosis. **Am. J. Vet. Res.**, v.38, n.10, p.557-559, 1977.
- KAKOMA, I.; HANSEN, R.D.; ANDERSON, B.E. et al. Cultural, molecular, and immunological characterization of the etiologic agent for atypical canine ehrlichiosis. **J. Clin. Microbiol.**, n.32, p.170-175, 1994.
- KAPLAN, D.; SMITH, D.; MEYERSON, H. et al. CD5 expression by B lymphocytes and its regulation upon Epstein-barr virus transformation. **PNAS**, v.98, n.24, p. 13850-53, 2001.
- KATZ, K.S. Protein preview on the web CD45. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/prow/cd45/cd45.html> . Acessado em 17/03/2003.
- KAUFMANN, S.H.E. Immunity to intracellular bacteria. **Adv. Immunol.**, n.11, p.129-163, 1993.
- KEEFE, T. J., HOLAND, C.J., SAYLER, P.E., RISTIC, M. Distribution of *Ehrlichia canis* among military working dogs in the world and selected civilian dogs in United States. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 181, p. 236-36, 1982.
- KELLERMAN, S.A.; DELL, C.L.; HUNT, S.W.; SHIMIZU, Y. Genetic analysis of intergrin activation in T lymphocytes. **Immunol. Rev.**, v.186, p.172-188, 2002.
- KEYSARY, A.; WANER, T.; ROZNER, M. et al. Isolation, in vitro propagation and genetic characterization of *Ehrlichia canis* from dogs in Israel. **Vet. Parasitol.**, n.62, p.331-340, 1995.
- KLEIN, A.K.; DYCK, J.A.; STITZEL, K.A. Characterization of canine fetal lymphohematopoiesis: studies of CFU<sub>GM</sub>, CFU<sub>L</sub>, CFU<sub>P</sub>. **Exp. Hematol.**, v.11, p.263-274, 1983.
- KORDICK, S.K.; BREITSCHWERDT, E.B.; HEGARTY, B.C. et al. Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a Walker Hound Kennel in North Carolina. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, n.8, p.2631-2638, 1999.
- KUHEN, N.F.; GAUNT, S.D. Clinical and hematologic findings in canine ehlichiosis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.186, n.4, p.355-358, 1985.
- LABARTE, N.; CAMPOS PEREIRA, M.; BARBARINE, O. et al. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* infections in Brazil. **Vet. Therapeutics**, v.4, n.1, p.67-75, 2003.
- LABRUNA, M.B. Biológica-ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA:13 e SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES: 1, 2004, Ouro Preto, MG. **Anais...**, Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, v.13, p.123-124, 2004a.

- LABRUNA, M.B. Carta acarológica. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA:13 e SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES: 1, 2004, Ouro Preto, MG. **Anais...**, Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, v.13, p.199-202, 2004b.
- LADIEGES, W.C.; STORB, R.; THOMAS, E.D. Canine models of bone marrow transplantation. **Lab. Ann. Sci.**, n.40, p.11-15, 1990.
- LAI, L.; ALAVERDI, N.; MALTAIS, L.; MORSE, H.C. Mouse cell surface antigens: Nomenclature and immunophenotyping. **J. Immunol.**, v.160, p.3861-3868, 1998.
- LAZAROVITS, A.I.; POPPEMA, S.; ZHANG, Z. Prevention and reversal of renal allograft rejection by antibody against CD45RB. **Nature**, v.380, p.717-720, 1996.
- LEDBETTER, J.A.; ROSE, L.M.; SPOONER, C.E. Antibodies to common leukocyte antigen p220 influence human T cell proliferation by modifying IL 2 receptor expression. **J Immunol.** v.135, n.3, p.1819-1825, 1985.
- LEITENBERG, D.; NOVAK, T.J.; FARBER, D. et al. The extracellular domain of CD45 controls association with the CD4-T cell receptor complex and the response to antigen-specific stimulation. **J. Exp. Med.**, v.183, n.1, p.249-259, 1996.
- LEMONS, E.R.; MACHADO, R.D.; COURA, J.R. et al. Infestation by ticks and detection of antibodies to Spotted fever group Rickettsiae in wild animal captured in the state of São Paulo, Brazil. A preliminary report. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.91, n.6, p.701-702, 1996.
- LEWIS Jr., G.E. RISTIC, M.; SMITH, R.D. et al. The brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* and the dog as experimental hosts of *Ehrlichia canis*. **Am. J. Vet. Res.**, v.32, p.1953-55, 1977.
- LI, J.S.; YAGER, E.; REILLY, A.; FREEMAN, C. et al. Outer membrane protein specific monoclonal antibodies protect SCID mice from fatal infection by the obligate intracellular bacterial pathogen *Ehrlichia chaffeensis*. **J. Immunol.**, n.166, p.1855, 2001.
- LOKEN, M.R.; SHAH, V.O.; DATTILIO, K.L. et al. Flow cytometric analysis of human bone marrow. I. Normal erythroid development. **Blood**, n.69, p.255-259, 1987.
- MACALUSO, K.R.; SONENSHINE, D.E.; CERAUL, S.M.; AZAD, A.F. Rickettsial infection in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) inhibits transovarial transmission of a second rickettsia. **J. Med. Entomol.**, v.39, p.808-813, 2002.
- MACHADO, R.Z. (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP-Jaboticabal) Comunicação pessoal, 1993.
- MACHADO, R.Z. Erliquiose canina. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA:13 e SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES: 1, 2004, Ouro Preto, MG. **Anais...**, Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, v.13, p.53-57, 2004.
- MADDON, P.J.; MOLINEAUX, S.M. MADDON, D.E. et al. Structure and expression of the human and mouse T4 genes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, n.84, p.915, 1987.
- MAEDA, K.N.; MARKOWITZ, R.C.; HAWLEY, M. et al. Human infection with *Ehrlichia canis*, a leucocytic rickettsia. **N. Engl. J. Med.** n.316, p.853-856, 1987.
- MAGNARELLI, L.A.; DUMLER, J.S. Ehrlichioses: Emerging infectious diseases in tick-infested areas. **Clin. Microbiol. News Letter.**, n.11, p.81-83, 1996.
- MARTH, J.D.; ONG, C.J.; CHUI, D. Specific CD45 isoforms regulate T cell ontogeny and are functionally distinct in modifying immune activation. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.365, p.149-166, 1994.



- MASSUNG, R. F., SLATER, K., OWENS, J. H. et al. Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n.4. p. 1090-95, 1998.
- MATSUYAMA, S.; KOIDE, Y., YOSHIDA, T.O. HLA class II molecule-mediated signal transduction mechanism responsible for the expression of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha genes induced by a staphylococcal superantigen. **Eur. J. Immunol.** n.23, p.3194-3202, 1993.
- MAYANI, H.; LANSDORP, P.M. Thy-1 expression is linked to functional properties of primitive hematopoietic progenitor cells from human umbilical cord blood. **Blood**, n.83, p.2410-2422, 1994.
- McBRIDE, J. W., CORSTVET, R. E., GAUNT, S. D. et al. PCR detection of acute *Ehrlichia canis* infection in dogs. **J. Vet. Diagn. Invest.** V. 8, p. 441-447, 1996.
- McBRIDE, J.W.; CORSTVET, R.E.; BREITSCHWERDT, E.B.; WALKER, D.H. Immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* infection with recombinant proteins. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, n.1, p.315-322, 2001.
- McBRIDE, J.W.; CORSTVET, R.E.; GAUNT, S. et al. Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* immunoreactive proteins. **Infect. Immun.**, v.71, n.5, p.2516-24, 2003.
- McDONOUGH, S.P.; MOORE, P.F. Clinical, hematologic, and immunophenotypic characterization of canine large granular lymphocytosis. **Vet. Pathol.**, v.37, p.637-646, 2000.
- McFARLANE, D.; SELLON, D.C.; GIBBS, S.A. Age-related quantitative alterations in lymphocytes subsets and immunoglobulin isotypes in healthy horses. **Am. J. Vet. Res.**, v.62, p.1413,1417, 2001.
- McKENZIE, J.L.; FABRE, J.W. Studies with monoclonal antibody on the distribution of Thy-1 in the lymphoid and extracellular connective tissue of the dog. **Transplantation**, v.31, p.275-282, 1981.
- McNEILL, L.; CASSADY, R.L.; SARKARDEI, S. et al. CD45 isoforms in T cell signalling and development. **Immunol. Letters**, v.92, p.125-134, 2004.
- MEINKOTH, J.H., HOOVER, J.P., COWELL, R.L.; TYLER, R.D.; LINK, J. Ehrlichiosis in a dog with seizures and non regenerative anemia. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.195, p.1754-55, 1989.
- MESSICK, J.B.; RIKIHISA, Y. Inhibition of binding, entry, or intracellular proliferation of *Ehrlichia risticii* in P388D1 cells by anti-*E. risticii* serum, immunoglobulin-G, or Fab fragment. **Infect. Immun.**, n.62, p.3156-3161, 1994.
- MEYER, D.J. and HARVEY, J.W. **Veterinary laboratory medicine: Interpretação e Diagnóstico.** W.B.Saunders Company, 1998, 373p.
- MILDE, K.F.; CONNER, G.E.; MINTZ, D.; ALEJANDRO, R. Primary structure of the canine CD4 antigen. **Bioch. Biophys. Acta**, n.1172, p.315-318, 1993.
- MONOS, D.S.; WOLF, B.; RADKA, S.F. et al. Equine class II MHC antigens: identification of two sets of using antihuman monoclonal antibodies. **Tissue Antigens**, n.34, p.111-120, 1989.
- MOORE, P.F.; ROSSITO, P.V.; DANILENKO, D.M. Canine leucocyte integrins: characterization of Cd18 analogue. **Tissue Antigens**, v.36, p.211-220, 1990.
- MOORE, P.F.; ROSSITO, P.V.; DANILENKO, D.M. et al. Monoclonal antibodies specific for canine CD4 and CD8 define functional T-lymphocyte subsets and high-density expression of CD4 by canine neutrophils. **Tissue Antigens**, n.40, p.75-85, 1992.
- MOREAU, M.F., THIMBAUD, J.L., MILED, L.B. et al. *Theileria annulata* in CD5+ macrophages and B1 B cells. **Infect. Immun.**, v.67, n.12, p.6678-82, 1999.

- MOREIRA, S.M.; BASTOS, C.V.; ARAÚJO, R.B.; SANTOS, M.; PASSOS, L.M.F. Retrospective study (1998-2001) on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, MG, Brazil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, n.2, p. 141-147, 2003.
- NEER, T.M. Canine monocytic ehrlichiosis and granulocytic ehrlichiosis. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dogs and cats**. 2ª ed., Philadelphia: W.B. Saunders, 1998, p.139-147.
- NEUMER, E.; SCHUMM, M.; SCHNEIDER, E.M. et al. Immune phenotype of canine hematopoietic progenitor cells. **Tissue Antigens**, n.50, p.466-474, 1997.
- NIELBYLSKI, M.L.; PEACOCK, M.G.; SCHWANT, T.G. Lethal effect of *Rickettsia rickettsii* on ticks vector (*Dermacentor andersoni*). **Appl. Environ. Microbiol.**, v.65, p.773-778, 1999.
- NYINDO, M.; HUXSOLL, D.L.; RISTIC, M. et al. Cell-mediated and humoral immune response of German Shepherd dogs and beagles to experimental infection with *Ehrlichia canis*. **Am. J. Vet. Res.**, v.41, n.2, p.250-254, 1980.
- OLIVEIRA, D.; TIE NISHIMORI, C.; COSTA, M.T. et al. Anti-*Ehrlichia canis* antibodies detections by "Dot ELISA" in naturally infected dogs. **Bras. J. Vet. Parasitol.**, V.9, n.1, p.1-5, 2000.
- OMS. Medicamentos Esenciales. 13ª ed. Lista Modelo de la OMS. [http://www.who.int/medicines/organization/p\\_ar/edl/expcom13/eml13\\_sp.pdf](http://www.who.int/medicines/organization/p_ar/edl/expcom13/eml13_sp.pdf) (acessado em agosto de 2003).
- PADDOCK, C. D.; SUCHARD, D. P.; GRUMBACH, K. L. et al. Brief report: Fatal seronegative ehrlichiosis in a patient with HIV infection. **N. Engl. J. Med.** v.329, p. 1164-67, 1993.
- PAGE, R.L. Clinical implication of lymphocyte phenotyping. In: The North American Veterinary Conference, 9, 1995, Orlando, **Proceedings**. p.257.
- PARNERS, J.R. Molecular biology and functional of CD4 and CD8. **Adv. Immunol.**, v.44, p.265-311, 1989.
- PAPALARDO, B.L.; BROWN, T.T.; TOMPKINS, M.; BREITSCHWERDT, E.B. Immunopathology of *Bartonella vinsonii (berkhoffii)* in experimentally infected dogs. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, n.83, p.125-147, 2001.
- PARKER, D.C.; T cell-dependent B cell activation. **Ann. Rev. Immunol.**, v.11, p.331-360, 1993.
- PARNES, J.R. Molecular biology and function of CD4 and CD8. **Adv. Immunol.** n. 44, p. 265-312, 1989.
- PEREZ, M.; RIKIHISA, Y.; WEN, B. *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. **J. Clin. Microbiol.**, v.34, n.9, p.2133-2139, 1996.
- PIERCE, K.R.; MARRS, G.E.; HIGHTOWER, D. Acute canine ehrlichiosis: platelet survival and factor 3 assay. **Am. J. Vet. Res.**, n.38, p.1821-1825, 1977.
- PRENDERGAST, M.M.; BRADSTOCK, K.F.; BROOMHEAD, A.F. et al. Monoclonal antibody analysis of canine hemopoietic cells. Role of Ia-like and Thy-1 antigens in bone marrow engraftment. **Transplantation**, n.41, p.565-571, 1986.
- PRICE, J.E.; DOLAN, T.T. A comparison of imidocarb dipropionate and tetracycline hydrochloride in the treatment of canine ehrlichiosis. **Vet. Rec.** n.107, p.275-277, 1980.
- RABANAL, R.M.; FERRER, L.; ELSE, R.W. Immunohistochemical detection of canine leucocyte antigens by specific monoclonal antibodies in canine normal tissues. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.47, p.13-23, 1995).



- RAINER, R.O.; HODGES, L.; SELTZER, G.T. CD45 gating correlates with bone marrow differential. **Cytometry**, v.22, p.139-145, 1995.
- REARDON M.J.; PIERCE, K.R. Acute experimental canine ehrlichiosis. I. Sequential reaction of the hemic and lymphoreticular systems. **Vet. Pathol.** n.18, p.48-61, 1981.
- REIS, A.B. **Avaliação de parâmetros laboratoriais e imunológicos de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*, portadores de diferentes formas clínicas da infecção.** 2001. 176p. (Tese, Doutorado) - Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte.
- RIDEOUT, B.A.; MOORE, P.F.; PEDERSEN, N.C. Distribution of MHC class II antigens in feline tissues and peripheral blood. **Tissue Antigens**, n.36, p.221-227, 1990.
- RIKIHISA, Y. The Tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.4, n.3, p.286-308, 1991.
- RISTIC, M.D.L.; HUXSOLL, R.M.; WEISIGER, P.K. et al. Serological diagnosis of tropical canine pancytopenia by indirect immunofluorescence. **Infect. Immun.**, v.6, p.226-31, 1972.
- RISTIC, M., HOLLAND, C. J. canine ehrlichiosis. P. 169-186, In: WOLDEHIWET, Z., RISTIC, M. (ed.), **Rickettsial and chlamydial disease of domestic animals.** Pergamon press, 1993.
- RITTER, M.A.; SAUVAGE, C.A.; DELIO, D. et al. Human Thy-1 antigen: cell surface expression on early T and B lymphocytes. **Immunology**, n.49, p.555, 1993.
- SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALLONA, F., et al. Enzymatic amplification of the globulingenomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v.230, p. 1350-54, 1985.
- SAN MIGUEL, J.F.; VIDRIALES, M.B; LÓPEZ-BERGES, C. et al. Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification. **Blood**, v.98, n.6, p.1746, 1751.
- SCHAIBLE, U.E.; COLLINS, H.L.; KAUFMANN, S.H.E. Confrontation between intracellular bacteria and the immune system. **Adv. Immunol.**, n.71, p.267-377, 1999.
- SCHALM, O.W. **Veterinary hematology.** 3 ed. Philadelphia: Lea e Febiger, 1975. 807p.
- SCHUBERT, H.J.; RABE, H.U.; BEER, A.; LEIBOLD, W. et al. Crossreactivity of workshop monoclonal antibodies with canine blood leukocytes. **Vet Immunol. Immunopathol.**, v.60, p.419-424, 1998.
- SCHWARTZ, R.H. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. **Science**, n.248, p.1349-11352.
- SEEGER, R.C.; DANON, Y.L.; RAYNER, S.A. et al. Detection of a thy-1 determinant on human neuroblastoma, glioma, sarcoma, and teratoma cells with a monoclonal antibody. **J. Immunol.**, n.128, p.983, 1982.
- SELLON, R.K.; LEVY, J.K.; JORLAN, D.H. et al. Changes in lymphocyte subsets with age in perinatal cats: late gestation through eight weeks. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.53, p.105-113, 1996.
- SHAH, V.O.; CIVIN, C.I.; LOKEN, M.R. Flow cytometric analysis of human bone marrow. IV: Differential quantitative expression of T-200 common leukocyte antigen during normal hemopoiesis. **Am. Assoc. Immunol.**, v.140, n.6, p.1862-1867, 1988.
- SHAW, S.; DAY, M.J.; BIRTLES, R.J.; BREITSHWERDT, E.B. Tick-borne infectious diseases of dogs. **Trends Parasitol.**, v.17, n.2, p.74-80, 2001.

- SIMPSON, C.F. Relationship of *Ehrlichia canis* infected mononuclear cells to blood vessels of the lung. **Infect. Immun.**, v.10, p.590-596, 1974.
- SLY, L.M.; HINGLEY-WILSON, S.M.; REINER, N.E. et al., Survival of *Mycobacterium tuberculosis* in host macrophages involves resistance to apoptosis dependent upon induction of antiapoptotic Bcl-2 family member Mcl-1. **J. Immunol.**, n.170, p.430-437, 2003.
- SMITH, R.D.; RISTIC, M.; HUXOLL, D.L.; BAYLOR, R.A. Platelet kinetics in canine ehrlichiosis: evidence for increased platelet destruction as the cause of thrombocytopenia. **Infect. Immun.**, n.11, p.1216-1221, 1975.
- SMITH, R.D.; SELLS, D.M.; STEPHENSON, E.H. et al. Development of *Ehrlichia canis*, causative agent of canine ehrlichiosis, in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and its differentiation from symbiotic rickettsia. **Am. J. Vet. Res.**, v.37, n.2, p.119-126, 1976.
- STARR, T.K.; JAMESON, S.C.; HOUGQUIST, K.A. Positive and negative T cell selection. **Ann. Rev. Immunol.**, v.21, p.139-176, 2002.
- SZABÓ, M.P.J.; MUKAI, L.S.; ROSA, P.C.S.; BECHARA, G.H. Differences in the acquired resistance of dogs, hamsters and guinea pigs to infestations with adult ticks *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Braz. J. Vet. Res. Anim.**, v.32, p.43-50, 1995.
- SZABÓ, M.P.J.; CUNHA, T.M.; PINTER, A.; VINCENTINI, F. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. **Exp. Appl. Acarol.**, v.25, n.10-11, p.909-916, 2001.
- TAKEUCHI, O.; HOSHINO, K.; KAWAI, T. et al. Different roles of TIR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. **Immunity**, n.11, p.443-451, 1999.
- TAN, J.A.; TOWN, T.; ABDULLAH, L. et al. CD45 isoform alteration in CD4+ T cells as potential diagnostic marker of Alzheimer's disease. **J. Neuroimmunol.**, v.132, n.1-2, p.164-172, 2002.
- TELFORD, S. R.; DAWSON, J.E. Persistent infection of C3H/HeJ mice by *Ehrlichia chaffeensis*. **Vet. Microbiol.**, n. 52, p.103-112, 1996.
- TEZUKA, T.; SUGITA, K.; MIZOBE, N. et al. Transient increase on CD45RO expression on T lymphocytes in infected newborns. **Pediatric Res.**, v.43, n.2, p.283-290, 1998.
- THOMAS, M.L.; LEFRANCOIS, L. Differential expression of the leukocyte common antigen family. **Immunol. Today**, v.9, p.320-326, 1988.
- TIVERON, M.C.; BARBONI, E.; RIVERO, F.B.P. et al. Selective inhibition of neurite outgrowth on mature astrocytes by thy-1 glycoprotein. **Nature**, n.355, p.745-751, 1992.
- TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária: Uma introdução**. 6ª ed. São Paulo: Roca, 2002. 532p.
- TOMAN, M.; FALDYNA, M.; KONOTIGOVA, P. et al. Postnatal development of leucocyte subset composition and activity in dogs. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.87, p.321-326, 2002.
- TOMPKINS, M.B.; GEBHARD, D.H.; BINGHAM, H.R. et al. Characterization of monoclonal antibodies to feline T lymphocytes and their use in the analysis of lymphocyte tissue distribution in the cat. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.26, p.305-317, 1990.
- TOMPKINS, M.B.; NELSON, P.D.; ENGLISH, R.V.; NOVOTNEY, C. Early events in the immunopathogenesis of feline retrovirus infections. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.199, 1311-1315, 1991.



- TROY, G.C.; VULGAMOLTT, J.C.; TURNWALD, G.H. Canine ehrlichiosis: a retrospective study of 30 naturally occurring cases. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.** n.16, p.181-187, 1980.
- TROY, G.C.; FORRESTER, S.D. Canine Ehrlichiosis. In: GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1990, p.48-59.
- UNVER, A.; PEREZ, M.; ORELLANA, N.; HUANG, H.; RIKIHISA, Y. Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and human in Venezuela. **J. Clin. Microbiol.**, n.8, p.2788-93, 2001.
- VACHIERY, N.; TRAP, I.; TOTT, P. et al. Inhibition of MHC class I and II cell surface expression on bovine endothelial cells upon infection with *Cowdria ruminantium*. **Vet. Immunol. Immunopathol.** n.61, p. 37-48, 1998.
- VAN DER FELTZ, M.J.M.; PLOEGH, H.L. Immunochemical analysis of glycosylated and nonglycosylated DLA class I antigens. **Immunogenetics**, n.19, p.95-107, 1984.
- VAN HEERDEN, J.; IMMELMAN, A. The use of doxycycline in the treatment of canine ehrlichiosis. **J. S. Afr. Vet. Assoc.**, n.50, p.241-244, 1979.
- VENDITTI, A.; BUCCISANO, F.; DEL POETA, G. et al. Level of minimal residual disease after consolidation therapy predicts outcome in acute myeloid leukemia. **Blood**, v.96, n.12, p.3948-3952, 2000.
- VIRTS, E.; BARRITT, D.; SIDEN, E. et al. Murine mast cells monocytes express distinctive sets of CD45 isoforms. **Immunology**, v.34, n.16-17, p.1119-1197.
- WADDLE, J.R.; LITTMAN, M.P. A retrospective study of 27 cases of naturally occurring canine ehrlichiosis. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v.24, n.6, p.615-20, 1988.
- WAGNER, J.L.; STORB, R. Preclinical large animal models for hematopoietic stem cell transplantation. **Curr. Opin. Hematol.**, n 3, p.410-415, 1996.
- WALKER, J.S.; RUNDQUIST, J.D.; TAYLOR, R. et al. Clinical and clinicopathologic findings in tropical canine pancytopenia. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, n.157, p.43-55, 1970.
- WANER, T. et al. Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.48, n.1/2, p.177-72, 1995.
- WANER, T.; ROSNER, M.; HARRUS, S. et al., Detection of ehrlichial antigen in plasma of Beagle dogs with experimental acute *Ehrlichia canis* infection. **Vet. Parasitol.**, v.63, n.3-4, p.331-335, 1996.
- WANER, T. et al. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. **Vet. Parasitol.**, v.69, n.3/4, p.307-17, 1997.
- WANER, T.; HARRUS, S.; JONGEJAN, F. et al. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. **Vet. Parasitol.**, v.95, n.1, p.1-15, 2001.
- WEISER, M.; THRALI, M.; FULTON, R.; et al. Granular lymphocytosis and hyperproteinemia in dogs with chronic ehrlichiosis. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.** v.27, p.84-88, 1991.
- WEISS, D.J. Evaluation of proliferative disorders in canine bone marrow by use of flow cytometric scatter plots and monoclonal antibodies. **Vet. Pathol.**, n.38, p.512-518, 2001a.
- WEISS, D.J. Evaluation of monoclonal antibodies for identification of subpopulations of myeloid cells in bone marrow obtained from dogs. **Am. J. Vet. Res.**, n.62, p.1229-1233, 2001b.

WEISS, D.J. Application of flow cytometric techniques to veterinary clinical hematology. **Vet. Clin. Pathol.**, v.31, n.2, p.72-82, 2002a.

WEISS, J.D. Flow cytometric evaluation of hemophagocytic disorders in canine bone marrow. **Vet. Clin. Pathol.**, v.31, p.36-41, 2002b.

WELLS, M.Y.; RIKIHISA, Y. Lack of lysosomal fusion with phagosomes containing *Ehrlichia risticii* in P388D cells: Abrogation of inhibition with tetracyclines. **Infect. Immun.**, v.56, p.3209-15, 1988.

WEN, B., RIKIHISA, Y., MOTT, M.J. et al. Comparison of Nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n.7, p. 1852-1855, 1997.

WILLIAMS, D.L. Studies of canine leucocyte antigens: A significant advance in canine immunology. **Vet. J.**, n. 153, p.31-39, 1997.

WINNICKA, A.; JAGIELSKI, D.; HOFFMANN-JAGIELSKA, M.; LECHOWSKI, R. Cytometric evaluation of peripheral blood lymphocytes in dogs with lymphoma during chemotherapy. **J. Vet. Med.**, n.49, p.303306, 2002.

WINSLOW, G.M.; YAGER, E.; SHILO, K. et al. Antibody-mediated elimination of the obligate intracellular bacterial pathogen *Ehrlichia chaffeensis* during active infection. **Infect. Immun.** n.68, p.2187-2195, 2000.

WOLDEHIWET, Z.; RISTIC, M. **Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals**. Pergamon Press, 1993, 427p.

WOODY, B.J., HOSKINS, J.D. Ehrlichial diseases of dogs. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v.21, n.1, p. 75-98, 1991.

YUHKI, N.; HEIDECKER, G.F.; O'BRIEN, S.J. Characterization of MHC cDNA clones in the domestic cat. Diversity and evolution of class I genes. **J. Immunol.**, n.142, p.3676-3682, 1989.



## ANEXO

### Valores de uréia (em mg/dl) nos cães infectados por *E. canis*

| Cão | Dia Zero | 30 dias PI | Pós Tratamento |
|-----|----------|------------|----------------|
| 1   | 43       | 34         | 41             |
| 2   | 23       | 21         | 26             |
| 3   | 34       | 27         | 35             |
| 4   | 32       | 19         | 31             |
| 5   | 48       | 20         | 26             |
| 6   | 32       | 30         | 28             |
| 7   | 52       | 33         | 38             |
| 8   | 45       | 18         | 30             |
| 9   | 57       | 111        | 374            |

### Valores de creatinina (em mg/dl) nos cães infectados por *E. canis*.

| Cão | Dia Zero | 30 dias PI | Pós Tratamento |
|-----|----------|------------|----------------|
| 1   | 1,1      | 0,7        | 1,1            |
| 2   | 0,7      | 0,6        | 0,7            |
| 3   | 0,7      | 0,7        | 0,6            |
| 4   | 0,8      | 0,6        | 0,8            |
| 5   | 0,9      | 0,5        | 0,7            |
| 6   | 0,7      | 0,6        | 0,6            |
| 7   | 0,9      | 0,8        | 1              |
| 8   | 0,7      | 0,4        | 0,7            |
| 9   | 0,8      | 0,6        | 4,6            |