TAÍS BERELLI SAITO

Estudo da erliquiose em cães expostos a carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* experimentalmente infectados

São Paulo

2009

TAÍS BERELLI SAITO

Estudo da erliquiose em cães expostos a carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* experimentalmente infectados

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:
Clínica Médica

Área de concentração:
Clínica Veterinária

Orientador:
Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson

Co-Orientador:
Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

São Paulo
2009

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2108
FMVZ

Saito, Taís Berelli

Estudo da erliquiose em cães expostos a carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* experimentalmente infectados / Taís Berelli Saito. – São Paulo : T. B. Saito, 2009.
127 p. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, 2009.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.
Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Carlos Eduardo Larsson.
Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna.

1. *Ehrlichia canis*. 2. Carrapato. 3. Citocina. 4. Linfócito T.
5. Reação em cadeia da polimerase. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo da erliquiose em cães expostos a carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* experimentalmente infectados e avaliação da aquisição de *Ehrlichia canis* por carrapatos", protocolado sob o nº1019/2006, utilizando 16 (dezesesseis) cães, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Study of the ehrlichiosis in exposed dogs to experimentally infected ticks *Rhipicephalus sanguineus* and evaluation of the acquisition of *Ehrlichia canis* for ticks", protocol number 1019/2006, utilizing 16 (sixteen) dogs, under the responsibility Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 11 de janeiro de 2007

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SAITO, Taís Berelli

Título: Estudo da erliquiose em cães expostos a carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* experimentalmente infectados

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Às minhas fontes inspiradoras: ...

... Os animais e a minha família ...

... Dedico mais essa importante etapa ...

AGRADECIMENTOS

Este é, com certeza, o momento mais feliz e mais difícil de um trabalho. O momento de agradecer aos que de uma forma ou outra contribuíram para a conclusão desse experimento. Feliz, porque nos lembramos dos contatos, das trocas de experiência e dos fortes laços de amizade que se constroem durante o tempo em que desenvolvemos um trabalho como esse. Mas, muito difícil, porque agradecer em poucas palavras, a tantos amigos tudo o que fizeram para que pudesse chegar até aqui, é quase impossível. (...)

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna pelos ensinamentos, pelo exemplo de competência teórica e prática, aliadas a humildade, mas principalmente pela confiança, pela paciência.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson pelo apoio e compreensão nos momentos de maior dificuldade, mas também pelo exemplo de competência e amor a profissão.

À Profa. Dra. Beatriz R. Ferreira e a Ms. Daniela D. Moré pelos importantes ensinamentos, pela disponibilidade e paciência.

Ao Prof. Dr. João S. da Silva e Profa. Dra. Isabel K. F. de Miranda pelas sugestões e por disponibilizarem as instalações do Laboratório de Imunologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

A Profa. Dra. Rosângela Z. Machado, pelo fornecimento de uma amostra da Cepa Jaboticabal de *Ehrlichia canis*, utilizada na realização do experimento.

A Profa. Dra. Sílvia R. R. Lucas pelo apoio e incentivo no momento mais difícil.

Ao Prof. Dr. Leonardo J. Richtzenhain, Prof. Dr. Rodrigo M. Soares e ao Prof. Dr. Paulo E. Brandão pelos ensinamentos e paciência.

Ao Prof. Dr. Antonio J. P. Ferreira e Profa. Dra. Silvana L. Górnaiak do VPT/FMVZ-USP, por disponibilizarem equipamentos para realização de algumas das técnicas utilizadas no trabalho.

Ao Dr. Enio Mori, Dra. Sandra Nishi, Dr. Daniel M Aguiar, Dr. Márcia Hasegawa e Dra. Hilda F. J. Pena pelos ensinamentos e pela amizade.

Aos profissionais Dr. Ubiraem M. Schalch e Maria C. Guimarães pela realização dos hemogramas, por disponibilizarem estrutura e acolhimento.

A Cláudia, Dayse, Joana e Carlos do Serviço de Pós Graduação, pela ajuda, compreensão e paciência de sempre.

Aos funcionários da Biblioteca, em especial a Elza M. Faquim, pelo auxílio, compreensão e extrema gentileza.

Aos funcionários do setor de transporte e da segurança, pela paciência, amizade e colaboração de sempre.

Aos funcionários e amigos Sr. Antonio, José Roberto (Ni) e João do VPS-Pirassununga pela essencial ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

A todos os funcionários e amigos do VCM e do VPS: Adelaide, Claudia, Clara, Dinha, Cida, Janilda, Pedrinho, Renato, Danival, Cristina e Virginia, pelo auxílio em todos os momentos.

Aos colegas: Thiago, Freddy, Paulo, Diego, Djalma e Alessandra, do Laboratório de Imunologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

Aos amigos do VPS: Iara, Jonas, Richard, Guilherme, Thiago, Maria, Fernanda, Maurício, Adriano, Patrícia e Luciana, pelo auxílio, apoio, paciência e amizade.

Aos amigos de Pirassununga: Nicinha, Jô, Dr. Bira, Pacheco, Maria, Rosilene, Wanderley, Gerson, Paulão, Hilda, Valdir e Maico, pelo apoio, auxílio, amizade e alegria.

Aos amigos de todas as horas: Rose, Carol, Ceci, Angela, Magda, Andrea, Helena, Leila, Lucas, Edson, Cinthia, Teca e Laura.

A todos os amigos e familiares que mesmo não citados aqui, sabem o quanto foram importantes nesta etapa.....

E, especialmente àqueles que foram essenciais a realização do trabalho e que, infelizmente, mais sofreram:

Minha melhor amiga e mãe Ilza Berelli, pelo amor incondicional

E os cães: Chico, Cicatriz, Tricolor, Biguinha I, Biguinha II, Araçá, Pintinha (óbito), Pretinha, Sorridente, Mansinha, Xuxa, Zezão, Medroso, Bravinho, Creuza, Tadeu, Peludo e Maria...

... a todos... meus sinceros agradecimentos por tudo...

Taís Berelli Saito

AGRADECIMENTOS ADICIONAIS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES),
pela concessão de uma bolsa do Programa de Apoio a Pós Graduação

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo
auxílio financeiro.

A Prefeitura do Campus de USP de Pirassununga.

RESUMO

SAITO, T. B. **Estudo da erliquiose em cães expostos a carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* experimentalmente infectados.** [Study of the ehrlichiosis in dogs exposed to experimentally infected *Rhipicephalus sanguineus* ticks]. 2009. 127 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A erliquiose monocitotrófica canina é caracterizada como uma infecção persistente, podendo evoluir para doença fatal. Mecanismos imunopatogênicos estão implicados no desenvolvimento da doença, porém não é completamente compreendido o papel da resposta imune celular nas infecções causadas por *Ehrlichia canis* transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. A infecção do vetor ocorre somente durante o repasto em cães riquetsêmicos, porém não é reconhecido o nível de riquetsemia infectante durante o curso da infecção nos cães. O objetivo desse estudo foi verificar os níveis de riquetsemia relativa capazes de infectar o vetor (*R. sanguineus*) durante o curso da erliquiose canina; e avaliar a resposta imune celular induzida por exposição de cães a carrapatos infectados com *Ehrlichia canis*. Um cão foi utilizado para produção do inoculo e infecção de ninfas de *R. sanguineus*. Subseqüentemente, os carrapatos adultos infectados, oriundos das ninfas que se alimentaram nos cães infectados, foram utilizados para infecção dos cães dos grupos I (n=3) e II (n=3). Cães do grupo III (n=3) foram inoculados com sangue infectado com *E. canis*, por via intravenosa. Os grupos IV (n=3) e V (n=3) foram compostos por cães não infectados. Os grupos II e IV foram reinfestados periodicamente com ninfas não infectadas de *R. sanguineus*. Foram observadas, alterações clínicas como febre, apatia e disorexia nos cães infectados, durante a fase aguda da infecção, porém de forma mais intensa e precoce nos cães infectados por inoculação intravenosa (grupo III). As alterações hematológicas mais evidentes foram redução do número de plaquetas, leve redução na série vermelha e branca. Todos os animais infectados soroconverteram aos 14 dias após inoculação ou infestação com carrapatos infectados (dpi), mantendo títulos entre 10240 e 81920. Os níveis de riquetsemia foram variáveis durante o curso da infecção, persistindo até 364 dpi, porém mais constante na fase aguda da doença. Um pequeno número de carrapatos alimentados nos cães infectados apresentou amplificação de DNA de *E. canis*, porém foram demonstrados até 308 dpi. Foi observada uma redução na

relação CD4:CD8 nos animais infectados, no 28º dpi, mantendo-se de forma mais branda até 252 dpi. Uma maior proporção de linfócitos T CD4+ produtores de IFN- γ e IL-4 foi observada no tempo zero de cães que não adquiriram infecção após infestação com carrapatos infectados. Os níveis séricos de citocinas mostraram de forma mais evidente a elevação de IL-10 e TNF- α em um cão que desenvolveu doença fatal, podendo indicar a participação de mecanismos imunes na apresentação clínica e na persistência do agente no organismo hospedeiro.

Palavras-chave: *Ehrlichia canis*. Carrapato. Citocina. Linfócito T. Reação em cadeia da polimerase.

ABSTRACT

SAITO, T. B. **Study of the ehrlichiosis in dogs exposed to experimentally infected *Rhipicephalus sanguineus* ticks.** [Estudo da erliquiose em cães expostos a carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* experimentalmente infectados]. 2009. 127 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The canine monocytic ehrlichiosis is characterized as a persistent infection, which can develop fatal disease. Immunopathogenic mechanisms are implicated in the development of the disease, however it is not completely understood the role of cellular immune in the infection caused by *Ehrlichia canis* transmitted by the tick *Rhipicephalus sanguineus*. The vector becomes infected only while feeding on rickettsemic dogs, however the level of rickettsemia is not recognized during the course of the infection in the dogs. The objective of this study was to verify the level of relative rickettsemia capable to infect the vector (*R. sanguineus*) during the course of the canine ehrlichiosis; and to evaluate the cellular immune induced in dogs exposed to *Ehrlichia canis*-infected ticks. A dog was used for production of the inoculum and infection of nymphs of *R. sanguineus*. Infected adult ticks that had fed as nymphs on the infected dog were used to feed on and transmit the infection to dogs of groups I (n=3) and II (n=3). Group III dogs (n=3) were intravenously inoculated with *E. canis*-infected dogs. Group IV (n=3) and V (n=3) dogs were the control groups, never exposed to *E. canis*. Dogs of groups II and IV were reinfested periodically with uninfected *R. sanguineus* nymphs. Clinical alterations such as fever, apathy and dysorexia were observed in the infected dogs during the acute phase of the infection, however in a more intense and precocious form in the dogs infected by intravenous inoculation (group III). The more evident hematological alterations were reduction of the number of platelets, mild reduction in the red and white cells series. All infected animals soroconverted by 14 days after inoculation or infestation by infected ticks (dpi), showing titers between 10240 and 81920 during the study. The rickettsemia levels were variable during the course of the infection, persisting up to 364 dpi, however more constant in the acute phase of the disease. A small number of ticks that fed on infected dogs presented amplification of *E. canis* DNA, however they were demonstrated up to 308 dpi. A reduction in the relationship CD4:CD8 in the infected animals was observed in 28th dpi, keeping in a mild form up to 252 dpi. A

larger proportion of lymphocytes T CD4⁺ producing IFN- γ and IL-4 it was observed in the zero time of dogs that did not acquire infection after infestation with infected ticks. The cytokine seric levels showed the elevation in a more evident form of IL-10 and TNF- α in a dog that developed fatal disease, what could indicate the participation of immune mechanisms in the clinical presentation and in the persistence of the agent in the organism host.

Key words: *Ehrlichia canis*. Tick. Cytokine. Lymphocytes T. Polymerase Chain Reaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Temperatura retal média dos grupos experimentais nos primeiros 90 dias de infecção. A faixa cinza delimita a elevação térmica em relação limites de referência.....	66
Figura 2 -	Temperatura retal do cão 4 inoculado com <i>E. canis</i> por via intravenosa (grupo III), durante o curso da infecção, até o óbito. A faixa cinza delimita a elevação térmica em relação aos limites de referência.....	67
Figura 3 -	Valores médios da contagem total de hemácias no sangue periférico dos cães dos grupos experimentais, durante o curso da infecção.....	68
Figura 4 -	Valores médios das concentrações de hemoglobina no sangue periférico dos cães dos grupos experimentais, durante o curso da infecção.....	69
Figura 5 -	Valores médios da porcentagem de hematócrito no sangue periférico dos cães dos grupos experimentais, durante o curso da infecção.....	69
Figura 6 -	Valores médios da contagem de leucócitos no sangue periférico dos cães dos grupos experimentais, durante o curso da infecção....	71
Figura 7 -	Valores médios da contagem absoluta de neutrófilos no sangue periférico dos cães dos grupos experimentais, durante o curso da infecção.....	71
Figura 8 -	Valores médios da contagem absoluta de linfócitos no sangue periférico dos cães dos grupos experimentais, durante o curso da infecção.....	71
Figura 9 -	Valores médios de contagem total de plaquetas no sangue periférico dos cães dos grupos experimentais durante o curso da infecção.....	72
Figura 10 -	Titulação de anticorpos séricos anti- <i>E. canis</i> , dos cães experimentalmente infectados, durante o curso da infecção. Grupo III composto dos cães 4, 5 e 6; grupo II: cães 10 e 15; grupo I: cães 8 e 12.....	73

Figura 11 -	Quantificação relativa de DNA de <i>E. canis</i> no sangue periférico dos cães dos grupos experimentais, durante o curso da infecção. As estrelas identificam momentos em que foram amplificados fragmentos de DNA de <i>E. canis</i> em carrapatos alimentados nos respectivos cães do Grupo II. As legendas referem-se aos cães de cada grupo. Em cada um dos grupos I e II, um cão não se infectou e, portanto, não foi analisado.....	76
Figura 12 -	Ensaio de proliferação com CFSE do 14° dpi, após sete dias de cultura, de um cão controle e um cão infectado. Linha preta: células não marcadas; linha cinza: células recém marcadas ou pré-cultura; linha vermelha: células pós cultura. <i>PHA</i> = phytohemagglutinin <i>Ag</i> = antígenos purificados de <i>E. canis</i> ; <i>Cel</i> = antígenos purificados de células de cultivo de <i>E. canis</i> (DH82), utilizados como controle do antígeno específico.....	79
Figura 13 -	Ensaio de proliferação com CFSE do 112° dpi, após sete dias de cultura, de um cão controle e um cão infectado.....	80
Figura 14 -	Concentrações séricas de IL-10 nos cães dos grupos infectados (I, II e III) e controle (IV e V), durante o período experimental.....	81
Figura 15 -	Concentrações séricas de TNF- α nos cães dos grupos infectados (I, II e III) e controle (IV e V), durante o período experimental.....	83
Figura 16 -	Concentrações séricas de IFN- γ nos cães dos grupos infectados (I, II e III) e controle (IV e V), durante o período experimental.....	85
Figura 17 -	Porcentagem da subpopulação de linfócitos T CD4+ no sangue periférico dos cães dos grupos infectados e controle, durante o período experimental.....	86
Figura 18 -	Porcentagem da subpopulação de linfócitos T CD8+ no sangue periférico dos cães dos grupos infectados e controle, durante o período experimental.....	87
Figura 19 -	Valores médios da relação CD4:CD8 nos cães dos grupos infectados e controle, durante o período experimental (dias 0, 28 e 252)	87
Figura 20 -	Porcentagem de linfócitos T CD4 e CD8 do animal 8 (grupo I), ao longo da infecção.....	88
Figura 21 -	Porcentagem de células T CD4 positivas para IFN- γ nos animais dos grupos experimentais ao longo da infecção. Os símbolos •; ■; ▲ representam o primeiro, segundo e terceiro cão de cada grupo, respectivamente.....	88

Figura 22 - Porcentagem de células T CD8 positivas para IFN- γ nos animais dos grupos experimentais ao longo da infecção. Os símbolos •; ■; ▲ representam o primeiro, segundo e terceiro cão de cada grupo, respectivamente.....	89
Figura 23 - Porcentagem de células T CD4 positivas para IL-4 nos animais dos grupos experimentais ao longo da infecção. Os símbolos •; ■; ▲ representam o primeiro, segundo e terceiro cão de cada grupo, respectivamente.....	89
Figura 24 - Porcentagem de células T CD8 positivas para IL-4 nos animais dos grupos experimentais ao longo da infecção. Os símbolos •; ■; ▲ representam o primeiro, segundo e terceiro cão de cada grupo, respectivamente.....	90
Figura 25 - Porcentagem de linfócitos T CD4+ expressando IFN- γ e IL-4 intracelular, nos cães no dia 0 (zero), previamente a infecção experimental.....	91
Figura 26 - Porcentagem de linfócitos T CD8+ expressando IFN- γ e IL-4 intracelular, nos cães no dia 0 (zero), previamente a infecção experimental.....	91
Figura 27 - Porcentagem de linfócitos T CD4+ e CD8+ nos cães no dia 0 (zero), previamente a infecção experimental	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma(s)
µL	Microlitro(s)
µm	Micrômetro(s)
µM	Micromolar
10X	10 vezes concentrado (a)
Ag	Antígeno
ALT	Alanina aminotransferase
B.O.D	<i>Biological Oxygen Demand</i>
bd	<i>Base par</i> – pares de base
BHQ	<i>Black Hole Quencher</i>
CA	Califórnia
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> - marcadores de membrana, moléculas de superfície
Cel	Célula
CFSE	<i>Carboxyfluorescein succinimidyl Ester</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
Ct	<i>Cycle threshold</i> – ciclo de amplificação inicial
D	Dia do experimento
DH	<i>Dog Histiocytosis</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> – Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	<i>Deoxynucleotides triphosphates</i> – desoxiribonucleotídeos trifosfatados
dpi	Dia(s) após infecção
dsb	<i>Disulfide bond formation</i>
EDTA	Ácido etileno diaminotetracetato sódico
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EMC	Erlíquiose Monocitotrófica Canina
EUA	Estados Unidos da América
FA	Fosfatase alcalina
FAM	<i>6-carboxy-fluorescein</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> - Isotiocianato de fluoresceína

FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
FSC	<i>Forward Scatter</i>
g	Grama(s)
H	Altura
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
LDP	Laboratório de Doenças Parasitárias
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> – Complexo de histocompatibilidade principal
mL	Mililitro(s)
mM	Milimolar
mm ³	Milímetro(s) cúbico(s)
MN	Minneapolis
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i> – ácido ribonucléico mensageiro
n	Número
ng	Nanograma(s)
NY	<i>New York</i>
NK	<i>Natural killer</i> – Células matadoras naturais
nm	Nanômetro(s)
PA	Padrão analítico
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i> – Célula mononuclear do sangue periférico
PBS	<i>Phosphate buffered saline solution</i> - Solução salina tamponada com fosfatos
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em cadeia da polimerase
PE	<i>Phycoeritrina</i> – Ficoeritrina
PhA	<i>Phytohemagglutinin</i> – fito-hemaglutinina
Phito	“fito-hemaglutinina”
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PMIF	<i>Platelet migration-inhibition factor</i> – Fator inibidor da migração plaquetária

R	Coeficiente de correlação múltipla
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
SSC	<i>Side Scatter</i>
T	Linfócitos T
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TGF	Fator transformador de crescimento
Th	<i>T helper</i> – linfócito T auxiliar
TNF	Fator de necrose tumoral
TR	Temperatura retal
U	Unidade(s)
UNESP	Universidade do Estado de São Paulo
UR	Umidade relativa
USP	Universidade de São Paulo
v:v	Volume:volume
VPS	Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

OBS: Devido ao uso consagrado na literatura técnica, algumas abreviaturas seguem as iniciais de sua grafia em inglês.

LISTAS DE SÍMBOLOS

-	Negativo(s)
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
γ	Gama
α	Alfa
β	Beta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	31
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	39
2.1	ETIOLOGIA.....	39
2.2	PATOGENIA.....	40
2.3	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	45
2.4	DIAGNÓSTICO.....	47
2.5	TRATAMENTO / PROGNÓSTICO.....	50
2.6	PREVENÇÃO.....	52
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
3.1	INÓCULO.....	55
3.2	CÃES.....	55
3.3	AMOSTRAS.....	57
3.4	METODOLOGIAS.....	57
3.4.1	Acompanhamento Clínico.....	57
3.4.2	Hemograma.....	58
3.4.3	Separação de Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC)	58
3.4.4	Purificação de Antígeno Específico (<i>Ehrlichia canis</i>)	58
3.4.5	Marcação de Subpopulações de Linfócitos T e Citocinas Intracelulares.	59
3.4.6	Ensaio de Proliferação.....	60
3.4.7	ELISA para citocinas Séricas.....	60
3.4.8	Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	61
3.4.9	Real-Time PCR.....	61
3.5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	62
4	RESULTADOS.....	65
4.1	ANIMAIS.....	65
4.2	ACOMPANHAMENTO CLÍNICO.....	65
4.3	ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS.....	67
4.4	REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI).....	72
4.5	REINFESTAÇÕES COM CARRAPATOS.....	73
4.6	REAL-TIME PCR.....	74
4.7	ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO.....	77

4.8	DOSAGEM DE CITOCINAS SÉRICAS.....	80
4.9	AVALIAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T E CITOCINAS INTRACELULARES.....	86
5	DISCUSSÃO	93
6	CONCLUSÕES	99
	REFERÊNCIAS	101
	APÊNDICES	111

1 INTRODUÇÃO

Incluem-se atualmente, como doenças emergentes, algumas zoonoses transmitidas por carrapatos causadas por espécies do gênero *Ehrlichia*. Na erliquiose canina, assim como na erliquiose humana, as alterações clínicas e hematológicas, induzidas pelas espécies de *Ehrlichia*, podem tornar-se graves e, até mesmo, fatais. No Brasil, a infecção por *Ehrlichia canis* é considerada endêmica principalmente nas áreas urbanas (LABRUNA; PEREIRA, 2001), sendo relatada pela primeira vez, em Belo Horizonte, por Costa et al. (1973), e posteriormente em aproximadamente 20% da população de cães atendidos em hospitais e clínicas veterinárias dos estados das regiões nordeste, sudeste, sul e centro-oeste (DAGNONE et al., 2003; LABARTHE et al., 2003; MOREIRA; AL., 2003; BULLA et al., 2004; MACHADO, 2004; TRAPP et al., 2006; LABRUNA et al., 2007). Em 1996, na Venezuela, foi identificada uma nova amostra ou subespécie de *E. canis* em humanos com infecção persistente, porém assintomática (PEREZ; RIKIHISA; WEN, 1996); entretanto, neste mesmo país, recentemente foram descritos três casos humanos sintomáticos causados por *E. canis*, determinando um importante papel zoonótico da erliquiose canina (PEREZ et al., 2005).

As alterações clínicas e patológicas observadas nas infecções por esses microrganismos estão sendo bem caracterizadas por estudos de inoculação experimental, porém, ainda não se compreende completamente o mecanismo patogênico induzido pelas erliquias. Estudos utilizando modelos experimentais para erliquiose humana demonstram o envolvimento de mecanismos imunológicos no desenvolvimento da doença clínica. Há evidências de que uma resposta desequilibrada do sistema imune do hospedeiro, aliada aos mecanismos de escape criados pelo microrganismo, permite um longo período de infecção que pode culminar com o desenvolvimento de alterações clínicas fatais para o hospedeiro. Atualmente tem-se buscado esclarecer os mecanismos pelos quais estes microrganismos subvertem as respostas inata e adaptativa do hospedeiro (ZHANG et al., 2004; RIKIHISA, 2006).

As espécies classificadas recentemente como pertencentes à família *Anaplasmataceae*, gênero *Ehrlichia* são: *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* e *E. (Cowdria) ruminantium* (DUMLER et al., 2001).

As espécies de *Ehrlichia* que infectam cães são *E. canis*, *E. chaffeensis* e *E. ewingii*, porém a *E. canis* é a causa mais comum de infecção natural e é considerada a mais severa (ALMOSNY, 2002). A *E. canis* é transmitida pelo carrapato marrom do cão, *Rhipicephalus sanguineus*. A transmissão no carrapato é transestadial, mas não transovariana (GROVES et al., 1975; DUMLER et al., 2001). As larvas e ninfas se infectam ao alimentarem-se em cães infectados na fase aguda da doença. A infecção de animais susceptíveis através de carrapatos alimentados em cães apresentando a fase crônica da erliquiose, não foi efetiva, sugerindo uma incapacidade de transmissão a partir de cães cronicamente infectados (LEWIS et al., 1977). Entretanto, não tem sido determinada a dose infectante de *Ehrlichia* para infectar o carrapato, ou para infectar o hospedeiro (MATHEW et al., 1996). No carrapato o microrganismo se dissemina em hemócitos, para a glândula salivar, e a infecção do hospedeiro ocorre através das secreções salivares no sítio de alimentação do vetor (HARRUS; BARK; WANER, 1997).

A *E. canis* é classificada como monocitotrófica, assim como outras espécies de erliquia, incluindo a *E. chaffeensis*, agente da Erliquiose Monocítica de Humanos, e *E. ruminantium* (DUMLER et al., 2001). São bactérias intracelulares obrigatórias, pleomórficas, Gram negativas, com parede celular de estrutura não protéica, com perda de lipopolissacarídeo e peptidoglicano, e incorporação de colesterol de membrana, o que pode facilitar sua adaptação às células, tanto do hospedeiro que infectam, como do carrapato vetor (RIKIHISA, 2006). Esses microrganismos se multiplicam no hospedeiro, por fissão binária em vacúolos intracelulares (LI; WINSLOW, 2003) e têm a habilidade de inibir a fusão fagolisossoma nas células infectadas, permitindo a sobrevivência intracelular dentro dos fagossomas (ZHANG et al., 2004; RIKIHISA, 2006). Essa inibição ocorre devido: (i) a supressão de proteínas que formam um complexo que justapõe as membranas vesiculares, dificultando a fusão (ZHANG et al., 2004); (ii) redução dos níveis de interferon-gama (IFN- γ), que é importante na ativação de macrófagos para eliminação de microrganismos intracelulares, através da indução dessa fusão fagolisossoma (ISMAIL et al., 2004). Também, durante essa fase da infecção, a imunossupressão induzida pela saliva do carrapato (WIKEL, 1999), pode facilitar a instalação do agente infeccioso, visto que a saliva de *R. sanguineus* inibe a proliferação de células T, interfere na função de macrófagos e promove um desequilíbrio na produção de

citocinas, aumentando IL-4, IL-10 e TGF- α , e reduzindo IL-2, IL-12 e IFN- γ (FERREIRA; SILVA, 1999).

Em três a cinco dias após a infecção pela *E. canis*, se formam os corpúsculos iniciais, que correspondem a um pequeno número de estruturas compactas com 1-2,5 μ m de diâmetro, compostas por corpúsculos elementares. Nos próximos sete a 12 dias da infecção ocorre um crescimento adicional dos corpúsculos iniciais e replicação do microrganismo, formando as mórulas, que podem ser observadas na fase aguda da infecção, em células mononucleares do sangue periférico (ALMOSNY, 2002).

As células mononucleares infectadas, predominantemente em órgãos linfóides, liberam os corpúsculos elementares por exocitose ou lise, que irão infectar outras células, disseminando-se pelo organismo do hospedeiro (ALMOSNY, 2002). A multiplicação ocorre primariamente em macrófagos e linfócitos, resultando em hiperplasia linforreticular, podendo causar aumento de órgãos como baço, fígado e linfonodos. As células infectadas interagem com as células endoteliais dos vasos de menor calibre, induzindo vasculite, ou resposta celular inflamatória perivascular, após a migração para o tecido subendotelial (ALMOSNY, 2002). Nessa fase inicial da infecção os sinais clínicos são inespecíficos e incluem: febre, anorexia, perda de peso, letargia, esplenomegalia e linfadenomegalia (HARRUS et al., 1997). As alterações laboratoriais encontradas nos animais na fase aguda da infecção são: anemia e trombocitopenia, leucopenia variável, hipergamaglobulinemia (HARRUS et al., 1997) e elevação de enzimas citosólicas hepáticas (KUEHN; GAUNT, 1985; ALMOSNY, 1998). A liberação de TNF- α pelas células infectadas pode ser um dos mecanismos implicados na aparente supressão da medula óssea (HARA, T et al., 2004), o que justificaria as alterações hematológicas. A elevação dessa citocina também poderia justificar a alteração das enzimas hepáticas devido à hepatotoxicidade (BRADHAM et al., 1998).

A resposta de anticorpos é observada a partir do 13º dpi (GAUNT et al., 1996; KEYSARY et al., 1996; WANER et al., 1996; HASEGAWA, 2005), apresentando títulos crescentes, com pico ao redor de 56-70 dias (HARRUS et al., 1997; HASEGAWA, 2005). Porém, a imunidade humoral, por si só, é insuficiente para extinguir a infecção por *E. canis* (NYINDO et al., 1980; WANER et al., 2001). Nessa fase a utilização de métodos moleculares para o diagnóstico permite a detecção do

microrganismo mesmo na presença de altos títulos de anticorpos (HARRUS et al., 1998b; HASEGAWA, 2005).

Os animais que mantêm a infecção após a resolução das manifestações clínicas iniciais, desenvolvem a fase subclínica ou assintomática da doença. A maioria dos pacientes infectados sobrevive à fase aguda. Animais tratados ou não podem evoluir para a fase assintomática e manter uma infecção persistente (PERILLE; MATUS, 1991; BARTSCH; GREENE, 1996). Nesses pacientes a contagem global de células sanguíneas pode estar moderadamente reduzida, especialmente as plaquetas (HARRUS et al., 1998b; ALMOSNY, 2002). Durante essa fase os títulos de anticorpos anti-*E. canis* permanecem elevados por longo período (meses a anos), porém a pesquisa do agente pode ou não ser demonstrada no sangue e/ou no baço dos animais infectados, mesmo utilizando técnicas moleculares de alta sensibilidade (PERILLE; MATUS, 1991; HARRUS et al., 1998b; HARRUS et al., 2004).

Os cães imunocompetentes podem eliminar a infecção, apresentando redução nos títulos de anticorpos (HARRUS et al., 1998b), porém muitos desenvolvem a fase crônica da doença. Nessa fase, as manifestações clínicas são indistinguíveis daquelas observadas na fase aguda (HUXSOLL et al., 1970a; ALMOSNY, 2002). A principal característica dessa fase é a hipoplasia da medula óssea (BUHLES; HUXSOLL; HILDEBRANDT, 1975; HARRUS et al., 1999), resultando na diminuição da eritropoese, mielopoese e trombopoese, que pode ser evidenciada no hemograma por anemia não regenerativa, leucopenia e trombocitopenia (HUXSOLL et al., 1970a; MYLONAKIS et al., 2004). Essa pancitopenia tem sido implicada como um dos indicadores de mau prognóstico (HARRUS et al., 1997), e os cães cronicamente infectados, nos quais esta alteração hematológica é a mais freqüente, geralmente não respondem bem a terapia específica para o microrganismo, resultando em óbito (MYLONAKIS et al., 2004). Clinicamente é difícil, se não impossível, determinar a fase da infecção em que o animal se encontra (WANER et al., 1998). Além disso, a despeito do tratamento e aparente recuperação clínica, o microrganismo pode permanecer no hospedeiro (BARTSCH; GREENE, 1996; HARRUS et al., 1998b), que se torna portador crônico. Estudos experimentais demonstram a influência da dose infectante de *Ehrlichia*, a via de inoculação e a cepa envolvida, como fatores importantes na determinação de portadores crônicos, assim como pode interferir na instalação da infecção e na

gravidade da doença clínica (GAUNT et al., 1996; ISMAIL et al., 2004; ISMAIL; WALKER, 2005; TAJIMA; RIKIHISA, 2005).

O envolvimento de mecanismos imunes na patogênese das diferentes fases da erliquiose tem sido evidenciado em estudos experimentais com cepas de diferentes patogenicidades para camundongos, buscando associar as alterações observadas na erliquiose humana, demonstrando que o prognóstico da doença pode ser dependente da capacidade do sistema imune em controlar a infecção (ISMAIL et al., 2004; ISMAIL; WALKER, 2005).

A semelhança de outras infecções causadas por microrganismos intracelulares, na erliquiose a extinção da infecção está mais relacionada à resposta imune celular, embora a participação da imunidade humoral também tenha alguma importância (WINSLOW et al., 2000; GANTA et al., 2004). Na erliquiose canina, a persistência do agente concomitante aos altos títulos de anticorpos (HARRUS et al., 1998b) evidenciam que, para a adequada eliminação intracelular do microrganismo, há necessidade da interação entre a resposta humoral e a resposta celular do hospedeiro (KAKOMA et al., 1977; WEISER et al., 1991).

A manutenção de altos títulos de anticorpos circulantes, na infecção por *E. canis*, pode indicar um estímulo antigênico persistente e/ou periódico (PERILLE; MATUS, 1991; HARRUS et al., 1998b). Outra característica da resposta humoral nas infecções erliquiais é a plasmocitose evidente, na maioria dos órgãos afetados, inclusive na medula óssea (GREENE; HARVEY, 1984; CASTRO, 2004; MYLONAKIS et al., 2004). Além dos mecanismos humorais, o desajuste na resposta imune mediada por células, descrito nas infecções por espécies de erliquia, tem sido amplamente estudado recentemente. Patógenos, como as erliquias, que têm como alvo o sistema imune inato, ativam a produção de IL-12 por células apresentadoras de antígenos, induzindo o desenvolvimento de resposta Th1 e secreção de IFN- γ , pelas células T CD4, o que determinaria a resistência do hospedeiro à infecção. Porém, a avaliação imunohistoquímica de órgãos linfóides (baço e linfonodos) de cães experimentalmente infectados com *E. canis* revelou uma redução significativa na expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal de classe II (MHC II) (CASTRO, 2004). A expressão dessas moléculas de MHC II é necessária à maturação de células T em linfócitos T CD4⁺ (GRUSBY et al., 1991), que possuem um importante papel na elaboração e potencialização da resposta imune humoral e celular. Nas infecções causadas por erliquia, ocorre uma inversão da relação de

linfócitos T CD4:CD8 no sangue periférico (FRANK; BREITSCHWERDT, 1999; HEEB et al., 2003; HASEGAWA, 2005), algumas vezes demonstrada, mais especificamente, como uma redução dos níveis de células CD4+ (HASEGAWA, 2005), em experimentos de inoculação parenteral com *E. canis*. Os linfócitos T CD4+ são responsáveis pela produção de IFN- γ , que atuam na estimulação da atividade microbicida de macrófagos (BITSAKTSIS; HUNTINGTON; WINSLOW, 2004); portanto, são essenciais no mecanismo de proteção e eliminação da infecção causada pelas erliquias (BITSAKTSIS; HUNTINGTON; WINSLOW, 2004). Na infecção de camundongos por *E. chaffeensis*, demonstrou-se que a presença de células T CD4+ funcionalmente aptas é essencial para a secreção de IFN- γ e uma resposta celular do tipo Th1 (GANTA et al., 2002). A infecção por erliquias monocitotrópicas restringe o estímulo a produção de IL-12 e reprime a produção de IL-15 e IL-18 em células mononucleares, que têm um papel fundamental no estímulo de células NK ("natural killer") e Th1 para produção de IFN- γ , também interferindo na eliminação do agente em células infectadas (BITSAKTSIS; HUNTINGTON; WINSLOW, 2004; ZHANG et al., 2004). Essas alterações nos mecanismos imunes podem representar uma forma de evasão do parasita.

Outros estudos da patogênese da infecção, utilizando cepas pouco virulentas comparativamente a uma amostra altamente virulenta para modelos experimentais de erliquiose monocitotrópica, demonstram um desequilíbrio de citocinas, com evidente redução de IFN- γ , além de uma elevação significativa de TNF- α (ISMAIL et al., 2004), evidenciando-se assim a importância de mecanismos imunopatogênicos no desenvolvimento da doença. A expressão de mRNA de TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IFN- γ e IL-6 foram examinados por métodos moleculares, em cães experimentalmente infectados pela via parenteral, com *E. canis*, demonstrando expressão persistente de mRNA de TNF- α e IFN- γ e baixos níveis de IL-1 β , IL-2, IL-4 e IL-6 até 56 dpi (TAJIMA; RIKIHISA, 2005). Porém esses resultados foram observados na erliquiose moderada, contrastando com a persistente elevação de IL-1 β e IL-8 e reduzidos níveis de IFN- γ e TNF- α , em cães com erliquiose aguda severa, causada pela amostra New Mexico (UNVER; HUANG; RIKIHISA, 2006). Esses resultados podem indicar que uma resposta Th1, representada por IFN- γ , está associada à doença moderada e não severa, como evidenciado pela infecção de camundongos com uma amostra altamente patogênica de erliquia monocitotrópica

identificada em *Ixodes ovatus* (ISMAIL et al., 2004). Portanto, os fatores considerados mais críticos na determinação de uma erliquiose severa e até fatal, por esses estudos, são: (i) a marcada redução da resposta de células T CD4⁺ e diminuição do número de células Th1 produtoras de IFN- γ , com deficiente produção de IL-12; e (ii) a superprodução de TNF- α com conseqüente elevação dos seus níveis séricos (ISMAIL et al., 2004).

Os efeitos do desequilíbrio de citocinas podem ser evidenciados por diversos estudos. A produção aumentada de TNF- α pode resultar em hepatotoxicidade (BRADHAM et al., 1998), que pode estar correlacionada à elevação das enzimas hepáticas observada em cães infectados por *E. canis*, durante a fase aguda da doença. A elevação dessa citocina pode estar relacionada também a supressão da atividade medular, levando à redução do número de células sanguíneas (HARA, T et al., 2004), podendo estar relacionada à pancitopenia observada em cães com erliquiose.

Os efeitos sistêmicos de elevados níveis de TNF- α ou IL-1 estão associados à febre, perda de peso, redução do apetite e prostração (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000), sinais estes observados tanto na fase aguda como crônica da erliquiose canina, e que poderia ser um indício do desequilíbrio de interleucinas nos animais infectados. A formação de complexos antígeno-anticorpo nas infecções causadas pela erliquia monocitotrófica humana, induziu uma potente expressão de mRNA de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, indicando que na presença desses anticorpos o efeito do agente no hospedeiro pode ser tão prejudicial quanto o choque endotóxico (LEE; RIKIHISA, 1997). Visto que as espécies de erliquia monocitotrófica induzem uma forte resposta humoral, a produção de elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias por período prolongado poderia justificar as alterações clínicas e laboratoriais observadas na erliquiose monocitotrófica canina. Portanto podemos sugerir que um desequilíbrio de citocinas, com elevação de IL-4 e IL-10 e redução de IL-2, IL-12 e IFN- γ (predominantemente do tipo Th2), inicialmente induzido pela picada do carrapato vetor, pode favorecer a instalação da infecção pela erliquia. Posteriormente, durante a infecção esses microrganismos podem manter reduzidos os níveis de algumas citocinas importantes na coordenação de uma resposta efetiva contra as erliquias (IFN- γ , IL-12, IL-2, IL-15 e IL-18), e a elevação de outras citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-6) que podem

determinar alterações clínicas fatais. Importante também é avaliar a influência das reinfestações com *R. sanguineus* no nível de citocinas durante o curso da erliquiose canina e a determinação da riquetsemia relativa necessária para a infecção do vetor, o que interferiria diretamente na dose infectante e conseqüentemente na intensidade da doença.

O principal objetivo desse trabalho foi estudar a erliquiose em cães infectados via infestação com carrapatos carreando *Ehrlichia canis* de forma comparativa com cães inoculados pela via intravenosa, através da:

- Determinação do nível de infecção (riquetsemia relativa) capaz de infectar carrapatos vetores (*R. sanguineus*) durante o curso da erliquiose canina.

- Avaliação do intervalo de tempo que cães permanecem como reservatório de erliquiose após infestação com carrapatos *R. sanguineus* experimentalmente infectados com *Ehrlichia canis*.

- Avaliação comparativa das manifestações clínicas e alterações hematológicas em cães infectados com *E. canis* através de infestação com carrapatos (via vetor) e por via intravenosa.

- Determinação da porcentagem de linfócitos T CD4+, T CD8+ e a relação entre essas subpopulações de linfócitos no sangue periférico de cães infectados com *E. canis* através de infestação com carrapatos (via vetor) e por via intravenosa.

- Determinação dos níveis de citocinas intracelulares (IL-4 e IFN- γ) nas subpopulações de linfócitos T do sangue periférico de cães infectados com *E. canis* através de infestação com carrapatos (via vetor) e por via intravenosa.

- Determinação das concentrações séricas de IL-10, TNF- α e IFN- γ em cães infectados com *E. canis* através de infestação com carrapatos (via vetor) e por via intravenosa.

- Avaliação da resposta proliferativa em cultivo, de linfócitos obtidos do sangue periférico de cães infectados com *E. canis* através de infestação com carrapatos (via vetor) e por via intravenosa.

- Avaliação dos títulos de anticorpos séricos durante o curso da infecção em cães infectados com *E. canis* através de infestação com carrapatos (via vetor) e por via intravenosa.

- Investigação do efeito de infestações contínuas (repetidas) por carrapatos nas manifestações clínicas, alterações hematológicas, resposta imune celular e humoral de cães infectados ou não por *E. canis*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A erliquiose canina é uma doença transmitida por carrapato com ampla distribuição mundial, primeiramente reconhecida em 1935 (Donatien e Lestoquard, 1935) (HARRUS et al., 1996; KEYSARY et al., 1996).

Também conhecida como pancitopenia tropical canina, a erliquiose teve importância durante a guerra do Vietnam, devido à morte de centenas de cães de atividade militar dos Estados Unidos (RISTIC; HOLLAND, 1993; KEYSARY et al., 1996).

2.1 ETIOLOGIA

O agente *Ehrlichia spp* é um parasita intracelular obrigatório, do gênero *Ehrlichia*, família *Anaplasmataceae*. São erliquias: *E. canis*, *E. chaffeenses*, *E. ewingii*, *E. muris* e *E. ruminantium* (DUMLER et al., 2001). Uma espécie isolada de carrapatos *Ixodes ovatus*, no Japão, foi designada como sendo *Ehrlichia IOE* (SHIBATA et al., 2000). As espécies são divididas em classes de acordo com as células que infectam. As erliquias monocitotrópicas, como a *E. canis*, *E. chaffeensis* alojam-se em células do sistema reticuloendotelial do fígado, baço e linfonodos, onde se replicam, por fissão binária, inicialmente em macrófagos e linfócitos (IMMELMAN; BUTTON, 1973; HOSKINS, 1991; KEYSARY et al., 1996; NEER; HARRUS, 2006).

A observação ultra estrutural das inclusões de erliquia em monócitos sanguíneos demonstra que as mórulas são inclusões intracitoplasmáticas formadas de numerosos organismos redondos, ovóides ou alongados, circundados por dupla membrana (IMMELMAN; BUTTON, 1973; SMITH et al., 1976; NEER; HARRUS, 2006). São descritas outras duas formas de apresentação do parasita: i) a forma amorfa, arredondada e que varia muito em tamanho e pode ocorrer em vacúolos no citoplasma da célula hospedeira; e ii) a forma granular, que aparece como múltiplos grânulos no citoplasma, isolados ou em associação a uma das outras duas formas (IMMELMAN; BUTTON, 1973).

As amostras de *Ehrlichia canis* descritas são: Cepa Flórida; Oklahoma; Israel; PDE; VDE; VTE; VHE; 611; Gzh982; Germishuys; Gxht67; Gdt3; 95E10; Ovina; Kagoshima; Madrid; Greece1; Greece0; Thai; Okinawa (KEYSARY et al., 1996; VINASCO et al., 2007). Estudo utilizando desafio heterólogo resultou em aumentada severidade da doença (BREITSCHWERDT; HEGARTY; HANCOCK, 1998).

Os hospedeiros vertebrados da *E. canis* estão limitados a família *Canidae*. E o vetor artrópode é o carrapato marrom do cão, *Rhipicephalus sanguineus*, que apresenta transmissão transtadiária estrita. O carrapato adquire a erliquia nas suas fases de larva ou ninfa ao fazer o repasto sanguíneo em hospedeiros riquetsêmicos, transmitindo a doença nas fases de ninfa ou adultos (IMMELMAN; BUTTON, 1973; NEER; HARRUS, 2006). Um estudo verificou que para ninfas de *R. sanguineus* infectadas como larvas, transmitirem a infecção para os cães, foi desejável, se não necessária, que elas se alimentassem ao menos parcialmente, embora não tenha sido esclarecido se a alimentação aumenta o número ou altera a virulência da erliquia no interior do carrapato (SMITH et al., 1976). Em carrapatos adultos ingurgitados parcialmente que foram infectados como larvas ou ninfas, o agente é detectado no intestino, glândula salivar e em hemócitos, porém não foram observados no ovário (SMITH et al., 1976). A infecção do hospedeiro vertebrado ocorre quando um carrapato infectado ingere sangue e as secreções salivares contaminam o sítio de ingestão (NEER; HARRUS, 2006). A transmissão pode ocorrer também por transfusão sanguínea (NEER; HARRUS, 2006).

Carrapatos adultos podem sobreviver por mais de 568 dias e transmitir a infecção para cães susceptíveis por pelo menos 155 dias após a infecção (NEER; HARRUS, 2006). A doença é mais séria onde há grande número de cães em contato estrito, e onde o controle de carrapatos é ruim (IMMELMAN; BUTTON, 1973).

2.2 PATOGENIA

Na erliquiose, diferenças na susceptibilidade racial e na forma de transmissão podem afetar a duração da infecção. Em cães com erliquiose ocorrendo de forma natural, infecções assintomáticas têm persistido por cinco anos, enquanto cães

experimentalmente infectados, em alguns relatos, apresentam uma fase assintomática de um a quatro meses (CODNER; FARRIS-SMITH, 1986).

Alguns estudos têm sugerido que a patogenia da doença seja atribuída à resposta imune do organismo mais que ao efeito direto da riquetsia (CODNER; ROBERTS; AINSWORTH, 1985; MATUS; LEIFER; HURVITZ, 1987; HARRUS et al., 1996). Vários aspectos da doença corroboram com essa suposta patogenia.

As concentrações de proteínas totais, globulina total, α -2 globulina, β -2 globulina e γ globulina apresentam-se significativamente elevadas em cães infectados quando comparados aos controles, enquanto albumina, α -1 globulina e a taxa albumina/globulina foram menores nos infectados (MATUS; LEIFER; HURVITZ, 1987; HARRUS et al., 1996; WANER et al., 1997). Em um estudo, todos os cães com hipergamaglobulinemia mostraram gamopatia policlonal, exceto um (MATUS; LEIFER; HURVITZ, 1987; HARRUS et al., 1996). Os autores sugerem que as menores concentrações de gamaglobulinas encontradas nos cães pancitopênicos podem ser consequência da pronunciada leucopenia destes animais. Dessa forma, espera-se que as concentrações dessas globulinas estejam diminuídas em casos crônicos de erliquiose canina. Uma combinação de neutropenia e baixas concentrações de gamaglobulinas em cães infectados pancitopênicos sugerem que estes animais são mais imunocomprometidos que os não pancitopênicos e, portanto, mais susceptíveis a infecções secundárias que podem resultar em complicações e em um prognóstico desfavorável (HARRUS et al., 1996). A correlação entre anticorpos anti-*E. canis* e a concentração de γ globulinas não foi significativa e, essa observação associada à presença de gamopatia policlonal, sugere que *E. canis* induz a produção de anticorpos não específicos e que os anticorpos anti-*E. canis* não contribuem para a hipergamaglobulinemia. Este fenômeno ocorre em outras doenças com prolongada estimulação antigênica e sugere exagerada resposta imune com efetividade inadequada (REARDON; PIERCE, 1981; HARRUS et al., 1996). Os elevados títulos de anticorpos anti-*E. canis* detectados em cães assintomáticos por meses após a fase aguda da infecção, assim como uma linfocitose absoluta também indicam uma prolongada duração da infecção e estimulação antigênica crônica, sugerindo inabilidade de alguns animais em eliminar naturalmente a infecção após a fase aguda da doença (CODNER; FARRIS-SMITH, 1986; WANER et al., 1997; HARRUS et al., 1998b). Esses anticorpos séricos anti-*E.*

canis não são protetores, já que cães tratados e curados são susceptíveis a reinfeção em meio a altos níveis de anticorpos (DAVIDSON et al., 1978). Em um estudo de animais assintomáticos infectados por 34 meses, que foram tratados de forma eficaz por seis semanas, mantiveram altos títulos de anticorpos anti-*E. canis* sem modificação significativa durante e após o tratamento, sugerindo uma resposta humoral contínua aberrante causada pela infecção inicial (HARRUS et al., 1998a).

Em animais inoculados experimentalmente foi observada plasmocitose e modificação na produção das subclasses de imunoglobulinas G e E, ocorrendo um aumento na produção de IgG2 nos órgãos linfóides e tecidos acometidos, sugerindo um padrão Th-1 de resposta imune. Foi observada também uma diminuição significativa na expressão de moléculas de MHC-II em células dos linfonodos e baço de cães infectados (CASTRO, 2004).

Algumas anormalidades clínicas como a trombocitopenia e trombocitopenia observadas na erliquiose envolvem mecanismos imunológicos e inflamatórios relacionados ao aumento no consumo de plaquetas e diminuição na meia vida, provavelmente por seqüestro esplênico. Uma gamopatia pode resultar em trombocitopenia em alguns cães infectados. Plaquetas associadas à IgG ou anticorpos contra proteínas plaquetárias podem levar a redução do número de plaquetas. Também uma citocina sérica PMIF (fator de inibição da migração plaquetária) foi encontrada em cães com erliquiose e seu nível foi inversamente proporcional a contagem de plaquetas. O PMIF tem sido associado a cepas mais virulentas. É produzido por linfócitos quando expostos a monócitos infectados. (NEER; HARRUS, 2006).

Cães esplenectomizados apresentam alterações clínicas e hematológicas mais brandas, sugerindo que o processo de doença nesses animais é mais leve. Diferenças significativas observadas entre cães esplenectomizados e intactos podem ser explicadas pelo envolvimento de mecanismos imunológicos na patogênese da erliquiose canina (HARRUS et al., 1998c). Estudos avaliando as amostras de baço, medula óssea e sangue, sugerem que o baço é provavelmente o último órgão a albergar a *E. canis*, durante a recuperação. Entretanto, a possibilidade que o parasita esteja escondido em macrófagos esplênicos, evitando reação imune, não pode ser descartada (HARRUS et al., 1998b).

A participação do vetor na infecção por bactérias riquetsiais ainda é pouco compreendida. Um estudo demonstrou que camundongos susceptíveis infestados

por carrapatos desenvolvem uma resposta de citocinas caracterizada por um perfil do tipo Th-2. Este tipo de resposta imune do hospedeiro está associado à susceptibilidade a patógenos intracelulares transmitidos por carrapatos. Em infestações por *Amblyomma cajennense* foi observada uma resposta de hipersensibilidade imediata (tipo1), que pode ser também um padrão de resposta imune que favorece a transmissão de doenças carregadas por carrapatos (SZABO et al., 2004).

Os mecanismos imunes envolvidos nas infecções por erliquias têm sido melhor e mais amplamente estudados em camundongos, por inoculações experimentais de espécies com variados graus de virulência para o hospedeiro, principalmente a *E. muris* (baixa virulência) e a *E. IOE* (altamente virulenta). Alguns experimentos utilizam também a erliquia monocitotrópica humana (*E. chaffeenses*) para estudos em camundongos ou em cultivo de células de linhagem contínua, embora não haja modelo experimental aceito para avaliação de infecções por essa espécie de erliquia em pacientes humanos. As erliquias caracterizam-se por persistirem nos hospedeiros vertebrados por longos períodos de tempo, apesar das suas respostas imunes ativas (DUMLER; SUTKER; WALKER, 1993; GANTA et al., 2002). Essa persistência por mecanismos de evasão não definidos, ocorre por uma afinidade entre o agente e as células alvo do hospedeiro, que falham em eliminá-lo, como seria sua função natural (GANTA et al., 2002). Estudos utilizando camundongos deficientes para genes do Complexo de Histocompatibilidade Principal de classe II (MHC-II), demonstraram persistência maior da infecção nestes indivíduos, sugerindo que moléculas funcionais de MHC-II são essenciais para eliminar o agente desses hospedeiros (GANTA et al., 2002). Embora a ativação de macrófagos possa contribuir para a eliminação do agente, isso isoladamente não é suficiente para eliminar o patógeno. A participação de células T CD4+ na resposta a infecção, parece ser o fator crítico, orquestrando a completa eliminação do agente. Uma resposta imune protetora pode estar associada à secreção de citocinas específicas, como IFN- γ e, portanto, a uma resposta imune celular tipo Th-1 (GANTA et al., 2002). A análise da secreção de citocinas em camundongos não revelou mudanças nas concentrações de TNF- α e IL-10 entre indivíduos infectados ou não (GANTA et al., 2002). A infecção geralmente induz inibidores de apoptose celular e altera a transcrição de uma ampla gama de genes do genoma hospedeiro. A interação entre o agente e a célula hospedeira é mais complexa do que a simples

satisfação das necessidades metabólicas do patógeno, ocorrendo mudanças importantes na célula infectada, como regulação diferenciada do ciclo celular e uma depressão regulatória do sistema imune inato (ZHANG et al., 2004). O aspecto mais forte da infecção é a repressão das citocinas que modulam a imunidade inata e adaptativa a bactéria intracelular. A *E. chaffeensis* reprime o estímulo a produção de IL-12 e reprime diretamente a produção de IL-15 e IL-18. Essas citocinas têm papel fundamental no estímulo de células NK e Th-1 a produzirem IFN- γ , que ativa macrófagos a eliminarem bactérias fagocitadas (ZHANG et al., 2004). A IL-12 e IL-15 também ativam diretamente células NK e linfócitos T citotóxicos a eliminarem células infectadas. Desta forma, a supressão dessas citocinas pode permitir que o agente escape a resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro (ZHANG et al., 2004). O agente pode sobreviver no interior da célula hospedeira através da regulação de proteínas responsáveis pela interação fagolisossoma inibindo, portanto a fusão das membranas dessas organelas e, conseqüentemente, a destruição do microrganismo pelas enzimas lisossomais (ZHANG et al., 2004).

A análise da produção de citocinas em camundongos experimentalmente infectados com cepas de erliquia com alta e baixa virulência demonstrou, no início da infecção, níveis séricos de TNF- α proporcionais a patogenicidade da cepa inoculada, apresentando uma elevação próxima ao óbito do hospedeiro. As células produtoras dessa citocina foram os linfócitos T CD8+, em 60% dos casos (ISMAIL et al., 2004). Quanto às subpopulações de linfócitos T, a sobrevivência de camundongos infectados com uma baixa dose de antígeno altamente patogênico foi associada à maior expansão de células T CD4+, mas não CD8+ (ISMAIL et al., 2004). A avaliação da resposta T CD4+ antígeno específica mostrou uma pobre proliferação em resposta a diferentes concentrações de antígeno altamente patogênico, comparativamente ao de baixa patogenicidade. Uma infecção letal resulta em um prejuízo seletivo da resposta proliferativa de células T CD4+ *in vivo*. Entretanto, a diminuição da proliferação de células T CD4+ antígeno específicas, *in vitro*, não foi associada à ação do antígeno específico (ISMAIL et al., 2004).

Esplenócitos de indivíduos resistentes a infecção continham maiores números de células produtoras de IFN- γ antígeno específicas. Uma diminuição de células produtoras de IFN- γ em animais infectados com antígeno patogênico foi simultânea ao aumento sérico de TNF- α e baixa taxa de sobrevivência (ISMAIL et al., 2004).

Uma forte resposta Th-1 está associada com a resistência a doença causada por erliquia, enquanto uma fraca resposta Th-1, mas não Th-2, está associada à susceptibilidade a erliquiose severa. A marcada diminuição da resposta de células T CD4⁺ e diminuição do número de células Th-1 produtoras de IFN- γ , foram fortemente associadas à susceptibilidade a doença fatal. A produção de IL-12 por macrófagos também foi deficiente no início da infecção. Observou-se também, que os animais sucumbiram à infecção apesar da produção de IFN- γ por células T CD8⁺, sugerindo que a produção de IFN- γ é efetiva quando decorrente de células T CD4⁺, e que a produção de IFN- γ por células T CD8⁺ é insuficiente para controlar a infecção (ISMAIL et al., 2004). A superprodução de TNF- α por células T CD8⁺ esplênicas antígeno específicas e níveis séricos muito altos estão fortemente associados à doença grave e fatal. Uma produção mínima de TNF- α foi associada com doença moderada e sobrevivência a longo prazo (ISMAIL et al., 2004).

2.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Em cães, geralmente suspeita-se de erliquiose quando o animal apresenta histórico de infestação por carrapatos associado a manifestações clínicas inespecíficas, como febre, anorexia, depressão, letargia, perda de peso (KEYSARY et al., 1996; COHN, 2003; NEER; HARRUS, 2006).

O curso da doença, classicamente, pode ser dividido em três fases: aguda, assintomática e crônica.

A fase aguda ocorre após um período de incubação de oito a 20 dias e persiste por duas a quatro semanas, enquanto ocorre multiplicação do microrganismo em células mononucleares, disseminando-se pelo organismo hospedeiro (IMMELMAN; BUTTON, 1973; HOSKINS, 1991; NEER; HARRUS, 2006). Pode aparecer como doença multissistêmica, com ou sem tendências hemorrágicas como petéquias e/ou equimoses dérmicas. Sangramento de mucosas pode manifestar-se mais frequentemente por epistaxe. Uma linfadenomegalia ou esplenomegalia pode aparecer em 20 a 25 % dos casos, respectivamente. Os animais doentes podem apresentar sinais oculares, como uveíte anterior,

corioretinite, papiledema, hemorragia da retina, infiltrado perivascular e descolamento de retina, ou até cegueira. A apresentação de sinais neuromusculares ocorre devido à meningite por inflamação e/ou sangramento. Convulsões, estupor, ataxia com diminuição de neurônios motores superiores e inferiores, disfunção vestibular central ou periférica aguda, anisocoria, disfunção cerebelar, tremor de intenção e hiperestesia generalizada ou localizada tem sido observados. Podem aparecer também casos de poliartrite ou doença articular devido à hemartrose ou deposição de imunocomplexos. Algumas disfunções renais foram relatadas, como amiloidose e alterações glomerulares, embora discretas (CODNER et al., 1992; CODNER; MASLIN, 1992; COHN, 2003; LUCKSCHANDER; KLEITER; WILLMANN, 2003; NEER; HARRUS, 2006). Nessa fase as alterações hematológicas estão associadas a processos imunes ou de coagulação, incluindo trombocitopenia persistente com aumento de plaquetas grandes e regenerativas, leucopenia leve variável e anemia arregenerativa, podendo ser regenerativa quando ocorre hemólise ou sangramento extenso concomitante. Estudos utilizando inoculação experimental demonstram que uma leucopenia moderada e anemia não-regenerativa ocorreram aos 10 dias de infecção, com pico de redução de hematócrito aos 30 dias após infecção. O pico de trombocitopenia foi observado aos 22 dias após a infecção (KEYSARY et al., 1996; HARRUS et al., 1998b; COHN, 2003). Geralmente esta fase clínica se resolve espontaneamente (IMMELMAN; BUTTON, 1973; HOSKINS, 1991; KEYSARY et al., 1996; NEER; HARRUS, 2006). Os animais imunocompetentes podem eliminar o agente, mesmo sem tratamento específico. Se não, servem como portadores carreadores mesmo sem desenvolver a fase crônica, mantendo-se como reservatórios do agente, sem manifestações clínicas (HARRUS et al., 1998b; MURPHY, G L et al., 1998; NEER; HARRUS, 2006).

A fase assintomática dura em média de 40 a 120 dias, porém estudos utilizando cães naturalmente ou experimentalmente infectados demonstraram que esta fase pode persistir por anos. Os animais voltam a ganhar peso e não mais apresentam febre, parecendo clinicamente normais. Entretanto a maioria dos cães sofre recaídas periódicas (IMMELMAN; BUTTON, 1973; BANETH et al., 1996; WANER et al., 1997; HARRUS et al., 1998b; COHN, 2003; NEER; HARRUS, 2006). Cães clinicamente saudáveis com moderada trombocitopenia, aumento persistente do título de anticorpos anti-*E. canis*, hipergamaglobulinemia e uma linfocitose absoluta são identificados como cursando a fase assintomática da erliquiose canina

(CODNER; FARRIS-SMITH, 1986; WANER et al., 1997; HARRUS et al., 1998b). Em áreas endêmicas muitos cães saudáveis são soropositivos para *E. canis*, sugerindo que estejam nesta fase da infecção (BANETH et al., 1996; WANER et al., 1997; HARRUS et al., 1998b; NEER; HARRUS, 2006).

Alguns cães evoluem ainda para a fase crônica da erliquiose, que pode ser branda, aparecendo como doença vaga associada à perda de peso e alterações hematológicas menos severas. As manifestações clínicas são semelhantes as da fase aguda. Monocitose persistente, linfocitose, trombocitopenia e anemia não regenerativa são proeminentes (HOSKINS, 1991; COHN, 2003). A forma severa pode estar associada com a virulência da amostra de *E. canis*, a idade ou raça do cão infectado, doenças concomitantes ou estresse (CODNER; FARRIS-SMITH, 1986; NEER; HARRUS, 2006). Caracteriza-se por falha na produção de elementos sanguíneos pela medula óssea, resultando em pancitopenia. Pode ocorrer óbito devido à anemia, uremia, infecção secundária, ou ambos (IMMELMAN; BUTTON, 1973; COHN, 2003; NEER; HARRUS, 2006).

2.4 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico clínico da erliquiose canina é realizado frequentemente com base nas manifestações clínicas e anormalidades hematológicas, entretanto o diagnóstico definitivo depende da associação entre os resultados das técnicas de detecção do agente infeccioso e da avaliação da soroconversão. As alterações hematológicas compreendem anemia (82%), usualmente não regenerativa, trombocitopenia (82%) e leucopenia (32%) com aproximadamente 20% de neutropenia (HOSKINS, 1991; KEYSARY et al., 1996; COHN, 2003; NEER; HARRUS, 2006). Entretanto, em alguns casos pode ser observada uma linfocitose granular com contagem absoluta variando entre 5200 a 17200/uL e granularidade do citoplasma típica de leucemia linfocítica bem diferenciada (NEER; HARRUS, 2006). Trombocitopenia é um achado consistente em todos os estágios da erliquiose, porém a contagem normal de plaquetas nunca deve descartar a doença. A pancitopenia resulta de hipoplasia das células precursoras da medula óssea e ocorre freqüentemente na fase crônica severa (18% dos casos) (HOSKINS, 1991;

KEYSARY et al., 1996; COHN, 2003; NEER; HARRUS, 2006). As anormalidades em aspirados ou biópsias de medula óssea são dependentes da fase e severidade da doença. As séries megacariocítica e mielóide normais ou com aumento da celularidade, e uma diminuição nos precursores eritróides, levando a um aumento na taxa mielóide:eritróide, são achados comuns na fase aguda da doença e na maioria dos casos crônicos (MATUS; LEIFER; HURVITZ, 1987; HOSKINS, 1991). Uma plasmocitose medular com infiltração difusa aparece em muitos casos de erliquiose, independente da fase da doença (MATUS; LEIFER; HURVITZ, 1987; HOSKINS, 1991).

Os exames de bioquímica sérica mostram hiperproteinemia (33%), hiperglobulinemia (39%), hipoalbuminemia (43%) e aumento das enzimas hepáticas ALT e FA (43 e 31%, respectivamente). Na eletroforese de proteínas séricas observa-se freqüentemente uma hiperglobulinemia policlonal, entretanto vários estudos têm demonstrado a ocorrência de gamopatia policlonal ou monoclonal. Os cães infectados que apresentam pancitopenia têm concentrações séricas mais baixas de gamaglobulina comparativamente aos não pancitopênicos (HOSKINS, 1991; HARRUS et al., 1996; NEER; HARRUS, 2006). Outros achados laboratoriais incluem: proteinúria, hematúria, aumento no tempo de sangramento (mesmo com plaquetas normais) e radiopacidade pulmonar intersticial. Há aumento de proteínas e pleocitose linfocítica no líquido semelhante doença viral (HOSKINS, 1991; COHN, 2003; NEER; HARRUS, 2006).

O diagnóstico pode ser feito pela presença de mórulas em leucócitos de esfregaços sanguíneos otimizados por “papa” de leucócitos ou em esfregaços periféricos, aspirados de baço, pulmão e linfonodos (NEER; HARRUS, 2006). Porém, são encontradas apenas durante a fase inicial da doença, em pequena porcentagem dos casos, enquanto o animal apresenta febre (VAN HEERDEN; REYERS; STEWART, 1983; MYLONAKIS et al., 2003).

Os achados patológicos de cães com erliquiose incluem petéquias e equimoses nas superfícies serosa e mucosa da maioria dos órgãos, como cavidade nasal, pulmões, rins, bexiga, trato gastrointestinal e tecido subcutâneo. Linfadenomegalia, esplenomegalia e hepatomegalia são mais freqüentes na fase aguda. Perda da condição corporal é um achado adicional em casos crônicos. A medula óssea é hipercelular e vermelha na fase aguda, mas na doença crônica torna-se hipoplásica e pálida (NEER; HARRUS, 2006). Um dos achados

histopatológicos mais característicos é um infiltrado de células plasmáticas perivascular em vários órgãos (pulmões, cérebro, meninges, rins, linfonodos, medula óssea, baço e, às vezes, pele ou mucosa). O grau de infiltração aumenta com a cronicidade (NEER; HARRUS, 2006). No baço observa-se hiperplasia reticuloendotelial da polpa vermelha, aumento de folículos linfóides com aumentada atividade fagocítica, infiltração linfocítica plasmocítica e hemorragia moderada a severa (HARRUS et al., 1998c). No sistema nervoso central há meningoencefalite multifocal não supurativa envolvendo tronco encefálico, mesencéfalo e córtex cerebral. Nos pulmões observa-se pneumonia intersticial. Nos rins ocorre vasculite com infiltração de células plasmáticas na junção corticomedular, glomerulonefrite e plasmocitose intersticial. Mórulas são pouco freqüentes na histopatologia (HUXSOLL et al., 1970b; NEER; HARRUS, 2006).

A detecção de anticorpos anti-*E. canis* pode indicar infecção, embora isoladamente não seja conclusiva. A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) pode detectar anticorpos séricos específicos já aos sete dias após infecção inicial, porém alguns cães podem não ser soropositivos até 28 dias após infecção. O pico de anticorpos em animais não tratados ocorre aos 80 dias após infecção. Um aumento progressivo nos títulos foi relatado durante os primeiros cinco meses após infecção, permanecendo altos por um período adicional de mais de 11 meses, e depois declinaram, alguns animais permanecendo soropositivos ainda aos 34 meses de infecção (WANER et al., 1996; HARRUS et al., 1998b). Nos primeiros sete dias de infecção, predominam IgA e IgM, e aos 20 dias a maioria é IgG, com títulos de IgG variando entre 160 a 640. Os títulos de anticorpos persistem após o tratamento ou recuperação, não significando que as manifestações clínicas ou a doença sejam devidas a erliquiose, principalmente em áreas endêmicas. Alguns animais podem tornar-se assintomáticos após a terapia, mas ainda manter altos títulos para *E. canis* por anos (KEYSARY et al., 1996; HARRUS et al., 1998b; NEER; HARRUS, 2006). A desvantagem da reação de imunofluorescência indireta é a inability para diferenciar infecção corrente e exposição prévia, além de, na maioria dos casos, os anticorpos não serem detectáveis no início da infecção (MURPHY, G L et al., 1998). Reações cruzadas com outras erliquias pode ser outro problema potencial para a especificidade do teste (MCBRIDE et al., 1996; WEN et al., 1997).

A detecção de antígenos de erliquia pela reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método sensível para a identificação de infecção aguda em cães,

podendo ser utilizado para distinguir animais tratados que mantêm infecção persistente daqueles com altos títulos de anticorpos após tratamento efetivo (HARRUS et al., 1998b; NEER; HARRUS, 2006). O nested-PCR do gene 16sRNA para *E. canis* foi altamente sensível, detectando 0,2 pg de DNA purificado (WEN et al., 1997). Comparando-se as amostras de baço, medula óssea e sangue, foi demonstrado que os aspirados de baço são a melhor escolha de amostra para diagnóstico através de PCR para determinar o estado de carreador durante a erliquiose subclínica ou assintomática. As amostras de sangue podem ser inefetivas nesta fase, porém para o diagnóstico definitivo o ideal é a utilização de várias amostras (sangue, baço e medula óssea) em um mesmo momento (HARRUS et al., 1998a; HARRUS et al., 1998b). O Real-Time PCR tem sido utilizado para quantificação de antígeno de *E. canis*, utilizando-se fragmentos de diferentes genes do agente infeccioso (“dsb” e 16sRNA) (DOYLE et al., 2005; BANETH et al., 2008). Com essa técnica foi possível a detecção de *E. canis* já aos sete dias após infecção em amostras de sangue e baço (BANETH et al., 2008).

A utilização conjunta da detecção de anticorpos anti-*E. canis* pela RIFI e a detecção do agente pela PCR permite uma avaliação diagnóstica mais precisa. Se os resultados obtidos em ambas as técnicas for positivo ou negativo, os cães são infectados ou não infectados respectivamente. Se a RIFI for positiva e a PCR negativa, em cães sem alterações clínicas, seria recomendado retirar o tratamento antibiótico e repetir o teste após dois meses e, se os cães permanecem assintomáticos, os títulos de anticorpos diminuirão mais que 16 vezes e a PCR for negativa, o agente foi eliminado do organismo. Nos casos em que a RIFI é negativa, mas a PCR positiva, o tratamento deve ser indicado mesmo sem alterações clínicas até que se torne negativa, pois a infecção pode estar presente (WEN et al., 1997). Cães tratados adequadamente podem permanecer soropositivos durante ou após o tratamento, sugerindo resposta humoral contínua (HARRUS et al., 1998a).

2.5 TRATAMENTO / PROGNÓSTICO

O tratamento da erliquiose canina consiste de agentes antiriquetsiais e cuidados de suporte. Drogas utilizadas com sucesso incluem tetraciclina,

cloranfenicol, dipropionato de imidocarb e amicarbalide. O prognóstico é mais favorável quanto mais cedo for iniciado o tratamento, pois cães em estágio crônico severo são de difícil cura (CODNER; FARRIS-SMITH, 1986; WANER et al., 1997; NEER; HARRUS, 2006). Os antibióticos do grupo das tetraciclina são riquetsiostáticos e não riquetsicidas e, portanto, a duração do período de tratamento pode ser importante (AMYX et al., 1971). A doxiciclina e a minociclina são tetraciclina semi-sintéticas, lipossolúveis. O tratamento com 10 mg/Kg/dia por 7 dias foi inefetivo em alguns casos, entretanto na dose de 5 mg/Kg/dia durante 10 ou 14 dias o tratamento foi eficaz (IQBAL; RIKIHISA, 1994; BREITSCHWERDT; HEGARTY; HANCOCK, 1998; NEER et al., 1999; NEER; HARRUS, 2006). A eficácia do tratamento com doxiciclina foi avaliado, em cães experimentalmente inoculados, utilizando-se também um tempo de terapia de seis semanas (42 dias). Neste estudo, cães infectados, assintomáticos por 34 meses, foram tratados com a dose de 10 mg/Kg a cada 24 horas por seis semanas, e 75% dos cães eliminaram o parasita, indicando que uma terapia de longa ação em animais na fase assintomática da doença pode ser necessária, embora nesse experimento tenham sido utilizados apenas quatro animais (HARRUS et al., 1998a). Um estudo utilizando a dose diária de 10 mg/Kg, porém dividida em duas vezes ao dia, por 10 dias, foi eficaz no tratamento dos cães com erliquiose induzida experimentalmente, sugerindo que a concentração mínima inibitória em uma administração diária pode não promover concentrações bacteriostáticas adequadas (IQBAL; RIKIHISA, 1994; NEER et al., 1999). Alguns trabalhos indicam resistência a doxiciclina pela *E. canis* (WEN et al., 1997). Porém, é necessário avaliar a duração do tratamento assim como a dose e a frequência de administração da doxiciclina para determinar sua eficácia (SAINZ et al., 2000). A persistência do antígeno infectante mesmo após o tratamento tem sido sugerida como decorrente do escape da erliquia para órgãos como o baço, não utilizado frequentemente como amostra para diagnóstico, porém recentemente foi demonstrada quantitativamente a eliminação do agente tanto em amostras de sangue como de baço em cães após tratamento com doxiciclina, embora não possam ser descartados completamente outros locais (BANETH et al., 2008).

Uma importante melhora clínica ocorre geralmente em 24-48 horas após o início da terapia com tetraciclina em cães com a fase aguda ou doença crônica moderada. A melhora clínica geralmente ocorre previamente a qualquer melhora nos

parâmetros hematológicos (HOSKINS, 1991). A contagem de plaquetas aumenta neste período e é usualmente normal no 14º dia de tratamento (NEER et al., 1999; NEER; HARRUS, 2006).

A enrofloxacin não tem se mostrado efetiva contra *E. canis* (NEER et al., 1999; NEER; HARRUS, 2006).

Embora alguns estudos tenham demonstrado eficácia similar a doxiciclina (SAINZ et al., 2000), o uso de imidocarb foi inefetivo em esterilizar a infecção por *E. canis* e não resulta em cura clínica (VAN HEERDEN; VAN HEERDEN, 1981; EDDLESTONE et al., 2006).

Em um estudo, cães que falharam em responder ao tratamento apresentavam azotemia ou aplasia da medula óssea associada à doença, sugerindo os autores que esses achados podem implicar em prognóstico pobre (SAINZ et al., 2000).

A terapia de suporte deve ser feita com fluidos para desidratação e transfusão de sangue para animais severamente anêmicos. Alguns cães cronicamente infectados podem requerer cuidados de suporte constantes ou ao menos intermitente, até melhorarem, possivelmente durante dois a seis meses (HOSKINS, 1991) A terapia de curto período (dois a sete dias) com glicocorticóides pode ser benéfica no início do tratamento quando a trombocitopenia é severa ou risco de vida está presente (NEER; HARRUS, 2006).

Cães livres da infecção com *E. canis* após o tratamento, são plenamente susceptíveis a reinfecção com amostra homóloga. Por essa falta de imunidade a reinfecções, parece ser pouco provável o desenvolvimento de uma vacina morta (AMYX et al., 1971; HOSKINS, 1991).

2.6 PREVENÇÃO

A prevenção da erliquiose canina é realizada através do controle de carrapatos, tratando-se o ambiente, particularmente onde os animais dormem, e os cães. O tratamento do ambiente deve ser feito a cada duas semanas, por seis semanas e, então, mensalmente, durante as épocas de carrapatos. Os cães devem ser banhados com produto comercial a cada duas a três semanas. Os animais

suspeitos ou com títulos positivos para anticorpos anti-*E. canis* devem ser tratados. O programa de controle deve ser acompanhado através de testes repetidos a intervalos de seis a nove meses (HOSKINS, 1991).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 INÓCULO

Todas as infecções experimentais por *E. canis* no presente estudo (seja em carrapatos ou cães) foram realizadas com a cepa Jaboticabal de *E. canis*, gentilmente cedida pela Professora Doutora Rosangela Zacarias Machado (UNESP - Campus Jaboticabal). Esta cepa tem se mostrado altamente patogênica para cães infectados experimentalmente (CASTRO, 2004; HASEGAWA, 2005). Recentemente, a cepa Jaboticabal foi adaptada ao cultivo celular e, portanto, foi também utilizada para confecção de antígeno para uso nas reações de imunofluorescência indireta (RIFI), conforme descrito abaixo.

3.2 CÃES

Foram utilizados 16 cães (provenientes de biotérios experimentais de laboratórios farmacêuticos ou de universidades). Antes do início do experimento, os animais apresentaram valores hematológicos dentro dos limites de normalidade, título de anticorpos negativo para *E. canis* e pesquisa de ácido nucléico por PCR para o gênero *Ehrlichia* negativo.

Um dos cães (designado como EC) foi inoculado com sangue infectado com *E. canis* (cepa Jaboticabal), conforme previamente descrito (CASTRO, 2004). No primeiro dia de febre após a inoculação (início da fase aguda da doença), foram coletadas amostras de sangue total desse cão, que foram utilizadas como inóculo para cães do grupo III (descrito posteriormente). Também foi realizada a infestação desse animal com ninfas de *R. sanguineus*, originários de colônia do laboratório de Doenças Parasitárias (LDP) da FMVZ/USP, regularmente mantida em coelhos isentos de infecção por patógenos. As ninfas ingurgitadas obtidas foram acondicionadas em estufa B.O.D a 25°C e 80% de umidade relativa (UR), para que realizassem ecdise para o estágio adulto.

A infecção do cão EC foi confirmada pela presença de mórulas em células mononucleares do sangue periférico visualizadas em esfregaço sanguíneo, e por PCR realizado com DNA extraído do sangue total (protocolo do PCR está descrito abaixo). Uma amostra dos carrapatos adultos obtidos foi testada por PCR para verificar a presença de DNA de *Ehrlichia* (método descrito abaixo), resultando em aproximadamente 15% de carrapatos infectados.

Os outros 15 cães foram divididos em cinco grupos:

Grupo I – formado por três cães infectados por exposição aos carrapatos *R. sanguineus* adultos, experimentalmente infectados com *E. canis* no cão EC, conforme descrito acima. Cada cão foi infestado com 10 a 20 casais de carrapatos adultos. Os cães desse grupo foram mantidos livres de carrapatos após a exposição aos carrapatos infectados (tratados continuamente com carrapaticidas de longa ação);

Grupo II – formado por três cães infectados com *E. canis* por exposição aos carrapatos (10 a 20 casais) experimentalmente infectados, obtidos do cão EC. Após a infestação com carrapatos adultos infectados, esses animais foram infestados a cada 14 dias com aproximadamente 60 ninfas de *R. sanguineus*, porém esses carrapatos eram livres de infecção por *E. canis* (originários da colônia de *R. sanguineus* mantida em coelhos);

Grupo III – formado por três cães infectados por inoculação intravenosa do isolado Jaboticabal de *E. canis*, conforme descrito por Castro (2004) e Buhles Jr. et al. (1974);

Grupo IV – formado por três cães não infectados por *E. canis*, porém expostos a infestações repetidas por carrapatos *R. sanguineus* não infectados (aproximadamente 60 ninfas de *R. sanguineus* a cada 14 dias, conforme realizado no grupo I).

Grupo V – formado por três cães não infectados por *E. canis* e mantidos livres de carrapatos (tratados continuamente com carrapaticidas de longa ação).

Todas as ninfas ingurgitadas obtidas dos cães dos grupos II e IV foram acondicionadas em estufa B.O.D a 25°C e 80% UR, para que realizassem ecdise para o estágio adulto. Todos os carrapatos adultos obtidos foram testados por PCR (método descrito abaixo) para presença ou não de DNA de *E. canis*.

3.3 AMOSTRAS

De cada cão, foram obtidas amostras de sangue total periférico por venopunção cefálica ou jugular. Uma parte de cada amostra de sangue foi acondicionada em frascos com EDTA, utilizada para hemograma, extração de DNA para Real-Time PCR para *E. canis* e separação de leucócitos para ensaio de proliferação, determinação das subpopulações de linfócitos T do sangue periférico e expressão de citocinas IL-4 e IFN- γ em células T CD4+ e CD8+ (métodos descritos abaixo). Outra parte da amostra de sangue total foi acondicionada em frascos sem anticoagulante para obtenção de soro, utilizado para titulação de anticorpos anti-*E. canis* e determinação dos níveis de citocinas séricas (IL-10, IFN- γ , TNF- α) por ELISA. As amostras de sangue periférico foram obtidas semanalmente nos dias 0 (dia da primeira infestação dos cães ou da inoculação intravenosa com *E. canis*), 7, 14, 21 e 28. Posteriormente foram obtidas amostras quinzenalmente, nos dias 42, 56, 70 e 84, e então a cada 28 dias até completar 12 meses (364 dias).

Todos os cães foram mantidos no canil experimental do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ/USP – Campus de Pirassununga, durante todo o período do experimento. Os animais foram avaliados periodicamente quanto à presença de alterações ao exame físico.

3.4 METODOLOGIAS

3.4.1 Acompanhamento Clínico

Os animais foram acompanhados quanto à temperatura retal (TR), e manifestações clínicas apresentadas durante o curso da doença. A TR foi aferida diariamente no período da manhã e as alterações clínicas foram anotadas conforme se apresentavam.

3.4.2 Hemograma

Os hemogramas foram realizados com as amostras de sangue total periférico acondicionado em frascos contendo EDTA, obtendo-se os seguintes parâmetros hematológicos: contagem total de hemácias, níveis de hemoglobina sérica, hematócrito (ou volume globular), contagem total e diferencial de leucócitos e contagem de plaquetas. A contagem total de hemácias, leucócitos e plaquetas foram realizadas em câmara de Neubauer, nas diluições de 1:200 em solução de Gower, 1:20 em líquido de Thoma e 1:200 em solução de oxalato de amônio a 1%, respectivamente. A dosagem de hemoglobina circulante foi realizada utilizando-se reativo de Drabkin. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em esfregaços sangüíneos corados pelo método de Rosenfeld (BIRGEL, 1982).

3.4.3 Separação de Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC)

Parte da amostra de sangue total em EDTA (aproximadamente 17,0 ml) foi utilizada para separação de PBMC, utilizando-se um gradiente de densidade com a solução Histopaque 1083 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), segundo o protocolo descrito por Paddock et al. (1997).

3.4.4 Purificação de Antígeno Específico (*Ehrlichia canis*)

Para preparação do estímulo específico, foi realizada a purificação do antígeno de *E. canis* em cultivo celular com aproximadamente 95% de infecção. O antígeno erliquial foi purificado de duas formas: por sonicação e sonicação seguida de gradiente de densidade, utilizando a solução de Percoll (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Para controle do antígeno específico, utilizamos as células de cultivo de *E. canis* (DH82), não infectadas, processadas somente por sonicação. As

concentrações protéicas dos antígenos de *E. canis* e de células, foram determinadas pelo “kit” BCA (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) com padrão albumina.

As concentrações dos estímulos policlonais inespecíficos e antígeno específico, assim como o tempo de cultura, foram testados previamente utilizando-se amostras de animais infectados e controles não infectados, para a otimização dos protocolos. As melhores concentrações foram determinadas para utilização nos protocolos de ensaio de proliferação.

3.4.5 Marcação de Subpopulações de Linfócitos T e Citocinas Intracelulares

A titulação dos marcadores de linfócitos T (pan-T: CD3¹), subpopulações de linfócitos T (CD4+² e CD8+³) e citocinas intracelulares (IFN- γ ⁴ e IL-4⁵) resultou na concentração ideal para uso de 10 μ L/ reação de cada marcador. Como isotipos controles foram utilizados 1 μ L/ reação da solução de anticorpos marcados com FITC e PE e 2 μ L/ reação de anticorpos marcados com Alexa.

A expressão de citocinas intracelulares foi avaliada através da utilização de estimulação inespecífica e específica, após cultura rápida de seis horas (ex-vivo). Foram determinados como estímulos: Meio RPMI com 10% soro fetal bovino (controle sem estímulo), Phorbol-12-myristate-13-acetato (PMA) com ionomicina, e antígeno específico (purificado por sonicação e gradiente de densidade). As concentrações de PMA e ionomicina foram determinadas como: 40 ng/mL e 4 μ g/mL, respectivamente, conforme Horiuchi et al. (2007). O antígeno específico foi utilizado na concentração de 10 μ g/mL. Foram feitas, então, as marcações externas (CD3, CD4 e CD8), seguidas de permeabilização com o “kit” específico (Cytotfix / Cytoperm Kit Plus – BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) para marcação intracelular (citocinas IFN- γ e IL-4). A aquisição foi feita no dia seguinte, em um total de 10000 eventos, utilizando um padrão de células não marcadas por animal e

¹ Mouse anti canine CD3:FITC - Serotec

² Rat anti canine CD4:ALEXA 647 - Serotec

³ Rat anti canine CD8:ALEXA 647- Serotec

⁴ Mouse anti bovine interferon gamma:RPE - Serotec

⁵ Mouse anti bovine interleukin-4:RPE - Serotec

isotipos controle para cada estímulo. As aquisições foram analisadas utilizando-se o programa FlowJo versão 7.2.

3.4.6 Ensaio de Proliferação

As PBMC dos cães foram avaliadas quanto a sua capacidade de responder com proliferação celular frente a estímulos inespecíficos (fito-hemaglutinina (PhA – Gibco Laboratories, Grand Island, NY, EUA) a 1,5%) e específicos (antígenos de *Ehrlichia* a 10 µg/mL) por citometria de fluxo. Para isso, após a contagem de PBMC, um volume equivalente a 5×10^5 células por poço foi acrescido de igual volume de carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE), para determinar a proliferação celular. Assim, CFSE diluído 1:1000 foi adicionado v:v à suspensão celular e mantido por 5 min; a reação foi interrompida com a adição de 10% de soro bovino fetal. As células foram, então, lavadas e ressuspensas em meio RPMI completo e mantidas em cultura por sete dias, em placas de 96 poços (Corning-Costar, NY, EUA), com PhA (1,5%), antígeno específico (10 µg/mL) e controles (meio RPMI e antígenos purificados de células DH82 de linhagem continua a 5 µg/mL) em triplicata. Durante os sete dias, as células foram mantidas a 37°C com 5% de CO₂, em placas de 96 poços, com fundo em “U” (para melhor contato entre as células). Após esse período, as células foram lavadas com PBS e ressuspensas em PBS-formol a 1% para aquisição de 30000 eventos em citômetro de fluxo, para determinação do CFSE.

3.4.7 ELISA para Citocinas Séricas

As reações imunoenzimáticas para detecção das citocinas disponíveis para cães: IL-10⁶, IFN-γ⁷ e TNF-α⁸ (R&D Systems, MN, EUA) nas amostras de soro, foram realizadas, conforme as orientações do fabricante.

⁶ Canine IL-10 Immunoassay – R&D Systems

As amostras de soro foram armazenadas a -20°C até o processamento.

3.4.8 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

As amostras de soro dos animais foram submetidas à reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção e titulação de anticorpos anti-*E. canis*. O antígeno utilizado para a reação foi obtido a partir de cultivo em células DH82, mantidas no LDP – VPS – FMVZ/USP, infectadas previamente com a cepa Jaboticabal de *E. canis*. As lâminas foram preparadas utilizando-se uma suspensão de células infectadas em PBS formol a 1%, fixadas com acetona PA. As lâminas prontas para teste foram mantidas refrigeradas a 4-8°C, até o uso (MCBRIDE et al., 1996; WEN et al., 1997). As amostras de soro, diluídas de forma seriada em Solução Tampão Fosfatada (PBS) pH 7,2, na razão dois a partir de 1:40, foram colocadas sobre a lâmina, incubadas a 37°C por 30 minutos. Após lavagens de 5 minutos com solução de PBS, foi adicionado conjugado anti-IgG de cão (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) a cada amostra e novamente foram incubadas por 30 minutos a 37°C. Após lavagens em solução de PBS, as lâminas foram preparadas com glicerina tamponada, cobertas com lamínula, para visualização em microscópio de fluorescência. Em cada lâmina foram testados soros testemunhas de títulos positivos e negativos conhecidos.

3.4.9 Real-Time PCR

As amostras de sangue total periférico, foram submetidas à extração de DNA, utilizando-se o “kit” de extração “DNeasy Tissue Kit” (Qiagen, Chatsworth, CA), conforme instruções do fabricante.

⁷ Canine IFN- γ Immunoassay – R&D Systems

⁸ Canine TNF- α Immunoassay – R&D Systems

Os carrapatos adultos resultantes da ecdise das ninfas obtidas das reinfestações dos cães foram submetidos à extração de DNA, utilizando-se fenol-isotiocianato de guanidina conforme técnica modificada por Sangioni et al. (2005).

O material obtido da extração foi analisado para *Ehrlichia canis* pela determinação da sequência de nucleotídeos amplificados do gene *dsb*, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores denominados Dsb-321 (5'-TTGCAAAATGATGTCTGAAGATATGAAACA-3') Dsb-671 (5'-GCTGCTCCACCAATAAATGTATCYCCTA-3'), e a sonda TaqMan (5'-AGCTAGTGCTGCTTGGGCAACTTTGAGTGAA-3') 5' FAM/BHQ-1 3', específica para a espécie *E. canis*, conforme previamente padronizado (DOYLE et al., 2005). A reação foi realizada em placas de 96 poços submetidas a variações térmicas correspondentes a um ciclo inicial de 95°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto, conforme descrito por Doyle et al. (2005). A amplificação, aquisição e análise dos dados foram realizadas em um sistema de detecção multicolor para Real-Time PCR (7500 Real-Time PCR Systems - Applied BioSystems, Foster City, CA, EUA).

3.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente trabalho propõe verificar o nível de ricketsemia capaz de infectar o carrapato vetor (*R. sanguineus*) durante o curso da erliquiose monocitotrófica canina, o intervalo de tempo que cães infectados com erliquia permanecem como reservatório da doença e analisar a resposta imune celular e humoral induzida por exposição de cães a carrapatos infectados com *Ehrlichia canis*. Para isso foram montados cinco grupos experimentais:

- I- Três cães foram infestados com 10-20 casais de carrapatos *R. sanguineus* adultos experimentalmente infectados com erliquia.
- II- Três cães foram infestados 10-20 casais de carrapatos *R. sanguineus* adultos experimentalmente infectados com erliquia. A cada 14 dias, esse grupo ainda foi infestado com 60 ninfas não infectadas.
- III- Três cães foram infectados com erliquia por via intravenosa.

- IV- Três cães receberam infestação com 60 ninfas não infectadas a cada 14 dias.
- V- Três cães não foram infectados nem infestados.

A obtenção de carrapatos vetores de *Ehrlichia canis* foi possibilitada pela alimentação de ninfas de carrapatos *R. sanguineus*, de colônia previamente estabelecida no laboratório, em um cão infectado com *E. canis* (cepa de Jaboticabal) por via intravenosa.

Todas as ninfas ingurgitadas nos cães do grupo II e IV foram acondicionadas em estufa, aguardada ecdise para o estágio adulto, sendo posteriormente testadas por Real-Time PCR para detecção de DNA de *Ehrlichia*.

Os cães foram avaliados periodicamente quanto à presença de alterações ao exame físico (principalmente febre, linfadenomegalia e/ou esplenomegalia). Foram colhidas amostras de sangue periférico antes da infestação/infecção e a cada sete dias, durante 28 dias. Posteriormente, foram colhidas amostras a cada 14 dias, por um período de dois meses, e então a cada 28 dias até completar 12 meses. Foram avaliados os seguintes parâmetros hematológicos: número de hemácias, nível de hemoglobina, volume globular, número de leucócitos (total e diferencial) e plaquetas. O soro obtido foi empregado para dosagem de anticorpos (específicos anti-*Ehrlichia*) pela RIFI. A partir do sangue ainda foram determinados os níveis de infecção com a riquetsia (quantificação relativa de DNA de *Ehrlichia*). As amostras obtidas nos dias 0, 28, 252 foram utilizadas na determinação das subpopulações de linfócitos T (CD3, CD4 e CD8) e a expressão de IFN- γ e IL-4 por esses tipos celulares. A proliferação celular frente à mitógeno e antígenos específicos de *Ehrlichia* por incorporação de CFSE foi determinada nos dias 0, 14, 28, 42, 112, 196 e 364. As amostras de soro para dosagem de citocinas (IL-10, IFN- γ e TNF- α) foram às mesmas utilizadas para RIFI.

4 RESULTADOS

4.1 ANIMAIS

Os 15 cães foram divididos nos cinco grupos, com três cães por grupo:

Grupo I (Infectados por carrapatos) – cães 8, 9, 12;

Grupo II (Infectados por carrapatos e reinfestados) – cães 7, 10, 15;

Grupo III (Infectados por inoculação intravenosa) – cães 4, 5, 6;

Grupo IV (Controle reinfestados com carrapatos livres de infecção) – cães 11, 13, 14;

Grupo V (Controle) – cães 1, 2, 3.

Em cada um dos grupos I e II, um dos três cães não se infectou, mantendo-se soronegativo para anticorpos anti-*E. canis*, e negativo para pesquisa de ácido nucléico de *E. canis*, por Real-Time PCR. As amostras dos dois cães foram processadas para as técnicas de proliferação celular, dosagem de citocinas séricas e determinação de citocina intracelular nas subpopulações de linfócitos T. As alterações clínicas e hematológicas desses cães não foram consideradas para as análises dos respectivos grupos.

4.2 ACOMPANHAMENTO CLÍNICO

Os resultados obtidos, da variação térmica dos cães, demonstraram oscilação acima dos valores de referência para a espécie, nos animais infectados, aproximadamente entre 14° a 32° dia pós-infecção (dpi), conforme demonstrado na figura 1. Entretanto, os cães infectados por via intravenosa diferiram dos infectados via carrapato por apresentarem alteração mais precoce e por um período de tempo menor. Após o período febril inicial, não ocorreram elevações significativas na temperatura retal dos cães, durante o curso da infecção. Apenas um dos cães do

grupo III, infectado por via intravenosa, apresentou aumento na TR novamente aos 47 dpi, persistindo até o óbito do mesmo, aos 56 dias de infecção (Figura 2).

Os cães apresentaram como alterações clínicas mais evidentes a apatia e redução na ingestão de alimentos, que foram observados durante os momentos de elevação térmica corporal. Um cão do grupo infectado por via intravenosa apresentou alguns poucos episódios de vômito também durante o período febril. O cão do grupo III que veio a óbito apresentou petéquias na região inguinal, íris do olho esquerdo e mucosa jugal, além de ulceração em mucosa jugal do lado esquerdo. A intensidade das alterações clínicas, assim como a gravidade de apresentação foi variável entre os cães, embora tenham sido piores e mais persistentes nos animais infectados por via intravenosa (grupo III)

Figura 1 – Temperatura retal média dos grupos experimentais nos primeiros 90 dias de infecção. A faixa cinza delimita a elevação térmica em relação limites de referência.

Figura 2 – Temperatura retal do cão 4 inoculado com *E. canis* por via intravenosa (grupo III), durante o curso da infecção, até o óbito. A faixa cinza delimita a elevação térmica em relação aos limites de referência.

4.3 ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS

Os resultados obtidos nos hemogramas dos cães experimentais foram analisados comparando-se as médias dos grupos. Os grupos infectados tanto por via intravenosa como via vetor demonstraram uma variação nos valores globais das três linhagens de células sanguíneas em relação aos valores de referência.

Na série vermelha observou-se uma redução na contagem total de hemácias nos grupos infectados, iniciando-se aos 14 dpi, porém esses valores estiveram abaixo dos valores de referência somente após o 21º dpi. Os valores de contagem de células vermelhas persistiram até 42-56 dpi, retornando aos valores de normalidade e elevando-se de forma contínua até 70-84 dpi (Figura 3; Apêndice C). A determinação de hemoglobina sérica indicou uma redução inicial aos 14 dpi, porém ficando abaixo dos valores de referência apenas após 21-28 dpi, retornando aos valores de normalidade por volta de 42 a 56 dpi. Essa elevação persistiu até o 84º dpi. O grupo III mostrou uma redução mais evidente na concentração de hemoglobina sérica, demonstrando diminuição mais precoce em relação aos valores de referência (21-28 dpi) e por um período de tempo mais longo (56 dpi). Nos cães dos grupos I e II a redução foi mais discreta, com pico de redução na concentração

de hemoglobina sérica aos 42 dpi (Figura 4; Apêndice D). A redução na porcentagem de células vermelhas no sangue (volume globular ou hematócrito) foi observada já aos 14-21 dpi, porém mostrou-se abaixo dos valores de referência somente após 28 dpi. O retorno aos valores de normalidade pode ser observado aos 42 a 56 dpi, porém elevando-se até 84 dpi. O grupo III teve uma queda mais evidente, mostrando-se abaixo dos valores de normalidade mais precocemente (21 dpi) e por mais tempo (56 dpi). Nos grupos I e II a redução foi mais discreta, com pico de redução de hematócrito aos 42 dpi (Figura 5; Apêndice E).

As anormalidades observadas na série vermelha se restringiram a fase inicial da infecção, não sendo observadas variações nos valores obtidos das médias dos grupos em relação aos padrões de normalidade entre os dias 84 e 364 após infecção.

Figura 3 – Valores médios da contagem total de hemácias no sangue periférico dos cães dos grupos experimentais, durante o curso da infecção

Figura 4 – Valores médios das concentrações de hemoglobina no sangue periférico dos cães dos grupos experimentais, durante o curso da infecção

Figura 5 – Valores médios da porcentagem de hematócrito no sangue periférico dos cães dos grupos experimentais, durante o curso da infecção

Em relação à série branca, a comparação dos valores médios dos grupos revelou uma redução na contagem total de leucócitos nos grupos infectados iniciando-se já ao sétimo dpi, porém mostrando-se abaixo dos valores de referência, para a espécie, aos 14 dpi. A recuperação da leucopenia ocorreu aos 21-28 dpi,

porém uma nova queda no valor total de leucócitos pode ser observada entre 42 e 56 dpi. Os valores médios mantiveram-se variando próximos aos limites mínimos dos valores de referência, ao longo da infecção, aparecendo abaixo dos valores de normalidade nos 168-196 dpi no grupo III e 280-336 dpi no grupo II (Figura 6; Apêndice F). O grupo I teve uma constante elevação na contagem de leucócitos, embora dentro dos valores de referência, principalmente devido à linfocitose apresentada por um dos cães do grupo (Figura 8).

A contagem absoluta de neutrófilos segmentados, determinada pela contagem diferencial demonstrou uma redução evidente a partir do sétimo dpi nos grupos infectados, porém aparecendo abaixo dos valores de referência somente aos 42-56 dpi. Observou-se uma oscilação durante o curso da infecção nos grupos infectados, sendo a redução mais evidente no grupo I, principalmente próximo aos 196 dpi (Figura 7; Apêndice G).

Observou-se também uma diminuição na contagem de linfócitos evidente a partir do sétimo dpi, porém mostrando-se abaixo dos valores de referência entre 14 e 42 dpi. Houve oscilação dos valores médios de linfócitos nos grupos infectados, durante o curso da doença, observando-se uma redução mais constante no grupo II. No grupo I, ocorreu uma linfocitose crescente a partir de 112 dpi, persistindo até o final do experimento, porém esse aumento de linfócitos foi resultante da evidente elevação observada em apenas um (cão 8) dos animais do grupo (Figura 8; Apêndice H).

Embora todos os grupos tenham apresentado valores de eosinófilos acima dos valores de referência antes da infecção, comparativamente ao dia zero foi possível verificar uma redução dessas células nos grupos infectados, mais evidente entre 14 e 28 dpi (Apêndice I). Os valores de monócitos não apresentaram diferenças significativas entre infectados e cães controle (Apêndice J).

Figura 6 – Valores médios da contagem total de leucócitos no sangue periférico dos cães dos grupos experimentais, durante o curso da infecção

Figura 7 – Valores médios da contagem absoluta de neutrófilos no sangue periférico dos cães dos grupos experimentais, durante o curso da infecção

Figura 8 – Valores médios da contagem absoluta de linfócitos no sangue periférico dos cães dos grupos experimentais, durante o curso da infecção

Os grupos infectados apresentaram uma diminuição na contagem total de plaquetas aos sete dpi, evidenciando-se abaixo dos limites de referência entre 14 e 56 dpi. Nos grupos I e III os valores oscilaram abaixo dos valores de referência durante praticamente todo o curso da infecção, sendo que o grupo III manteve-se mais próximo aos valores de normalidade, principalmente a partir do 196 dpi. O grupo II apresentou uma redução média entre 112 e 168 dpi. Um dos grupos controle, reinfestado com carrapatos (grupo IV), apresentou momentos de oscilação abaixo dos limites de referência entre 42 e 70 dpi, entre 168 e 224 dpi, e ao final do experimento (364 dpi). O grupo I foi o que demonstrou valores mais reduzidos persistentemente ao longo na infecção (Figura 9; Apêndice K).

Figura 9 – Valores médios de contagem total de plaquetas no sangue periférico dos cães dos grupos experimentais durante o curso da infecção

4.4 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)

As amostras de soro mantidas a -20°C foram processadas nos momentos 0, 7, 14, 21, 28, 42, 56, 84, 112, 140, 168, 196, 224, 252, 280, 308, 336 e 364, para determinação do título final de anticorpos anti-*E. canis*, pela técnica de imunofluorescência indireta, utilizando-se as lâminas preparadas com a cepa Jaboticabal de *E. canis*, estabelecida em cultivo celular. Observaram-se reações

positivas para RIFI aos 21 dpi, em todos os cães dos grupos infectados. Os títulos iniciais de 5120 a 10240 demonstraram a soroconversão induzida pela infecção por *E. canis*. A detecção de anticorpos anti-*E. canis* demonstraram títulos crescentes até 56-84 dpi, variando entre 10240 e 40960. Ocorreram oscilações nos títulos dos cães infectados a partir do 224 dpi, chegando a atingir título de 81920 em um cão do grupo II. Todos os cães infectados mantiveram-se soropositivos até o final do experimento (364 dpi) (Figura 10; Apêndice B).

Figura 10 – Titulação de anticorpos séricos anti-*E. canis*, dos cães experimentalmente infectados, durante o curso da infecção. Grupo III composto dos cães 4, 5 e 6; grupo II: cães 10 e 15; grupo I: cães 8 e 12

4.5 REINFESTAÇÕES COM CARRAPATOS

Após o dia zero, foram realizadas 11 infestações com ninfas de *R. sanguineus* nos cães dos grupos II e IV, nos dias 14, 28, 42, 56, 70, 84, 98, 224, 252, 280, 308 após infecção. Nas infestações do grupo II, foi recuperado um total de 1187 ninfas ingurgitadas, que mudaram para 671 carrapatos adultos no laboratório. Nas infestações do grupo IV, foram recuperadas 779 ninfas ingurgitadas, que mudaram para 345 carrapatos adultos nas condições do laboratório. Infelizmente, houve uma mortalidade de ninfas ingurgitadas, acima do esperado, em função do excesso de

umidade relativa à que esses carrapatos foram submetidos na incubadora BOD. Amostras desses carrapatos adultos obtidos foram processadas por real-time PCR, conforme descrito a seguir.

4.6 REAL-TIME PCR

As amostras de sangue total e os carrapatos adultos obtidos após ecdise foram submetidos à extração de ácido nucléico (DNA) utilizando-se os protocolos descritos acima. Os carrapatos foram submetidos individualmente ao protocolo de extração. O material obtido foi armazenado a -20°C até a realização da técnica de Real-Time PCR.

As amostras de DNA purificado de sangue e de carrapatos foram utilizadas para amplificação e quantificação relativa de um fragmento de 378 bp do gene *dsb* de *E. canis*, através da técnica de Real-Time PCR, utilizando-se uma sonda TaqMan fluorescente 5'-AGCTAGTGCTGCTTGGGCAACTTTGAGTGAA-3', 5' FAM/BHQ-1 3', com excitação a 494/534nm (DOYLE et al., 2005). Em um volume de reação de 25 µL, foram adicionados 2,5 µL de amostra, 2,5 µL de tampão de PCR (10X), 4,0 µL de dNTP (desoxinucleotídeos a 1,25 mM), 1,0 µL de MgCl₂ (50mM), 0,1 µL de Taq DNA polimerase (5000U/mL – Invitrogen, Alsbad, EUA), 1,0 µL de cada primer a 10 µM, 0,25 µL da sonda específica a 20 µM, e água bi-destilada para ajuste do volume final. A reação de Real-Time PCR foi realizada no aparelho 7500 Real-Time PCR Systems (Applied BioSystems, Foster City, CA, EUA), utilizando-se um ciclo inicial de 95°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto .

Os resultados foram obtidos estabelecendo-se as mesmas condições de reação para todas as amostras, determinando a quantidade de ciclos para amplificação do fragmento de DNA específico em relação ao controle positivo extraído de cultivo celular com aproximadamente 70% de infecção com *E. canis*.

Todas as amostras positivas tiveram amplificação com maior número de ciclos (*Cycle threshold*=*Ct*) que o controle positivo. Em outras palavras, a quantidade de DNA de *E. canis* no controle positivo foi sempre maior que nas amostras de

carrapatos e sangue. Analisando-se os valores da diferença comparativa entre as amostras e o controle positivo, foi possível a determinação da quantificação relativa de DNA de *E. canis* no sangue e nos carrapatos alimentados nos animais experimentalmente infectados durante o curso da infecção até 364 dpi. Foi possível verificar o início de detecção do agente circulante aos 14 dpi em todos os cães infectados. As quantidades mais próximas aos valores do controle positivo foram observadas até os 42 dpi, em todos os cães infectados. Porém, durante o curso da infecção, um dos cães de cada grupo apresentou momentos em que não houve amplificação específica, sendo mais evidente a partir de 140 dpi nos grupos infectados e especialmente no grupo II (Figura 11). Os carrapatos positivos foram identificados numa proporção de um indivíduo positivo em 22 a 30 análises por animal reinfestado (grupo II). Um dos cães do grupo teve apenas um momento com carrapato positivo na amplificação de DNA de *E. canis*, ao redor de 70-75 dpi. O outro cão teve carrapatos positivos em quatro momentos distribuídos ao longo da infecção, podendo ser determinada amplificação específica até 308-313 dpi. Neste cão, em dois dos momentos em que houve amplificação específica nos carrapatos, a quantificação relativa revelou maior concentração do agente nos carrapatos, inclusive houve dois carrapatos positivos (em 60 analisados) entre 70-75 dpi, embora o cão tenha apresentado a amostra de sangue negativa para amplificação de DNA de *E. canis* (Figura 11; Apêndice A).

Figura 11 – Quantificação relativa de DNA de *E. canis* no sangue periférico dos cães dos grupos experimentais, durante o curso da infecção. As estrelas identificam momentos em que foram amplificados fragmentos de DNA de *E. canis* em carrapatos alimentados nos respectivos cães do Grupo II. As legendas referem-se aos cães de cada grupo. Em cada um dos grupos I e II, um cão não se infectou e, portanto, não foi analisado

4.7 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO

A proliferação de linfócitos dos animais experimentais foi analisada nos momentos 0, 7, 14, 28, 42, 112, 196, 252 e 364 da infecção.

As amostras de PBMC obtidas por separação em gradiente de densidade foram utilizadas para determinar a proliferação de linfócitos em cultivo celular submetidos à estimulação antígeno específica e policlonal com PhA. Inicialmente foi realizada a contagem do total de células por mL da suspensão de PBMC em câmara de Neubauer, utilizando-se a diluição de 1:100 em líquido de Turk. A concentração de células foi ajustada para 5×10^5 /poço da placa de 96 poços com fundo em “U”. Em seguida foi realizada a marcação das células com CFSE diluído 1:1000, na proporção de 1:1 na suspensão de células. A reação foi bloqueada utilizando-se meio RPMI com 10% de soro fetal bovino. Após lavagem, uma alíquota de células foi analisada por citometria de fluxo, quanto à marcação inicial, utilizada como referência para os resultados obtidos após cultura de sete dias com os estímulos específico e inespecífico. Foram analisados aproximadamente 10000 eventos de cada estímulo, em triplicata.

Inicialmente os resultados obtidos após cultura, utilizando os estímulos (PhA e antígeno purificado de *E. canis*) e os controles (RPMI e células de cultivo de *E. canis*), não demonstraram proliferação celular comparativamente a marcação inicial. Também não foi observada proliferação celular entre os estímulos e entre animais dos grupos infectados e controles, como observado na figura 12. Foram realizados testes paralelos para ajustar as condições da reação objetivando verificar a proliferação de PBMC de cães. Foram testadas diferentes concentrações dos estímulos em cultura de células de cães e também em células de outras espécies animais. Os estímulos inespecíficos funcionaram em ensaios de outras espécies. Diferentes tempos de cultura foram testados (de 3 a 12 dias) quanto à proliferação celular, porém não demonstraram resultados satisfatórios (Figura 12). As condições de cultivo, tipo de meio de cultura e a concentração de soro fetal bovino também foram testados com amostras de cães e todas as condições foram satisfatórias, demonstrando proliferação em linfócitos de cães, estimulados com PhA, comparativamente ao controle (meio RPMI). As amostras obtidas nos 112 dpi, tanto dos animais infectados como dos controles, foram analisadas após os testes das

condições de cultura, e demonstraram proliferação sob estímulo policlonal com PhA, frente ao controle utilizando-se meio RPMI. Porém nenhuma das amostras de linfócitos dos cães infectados e controles mostrou proliferação frente ao estímulo antígeno específico e ao antígeno purificado de células não infectadas (controle) (Figura 13). Nos outros momentos novamente não foram observadas diferenças entre os estímulos e controles em todas as amostras testadas, não sendo possível a avaliação da proliferação de linfócitos frente a estímulo específico e inespecífico durante o curso da infecção (até 364 dpi).

Figura 12 – Ensaio de proliferação com CFSE do 14º dpi, após sete dias de cultura, de um cão controle e um cão infectado. Linha preta: células não marcadas; linha cinza: células recém marcadas ou pré-cultura; linha vermelha: células pós-cultura. *PHA* = phytohemagglutinin *Ag* = antígenos purificados de *E. canis*; *Cel* = antígenos purificados de células de cultivo de *E. canis* (DH82), utilizados como controle do antígeno específico

Figura 13 - Ensaio de proliferação com CFSE do 112° dpi, após sete dias de cultura, de um cão controle e um cão infectado

4.8 DOSAGEM DE CITOCINAS SÉRICAS

As amostras de soro mantidas a -20°C até uso foram processadas para determinação da concentração das citocinas IL-10, TNF- α e IFN- γ , utilizando-se os kits específicos para dosagem em cães, conforme orientações do fabricante (R&D Systems, MN, EUA). O coeficiente de correlação obtido para os kits foi de aproximadamente 0,99 (R).

As concentrações séricas de IL-10, TNF- α e IFN- γ , foram determinadas em oito momentos durante o período experimental.

A avaliação dos níveis de IL-10 demonstrou elevação evidente em um dos cães dos grupos I e III, ao longo da infecção. O aumento de IL-10, no grupo I foi observado apenas ao final do experimento, nos 364 dpi, no cão 12. No grupo III, um animal apresentou uma concentração sérica de IL-10 muito elevada aos 14 dpi (1026,7 pg/mL), permanecendo em níveis altos até o momento do seu óbito (Figura14; Apêndice L).

Figura 14 – Concentrações séricas de IL-10 nos cães dos grupos infectados (I, II e III) e controle (IV e V), durante o período experimental

Os cães do grupo I apresentaram um aumento discreto nos níveis séricos de TNF- α no sétimo dpi e novamente aos 84 e 168 dpi. Houve uma redução nos dois cães do grupo aos 42 dpi. Os grupos II e IV apresentaram pouca variação da concentração sérica de TNF- α durante o período experimental, ocorrendo apenas pequena elevação no sétimo dpi em um cão (10) do grupo II, e aos 42 ou 168 dpi em cães (14 e 11) do grupo IV (Figura 15; Apêndice M).

Um animal do grupo III (cão 4) apresentou pico significativo de elevação aos 21 dpi (65,9 pg/mL), que declinou aos 42 dpi, próximo ao óbito do mesmo, aos 56 dpi. Outro cão desse grupo (cão 5) apresentou elevação aos 42 dpi (41,8 pg/mL) e novamente aos 168 dpi, embora mais discreto (Figura 15).

No grupo V observa-se elevação discreta dos níveis de TNF- α a partir de 42-84 dpi, porém evidente nos três cães somente aos 168 dpi, embora ocorra variação durante todo o período experimental (Figura 15).

Figura 15 – Concentrações séricas de TNF- α nos cães dos grupos infectados (I, II e III) e controle (IV e V), durante o período experimental

A dosagem dos níveis séricos de IFN- γ revelou algumas diferenças entre os grupos. Nos cães do grupo I houve um aumento aos 21 dpi (501,5 e 540,6 pg/mL), que persistiu em um dos animais (cão 8) até os 112 dpi, enquanto no outro cão (12) ocorreu nova elevação somente aos final do experimento, aos 364 dpi.

Nos grupos reinfestados com carrapatos, tanto infectado (G-II) como controle (G-IV), os níveis de IFN- γ apresentaram pouca variação ao longo do período experimental.

Os três cães do grupo III apresentaram aumento discreto dos níveis séricos de IFN- γ no 21º dpi. Um dos animais (cão 4) manteve a elevação até o 28º dpi, porém apresentou uma redução nos níveis dessa citocina sérica no dia do seu óbito (56 dpi).

Nos grupos infectados e no grupo controle reinfestado com carrapatos, houve uma tendência a redução nos níveis séricos de IFN- γ ao longo da infecção.

Um cão do grupo controle (G-V) apresentou níveis séricos de IFN- γ mais elevados que os outros cães do grupo durante praticamente todo o período experimental, apresentando apenas um momento de redução, aos 196 dpi. Conforme observa-se na figura 16 (Apendice N).

Figura 16 – Concentrações séricas de IFN- γ nos cães dos grupos infectados (I, II e III) e controle (IV e V), durante o período experimental

4.9 AVALIAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T E CITOCINAS INTRACELULARES

As amostras de PBMC obtidas de sangue fresco dos cães infectados e controles nos dias zero, 28 e 252 após infecção, foram processadas para determinação de porcentagens de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, assim como a relação entre estas subpopulações (Apêndice O). Os resultados obtidos demonstraram uma redução na relação CD4:CD8 aos 28 dpi, nos grupos infectados, em relação aos controles. Essa redução mostrou-se ser devido a uma mais expressiva diminuição na porcentagem de linfócitos T CD4, mas também a uma elevação dos linfócitos T CD8. Aos 252 dpi, houve elevação na porcentagem de linfócitos T CD4 (Figura 17), nos animais dos grupos infectados, o que levou ao aumento na relação CD4:CD8 para próximo dos valores pré-infecção. Porém houve também um aumento na porcentagem de linfócitos T CD8 nos grupos I e II, e uma discreta redução no grupo III (Figura 18). Conseqüentemente, pode-se observar que a relação CD4:CD8 não apresentou uma elevação significativa no dia 252 (Figura 19). A redução mais evidente de linfócitos T CD4 foi observada em um cão do grupo III (cão 4), que veio a óbito e em um cão do grupo II (cão 15).

Um cão do grupo I apresentou linfocitose progressiva que coincidiu com uma elevação da subpopulação de linfócitos T CD8⁺, como observado na figura 20.

Figura 17 – Porcentagem da subpopulação de linfócitos T CD4⁺ no sangue periférico dos cães dos grupos infectados e controle, durante o período experimental

Figura 18 - Porcentagem da subpopulação de linfócitos T CD8+ no sangue periférico dos cães dos grupos infectados e controle, durante o período experimental

Figura 19 – Valores médios da relação CD4:CD8 nos cães dos grupos infectados e controle, durante o período experimental (dias 0, 28 e 252)

Figura 20 – Percentagem de linfócitos T CD4 e CD8 do animal 8 (grupo I), ao longo da infecção

A avaliação das citocinas intracelulares produzidas pelos linfócitos T CD4+ e CD8+ foi realizada frente à estimulação inespecífica (PMA-ionomicina) e específica (antígenos purificados de *E. canis*), comparativamente ao controle (RPMI). As diferenças entre estímulos e entre os grupos infectados e não infectados não foram evidentes em qualquer dos momentos analisados (Figuras 21, 22, 23, 24; Apêndice P).

Figura 21 – Percentagem de células T CD4 positivas para IFN-γ nos animais dos grupos experimentais ao longo da infecção. Os símbolos •; ■; ▲ representam o primeiro, segundo e terceiro cão de cada grupo, respectivamente

Figura 22 – Porcentagem de células T CD8 positivas para IFN- γ nos animais dos grupos experimentais ao longo da infecção. Os símbolos •; ■; ▲ representam o primeiro, segundo e terceiro cão de cada grupo, respectivamente

Figura 23 – Porcentagem de células T CD4 positivas para IL-4 nos animais dos grupos experimentais ao longo da infecção. Os símbolos •; ■; ▲ representam o primeiro, segundo e terceiro cão de cada grupo, respectivamente

Figura 24 – Porcentagem de células T CD8 positivas para IL-4 nos animais dos grupos experimentais ao longo da infecção. Os símbolos •; ■; ▲ representam o primeiro, segundo e terceiro cão de cada grupo, respectivamente

Três cães (7, 9 e 15) que permaneceram negativos na pesquisa de fragmento de DNA de *E. canis* por PCR e com títulos abaixo de 40 para anticorpos anti-*E. canis*, na primeira tentativa de infecção via carrapatos, apresentaram uma maior proporção de linfócitos T CD4 que expressavam tanto IFN- γ quanto IL-4 intracelular, previamente a tentativa de infecção, no dia zero (Figura 25). O cão 5 também apresentou maior proporção de linfócitos T CD4 produtores de IFN- γ no dia zero, porém não apresentou produção tão significativa desses linfócitos produtores de IL-4, sendo um dos cães inoculados por via intravenosa. Esses cães também demonstraram maior quantidade de linfócitos T CD8 expressando IL-4 intracelular, porém dois dos três cães tiveram maior proporção desses linfócitos que foram marcados para IFN- γ intracelular (Figura 26). Entretanto, uma diferença na proporção das subpopulações de linfócitos desses cães em relação aos demais não foi evidente (Figura 27).

Figura 25 – Porcentagem de linfócitos T CD4+ expressando IFN- γ e IL-4 intracelular, nos cães no dia 0 (zero), previamente a infecção experimental

Figura 26 – Porcentagem de linfócitos T CD8+ expressando IFN- γ e IL-4 intracelular, nos cães no dia 0 (zero), previamente a infecção experimental

Figura 27 - Porcentagem de linfócitos T CD4+ e CD8+ nos cães no dia 0 (zero), previamente a infecção experimental

5 DISCUSSÃO

A infecção experimental de cães através de infestação com *R. sanguineus* infectados com *E. canis* foi comparada a infecção por inoculação intravenosa, utilizada em todos os estudos de erliquiose monocitotrópica canina induzida. Os três cães do grupo infectado por inoculação intravenosa apresentaram manifestações clínicas da doença, soroconverteram e tiveram antígenos específicos detectados no sangue periférico. Entretanto, em cada um dos grupos infestados com carrapatos infectados, um cão não apresentou alterações clínicas e não teve anticorpos ou antígeno de *E. canis* detectados, em duas tentativas de infecção, mesmo utilizando-se seis vezes a quantidade inicial de carrapatos na segunda infestação. Esses cães foram mantidos até o final do experimento, permanecendo livres de infecção.

O acompanhamento da infecção por *E. canis* nos diferentes grupos de cães, inoculados via intravenosa ou pelo vetor *R. sanguineus*, revelou alterações clínicas e imunológicas mais evidentes na fase inicial da doença, que persistiram durante a infecção, embora de forma mais branda.

As manifestações clínicas foram discretas, aparecendo como apatia transitória, disorexia e distúrbios gastrointestinais leves (um a dois episódios de vômito ou diarreia). A apatia e a disorexia foram as alterações clínicas mais evidentes, podendo estar associadas à elevação da temperatura retal apresentada pelos cães infectados, nessa fase inicial da doença. Essas alterações inespecíficas são descritas frequentemente nos estudos da EMC tanto experimental como de ocorrência natural (HOSKINS, 1991; KEYSARY et al., 1996; NEER; HARRUS, 2006). Os animais infectados pela via de transmissão natural apresentaram anormalidades clínicas mais tardias, porém mais persistentes. Nos cães inoculados pela via intravenosa, as manifestações se mostraram mais intensas, inclusive um animal desse grupo veio a óbito, com febre, anorexia, apatia grave, petéquias na região inguinal, mucosa jugal e na íris. A ulceração mucosa apresentada por esse cão pode ser um indício de prejuízo da função renal, que pode ocorrer em cães com erliquiose (CODNER; MASLIN, 1992; LUCKSCHANDER; KLEITER; WILLMANN, 2003).

As alterações hematológicas foram observadas no início da infecção, nos três grupos infectados. Ocorreram reduções em todas as linhagens de células

sanguíneas. A série vermelha e a série branca tiveram os valores globais diminuídos, bem evidenciados na fase aguda da infecção, embora possam ser observadas flutuações ao longo da infecção. A redução na contagem de leucócitos foi decorrente de uma discreta diminuição tanto de neutrófilos segmentados quanto de linfócitos. Um dos cães do grupo infectado por carrapato apresentou linfocitose progressiva a partir dos 140 dias de infecção, persistindo até o final do experimento. Neste cão observa-se também um aumento na porcentagem da subpopulação de linfócitos T CD8 ao longo do experimento, porém, embora sugestivo, não é possível concluir que a linfocitose seja decorrente do aumento dessa subpopulação de linfócitos T, visto que não foi realizada marcação específica para outros linfócitos do sangue periférico, como linfócitos B, assim como parece ser uma tendência dos grupos infectados via carrapato (Figura 18). A contagem de plaquetas variou nos grupos experimentais, podendo observar-se uma redução mais evidente na fase aguda da doença. A trombocitopenia é descrita como alteração hematológica mais evidente da erliquiose canina (KEYSARY et al., 1996; COHN, 2003; NEER; HARRUS, 2006), porém muitos fatores relacionados à obtenção e conservação da amostra de sangue, assim como ao desenvolvimento da técnica laboratorial, podem ser causas iatrogênicas da redução da contagem total de plaquetas. Desta forma alguns animais não infectados podem apresentar redução nos valores de plaquetas, como observado nos grupos controle.

As alterações hematológicas foram mais precoces e menos persistentes nos cães infectados por via intravenosa quando comparados aos cães dos grupos infectados via vetor, o que pode ser explicado pelo acesso mais direto do agente a circulação sanguínea, possibilitando uma disseminação mais rápida. Entre os grupos infectados pelo vetor, não foram observadas diferenças significativas, demonstrando que as reinfestações com carrapatos livres de infecção não afetam a contagem de células sanguíneas de forma evidente.

Os resultados obtidos da amplificação do fragmento do gene *dsb* de *E. canis* através da técnica de Real-Time PCR foram utilizados para determinar uma quantificação relativa do agente no sangue e carrapatos infectados experimentalmente. A análise dos resultados demonstrou uma contínua proporção de antígeno circulante na fase inicial da doença, durante o período em que as alterações clínicas, hematológicas e imunológicas se tornaram evidentes. Entretanto, durante o curso da doença, alguns cães infectados apresentaram momentos em que

não foi possível obter amplificação de fragmentos de DNA específicos de *E. canis*. Portanto, a riquetsemia detectável foi transitória ao longo da infecção, algumas vezes mostrando-se negativa para DNA de *E. canis*, embora tenha sido persistente até o final do experimento aos 364 dpi. Em um experimento realizado recentemente foi feita a quantificação absoluta de fragmentos do gene 16sRNA de *E. canis* em amostras de sangue e baço de cães natural e experimentalmente infectados, demonstrando maior quantidade do agente inicialmente no baço, embora detectável também no sangue, já aos sete dias de infecção (BANETH et al., 2008).

A detecção do agente em carrapatos alimentados nos cães infectados via vetor foi observada em um dos cães do grupo II, em quatro momentos ao longo da infecção, podendo-se verificar a possibilidade de infecção dos carrapatos mesmo após a fase aguda da doença, discordando de alguns ensaios que analisam a transmissão apenas pela manifestação da doença nos cães infestados, que não é sensível para identificação da infecção (LEWIS et al., 1977). O ciclo da erliquia no carrapato não é bem compreendido, sendo sugerido em um experimento que a alimentação do vetor pode ser necessária (ao menos parcialmente) para a amplificação do agente e, portanto, sua transmissão (SMITH et al., 1976). Embora não tenham sido realizados estudos quantitativos para confirmar esses dados, esse pode ser um dos indícios para justificar a baixa taxa de detecção do agente em carrapatos ao longo da infecção, além das causas relacionadas à sensibilidade dos métodos utilizados para obtenção e amplificação do fragmento escolhido do DNA da *E. canis*.

A quantidade de agente detectável no sangue circulante dos cães infectados não está relacionada à infecção de carrapatos, visto que carrapatos positivos foram obtidos de momentos de não detecção do agente circulante. A quantificação do agente nos carrapatos em alguns momentos demonstrou um nível de riquetsemia maior em relação ao sangue no momento de alimentação desses carrapatos. No entanto, essas informações devem ser interpretadas com cautela, uma vez que a detecção de *E. canis* no sangue canino refere-se a apenas aquele momento em que o sangue foi colhido, ao passo que cada ninfa de *R. sanguineus* permaneceu em torno de 4 dias se alimentando do sangue do cão, quando pode ter sido desafiada com diferentes graus de riquetsemia.

Todos os cães infectados soroconverteram aos 14 dpi, independente da via de infecção, semelhante aos resultados obtidos em outros trabalhos com infecção

experimental, que relatam a detecção de anticorpos anti-*E. canis* entre sete e 28 dias de infecção (HARRUS et al., 1998b; MURPHY, G. L. et al., 1998; NEER; HARRUS, 2006). Os animais mantiveram títulos de anticorpos entre 10240 e 81920 que persistiram durante todo o período experimental (364 dias). Esses resultados em conjunto com a persistente riquetsemia demonstrada pela amplificação de fragmentos de DNA de *E. canis*, indicam que o agente induz a uma infecção persistente, como demonstrado em experimento a longo prazo (34 meses), com cães assintomáticos (HARRUS et al., 1998b).

Na fase inicial da infecção foi evidente uma redução na relação CD4:CD8 associada a uma diminuição da subpopulação de linfócitos T CD4, mas também a um aumento menos evidente da subpopulação de linfócitos T CD8. Essas alterações foram evidentes nos três grupos infectados, porém nos cães do grupo infectado via intravenosa ocorreu uma recuperação dessas anormalidades aos 252 dpi, enquanto nos grupos infectados via vetor as alterações apresentaram uma discreta recuperação embora permanecessem evidentes. Esses resultados revelam anormalidades mais persistentes em cães infectados via carrapatos, sugerindo a participação do vetor na evolução do processo patológico, na erliquiose canina.

A redução na porcentagem de linfócitos T CD4 durante a fase inicial da doença foi observada também em outros experimentos com *E. canis* e com outras espécies de erliquia (CASTRO, 2004; ISMAIL et al., 2004). Em camundongos inoculados com amostra altamente virulenta de erliquia a infecção letal foi associada à redução na resposta proliferativa de linfócitos T CD4, assim como a expansão dessas células foi correlacionada com a sobrevivência de animais infectados, auxiliando a eliminação do agente infeccioso (GANTA et al., 2002; ISMAIL et al., 2004). De forma semelhante, um dos cães do experimento, que veio a óbito, coincidentemente apresentou redução mais intensa dessa subpopulação de linfócitos T durante a fase inicial da infecção, o que pode sugerir uma semelhança nos mecanismos imunopatogênicos entre essas erliquias.

A proporção de células marcadas para citocina intracelular, assim como a determinação da concentração sérica de citocinas devem ser interpretadas com cautela devido à susceptibilidade da resposta imune a fatores individuais e ambientais, associados à utilização de um baixo número de animais por grupo experimental.

Uma análise individual permitiu verificar alterações mais evidentes no cão 4, inoculado por via intravenosa e que veio a óbito durante o experimento. Este animal apresentou elevação significativa nas concentrações séricas de IL-10 a partir de 14 dias da infecção, e de TNF- α aos 21 dpi, persistindo até o óbito. Um aumento discreto ocorreu nas concentrações de IFN- γ a partir de 21 dpi, mas declinou significativamente anterior ao óbito. Em camundongos infectados com amostras de erliquia de diferentes graus de virulência, o aumento de TNF- α ocorreu próximo ao óbito dos animais e foi associado à maior virulência da amostra. A maior parte dessa citocina foi produzida por linfócitos T CD8 (60%). Um aumento de células produtoras de TNF- α e da concentração sérica foi fortemente associado a doença grave e fatal, enquanto uma produção mínima de TNF- α relaciona-se a doença moderada e sobrevivência a longo prazo (ISMAIL et al., 2004). Embora não tenha sido tão evidente nos outros grupos experimentais, as manifestações clínicas mais importantes observadas nesses cães poderiam ser relacionadas aos efeitos sistêmicos de níveis elevados de TNF- α , caracterizados por febre e consequente anorexia e apatia, além de anormalidades hepáticas que podem justificar o aparecimento de vômitos em alguns cães (HARA, T. et al., 2004). As alterações apresentadas pelo cão próximo ao óbito, inclusive os distúrbios hemorrágicos (petéquias e equimoses) podem ser decorrentes da síndrome semelhante ao choque séptico induzida por TNF- α quando em altos níveis séricos (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000; HARA, T. et al., 2004).

A elevação de IL-10 foi observada na fase inicial da infecção simultaneamente a elevação de TNF- α , no animal que veio a óbito. Ambas citocinas são geralmente produzidas por fagócitos ativados, porém a IL-10 por seu efeito inibitório à produção de IFN- γ , pode justificar a discreta redução dos níveis de IFN- γ no cão 4. Estudos com outras espécies de erliquia demonstram uma redução significativa de IFN- γ em animais com doença grave, que pode ser um efeito de IL-10, assim como a redução na expressão de MHC-II, observada em cães com erliquiose experimentalmente inoculados, que também pode ser induzido por essa citocina (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000; CASTRO, 2004; ISMAIL et al., 2004). As alterações nos níveis de citocinas no cão que manifestou quadro mais grave de erliquiose pode sugerir que fagócitos mononucleares ativados pelo agente produzem IL-10 e TNF- α , gerando modificações sistêmicas na dependência da concentração destas citocinas no

sangue. As alterações clínicas são então induzidas pelo $\text{TNF-}\alpha$, podendo levar o animal a óbito. A elevação de IL-10, por seu efeito inibitório à ativação de fagócitos associado à inibição na produção de $\text{IFN-}\gamma$ e à expressão de MHC-II necessárias à apresentação e eliminação do antígeno, permitiria a manutenção do agente multiplicando-se nessas células. Assim a erliquia pode persistir no organismo e, induzindo desequilíbrio dessas citocinas, levar o hospedeiro ao óbito.

A observação do tempo zero de infecção nos animais que posteriormente mostraram resistência a infecção, quanto aos níveis de subpopulações de linfócitos T CD4 e CD8 marcados para citocinas intracelulares demonstrou haver elevados níveis de linfócitos T CD4 expressando IL-4, mas também $\text{IFN-}\gamma$, e linfócitos T CD8 expressando IL-4, mais evidente nesses cães. Isso pode sugerir que animais com níveis dessas células expressando tais citocinas podem ser resistentes a infecção ou apresentarem doença mais leve e eliminarem o agente.

Embora a avaliação da resposta proliferativa de linfócitos frente a estímulo específico e inespecífico não possa ser determinada durante o curso da infecção experimental, a observação de que a erliquiose não induziu resposta proliferativa antígeno específica em qualquer dos grupos infectados em um dos momentos estudados, corrobora com resultados de outros experimentos que demonstraram menor proliferação especificamente de linfócitos T CD4 por estímulo com amostra mais virulenta de erliquia, em camundongos, que também pode estar relacionado à persistência do agente no organismo, escapando a destruição pelas células do sistema imune (ISMAIL et al., 2004).

6 CONCLUSÕES

Os carrapatos *R. sanguineus* podem transmitir a *E. canis* mesmo quando alimentados em cães infectados após a fase aguda da erliquiose.

Durante o repasto sanguíneo pode ocorrer variável nível de ricketsemia suficiente para a aquisição da infecção pelo vetor.

As alterações clínicas e hematológicas da erliquiose monocitotrópica observadas em cães infectados via carrapato são mais brandas, tardias e persistentes quando comparadas aos cães infectados por inoculação intravenosa de *E. canis*.

A infecção por *E. canis* resulta em uma redução na relação de linfócitos T CD4:CD8, devido à redução mais significativa da subpopulação CD4, mas também a um aumento de CD8, embora mais discreto.

A infecção pelo vetor *R. sanguineus* induz uma redução na relação CD4:CD8 mais persistente ao longo da infecção, comparativamente a infecção por inoculação intravenosa.

A erliquiose canina fatal pode estar associada à intensa elevação de IL-10, aumento de TNF- α e discreta redução de IFN- γ , responsáveis por bloquear a ativação de fagócitos para eliminar o agente e pelas manifestações clínicas graves.

Na erliquiose monocitotrópica canina após a soroconversão, os títulos de anticorpos específicos persistem durante o curso da infecção, apesar da ricketsemia transitória.

As reinfestações com *R. sanguineus* não parecem influenciar o curso da erliquiose monocitotrópica canina.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, K. A.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and molecular immunology**. Philadelphia: W. B. Saunders, 2000. 553 p.
- ALMOSNY, N. R. P. ***Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard, 1935). Avaliação parasitológica, hematológica e bioquímica sérica da fase aguda de cães e gatos experimentalmente infectados**. 1998. 197 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1998.
- ALMOSNY, N. R. P. **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses**. Rio de Janeiro: L. F. Livros, 2002. 135 p.
- AMYX, H. L.; HUXSOLL, D. L.; ZEILER, D. C.; HILDEBRANDT, P. K. Therapeutic and prophylactic value of tetracycline in dogs infected with the agent of tropical canine pancytopenia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 159, n. 11, p. 1428-1432, 1971.
- BANETH, G.; HARRUS, S.; OHNONA, F. S.; SCHLESINGER, Y. Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection. **Veterinary Microbiology**, v., n., p., 2008.
- BANETH, G.; WANER, T.; KOPLAH, A.; WEINSTEIN, S.; KEYSARY, A. Survey of *Ehrlichia canis* antibodies among dogs in Israel. **The Veterinary Record**, v. 138, n. 11, p. 257-259, 1996.
- 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. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 10, n. 4, p. 271-274, 1996.
- BIRGEL, E. H. Hematologia clínica veterinária. In: Birgel, E. H. e Benesi, F. J. **Patologia clínica veterinária**. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982. p. 2-34.
- BITSAKTSIS, C.; HUNTINGTON, J.; WINSLOW, G. Production of IFN-gamma by CD4 T cells is essential for resolving ehrlichia infection. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 11, p. 6894-6901, 2004.
- BRADHAM, C. A.; PLUMPE, J.; MANNS, M. P.; BRENNER, D. A.; TRAUTWEIN, C. Mechanisms of hepatic toxicity. I. TNF-induced liver injury. **American Journal of Physiology**, v. 275, n. 3 pt. 1, p. G387-392, 1998.
- 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. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 2, p. 362-368, 1998.

BUHLES JR., W. C.; HUXSOLL, D. L.; HILDEBRANDT, P. K. Tropical canine pancytopenia: role of aplastic anemia in the pathogenesis of severe disease. **Journal of Comparative Pathology**, v. 85, n. 4, p. 511-521, 1975.

BUHLES JR., 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. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 130, n. 4, p. 357-367, 1974.

BULLA, C.; KIOMI TAKAHIRA, R.; PESSOA ARAUJO JR., J.; APARECIDATRINCA, L.; SOUZA LOPES, R.; WIEDMEYER, C. E. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Veterinary Research**, v. 35, n. 1, p. 141-146, 2004.

CASTRO, M. B. **Avaliação histopatológica e caracterização imunoistoquímica das células mononucleares em órgãos linfóides e lesões na infecção aguda experimental em cães por *Ehrlichia canis***. 2004. 75 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária - Área de Concentração: Patologia Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

CODNER, E. C.; FARRIS-SMITH, L. L. Characterization of the subclinical phase of ehrlichiosis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 189, n. 1, p. 47-50, 1986.

CODNER, E. C.; CACECI, T.; SAUNDERS, G. K.; SMITH, C. A.; ROBERTSON, J. L.; MARTIN, R. A.; TROY, G. C. Investigation of glomerular lesions in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 12, p. 2286-2291, 1992.

CODNER, E. C.; MASLIN, W. R. Investigation of renal protein loss in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 3, p. 294-299, 1992.

CODNER, E. C.; ROBERTS, R. E.; AINSWORTH, A. G. Atypical findings in 16 cases of canine ehrlichiosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 186, n. 2, p. 166-169, 1985.

COHN, L. A. Ehrlichiosis and related infections. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 33, n. 4, p. 863-884, 2003.

COSTA, J. O.; AL, E. *Ehrlichia canis* infection in dogs in Belo Horizonte - Brazil. **Arquivos da Escola Superior de Veterinaria da Universidade de Minas Gerais**, v. 25, n. 2, p. 185-197, 1973.

DAGNONE, A. S.; DE 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. **Veterinary Parasitology**, v. 117, n. 4, p. 285-290, 2003.

DAVIDSON JR., D. E.; DILL JR., G. S.; TINGPALAPONG, M.; PREMABUTRA, S.; NGUEN, P. L.; STEPHENSON, E. H.; RISTIC, M. Prophylactic and therapeutic use of tetracycline during an epizootic of ehrlichiosis among military dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 172, n. 6, p. 697-700, 1978.

DOYLE, C. K.; LABRUNA, M. B.; BREITSCHWERDT, E. B.; TANG, Y. W.; CORSTVET, R. E.; HEGARTY, B. C.; BLOCH, K. C.; LI, P.; WALKER, D. H.; MCBRIDE, J. W. Detection of medically important *Ehrlichia* by quantitative multicolor TaqMan real-time polymerase chain reaction of the *dsb* gene. **Journal of Molecular Diagnostic**, v. 7, n. 4, p. 504-510, 2005.

DUMLER, J. S. Is human granulocytic ehrlichiosis a new Lyme disease? Review and comparison of clinical, laboratory, epidemiological, and some biological features. **Clinical Infectious Diseases**, v. 25, p. S43-47, 1997. Supplement, 1.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 2145-2165, 2001. Pt. 6.

DUMLER, J. S.; SUTKER, W. L.; WALKER, D. H. Persistent infection with *Ehrlichia chaffeensis*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 903-905, 1993.

EDDLESTONE, S. M.; NEER, T. M.; GAUNT, S. D.; CORSTVET, R.; GILL, A.; HOSGOOD, G.; HEGARTY, B.; BREITSCHWERDT, E. B. Failure of imidocarb dipropionate to clear experimentally induced *Ehrlichia canis* infection in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 4, p. 840-844, 2006.

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.

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

GANTA, R. R.; CHENG, C.; WILKERSON, M. J.; CHAPES, S. K. Delayed clearance of *Ehrlichia chaffeensis* infection in CD4⁺ T-cell knockout mice. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 1, p. 159-167, 2004.

GANTA, R. R.; WILKERSON, M. J.; CHENG, C.; ROKEY, A. M.; CHAPES, S. K. Persistent *Ehrlichia chaffeensis* infection occurs in the absence of functional major histocompatibility complex class II genes. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 1, p. 380-388, 2002.

GAUNT, S. D.; CORSTVET, R. E.; BERRY, C. M.; BRENNAN, B. Isolation of *Ehrlichia canis* from dogs following subcutaneous inoculation. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 6, p. 1429-1432, 1996.

GREENE, C. E.; HARVEY, J. W. Canine Ehrlichiosis. In: Greene, C. E. **Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1984. p. 545-561

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

GRUSBY, M. J.; JOHNSON, R. S.; PAPAIOANNOU, V. E.; GLIMCHER, L. H. Depletion of CD4+ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice. **Science**, v. 253, n. 5026, p. 1417-1420, 1991.

HARA, T.; ANDO, K.; TSURUMI, H.; MORIWAKI, H. Excessive production of tumor necrosis factor-alpha by bone marrow T lymphocytes is essential in causing bone marrow failure in patients with aplastic anemia. **European Journal of Haematology**, v. 73, n. 1, p. 10-16, 2004.

HARRUS, S.; BARK, H.; WANER, T. Canine monocytic ehrlichiosis: an update. **Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 19, n. 4, p. 431-441, 1997.

HARRUS, S.; KASS, P. H.; KLEMENT, E.; WANER, T. Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. **The Veterinary Record**, v. 141, n. 14, p. 360-363, 1997.

HARRUS, S.; KENNY, M.; MIARA, L.; AIZENBERG, I.; WANER, T.; SHAW, S. Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment of experimental *Ehrlichia canis* infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 11, p. 4488-4490, 2004.

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

HARRUS, S.; WANER, T.; AIZENBERG, I.; FOLEY, J. E.; POLAND, A. M.; BARK, H. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 73-76, 1998b.

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

HARRUS, S.; WANER, T.; BARK, H.; JONGEJAN, F.; CORNELISSEN, A. W. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 9, p. 2745-2749, 1999.

HARRUS, S.; WANER, T.; KEYSARY, A.; AROCH, I.; VOET, H.; BARK, H. Investigation of splenic functions in canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 62, n. 1, p. 15-27, 1998c.

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

HEEB, H. L.; WILKERSON, M. J.; CHUN, R.; GANTA, R. R. Large granular lymphocytosis, lymphocyte subset inversion, thrombocytopenia, dysproteinemia, and positive Ehrlichia serology in a dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 39, n. 4, p. 379-384, 2003.

HORIUCHI, Y.; NAKAJIMA, Y.; NARIAI, Y.; ASANUMA, H.; KUWABARA, M.; YUKAWA, M. Th1/Th2 balance in canine peripheral blood lymphocytes--a flow cytometric study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 118, n. 3-4, p. 179-185, 2007.

HOSKINS, J. D. Ehrlichial diseases of dogs: diagnosis and treatment. **Canine Practice**, v. 16, n. 3, p. 13-21, 1991.

HUXSOLL, D. L.; HILDEBRANDT, P. K.; NIMS, R. M.; AMYX, H. L.; FERGUSON, J. A. Epizootiology of tropical canine pancytopenia. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 6, n. 4, p. 220-225, 1970a.

HUXSOLL, D. L.; HILDEBRANDT, P. K.; NIMS, R. M.; WALKER, J. S. Tropical canine pancytopenia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 157, n. 11, p. 1627-1632, 1970b.

IMMELMAN, A.; BUTTON, C. *Ehrlichia canis* infection. (Tropical canine pancytopenia or canine rickettsiosis). **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 44, n. 3, p. 241-245, 1973.

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

ISMAIL, N.; SOONG, L.; MCBRIDE, J. W.; VALBUENA, G.; OLANO, J. P.; FENG, H. M.; WALKER, D. H. Overproduction of TNF-alpha by CD8+ type 1 cells and down-regulation of IFN-gamma production by CD4+ Th1 cells contribute to toxic shock-like syndrome in an animal model of fatal monocytotropic ehrlichiosis. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 3, p. 1786-1800, 2004.

ISMAIL, N.; WALKER, D. H. Balancing protective immunity and immunopathology: a unifying model of monocytotropic ehrlichiosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1063, p. 383-394, 2005.

KAKOMA, I.; CARSON, C. A.; RISTIC, M.; HUXSOLL, D. L.; STEPHENSON, E. H.; NYINDO, M. B. Autologous lymphocyte-mediated cytotoxicity against monocytes in canine ehrlichiosis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, n. 10, p. 1557-1559, 1977.

KEYSARY, A.; WANER, T.; ROSNER, M.; WARNER, C. K.; DAWSON, J. E.; ZASS, R.; BIGGIE, K. L.; HARRUS, S. The first isolation, in vitro propagation, and genetic characterization of *Ehrlichia canis* in Israel. **Veterinary Parasitology**, v. 62, n. 3-4, p. 331-340, 1996.

KUEHN, N. F.; GAUNT, S. D. Clinical and hematologic findings in canine ehrlichiosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 186, n. 4, p. 355-358, 1985.

LABARTHE, N.; DE CAMPOS PEREIRA, M.; BARBARINI, O.; MCKEE, W.; COIMBRA, C. A.; HOSKINS, J. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* infections in Brazil. **Veterinary Therapeutics**, v. 4, n. 1, p. 67-75, 2003.

LABRUNA, M. B.; MCBRIDE, J. W.; CAMARGO, L. M.; AGUIAR, D. M.; YABSLEY, M. J.; DAVIDSON, W. R.; STROMDAHL, E. Y.; WILLIAMSON, P. C.; STICH, R. W.; LONG, S. W.; CAMARGO, E. P.; WALKER, D. H. A preliminary investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 189-195, 2007.

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

LEE, E. H.; RIKIHISA, Y. Anti-*Ehrlichia chaffeensis* antibody complexed with *E. chaffeensis* induces potent proinflammatory cytokine mRNA expression in human monocytes through sustained reduction of kappaB-alpha and activation of NF-kappaB. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 7, p. 2890-2897, 1997.

LEWIS JR., G. E.; RISTIC, M.; SMITH, R. D.; LINCOLN, T.; STEPHENSON, E. H. The brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* and the dog as experimental hosts of *Ehrlichia canis*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, n. 12, p. 1953-1955, 1977.

LI, J. S.; WINSLOW, G. M. Survival, replication, and antibody susceptibility of *Ehrlichia chaffeensis* outside of host cells. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 8, p. 4229-4237, 2003.

LUCKSCHANDER, N.; KLEITER, M.; WILLMANN, M. [Renal amyloidosis caused by *Ehrlichia canis*]. **Schweizer Archiv für Tierheilkunde**, v. 145, n. 10, p. 482-485, 2003.

MACHADO, R. Z. Ehrlichiose canina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 53-57, 2004. Supplement.

MATHEW, J. S.; EWING, S. A.; BARKER, R. W.; FOX, J. C.; DAWSON, J. E.; WARNER, C. K.; MURPHY, G. L.; KOCAN, K. M. Attempted transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* after passage in cell culture. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 11, p. 1594-1598, 1996.

MATUS, R. E.; LEIFER, C. E.; HURVITZ, A. I. Use of plasmapheresis and chemotherapy for treatment of monoclonal gammopathy associated with *Ehrlichia canis* infection in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 190, n. 10, p. 1302-1304, 1987.

MCBRIDE, J. W.; CORSTVET, R. E.; GAUNT, S. D.; CHINSANGARAM, J.; AKITA, G. Y.; OSBURN, B. I. PCR detection of acute *Ehrlichia canis* infection in dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 8, n. 4, p. 441-447, 1996.

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

MURPHY, G. L.; EWING, S. A.; WHITWORTH, L. C.; FOX, J. C.; KOCAN, A. A. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. **Veterinary Parasitology**, v. 79, n. 4, p. 325-339, 1998.

MYLONAKIS, M. E.; KOUTINAS, A. F.; BILLINIS, C.; LEONTIDES, L. S.; KONTOS, V.; PAPADOPOULOS, O.; RALLIS, T.; FYTIANOU, A. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. **Veterinary Microbiology**, v. 91, n. 2-3, p. 197-204, 2003.

MYLONAKIS, M. E.; KOUTINAS, A. F.; BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; BILLINIS, C. D.; LEONTIDES, L. S.; KONTOS, V. S. Chronic Canine Ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): A Retrospective Study of 19 Natural Cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 40, n. 3, p. 174-184, 2004.

NEER, T. M.; EDDLESTONE, S. M.; GAUNT, S. D.; CORSTVET, R. E. Efficacy of enrofloxacin for the treatment of experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, n. 5, p. 501-504, 1999.

NEER, T. M.; HARRUS, S. Ehrlichiosis, Neorickettsiosis, Anaplasmosis, and Wolbachia Infection - Canine Monocytotropic Ehrlichiosis and Neorickettsiosis (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ruminantium*, *N. sennetsu*, and *N. risticii* Infections). In: Greene, C. E. **Infectious Diseases in the dog and cat**. St. Louis: W.B. Saunders Company, v., 2006. p. 203-216

NYINDO, M.; HUXSOLL, D. L.; RISTIC, M.; KAKOMA, I.; BROWN, J. L.; CARSON, C. A.; STEPHENSON, E. H. Cell-mediated and humoral immune responses of German Shepherd Dogs and Beagles to experimental infection with *Ehrlichia canis*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, n. 2, p. 250-254, 1980.

PEREZ, M.; BODOR, M.; ZHANG, C.; RIKIHISA, Y. *Ehrlichia canis* detection in symptomatic humans in Venezuela. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON RICKETTSIAE AND RICKETTSIAL DISEASES, 4., 2005, Logroño, Espanha. **Abstract**. 2005. 45p.

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

PERILLE, A. L.; MATUS, R. E. Canine ehrlichiosis in six dogs with persistently increased antibody titers. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 5, n. 3, p. 195-198, 1991.

REARDON, M. J.; PIERCE, K. R. Acute experimental canine ehrlichiosis. II. Sequential reaction of the hemic and lymphoreticular system of selectively immunosuppressed dogs. **Veterinary Pathology**, v. 18, n. 3, p. 384-395, 1981.

RIKIHISA, Y. Ehrlichia subversion of host innate responses. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 95-101, 2006.

RISTIC, M.; HOLLAND, C. H. Canine ehrlichiosis. In: Woldehiwet, Z. e Ristic, M. **Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals**. New York: Pergamon Press, 1993. p. 169-186

SAINZ, A.; TESOURO, M. A.; AMUSATEGUI, I.; RODRIGUEZ, F.; MAZZUCHELLI, F.; RODRIGUEZ, M. Prospective comparative study of 3 treatment protocols using doxycycline or imidocarb dipropionate in dogs with naturally occurring ehrlichiosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 14, n. 2, p. 134-139, 2000.

SANGIONI, L. A.; HORTA, M. C.; VIANNA, M. C.; GENNARI, S. M.; SOARES, R. M.; GALVAO, M. A.; SCHUMAKER, T. T.; FERREIRA, F.; VIDOTTO, O.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 265-270, 2005.

SHIBATA, S.; KAWAHARA, M.; RIKIHISA, Y.; FUJITA, H.; WATANABE, Y.; SUTO, C.; ITO, T. New Ehrlichia species closely related to *Ehrlichia chaffeensis* isolated from *Ixodes ovatus* ticks in Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 1331-1338, 2000.

SMITH, R. D.; SELLS, D. M.; STEPHENSON, E. H.; RISTIC, M. R.; HUXSOLL, D. L. Development of *Ehrlichia canis*, causative agent of canine ehrlichiosis, in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and its differentiation from a symbiotic Rickettsia. **American Journal of Veterinary Research**, v. 37, n. 2, p. 119-126, 1976.

SZABO, M. P.; CASTAGNOLLI, K. C.; SANTANA, D. A.; DE CASTRO, M. B.; ROMANO, M. A. *Amblyomma cajennense* ticks induce immediate hypersensitivity in horses and donkeys. **Experimental & Applied Acarology**, v. 33, n. 1-2, p. 109-117, 2004.

TAJIMA, T.; RIKIHISA, Y. Cytokine responses in dogs infected with *Ehrlichia canis* Oklahoma strain. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1063, p. 429-432, 2005.

TRAPP, S. M.; DAGNONE, A. S.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R. L.; AMUDE, A. M.; DE MORAIS, H. S. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 3-4, p. 223-230, 2006.

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

VAN HEERDEN, J.; REYERS, F.; STEWART, C. G. Treatment and thrombocyte levels in experimentally induced canine ehrlichiosis and canine babesiosis. **The Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 50, n. 4, p. 267-270, 1983.

VAN HEERDEN, J.; VAN HEERDEN, A. Attempted treatment of canine ehrlichiosis with imidocarb dipropionate. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 52, n. 3, p. 173-175, 1981.

VINASCO, J.; LI, O.; ALVARADO, A.; DIAZ, D.; HOYOS, L.; TABACHI, L.; SIRIGIREDDY, K.; FERGUSON, C.; MORO, M. H. Molecular evidence of a new strain of *Ehrlichia canis* from South America. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 8, p. 2716-2719, 2007.

WANER, T.; HARRUS, S.; BARK, H.; BOGIN, E.; AVIDAR, Y.; KEYSARY, A. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 69, p. 307-317, 1997.

WANER, T.; HARRUS, S.; JONGEJAN, F.; BARK, H.; KEYSARY, A.; CORNELISSEN, A. W. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 1, p. 1-15, 2001.

WANER, T.; ROSNER, M.; HARRUS, S.; NAVEH, A.; ZASS, R.; KEYSARY, A. Detection of ehrlichial antigen in plasma of beagle dogs with experimental acute *Ehrlichia canis* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 63, n. 3-4, p. 331-335, 1996.

WANER, T.; STRENGER, C.; KEYSARY, A.; HARRUS, S. Kinetics of serologic cross-reactions between *Ehrlichia canis* and the *Ehrlichia phagocytophila* genogroups in experimental *E. canis* infection in dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 66, n. 3-4, p. 237-243, 1998.

WEISER, M. G.; THRALL, M. A.; FUKTON, R.; BECK, E. R.; WISE, L. A.; STEENHOUSE, J. L. V. Granular lymphocytosis and hiperproteinemia in dogs with chronic ehrlichiosis. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 27, p. 84-88, 1991.

WEN, B.; RIKIHISA, Y.; MOTT, J. M.; GREENE, R.; KIM, H. Y.; ZHI, N.; COUTO, G. C.; UNVER, A.; BARTSCH, R. Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 7, p. 1852-1855, 1997.

WIKEL, S. K. Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 6, p. 851-859, 1999.

WINSLOW, G. M.; YAGER, E.; SHILO, K.; VOLK, E.; REILLY, A.; CHU, F. K. Antibody-mediated elimination of the obligate intracellular bacterial pathogen *Ehrlichia chaffeensis* during active infection. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 4, p. 2187-2195, 2000.

ZHANG, J. Z.; SINHA, M.; LUXON, B. A.; YU, X. J. Survival strategy of obligately intracellular *Ehrlichia chaffeensis*: novel modulation of immune response and host cell cycles. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 1, p. 498-507, 2004.

[illegible]

APÊNDICE B - Títulos de anticorpos anti-*E. canis*, obtidos pela RIFI das amostras dos cães dos grupos infectados e controles, ao longo da infecção.

G	Cão	Título de anticorpos séricos anti- <i>E. canis</i> / dpi																		
		0	7	14	21	28	42	56	70	84	112	140	168	196	224	252	280	308	336	364
I	8	-	-	-	10240	10240	10240	10240	10240	10240	20480	20480	20480	20480	81920	40960	81920	40960	40960	40960
	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	10240	10240	20480	20480	20480	40960	40960	40960	40960	40960	40960	40960	20480	20480	20480	20480
II	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	5120	5120	10240	10240	10240	10240	10240	20480	20480	20480	20480	40960	20480	40960	20480	20480
	15	-	-	-	10240	20480	40960	40960	40960	40960	40960	40960	40960	40960	20480	40960	40960	40960	20480	40960
III	4	-	-	-	10240	10240	10240	20480												
	5	-	-	-	10240	10240	10240	20480	40960	40960	40960	40960	40960	40960	40960	20480	40960	40960	40960	20480
	6	-	-	-	5120	5120	10240	10240	10240	20480	20480	10240	20480	20480	20480	20480	20480	40960	40960	40960
IV	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

APÊNDICE C – Médias e desvios padrão dos valores da contagem total de hemácias dos cães dos grupos infectados e controles, durante o período experimental.

G	Cão	Contagem Total de Hemácias / dpi																		
		0	7	14	21	28	42	56	70	84	112	140	168	196	224	252	280	308	336	364
I	8	7,10	8,05	6,67	6,65	6,57	6,40	7,65	6,75	7,55	6,95	7,50	7,80	7,25	8,00	6,87	7,80	7,95	6,85	7,55
	12	7,65	7,62	7,65	5,35	4,60	5,60	5,90	6,85	7,80	7,05	7,55	6,90	7,80	7,65	6,52	6,75	7,05	7,67	6,30
	Média	7,38	7,84	7,16	6,00	5,59	6,00	6,78	6,80	7,68	7,00	7,53	7,35	7,53	7,83	6,70	7,28	7,50	7,26	6,93
	DP	0,39	0,30	0,69	0,92	1,39	0,57	1,24	0,07	0,18	0,07	0,04	0,64	0,39	0,25	0,25	0,74	0,64	0,58	0,88
II	10	7,60	7,12	6,17	5,95	5,00	4,70	5,65	6,17	6,20	6,75	5,95	6,15	6,80	6,87	6,75	6,15	6,25	6,55	6,40
	15	6,75	7,12	6,12	5,00	5,15	4,35	6,50	6,75	6,50	6,30	7,50	6,85	7,07	7,55	6,95	6,85	7,05	6,60	7,55
	Média	7,18	7,12	6,15	5,48	5,08	4,53	6,08	6,46	6,35	6,53	6,73	6,50	6,94	7,21	6,85	6,50	6,65	6,58	6,98
	DP	0,60	0,00	0,04	0,67	0,11	0,25	0,60	0,41	0,21	0,32	1,10	0,49	0,19	0,48	0,14	0,49	0,57	0,04	0,81
III	4	7,15	6,30	6,45	5,00	4,35	4,80	1,92												
	5	7,02	6,95	5,80	4,30	4,10	5,00	6,25	7,41	7,15	8,35	6,95	6,75	6,20	7,32	8,10	8,05	7,90	6,40	6,25
	6	6,85	6,90	5,80	3,90	4,17	5,70	6,40	6,27	6,75	7,30	7,35	7,55	6,30	7,25	6,40	6,70	7,40	6,82	6,25
	Média	7,01	6,72	6,02	4,40	4,21	5,17	4,86	6,84	6,95	7,83	7,15	7,15	6,25	7,29	7,25	7,38	7,65	6,61	6,25
	DP	0,15	0,36	0,38	0,56	0,13	0,47	2,54	0,81	0,28	0,74	0,28	0,57	0,07	0,05	1,20	0,95	0,35	0,30	0,00
IV	11	7,00	6,85	7,70	7,20	6,60	6,90	7,25	7,45	7,52	6,85	6,95	7,15	6,80	7,32	7,05	7,10	7,55	7,70	7,05
	13	7,00	6,65	6,50	7,75	6,85	6,10	6,90	6,45	6,85	7,30	7,70	6,55	6,55	7,10	6,50	6,80	6,75	6,45	7,72
	14	7,05	6,95	7,25	6,95	7,40	7,35	7,75	7,95	7,10	6,30	6,50	7,00	7,10	8,05	6,55	6,00	6,70	7,35	7,90
	Média	7,02	6,82	7,15	7,30	6,95	6,78	7,30	7,28	7,16	6,82	7,05	6,90	6,82	7,49	6,70	6,63	7,00	7,17	7,56
	DP	0,03	0,15	0,61	0,41	0,41	0,63	0,43	0,76	0,34	0,50	0,61	0,31	0,28	0,50	0,30	0,57	0,48	0,64	0,45
V	1	7,25	6,45	6,32	7,05	6,17	6,55	6,07	7,30	7,15	7,62	6,75	6,85	7,00	7,55	7,90	7,20	6,30	7,20	7,20
	2	6,70	6,70	6,50	6,65	6,30	6,70	6,85	6,65	7,10	6,85	6,70	6,20	6,50	8,55	7,20	7,70	6,55	7,25	6,80
	3	6,55	6,45	6,50	6,30	6,15	6,20	6,90	6,90	6,75	8,05	7,45	6,20	6,47	6,82	7,50	6,55	6,55	6,30	6,70
	Média	6,83	6,53	6,44	6,67	26,21	6,48	6,61	6,95	7,00	7,51	6,97	6,42	6,66	7,64	7,53	7,15	6,47	6,92	6,90
	DP	0,37	0,14	0,10	0,38	34,61	0,26	0,47	0,33	0,22	0,61	0,42	0,38	0,30	0,87	0,35	0,58	0,14	0,53	0,26

APÊNDICE D – Médias e desvios padrão dos valores da dosagem de hemoglobina sérica dos cães dos grupos infectados e controles, durante o período experimental.

G	Cão	Dosagem de Hemoglobina Sérica / dpi																		
		0	7	14	21	28	42	56	70	84	112	140	168	196	224	252	280	308	336	364
I	8	16,3	16,7	16,4	14,1	12,2	10,5	13,3	15,0	16,0	16,5	16,2	15,5	15,4	16,8	15,8	13,5	14,2	14,2	14,5
	12	18,0	16,7	16,5	12,5	10,7	12,0	13,4	15,5	16,5	15,4	16,0	16,5	15,4	16,9	14,4	16,3	16,0	16,6	14,5
	Média	17,2	16,7	16,5	13,3	11,5	11,3	13,4	15,3	16,3	16,0	16,1	16,0	15,4	16,9	15,1	14,9	15,1	15,4	14,5
	DP	1,2	0,0	0,1	1,1	1,1	1,1	0,1	0,4	0,4	0,8	0,1	0,7	0,0	0,1	1,0	2,0	1,3	1,7	0,0
II	10	15,2	15,2	13,9	12,8	10,6	11,1	11,9	13,0	14,5	14,5	14,1	15,0	14,0	15,0	15,1	14,4	14,7	15,3	14,2
	15	15,9	16,1	14,0	12,0	11,8	10,5	14,0	14,6	15,8	14,5	16,4	15,8	16,5	15,9	15,6	16,0	16,3	15,1	16,3
	Média	15,6	15,7	14,0	12,4	11,2	10,8	13,0	13,8	15,2	14,5	15,3	15,4	15,3	15,5	15,4	15,2	15,5	15,2	15,3
	DP	0,5	0,6	0,1	0,6	0,8	0,4	1,5	1,1	0,9	0,0	1,6	0,6	1,8	0,6	0,4	1,1	1,1	0,1	1,5
III	4	16,0	14,8	14,6	11,0	9,6	10,5	3,5												
	5	16,7	15,3	14,3	9,1	9,0	11,6	13,3	15,1	16,5	17,3	16,9	16,1	14,4	17,1	17,0	17,0	17,1	14,7	14,4
	6	14,8	14,0	12,3	8,8	9,6	12,2	15,8	13,2	15,2	15,3	16,0	15,5	14,1	15,4	14,9	15,7	15,4	14,4	14,4
	Média	15,8	14,7	13,7	9,6	9,4	11,4	10,9	14,2	15,9	16,3	16,5	15,8	14,3	16,3	16,0	16,4	16,3	14,6	14,4
	DP	1,0	0,7	1,3	1,2	0,3	0,9	6,5	1,3	0,9	1,4	0,6	0,4	0,2	1,2	1,5	0,9	1,2	0,2	0,0
IV	11	16,0	15,8	16,2	16,0	16,0	16,0	16,2	17,2	17,0	16,4	16,5	16,2	16,0	17,3	16,9	16,0	16,7	17,0	16,7
	13	15,6	15,8	15,2	15,7	15,5	13,7	15,1	14,6	14,6	16,1	16,4	15,2	14,0	16,0	14,9	13,7	14,0	15,7	16,3
	14	16,1	15,7	16,5	16,0	17,1	16,1	17,0	17,0	16,7	15,0	14,9	16,0	16,2	17,9	15,2	13,0	15,4	17,0	17,0
	Média	15,9	15,8	16,0	15,9	16,2	15,3	16,1	16,3	16,1	15,8	15,9	15,8	15,4	17,1	15,7	14,2	15,4	16,6	16,7
	DP	0,3	0,1	0,7	0,2	0,8	1,4	1,0	1,4	1,3	0,7	0,9	0,5	1,2	1,0	1,1	1,6	1,4	0,8	0,4
V	1	15,0	13,8	14,2	15,0	13,7	14,3	14,5	16,0	16,6	16,0	15,5	14,3	16,0	17,5	17,1	14,8	13,4	15,0	16,7
	2	15,0	15,2	14,5	15,2	14,4	15,2	16,6	16,0	16,3	16,0	15,2	14,4	15,0	17,8	16,5	16,2	13,8	15,5	15,2
	3	14,8	14,4	14,8	14,5	13,0	12,8	15,2	16,1	16,0	17,1	16,3	14,6	14,0	16,4	15,2	14,2	14,8	13,7	15,0
	Média	14,9	14,5	14,5	14,9	13,7	14,1	15,4	16,0	16,3	16,4	15,7	14,4	15,0	17,2	16,3	15,1	14,0	14,7	15,6
	DP	0,1	0,7	0,3	0,4	0,7	1,2	1,1	0,1	0,3	0,6	0,6	0,2	1,0	0,7	1,0	1,0	0,7	0,9	0,9

APÊNDICE E - Médias e desvios padrão dos valores de hematócrito dos cães dos grupos infectados e controles, durante o período experimental.

G	Cão	Hematócrito / dpi																		
		0	7	14	21	28	42	56	70	84	112	140	168	196	224	252	280	308	336	364
I	8	50	50	49	44	39	33	42	46	48	50	50	47	48	50	48	41	44	44	44
	12	55	51	51	39	33	38	41	46	50	48	50	50	49	52	44	49	50	52	45
	Média	52,5	50,5	50,0	41,5	36,0	35,5	41,5	46,0	49,0	49,0	50,0	48,5	48,5	51,0	46,0	45,0	47,0	48,0	44,5
	DP	3,5	0,7	1,4	3,5	4,2	3,5	0,7	0,0	1,4	1,4	0,0	2,1	0,7	1,4	2,8	5,7	4,2	5,7	0,7
II	10	48	47	43	40	33	35	37	39	44	45	43	45	43	45	46	44	45	47	44
	15	49	50	43	37	37	32	43	46	48	44	50	49	51	49	48	49	50	47	50
	Média	48,5	48,5	43,0	38,5	35,0	33,5	40,0	42,5	46,0	44,5	46,5	47,0	47,0	47,0	47,0	46,5	47,5	47,0	47,0
	DP	0,7	2,1	0,0	2,1	2,8	2,1	4,2	4,9	2,8	0,7	4,9	2,8	5,7	2,8	1,4	3,5	3,5	0,0	4,2
III	4	50	45	45	33	31	33	13												
	5	51	47	43	28	28	36	41	47	51	53	51	50	44	54	52	52	52	45	45
	6	46	43	38	27	30	38	48	41	46	47	49	48	43	47	46	48	47	45	45
	Média	49,0	45,0	42,0	29,3	29,7	35,7	34,0	44,0	48,5	50,0	50,0	49,0	43,5	50,5	49,0	50,0	49,5	45,0	45,0
	DP	2,6	2,0	3,6	3,2	1,5	2,5	18,5	4,2	3,5	4,2	1,4	1,4	0,7	4,9	4,2	2,8	3,5	0,0	0,0
IV	11	50	49	50	48	48	50	51	53	53	50	51	51	49	54	52	50	51	51	51
	13	48	49	47	49	49	43	46	44	45	49	50	45	4	49	45	41	43	48	50
	14	50	48	50	49	53	51	51	51	51	46	46	49	50	54	46	40	47	52	52
	Média	49,3	48,7	49,0	48,7	50,0	48,0	49,3	49,3	49,7	48,3	49,0	48,3	34,3	52,3	47,7	43,7	47,0	50,3	51,0
	DP	1,2	0,6	1,7	0,6	2,6	4,4	2,9	4,7	4,2	2,1	2,6	3,1	26,3	2,9	3,8	5,5	4,0	2,1	1,0
V	1	48	43	43	46	40	44	45	49	50	49	46	43	49	54	53	45	41	45	51
	2	47	47	43	46	45	47	50	48	50	50	47	44	46	55	50	50	42	47	47
	3	45	45	45	43	41	40	45	49	48	52	50	45	43	50	47	43	45	41	46
	Média	46,7	45,0	43,7	45,0	42,0	43,7	46,7	48,7	49,3	50,3	47,7	44,0	46,0	53,0	50,0	46,0	42,7	44,3	48,0
	DP	1,5	2,0	1,2	1,7	2,6	3,5	2,9	0,6	1,2	1,5	2,1	1,0	3,0	2,6	3,0	3,6	2,1	3,1	2,6

APÊNDICE F – Médias e desvios padrão dos valores da contagem total de leucócitos dos cães dos grupos infectados e controles, durante o período experimental.

G	Cão	Contagem Total de Leucócitos / dpi																		
		0	7	14	21	28	42	56	70	84	112	140	168	196	224	252	280	308	336	364
I	8	14,7	9,6	8,2	5,4	14,2	8	10,1	1	9,5	7,6	10,7	15,5	12,6	19,8	14,5	15,9	21,6	27,1	23,3
	12	10,8	7,2	7,7	5,8	5,5	6,3	5,9	7,8	5,3	5,5	7	6,4	5,1	4,5	5,6	6,7	6,4	6,1	5,1
	Média	12,8	8,4	8,0	5,6	9,9	7,2	8,0	4,4	7,4	6,6	8,9	11,0	8,9	12,2	10,1	11,3	14,0	16,6	14,2
	DP	2,8	1,7	0,4	0,3	6,2	1,2	3,0	4,8	3,0	1,5	2,6	6,4	5,3	10,8	6,3	6,5	10,7	14,8	12,9
II	10	14,6	10,8	6,7	3,4	6,8	4,1	3,6	8,7	8,9	7,8	6	15,8	8	6,7	5,6	5,9	8,9	7,3	8,8
	15	12,9	9,2	4,3	7,4	5,6	2,4	4	3,5	6,5	6	6,5	6,9	5,5	10,9	9,6	5,5	6,3	4,6	4,9
	Média	13,8	10,0	5,5	5,4	6,2	3,3	3,8	6,1	7,7	6,9	6,3	11,4	6,8	8,8	7,6	5,7	7,6	6,0	6,9
	DP	1,2	1,1	1,7	2,8	0,8	1,2	0,3	3,7	1,7	1,3	0,4	6,3	1,8	3,0	2,8	0,3	1,8	1,9	2,8
III	4	16,1	10,1	4,2	10	6,3	4,1	0,2												
	5	16,9	7	3,8	5,6	12,9	5,6	7,9	12,4	9,7	10,6	10,8	7,6	6	8,3	7,5	6,5	10	8	7,9
	6	17,5	5,7	4,2	8,4	14,1	6,1	7,6	6,2	7,6	9,2	10,8	4,7	4,9	9,5	5,4	7,4	10,1	8,1	6,1
	Média	16,8	7,6	4,1	8,0	11,1	5,3	5,2	9,3	8,7	9,9	10,8	6,2	5,5	8,9	6,5	7,0	10,1	8,1	7,0
	DP	0,7	2,3	0,2	2,2	4,2	1,0	4,4	4,4	1,5	1,0	0,0	2,1	0,8	0,8	1,5	0,6	0,1	0,1	1,3
IV	11	9,3	6,8	8,2	8,9	7,1	6,2	6,5	7,7	8,4	11,6	10,2	10	9	8,5	7	9	10,7	10,7	10,2
	13	10,5	8,2	12,8	8	4,6	9,8	6	6,9	9	8,9	12,8	7,9	6,8	10,4	8,1	7,2	9,7	8	10,9
	14	15,6	13,2	12,4	13,4	12,4	8,7	11,1	17,2	27,9	9,9	13,2	13	10,1	13,5	11,4	14,2	9,8	8,9	12,7
	Média	11,8	9,4	11,1	10,1	8,0	8,2	7,9	10,6	15,1	10,1	12,1	10,3	8,6	10,8	8,8	10,1	10,1	9,2	11,3
	DP	3,3	3,4	2,5	2,9	4,0	1,8	2,8	5,7	11,1	1,4	1,6	2,6	1,7	2,5	2,3	3,6	0,6	1,4	1,3
V	1	15,0	16,8	10,4	14,1	15,4	14,2	17,5	14,4	13,4	12,2	11,9	13,9	14,5	12,2	14,4	12,3	14,2	13,4	13,4
	2	11,6	11,9	11,1	12,2	10,7	14,9	13,8	15,0	14,0	12,9	14,1	12,8	9,7	10,7	9,6	11,0	10,7	7,4	12,7
	3	15,1	8,5	10,6	8,3	13,9	9,5	11,4	8,7	7,7	9,4	11,7	9,1	9,9	7,7	8,8	12,7	7,1	10,6	7
	Média	13,9	12,4	10,7	11,5	13,3	12,9	14,2	12,7	11,7	11,5	12,6	11,9	11,4	10,2	10,9	12,0	10,7	10,5	11,0
	DP	2,0	4,2	0,4	3,0	2,4	2,9	3,1	3,5	3,5	1,9	1,3	2,5	2,7	2,3	3,0	0,9	3,6	3,0	3,5

APÊNDICE G – Médias e desvios padrão dos valores da contagem absoluta de neutrófilos segmentados dos cães dos grupos infectados e controles, durante o período experimental.

G	Cão	Contagem Absoluta de Neutrófilos Segmentados / dpi																		
		0	7	14	21	28	42	56	70	84	112	140	168	196	224	252	280	308	336	364
I	8	6468	4320	5904	3510	6390	3520	5050	4900	4940	3344	4708	5115	3276	5742	4060	4134	5616	8130	4660
	12	5400	3528	4312	4176	3575	2079	2655	4680	2809	3190	4340	3584	2448	2700	2576	3216	3648	3233	2754
	Média	5934	3924	5108	3843	4983	2800	3853	4790	3875	3267	4524	4350	2862	4221	3318	3675	4632	5682	3707
	DP	755	560	1126	471	1991	1019	1694	156	1507	109	260	1083	585	2151	1049	649	1392	3463	1348
II	10	9198	5508	3953	2312	5032	2460	1836	4872	5162	4368	3420	12640	4640	4020	3584	3127	6141	4234	5192
	15	7095	5244	3483	4736	3248	1656	2680	1820	3055	4260	3900	4416	3960	8502	7104	3685	4347	2852	2989
	Média	8147	5376	3718	3524	4140	2058	2258	3346	4109	4314	3660	8528	4300	6261	5344	3406	5244	3543	4091
	DP	1487	187	332	1714	1261	569	597	2158	1490	76	339	5815	481	3169	2489	395	1269	977	1558
III	4	7406	3434	3192	7200	3276	2501	40												
	5	8788	2940	2432	3808	4515	3136	3476	8432	6984	6996	7560	4028	4440	4233	5625	3445	4900	4880	4898
	6	9975	2736	3192	5292	7755	4575	5016	3534	5016	7084	7452	2867	3479	6555	3942	4662	7474	5184	4148
	Média	8723	3037	2939	5433	5182	3404	2844	5983	6000	7040	7506	3448	3960	5394	4784	4054	6187	5032	4523
	DP	1286	359	439	1700	2313	1063	2547	3463	1392	62	76	821	680	1642	1190	861	1820	215	530
IV	11	6324	4488	4920	5162	4260	3348	3055	4389	4368	6728	6120	6700	6030	5950	4410	5040	5778	7704	7038
	13	6090	3444	9344	3920	2392	6272	3000	3588	4500	5340	6528	3555	3264	4472	2673	3096	5723	4720	7194
	14	9204	6468	5952	5628	6820	4959	6105	8256	20646	5445	6600	6110	7373	6345	5586	7526	5488	4628	6858
	Média	7206	4800	6739	4903	4491	4860	4053	5411	9838	5838	6416	5455	5556	5589	4223	5221	5663	5684	7030
	DP	1734	1536	2315	883	2223	1465	1777	2496	9360	773	259	1672	2095	987	1465	2221	154	1750	168
V	1	6150	6552	4368	6486	8624	5254	6825	6912	6566	5490	5474	5699	7250	6100	7488	4920	6248	6566	5762
	2	4640	5355	4884	5586	4815	6854	7176	6300	6580	6450	6768	4864	5141	5350	4704	5280	5564	3552	6731
	3	7097	4675	6042	5229	8896	6080	7410	5481	5159	6580	8658	6188	7227	4697	5544	9144	4615	7314	4480
	Média	5962	5527	5098	5767	7445	6063	7137	6231	6102	6173	6967	5584	6539	5382	5912	6448	5476	5811	5658
	DP	1239	950	857	648	2282	800	294	718	816	595	1601	669	1211	702	1428	2342	820	1991	1129

APÊNDICE H - Médias e desvios padrão dos valores da contagem absoluta de linfócitos dos cães dos grupos infectados e controles, durante o período experimental.

G	Cão	Contagem Absoluta de Linfócitos / dpi																		
		0	7	14	21	28	42	56	70	84	112	140	168	196	224	252	280	308	336	364
I	8	5733	4032	1886	1296	6106	3600	2929	3600	3040	3648	5136	8990	8190	12474	9425	10812	14472	18428	16310
	12	3024	2088	1155	1392	1485	2016	1947	1404	1272	990	980	1344	1479	720	1232	1809	1344	1708	1275
	Média	4379	3060	1521	1344	3796	2808	2438	2502	2156	2319	3058	5167	4835	6597	5329	6311	7908	10068	8793
	DP	1916	1375	517	68	3268	1120	694	1553	1250	1879	2939	5407	4745	8311	5793	6366	9283	11823	10631
II	10	3650	3780	1340	816	1224	1148	1296	2262	1602	2184	1620	2054	1520	1005	1176	1534	1602	1606	2112
	15	3225	1472	645	2072	2072	504	720	455	1495	960	1105	828	660	1199	1056	935	945	874	882
	Média	3438	2626	993	1444	1648	826	1008	1359	1549	1572	1363	1441	1090	1102	1116	1235	1274	1240	1497
	DP	301	1632	491	888	600	455	407	1278	76	865	364	867	608	137	85	424	465	518	870
III	4	3542	3838	882	2300	2646	492	152												
	5	3718	1820	874	1568	8256	1736	3318	2480	1552	1590	2052	1824	720	1992	975	1170	1900	1120	1580
	6	6125	2337	798	2688	5640	1281	2280	2046	1976	1564	2700	1692	1029	2280	864	1998	1616	2187	1586
	Média	4462	2665	851	2185	5514	1170	1917	2263	1764	1577	2376	1758	875	2136	920	1584	1758	1654	1583
	DP	1443	1048	46	569	2807	629	1614	307	300	18	458	93	218	204	78	585	201	754	4
IV	11	2418	1564	2460	2759	1988	2046	2145	2387	2772	3248	2346	3000	1710	1615	1680	2340	3852	1712	1938
	13	2835	3690	1920	2480	1104	2156	2100	2001	3060	2136	2560	3318	2108	3640	2592	2664	2231	2240	2834
	14	4680	5016	4216	4958	3720	2871	3885	6708	6138	3564	5016	4160	1919	5400	3990	5538	2940	3560	4318
	Média	3311	3423	2865	3399	2271	2358	2710	3699	3990	2983	3307	3493	1912	3552	2754	3514	3008	2504	3030
	DP	1204	1741	1200	1357	1331	448	1018	2613	1866	750	1484	599	199	1894	1163	1760	813	952	1202
V	1	5400	8064	3744	5217	4312	5112	5075	4752	4154	2928	4046	4726	4060	3782	3744	5166	4828	3752	4824
	2	4988	4284	3441	3904	2568	5215	4278	4200	3920	4386	5076	5120	2910	2996	3264	4400	3424	2738	2540
	3	5134	2720	3498	2324	3197	2470	2052	2088	1771	2068	2340	2184	1782	2310	2112	2540	1775	2120	1820
	Média	5174	5023	3561	3815	3359	4266	3802	3680	3282	3127	3821	4010	2917	3029	3040	4035	3342	2870	3061
	DP	209	2748	161	1449	883	1556	1567	1406	1313	1172	1382	1594	1139	737	839	1350	1528	824	1568

APÊNDICE I - Médias e desvios padrão dos valores da contagem absoluta de eosinófilos dos cães dos grupos infectados e controles, durante o período experimental.

G	Cão	Contagem Absoluta de Eosinófilos / dpi																		
		0	7	14	21	28	42	56	70	84	112	140	168	196	224	252	280	308	336	364
I	8	1323	384	246	0	568	240	1313	800	1140	304	321	930	378	594	290	477	648	271	1165
	12	1944	1368	1463	0	0	1827	1003	1326	1007	990	1190	1024	867	675	1400	1005	896	793	867
	Média	1633	876	854	0	284	1033	1158	1063	1073	647	755	977	622	634	845	741	772	532	1016
	DP	439	695	860	0	401	1122	219	371	94	485	614	66	345	57	784	373	175	369	210
II	10	1168	1296	1273	102	136	246	288	1218	1691	624	600	790	1280	1474	784	1121	801	876	1056
	15	2322	1564	129	74	224	168	440	910	1300	540	975	966	605	545	864	605	693	782	490
	Média	1745	1430	701	88	180	207	364	1064	1495	582	787	878	942	1009	824	863	747	829	773
	DP	816	189	808	19	62	55	107	217	276	59	265	124	477	656	56	364	76	66	400
III	4	4347	2424	84	0	0	738	0												
	5	3549	1610	266	112	0	448	790	992	679	106	864	684	300	1660	675	1755	2200	1520	1027
	6	875	342	168	0	141	61	0	496	456	460	216	94	245	380	432	370	707	486	244
	Média	2923	1458	172	37	47	415	263	744	567	283	540	389	272	1020	553	1062	1453	1003	635
	DP	1818	1049	91	64	81	339	456	350	157	250	458	417	38,9	905	171	979,3	1055	731	553
IV	11	186	476	492	712	781	744	1105	770	1092	1276	1428	200	900	765	770	1260	963	1070	918
	13	1365	574	1280	1120	920	980	540	966	900	979	3200	711	1088	1768	2673	1224	1358	800	218
	14	936	1056	1364	2278	1240	174	444	1720	558	594	924	2210	505	1080	1596	568	882	356	1143
	Média	829	702	1045	1370	980	632	696	1152	850	949	1850	1040	831	1204	1679	1017	1067	742	759
	DP	596	310	481	812	235	414	357	501	270	341	1195	1044	297	512	954	389	254	360	482
V	1	3300	840	1664	1833	2002	3408	5250	2448	2144	2928	1904	2363	2755	2196	2448	1599	2130	2144	2412
	2	1276	1904	1443	2074	2782	2384	1932	4200	3080	1806	1833	2176	1358	1819	1440	220	963	592	2667
	3	1812	510	318	249	1390	760	1254	696	385	188	468	273	495	385	528	508	284	530	420
	Média	2129	1084	1141	1385	2058	2184	2812	2448	1869	1640	1401	1604	1536	1466	1472	775	1125	1088	1833
	DP	1048	728	721	991	697	1335	2138	1752	1368	1377	809	1156	1140	955	960	727	933	914	1230

APÊNDICE J - Médias e desvios padrão dos valores da contagem absoluta de monócitos dos cães dos grupos infectados e controles, durante o período experimental.

G	Cão	Contagem Absoluta de Monócitos / dpi																		
		0	7	14	21	28	42	56	70	84	112	140	168	196	224	252	280	308	336	364
I	8	1176	864	164	540	1136	640	808	700	380	304	535	310	630	990	725	477	864	271	1165
	12	432	216	693	232	440	378	295	390	212	330	490	448	306	405	336	670	448	366	204
	Média	804,0	540,0	428,5	386,0	788,0	509,0	551,5	545,0	296,0	317,0	512,5	379,0	468,0	697,5	530,5	573,5	656,0	318,5	684,5
	DP	526,1	458,2	374,1	217,8	492,1	185,3	362,7	219,2	118,8	18,4	31,8	97,6	229,1	413,7	275,1	136,5	294,2	67,2	679,5
II	10	584	216	134	170	408	246	180	348	445	624	360	316	560	201	56	118	356	511	440
	15	258	736	43	518	56	72	160	175	520	180	455	552	275	654	480	275	315	92	490
	Média	421,0	476,0	88,5	344,0	232,0	159,0	170,0	261,5	482,5	402,0	407,5	434,0	417,5	427,5	268,0	196,5	335,5	301,5	465,0
	DP	230,5	367,7	64,3	246,1	248,9	123,0	14,1	122,3	53,0	314,0	67,2	166,9	201,5	320,3	299,8	111,0	29,0	296,3	35,4
III	4	322	303	42	500	378	369	8												
	5	676	490	228	112	129	280	316	496	485	848	324	1064	540	415	225	130	800	320	395
	6	525	285	42	252	564	183	304	124	152	92	432	47	147	285	162	370	303	243	122
	Média	507,7	359,3	104,0	288,0	357,0	277,3	209,3	310,0	318,5	470,0	378,0	555,5	343,5	350,0	193,5	250,0	551,5	281,5	258,5
	DP	177,6	113,5	107,4	196,5	218,3	93,0	174,5	263,0	235,5	534,6	76,4	719,1	277,9	91,9	44,5	169,7	351,4	54,4	193,0
IV	11	372	204	328	267	71	62	195	154	168	348	306	100	360	170	140	360	107	214	204
	13	105	492	128	480	184	392	360	276	540	445	512	316	340	520	612	216	388	240	654
	14	780	660	868	536	496	696	666	516	558	297	660	520	303	540	228	568	490	356	254
	Média	419,0	452,0	441,3	427,7	250,3	383,3	407,0	315,3	422,0	363,3	492,7	312,0	334,3	410,0	326,7	381,3	328,3	270,0	370,7
	DP	339,9	230,6	382,8	141,9	220,1	317,1	239,0	184,2	220,2	75,2	177,8	210,0	28,9	208,1	251,0	177,0	198,3	75,6	246,6
V	1	150	1344	624	282	462	284	175	288	536	610	357	834	435	122	288	615	426	804	361
	2	696	238	1332	366	535	149	276	300	420	258	423	512	291	535	192	1100	749	518	762
	3	1057	425	742	498	417	190	684	261	385	564	234	364	396	308	616	508	426	636	280
	Média	634,3	669,0	899,3	382,0	471,3	207,7	378,3	283,0	447,0	477,3	338,0	570,0	374,0	321,7	365,3	741,0	533,7	652,7	467,7
	DP	456,6	592,0	379,3	108,9	59,6	69,2	269,5	20,0	79,0	191,3	95,9	240,3	74,5	206,8	222,3	315,5	186,5	143,7	258,1

APÊNDICE K - Médias e desvios padrão dos valores da contagem de plaquetas dos cães dos grupos infectados e controles, durante o período experimental.

G	Cão	Contagem de plaquetas / dpi																		
		0	7	14	21	28	42	56	70	84	112	140	168	196	224	252	280	308	336	364
I	8	195	120	105	55	30	105	175	165	190	93	135	135	73	50	115	155	120	345	75
	12	180	185	145	55	70	85	70	135	115	70	150	80	110	131	160	160	90	142	160
	Média	187,5	152,5	125,0	55,0	50,0	95,0	122,5	150,0	152,5	81,5	142,5	107,5	91,5	90,5	137,5	157,5	105,0	243,5	117,5
	DP	10,6	46,0	28,3	0,0	28,3	14,1	74,2	21,2	53,0	16,3	10,6	38,9	26,2	57,3	31,8	3,5	21,2	143,5	60,1
II	10	515	260	275	65	115	95	32	345	415	300	180	210	390	360	385	370	425	420	245
	15	280	295	40	40	70	33	105	110	175	160	165	230	210	192	195	215	190	220	185
	Média	397,5	277,5	157,5	52,5	92,5	64,0	68,5	227,5	295,0	230,0	172,5	220,0	300,0	276,0	290,0	292,5	307,5	320,0	215,0
	DP	166,2	24,7	166,2	17,7	31,8	43,8	51,6	166,2	169,7	99,0	10,6	14,1	127,3	118,8	134,4	109,6	166,2	141,4	42,4
III	4	345	170	60	45	15	5	6												
	5	255	190	40	50	35	35	190	265	250	175	155	75	215	150	160	215	155	200	225
	6	415	305	85	110	85	105	110	51	51	110	230	90	170	230	290	135	305	375	315
	Média	338,3	221,7	61,7	68,3	45,0	48,3	102,0	158,0	150,5	142,5	192,5	82,5	192,5	190,0	225,0	175,0	230,0	287,5	270,0
	DP	80,2	72,9	22,5	36,2	36,1	51,3	92,3	151,3	140,7	46,0	53,0	10,6	31,8	56,6	91,9	56,6	106,1	123,7	63,6
IV	11	255	375	170	220	245	145	220	205	240	255	280	195	235	225	195	265	290	280	215
	13	190	245	235	300	220	50	165	230	270	220	285	215	142	195	315	165	215	235	67
	14	210	155	205	255	240	165	160	150	250	215	170	130	130	157	170	200	122	122	152
	Média	218,3	258,3	203,3	258,3	235,0	120,0	181,7	195,0	253,3	230,0	245,0	180,0	169,0	192,3	226,7	210,0	209,0	212,3	144,7
	DP	33,3	110,6	32,5	40,1	13,2	61,4	33,3	40,9	15,3	21,8	65,0	44,4	57,5	34,1	77,5	50,7	84,2	81,4	74,3
V	1	230	75	220	185	200	215	165	265	195	190	205	225	240	235	120	197	240	230	185
	2	275	365	230	260	70	200	250	245	235	162	250	360	150	140	220	210	260	207	20
	3	330	405	390	450	395	375	465	425	370	400	360	325	365	450	305	255	375	520	395
	Média	278,3	281,7	280,0	298,3	221,7	263,3	293,3	311,7	266,7	250,7	271,7	303,3	251,7	275,0	215,0	220,7	291,7	319,0	200,0
	DP	50,1	180,1	95,4	136,6	163,6	97,0	154,6	98,7	91,7	130,1	79,7	70,1	108,0	158,8	92,6	30,4	72,9	174,5	187,9

APÊNDICE L – Médias, desvios padrão (DP) e coeficientes de variação (CV) das concentrações séricas de IL-10 dos cães dos grupos infectados e controles, ao longo da infecção.

		Concentração Sérica de IL-10 / dpi							
	Cão	0	14	28	56	112	196	252	364
Grupo I	A8	303,67	161,18	274,21	185,77	138,67	42,12	75,80	49,11
	A12	111,53	185,49	88,67	45,44	78,03	73,89	151,91	636,13
	Média	207,60	173,34	181,44	115,60	108,35	58,01	113,86	342,62
	DP	135,87	17,19	131,19	99,23	42,88	22,46	53,82	415,09
	CV	0,65	0,10	0,72	0,86	0,40	0,39	0,47	1,21
Grupo II	A10	103,14	141,02	129,92	43,50	217,24	37,15	159,28	28,75
	A15	161,89	255,66	133,85	67,26	28,59	28,31	16,81	33,77
	Média	132,51	198,34	131,89	55,38	122,91	32,73	88,04	31,26
	DP	41,54	81,06	2,78	16,80	133,40	6,25	100,75	3,55
	CV	0,31	0,41	0,02	0,30	1,09	0,19	1,14	0,11
Grupo III	A4	255,81	1026,65	680,10	684,39				
	A5	113,49	13,94	125,99	257,87	106,53	55,10	215,77	71,97
	A6	120,46	58,70	117,60	111,46	92,60	36,04	31,85	32,00
	Média	163,25	366,43	307,90	351,24	99,56	45,57	123,81	51,98
	DP	80,23	572,21	322,36	297,66	9,85	13,48	130,05	28,26
	CV	0,49	1,56	1,05	0,85	0,10	0,30	1,05	0,54
Grupo IV	A11	91,89	100,64	109,39	54,55	229,39	50,13	11,79	23,00
	A13	104,21	96,71	89,21	52,62	34,39	106,76	24,77	26,83
	A14	110,10	113,31	116,53	86,60	28,59	15,05	33,91	21,97
	Média	102,06	103,55	105,04	64,59	97,45	57,31	23,49	23,93
	DP	9,29	8,68	14,17	19,08	114,29	46,28	11,12	2,56
	CV	0,09	0,08	0,13	0,30	1,17	0,81	0,47	0,11
Grupo V	A1	102,24	58,70	238,14	24,44	317,24	41,85	17,25	28,60
	A2	179,21	58,70	130,99	61,46	252,78	88,53	42,62	43,06
	A3	81,35	13,39	104,74	41,29	114,39	86,60	26,10	25,95
	Média	120,93	43,59	157,96	42,40	228,14	72,32	28,65	32,54
	DP	51,54	26,16	70,67	18,53	103,65	26,41	12,88	9,21
	CV	0,43	0,60	0,45	0,44	0,45	0,37	0,45	0,28

APÊNDICE M – Médias, desvios padrão (DP) e coeficientes de variação (CV) das concentrações séricas de TNF- α dos cães dos grupos infectados e controles, ao longo da infecção.

	Cão	Concentração de TNF- α / dpi							
		0	7	21	42	84	168	252	364
Grupo I	A8	14,48	27,78	13,66	-1,37	20,53	21,06	10,86	20,36
	A12	10,76	21,64	11,49	6,33	14,03	36,94	10,36	19,19
	Média	12,62	24,71	12,57	2,48	17,28	29,00	10,61	19,78
	DP	2,63	4,34	1,53	5,45	4,60	11,23	0,35	0,83
	CV	0,21	0,18	0,12	2,20	0,27	0,39	0,03	0,04
Grupo II	A10	15,73	26,84	11,15	4,77	10,28	18,57	12,42	15,90
	A15	11,80	5,62	11,28	10,53	8,17	10,96	10,33	10,16
	Média	13,76	16,23	11,21	7,65	9,23	14,77	11,37	13,03
	DP	2,78	15,00	0,09	4,08	1,49	5,38	1,48	4,06
	CV	0,20	0,92	0,01	0,53	0,16	0,36	0,13	0,31
Grupo III	A4	19,97	24,24	65,95	32,32				
	A5	11,62	0,99	7,73	41,76	7,08	27,55	11,50	13,56
	A6	12,49	13,75	9,98	4,49	12,40	18,02	10,08	11,14
	Média	14,69	12,99	27,89	26,19	9,74	22,79	10,79	12,35
	DP	4,59	11,64	32,98	19,38	3,76	6,74	1,01	1,71
	CV	0,31	0,90	1,18	0,74	0,39	0,30	0,09	0,14
Grupo IV	A11	10,76	15,32	19,88	12,19	18,59	25,07	11,75	12,73
	A13	10,37	12,94	15,52	11,53	9,73	10,53	12,25	11,44
	A14	10,50	11,43	12,36	27,59	11,24	9,64	10,50	11,86
	Média	10,54	13,23	15,92	17,10	13,19	15,08	11,50	12,01
	DP	0,20	1,96	3,78	9,09	4,74	8,66	0,90	0,65
	CV	0,02	0,15	0,24	0,53	0,36	0,57	0,08	0,05
Grupo V	A1	12,10	1,27	17,12	3,97	15,13	20,92	23,09	12,08
	A2	14,26	9,64	14,78	26,36	22,09	44,27	10,64	19,19
	A3	11,06	1,13	5,22	11,53	14,74	43,30	12,31	14,40
	Média	12,47	4,01	12,37	13,95	17,32	36,16	15,35	15,22
	DP	1,63	4,87	6,30	11,39	4,14	13,21	6,76	3,62
	CV	0,13	1,21	0,51	0,82	0,24	0,37	0,44	0,24

APÊNDICE N – Médias, desvios padrão (DP) e coeficientes de variação (CV) das concentrações séricas de IFN- γ dos cães dos grupos infectados e controles, ao longo da infecção.

		Concentração Sérica de IFN- γ / dpi							
	Cão	0	21	28	56	112	196	252	364
Grupo I	A8	251,84	501,53	419,86	267,63	277,42	21,06	132,45	139,70
	A12	91,95	540,58	103,00	7,88	63,81	36,94	86,80	276,65
	Média	171,90	521,06	261,43	137,75	170,62	29,00	109,62	208,17
	DP	113,05	27,62	224,05	183,67	151,04	11,23	32,28	96,84
	CV	0,66	0,05	0,86	1,33	0,89	0,39	0,29	0,47
Grupo II	A10	111,14	79,92	93,12	95,17	130,91	18,57	68,20	59,99
	A15	66,37	132,03	83,23	31,61	2,37	73,56	53,95	64,33
	Média	88,76	105,97	88,17	63,39	66,64	46,07	61,07	62,16
	DP	31,66	36,85	6,99	44,94	90,89	38,88	10,08	3,07
	CV	0,36	0,35	0,08	0,71	1,36	0,84	0,17	0,05
Grupo III	A4	98,35	149,83	165,21	50,25				
	A5	108,81	181,61	67,53	47,29	103,58	27,55	65,30	47,67
	A6	57,07	136,27	79,74	123,14	88,47	18,02	46,70	46,46
	Média	88,08	155,90	104,16	73,56	96,02	22,79	56,00	47,06
	DP	27,36	23,27	53,22	42,96	10,69	6,74	13,15	0,85
	CV	0,31	0,15	0,51	0,58	0,11	0,30	0,23	0,02
Grupo IV	A11	78,00	98,06	118,12	71,44	138,47	25,07	52,74	67,47
	A13	126,26	104,16	82,07	51,10	76,53	94,75	65,30	44,53
	A14	59,98	92,83	125,67	35,00	46,02	40,08	29,31	52,98
	Média	88,08	98,35	108,62	52,51	87,00	53,30	49,12	54,99
	DP	34,27	5,67	23,30	18,26	47,11	36,67	18,27	11,61
	CV	0,39	0,06	0,21	0,35	0,54	0,69	0,37	0,21
Grupo V	A1	32,07	124,41	106,49	48,98	89,05	20,92	61,43	49,84
	A2	361,72	276,10	556,49	440,51	339,63	44,27	275,93	249,84
	A3	71,02	68,90	103,00	21,86	129,74	43,30	66,75	49,36
	Média	154,94	156,47	255,33	170,45	186,14	36,16	134,70	116,35
	DP	180,14	107,26	260,82	234,27	134,47	13,21	122,33	115,61
	CV	1,16	0,69	1,02	1,37	0,72	0,37	0,91	0,99

APÊNDICE O – Médias, desvios padrão (DP) e coeficientes de variação (CV) das subpopulações de linfócitos T dos cães dos grupos infectados e controles, ao longo da infecção.

		Subpopulações de Linfócitos T								
G	Cão	D0			D28			D252		
		CD4	CD8	CD4:8	CD4	CD8	CD4:8	CD4	CD8	CD4:8
I	A8	43,58%	16,66%	2,62	22,00%	35,80%	0,61	31,21%	50,32%	0,62
	A12	34,51%	21,86%	1,58	19,78%	31,67%	0,62	35,99%	32,30%	1,11
	Média	39,04%	19,26%	2,10	20,89%	33,73%	0,62	33,60%	41,31%	0,87
	DP	0,06	0,04	0,73	0,02	0,03	0,01	0,03	0,13	0,35
	CV	0,16	0,19	0,35	0,08	0,09	0,01	0,10	0,31	0,40
II	A10	48,05%	12,67%	3,79	33,75%	36,97%	0,91	38,51%	39,32%	0,98
	A15	66,22%	29,55%	2,24	15,71%	33,39%	0,47			
	Média	57,14%	21,11%	3,02	24,73%	35,18%	0,69			
	DP	0,13	0,12	1,10	0,13	0,03	0,31			
	CV	0,22	0,57	0,36	0,52	0,07	0,45			
III	A4	55,27%	15,24%	3,63	7,28%	25,07%	0,29			
	A5	49,67%	20,38%	2,44	22,67%	47,54%	0,48	38,14%	23,69%	1,61
	A6	45,35%	14,14%	3,21	37,74%	27,01%	1,40	47,11%	29,91%	1,57
	Média	50,09%	16,59%	3,09	22,56%	33,21%	0,72	42,62%	26,80%	1,59
	DP	0,05	0,03	0,60	0,15	0,12	0,59	0,06	0,04	0,02
IV	A11	36,99%	18,91%	1,96	41,69%	27,26%	1,53	40,77%	26,86%	1,52
	A13	57,21%	14,90%	3,84	49,33%	25,24%	1,95	39,53%	22,80%	1,73
	A14	44,43%	17,10%	2,60	46,82%	30,27%	1,55	42,43%	20,51%	2,07
	Média	46,21%	16,97%	2,80	45,95%	27,59%	1,68	40,91%	23,39%	1,77
	DP	0,10	0,02	0,96	0,04	0,03	0,24	0,01	0,03	0,28
V	A1	45,46%	15,57%	2,92	46,49%	28,80%	1,61	40,40%	22,98%	1,76
	A2	37,49%	14,07%	2,66	44,08%	21,29%	2,07	43,03%	22,23%	1,94
	A3	44,20%	27,75%	1,59	42,54%	30,05%	1,42	41,32%	33,58%	1,23
	Média	42,38%	19,13%	2,39	44,37%	26,71%	1,70	41,58%	26,26%	1,64
	DP	0,04	0,08	0,70	0,02	0,05	0,34	0,01	0,06	0,37
V	CV	0,10	0,39	0,29	0,04	0,18	0,20	0,03	0,24	0,22

APÊNDICE P – Médias, desvios padrão (DP) e coeficientes de variação (CV) das citocinas intracelulares em linfócitos T, sem estímulo, dos cães dos grupos infectados e controles, ao longo da infecção.

Citocinas Intracelulares em Linfócitos T CD4 e CD8													
Cão	D0				D28				D252				
	CD4/IFN	CD8/IFN	CD4/IL4	CD8/IL4	CD4/IFN	CD8/IFN	CD4/IL4	CD8/IL4	CD4/IFN	CD8/IFN	CD4/IL4	CD8/IL4	
Grupo I	A8	28,16%	6,85%	35,04%	0,29%	84,78%	60,50%	35,80%	13,64%	78,23%	82,49%	43,55%	59,32%
	A12	23,03%	2,15%	16,89%	2,10%	30,96%	33,49%	0,88%	-2,40%	46,40%	43,63%	15,58%	57,19%
	Média	25,60%	4,50%	25,97%	1,20%	57,87%	47,00%	18,34%	5,62%	62,32%	63,06%	29,57%	58,26%
	DP	0,04	0,03	0,13	0,01	0,38	0,19	0,25	0,11	0,23	0,27	0,20	0,02
	CV	0,14	0,74	0,49	1,07	0,66	0,41	1,35	2,02	0,36	0,44	0,67	0,03
Grupo II	A10	16,07%	8,68%	16,12%	2,17%	31,63%	24,27%	22,19%	-2,33%	75,52%	71,48%	59,77%	50,25%
	A15	52,56%	27,47%	51,15%	24,66%	45,34%	38,12%	24,02%	15,46%				
	Média	34,32%	18,08%	33,64%	13,42%	38,49%	31,20%	23,11%	6,57%				
	DP	0,26	0,13	0,25	0,16	0,10	0,10	0,01	0,13				
	CV	0,75	0,74	0,74	1,19	0,25	0,31	0,06	1,92				
Grupo III	A4	26,24%	6,61%	25,49%	5,75%	49,78%	56,83%	32,38%	14,79%				
	A5	43,71%	7,98%	36,52%	1,45%	19,95%	28,66%	22,77%	7,90%	57,03%	46,71%	49,10%	21,36%
	A6	25,01%	4,19%	26,27%	0,85%	61,79%	5,10%	29,21%	6,33%	36,26%	34,89%	37,80%	31,67%
	Média	31,65%	6,26%	29,43%	2,68%	43,84%	30,20%	28,12%	9,67%	46,65%	40,80%	43,45%	26,52%
	DP	0,10	0,02	0,06	0,03	0,22	0,26	0,05	0,05	0,15	0,08	0,08	0,07
Grupo IV	A11	15,25%	1,99%	25,93%	-0,37%	76,00%	73,52%	23,46%	23,71%	81,58%	76,66%	52,43%	47,01%
	A13	28,28%	7,81%	36,21%	12,75%	38,87%	47,54%	1,53%	-1,36%	61,82%	54,86%	48,60%	44,03%
	A14	17,38%	11,60%	18,85%	8,46%	60,80%	45,02%	0,92%	0,11%	77,86%	62,94%	40,23%	33,41%
	Média	20,30%	7,13%	27,00%	6,95%	58,56%	55,36%	8,64%	7,49%	73,75%	64,82%	47,09%	41,48%
	DP	0,07	0,05	0,09	0,07	0,19	0,16	0,13	0,14	0,11	0,11	0,06	0,07
Grupo V	A1	25,55%	4,16%	25,01%	-1,01%	96,46%	88,68%	59,95%	41,13%	67,17%	67,89%	61,51%	59,67%
	A2	32,17%	12,14%	25,03%	9,07%	1,50%	71,10%	45,67%	31,57%	49,65%	50,80%	48,23%	16,31%
	A3	12,92%	5,83%	17,15%	4,79%	75,06%	72,17%	52,10%	33,81%	55,56%	32,09%	77,70%	27,54%
	Média	23,55%	7,38%	22,40%	4,28%	57,67%	77,32%	52,57%	35,50%	57,46%	50,26%	62,48%	34,51%
	DP	0,10	0,04	0,05	0,05	0,50	0,10	0,07	0,05	0,09	0,18	0,15	0,23
Grupo V	CV	0,42	0,57	0,20	1,18	0,86	0,13	0,14	0,14	0,16	0,36	0,24	0,65