

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS**

Adam Leal Lima

**COINFEÇÃO NATURAL POR *Leishmania infantum* E *Ehrlichia*
spp.: INFLUÊNCIA SOBRE OS SINAIS CLÍNICOS, PARÂMETROS
HEMATOLÓGICOS, FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA E
INTERLEUCINA 10**

Fortaleza – Ceará

2013

ADAM LEAL LIMA

COINFECCÃO NATURAL POR *Leishmania infantum* E *Ehrlichia spp.*:
INFLUÊNCIA SOBRE OS SINAIS CLÍNICOS, PARÂMETROS
HEMATOLÓGICOS, FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA E
INTERLEUCINA 10

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução e sanidade de carnívoros, onívoros, herbívoros e aves.

Orientadora: Profa.Dr. Diana Célia Sousa Nunes-Pinheiro.

FORTALEZA - CEARÁ

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação**Universidade Estadual do Ceará****Biblioteca Central Prof. Antônio Martins Filho****Bibliotecário Responsável – Francisco Welton Silva Rios – CRB-3/919**

L732c

Lima, Adam Leal

Coinfecção natural por *Leishmania infantum* e *Ehrlichia spp.*: influência sobre os sinais clínicos, parâmetros hematológicos, fator de necrose tumoral alfa e interleucina-10 / Adam Leal Lima . – 2013.

CD-ROM. 90 f. : il. (algumas color.) ; 4 ½ cm.

“CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm)”.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2013.

Área de Concentração: Sanidade Animal.

Orientação: Prof.^a Dr.^a Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro.

1. Coinfecção. 2. Leishmaniose visceral canina. 3. Erliquiose monocítica canina. 4. TNF- α . 5. IL-10. I. Título.

CDD: 636.0896

ADAM LEAL LIMA

COINFEÇÃO NATURAL POR *Leishmania infantum* E *Ehrlichia spp.*:
INFLUÊNCIA SOBRE OS SINAIS CLÍNICOS, PARÂMETROS
HEMATOLÓGICOS, FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA E
INTERLEUCINA 10

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da
Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para
a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Aprovada em 12 / 12 / 13

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Diana Célia Sousa Nunes-Pinheiro
Universidade Estadual do Ceará
Orientadora



Prof. Dra. Erika Freitas Mota
Universidade Federal do Ceará
Examinadora



Prof. Dra. Ana Karine Rocha de Melo
Leite
Universidade Estadual do Ceará
Examinadora

AGRADECIMENTOS

Primariamente a Deus, por sua divindade e amor.

A Universidade Estadual do Ceará por ter me dado à oportunidade de desenvolver meus conhecimentos na minha área de afinidade, contribuindo para meu crescimento profissional e pessoal.

A Universidade Federal de Ouro Preto por ter aceitado a colaboração de fazer essa pesquisa e ter contribuído bastante para realização da mesma.

Ao Centro de Controle de Zoonoses de Fortaleza, por ter colaborado com o manejo de cães infectados e abriram as portas para podermos coletar o tanto de informações quanto achamos necessárias.

A minha querida orientadora Diana Célia Sousa Nunes-Pinheiro, que se dedicou, teve paciência, me instruiu e me motivou.

Ao Professor Alexandre Baborsa Reis, que aceitou colaborar com a pesquisa e confiou na minha capacidade de gerar um bom trabalho.

Ao meu grande amigo José Claudio Carneiro de Freitas, que me impulsionou desde o início, ajudou em todos os passos e por grandes conversas e discussões científicas.

Ao Bruno Mendes Roatt, por ter colaborado com todas as técnicas de dosagens de citocinas e ter sido solícito em todos os momentos, sem negar ajuda e depositando confiança em mim.

Ao Dr. João Alberto Holanda Gomes, por ter aberto as portas da sua clínica, sendo bastante solícito a todos os precedimentos.

Aos proprietários de cães que permitiram a coleta de material acreditando em um fim científico com benefícios para a sociedade.

Ao meu pai, Aldo Ângelo Moreira Lima, meu grande ídolo e exemplo de profissional, professor, médico, pai, marido e amigo.

A minha mãe, Noélia Leal Lima, que me educou e me forneceu amor e carinho em todas as fases da minha vida, sendo sempre presente, nunca me deixando desviar dos caminhos corretos.

A Vanessa da Silva Lima, por acreditar em mim desde o primeiro dia que me viu.

Meus amigos, Carlos Victor Leal Aderaldo, Renan Nogueira da Silva, Ítalo Aguiar Bezerra de Menezes, por serem companheiros em praticamente todas as fases da minha vida.

As minhas cadelas, Naty, Kyra, Mel, Cacau e Eva, por me serem grandes motivadoras de eu ter me tornado veterinário e me proporcionam grandes momentos de descontração.

Ao meu amigo, Glauco Jonas Lemos Santos por ser disposto e nunca me negou colaboração, sendo grande parceiro de pesquisa.

Aos meus amigos de laboratório, Berlamino Eugenio Lopes Neto, Marcio Alencar Araripe, por me darem força e sempre contribuírem quando precisei mesmo sem eu pedir.

A minha irmã, Bruna Leal Lima Maciel, por ser um modelo de dedicação e contribuir com grandes conversas na minha pesquisa.

Ao meu irmão, Breno Leal Lima, por ser meu professor de educação física e me motivar a manter minha saúde física, além de ser um grande amigo e parceiro.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para eu chegar onde eu cheguei hoje, amigo, familiares, professores, colegas e conhecidos, o meu muito obrigado.

RESUMO

A erliquiose monocítica canina (EMC) e a leishmaniose visceral canina (LVC) são doenças sistêmicas que podem acometer um mesmo animal, agravando a patologia das enfermidades isoladamente. EMC é causada por *Ehrlichia canis*. Espécies do gênero *Ehrlichia* podem induzir alterações no sistema imunológico do hospedeiro, fazendo com que apresentem uma resposta com altos títulos de anticorpos não protetores ou um aumento de IL-8, IL-1 β e TNF- α , levando ao agravamento da EMC. A LVC é causada por *Leishmania infantum*. Este gênero de protozoários também afeta a atividade imunológica do hospedeiro. IL-10 e TGF- β estão associadas com a progressão da LVC e animais com aumento da produção de INF- γ controlam a progressão da enfermidade. A LVC e a EMC induzem sinais clínicos semelhantes e a coinfeção pode complicar o diagnóstico, o tratamento e prognóstico do animal. Logo este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da coinfeção natural por *L. infantum* em cães naturalmente infectados por *Ehrlichia spp* sobre os sinais clínicos, parâmetros hematológicos e níveis séricos de TNF- α e IL-10. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual do Ceará (CEUA) antes de ser iniciado. Foram utilizados 68 cães divididos em seis grupos: Controle endêmico (CE, n = 15), Controle não endêmico (CNE, n = 07), Infectados por *Ehrlichia spp*. (IE, n = 11), Infectados com *Leishmania infantum* (IL, n = 08), Coinfectado assintomático (COA, n = 16) e Coinfectado sintomático (COS, n = 11). Amostras de sangue dos animais foram coletadas para exames hematológicos e para obtenção de soro usado nas dosagens das citocinas realizadas com kits comerciais pela técnica de ELISA sanduíche. Para comparação dos grupos estudados foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste Dunn. A influência dos níveis séricos de TNF- α sobre os de IL-10 foi analisada por regressão linear e sua correlação (ρ) dada pelo teste de correlação de Spearman. Todas as análises foram feitas utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism 5.0, num nível de significância de 5%. Os grupos IE, COA e COS apresentaram níveis séricos de TNF- α mais elevados ($41,1 \pm 3,8$, $40,8 \pm 7,6$, $39,5 \pm 11,3$ $\mu\text{g/mL}$) que os grupos CNE e IL ($18,0 \pm 20,7$, $13,7 \pm 6,18$ $\mu\text{g/mL}$). As concentrações de IL-10 se mostraram maiores nos grupos IL ($26,9 \pm 7,92$) e COA ($25,1 \pm 11,5$). IL-10 e TNF- α demonstraram uma correlação positiva nos grupos COA e COS ($\rho = 0.15$, $\rho = 0.93$) e uma correlação negativa no grupo IE ($\rho = 0.07$). Podemos concluir que neste estudo a coinfeção por *Ehrlichia spp*. e *Leishmania infatum* em cães agrava a manifestação clínica das doenças EMC ou LVC isoladamente e que provavelmente o sistema imune está envolvido.

Palavras chaves: Coinfeção. Leishmaniose visceral canina. Erliquiose monocítica canina. TNF- α IL-10.

ABSTRACT

Canine monocytic ehrlichiosis (EMC) and canine visceral leishmaniasis (LVC) are systemic diseases that may affect the same animal, exacerbating the pathology of the diseases alone. EMC is caused by microorganisms of *Ehrlichia canis*. Species of the *Ehrlichia* genus can induce alterations in the host immunologic system, causing that infected dogs present an immune response with high titers of non protective antibodies and an increase of IL-8, IL-1 β and TNF- α , leading to aggravation of the disease. LVC in Brazil is caused by *Leishmania infantum* protozoan. This genus of protozoa also affects the immunologic activities of the host. The cytokine IL-10 and TGF- β are associated with the progression of LVC and animals with increase in the production of INF- γ control the progression of the disease. LVC and EMC have similar clinical signs and coinfection can complicate diagnosis, treatment and prognosis of the animal. Therefore this study aimed to evaluate the influence of natural coinfection by *L. infantum* in dog naturally infected by *Ehrlichia spp.* in serum levels of TNF- α and IL-10. This work was approved by the Comitê de Ética da Universidade Estadual do Ceará (CEUA) before starting. 68 dogs were used divided in six groups: Endemic control (CE, n = 15), Non endemic control (CNE, n = 7), Infected by *Ehrlichia spp.* (IE, n = 11), Infected by *Leishmania infantum* (IL, n = 8), Coinfected asymptomatic (COA, n = 16) and Coinfected symptomatic (COS, n = 11). Blood samples were collected for hematological and to obtain serum used in the cytokine dosages realized with commercial kits by ELISA sandwich technique. For comparison between studied groups the Kruskal-Wallis test was used followed by the Dunn test. The influence of the serum levels of TNF- α on IL-10 was analyzed by linear regression and its correlation (ρ) given by Spearman correlation test. The GraphPad Prism 5.0 software was used to make all statistic analysis using 5% of significance. IE, COA e COS groups presented serum levels of TNF- α more elevated ($41,1 \pm 3,8$, $40,8 \pm 7,6$, $39,5 \pm 11,3$ pg/mL) then CNE and IL groups ($18,0 \pm 20,7$, $13,7 \pm 6,18$ pg/mL). Higher concentrations of IL-10 was detected in IL ($26,9 \pm 7,92$) and COA ($25,1 \pm 11,5$) groups. IL-10 and TNF- α showed a positive correlation in COA e COS groups ($\rho = 0.15$, $\rho = 0.93$) and a negative correlation in IE group ($\rho = 0.07$). We can conclude that in this work the *Ehrlichia spp.* and *Leishmania infantum* coinfection can exacerbate the clinical manifestation of the EMC or LVC alone and that the immune system is probably involved.

Key words: Coinfection. Canine visceral leishmaniasis. Canine monocytic ehrlichiosis. TNF- α . IL-10.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição geográfica da LV	2
Figura 2: Agente etiológico da LV, protozoários do gênero <i>Leishmania</i> na sua forma promastigota (A) e amastigota (B).....	3
Figura 3: Fêmeas de <i>Phlebotomus argentipes</i> (A), <i>Lutzomyia longipalpis</i> (B e C), vetores das <i>Leishmania</i>	3
Figura 4: Ciclo biológico do gênero <i>Leishmania</i>	4
Figura 5: Recrutamento dos neutrófilos ao local da inflamação (inoculação do parasito)...	5
Figura 6: Uma NET aprisiona três formas promastigotas (P) de <i>L. amazonensis</i>	5
Figura 7: Modelos de transferência do parasito <i>Leishmania</i> dos neutrófilos para os macrófagos.....	6
Figura 8: Ilustração da diferenciação dos linfócitos T auxiliares em Th1, Th2 e Th17.....	8
Figura 9: Modelos de resposta imunológica contra <i>Leishmania</i>	9
Figura 10: Exemplos de cães com LVC mostrando caquexia, conjuntivite, onicogribose e lesões ulcerativas.....	10
Figura 11: <i>E. canis</i> dentro de um macrófago de um cão infectado experimentalmente.	12
Figura 12: Ilustração geográfica da prevalência sorológica e molecular de infecções por <i>Ehrlichia spp.</i> em cães no Brasil.....	13
Figura 13: Ciclo de vida do carrapato <i>R. sanguineus</i>	14
Figura 14: Carrapato <i>R. sanguineus</i> adulto fêmea ingurgitada após alimentação.....	14
Figura 15: Carrapato <i>R. sanguineus</i> adulto macho (A) e fêmea (B).....	15
Figura 16: Infestação por carrapato <i>R. sanguineus</i> em um cão.....	15
Figura 17: Cão com EMC sem sinais aparentes, com histórico de hiporexia emagrecimento (A) e com apatia, hiporexia e alopecia (B).....	17
Figura 18: Resposta não protetora contra <i>Ehrlichia spp.</i>	19
Figura 20: exemplo de desenho de placa para realização de ELISA sanduíche.....	27

CAPITULO I

Figure 1: Frequency of clinical signs observed in control dogs (CT) and naturally <i>Ehrlichia spp.</i> infected dogs (EH).....	36
Figure 2: Serum concentrations of TNF- α and IL-10 in control dogs (CT) and naturally <i>Ehrlichia spp.</i> infected dogs (EH).....	37
Figure 3: Correlation between serum IL-10 and TNF- α in control dogs (CT) (a) and naturally <i>Ehrlichia spp.</i> infected dogs (EH) (b).....	38

CAPITULO II

Figura 1: Frequência dos sinais clínicos observados nos grupos Controle Endêmico (CE), Infectados por <i>Ehrlichia spp.</i> (IE), Infectados por <i>L. infantum</i> (IL), Coinfectados Assintomáticos (COA) e Coinfectados Sintomáticos (COS).....	53
Figura 2: Parâmetros hematológicos e bioquímicos nos grupos nos grupos Controle Endêmico (CE), Controle Não Endêmico (CNE), Infectados por <i>Ehrlichia spp.</i> (IE), Infectados por <i>L. infantum</i> (IL), Coinfectados Assintomáticos (COA) e Coinfectados Sintomáticos (COS).....	55

Figura 3: Concentrações séricas de TNF- α e IL-10 nos grupos Controle Endêmico (CE), Controle Não Endêmico (CNE), Infectados por <i>Ehrlichia spp.</i> (IE), Infectados por <i>L. infantum</i> (IL), Coinfectados Assintomáticos (COA) e Coinfectados Sintomáticos (COS).....	56
Figura 4: Correlação de IL-10 e TNF α séricos nos grupos Infectados por <i>Ehrlichia spp.</i> (IE), Infectados por <i>L. infantum</i> (IL), Coinfectados Assintomáticos (COA) e Coinfectados Sintomáticos (COS).....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentrações de diluição usadas no padrão recombinante para realização da curva padrão de cada citocina.....	27
CAPITULO I	
Table 1: Hematological and biochemical parameters of control dogs (CT) and naturally <i>Ehrlichia spp.</i> infected dogs (EH).....	37
CAPITULO II	
Tabela 1: Média dos escores dos sinais clínicos dos grupos Controle Endêmico (CE), Infectados por <i>Ehrlichia spp.</i> (IE), Infectados por <i>L. infantum</i> (IL), Coinfectados Assintomáticos (COA) e Coinfectados Sintomáticos (COS).....	52
Tabela 2: Parâmetros hematológicos e bioquímicos (média $\pm$ desvio padrão) nos grupos Controle Endêmico (CE), Controle Não Endêmico (CNE), Infectados por <i>Ehrlichia spp.</i> (IE), Infectados por <i>L. infantum</i> (IL), Coinfectados Assintomáticos (COA) e Coinfectados Sintomáticos (COS).....	54
Tabela 3: Concentrações séricas de TNF- α e IL-10 (μ g/mL) nos grupos Controle Endêmico (CE), Controle Não Endêmico (CNE), Infectados por <i>Ehrlichia spp.</i> (IE), Infectados por <i>L. infantum</i> (IL), Coinfectados Assintomáticos (COA) e Coinfectados Sintomáticos (COS).....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

CE - Controle endêmico

CNE – Controle não endêmico

COA – Coinfectados assintomáticos

COS – Coinfectados sintomáticos

CT – Control dogs

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EH – Dogs infected by *Ehrlichia spp.*

EMC – Erliquiose monocítica canina

IE – Infectados por *Ehrlichia spp.*

Ig - Imunoglobulinas

IL – Infectados por *Leishmania infantum*

IL- – Interleucina

IFN - Interferon

INF - Interferon

LC – Leishmaniose cutânea

LMC –Leishmaniose mucocutânea

LV – Leishmaniose visceral

LVC – Leishmaniose Visceral Canina

NET – *Neutrophil extracellular traps*

PMN – Poliformonucleares

Th – Linfócitos T auxiliares

TNF – Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. LEISHMANIOSES.....	2
2.2. ERLIQUIOSE	12
3. JUSTIFICATIVA	20
4. HIPÓTESE CIENTÍFICA	21
5. OBJETIVOS	22
5.1. Objetivo Geral	22
5.2. Objetivos específicos	22
6. MATERIAL E MÉTODOS	23
6.1. Animais	23
6.2. Colheita de sangue e soro.....	24
6.3. Testes imunocromatográfico.....	25
6.4. Quantificação das citocinas no soro.....	25
6.4.1. Preparo das soluções para quantificação de citocinas.....	25
6.4.2. ELISA sanduíche.....	26
6.5. Ensaio imuno Enzimático (ELISA).....	28
6.6. Diagnóstico parasitológico	28
6.7. Análise estatística	29
7. CAPÍTULO 1.....	30
8. CAPÍTULO 2	46
9. CONCLUSÕES.....	65
10. PERSPECTIVAS	66
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1. INTRODUÇÃO

A medicina veterinária é a ciência médica que se dedica à saúde dos animais, garantindo produtos de origem animal, prevenindo a transmissão de zoonoses e zelando pelo bem estar de animais de companhia. Os cães são grandes companheiros da humanidade há séculos, no entanto podem ser acometidos por doenças infecciosas que causam transtornos tanto para eles como para seus proprietários.

Infecção por dois ou mais patógenos transmitidos por vetores artrópodes é comum em climas tropicais e subtropicais, onde os vetores são abundantes. As coinfeções podem potencializar a patogenicidade das doenças, alterando as manifestações clínicas, dificultando o diagnóstico e o tratamento (TOMMASI et al., 2013). Em locais onde a leishmaniose visceral canina (LVC) e a erliquiose monocítica canina (EMC) são endêmicas, assim como seus vetores, a *Lutzomyia longipalpis* e o *Rhipicephalus sanguineus* a coinfeção desses patógenos é possível (SOUSA; ALMEIDA, 2008).

As leishmanioses compreendem um espectro de doenças zoonóticas sendo largamente distribuídas em 88 países, em cinco continentes. Os agentes etiológicos das leishmanioses são espécies de protozoários intracelulares obrigatórios, pertencentes ao gênero *Leishmania*. O cão é o principal reservatório da leishmaniose em ambientes urbanos (ALVES, 2008).

Erliquiose é a doença causada por espécies de bactérias do gênero *Ehrlichia* os quais parasitam leucócitos circulantes de animais domésticos e silvestres, inclusive do homem (DUMLER et al., 2001, RIKIHISA, 2006). A *E. canis* é o agente etiológico da EMC (DUMLER et al., 2001).

Vem sendo relatado que a manifestação clínica dessas doenças depende da resposta imunológica do hospedeiro (KAYE; SCOTT, 2011 VIEIRA et al., 2011). Em ambos os casos uma resposta imune específica é gerada e pode se apresentar de dois tipos: uma celular, com ativação dos macrófagos para aumentar a capacidade de eliminar o protozoário, e a outra do tipo humoral, com a produção de anticorpos. Esta resposta é mediada por citocinas presentes no momento da apresentação do antígeno, bem como a manutenção do tipo da resposta depende dos níveis de citocinas que estimulam ou inibem o sistema imune. Logo as citocinas estão diretamente relacionadas à progressão ou cura da doença e embora existam abundantes informações sobre a imunologia da LVC e da EMC separadamente (ISAMAIL; WALKER, 2005, ALVES, 2008), poucos estudos foram realizados com a coinfeção por *Leishmania-Ehrlichia*. Sendo assim, novos estudos são necessários para entender o papel do sistema imunológico nesta coinfeção, contribuindo para o esclarecimento da imunopatogenese.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LEISHMANIOSES

As Leishmanioses são um complexo de doenças zoonóticas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. A enfermidade se apresenta, em três formas clínicas distintas: cutânea (LC), mucocutânea (LMC) e visceral (LV) (WHO, 2010). A LV é a forma mais grave da doença por possuir elevada mortalidade quando não tratada, sendo esta mortalidade estimada em 50.000 mortes por ano. Todo ano são contabilizados 500.000 casos de LV no mundo e 90% deles ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão (Figura 1) (ALVAR et al., 2006, WHO, 2010).

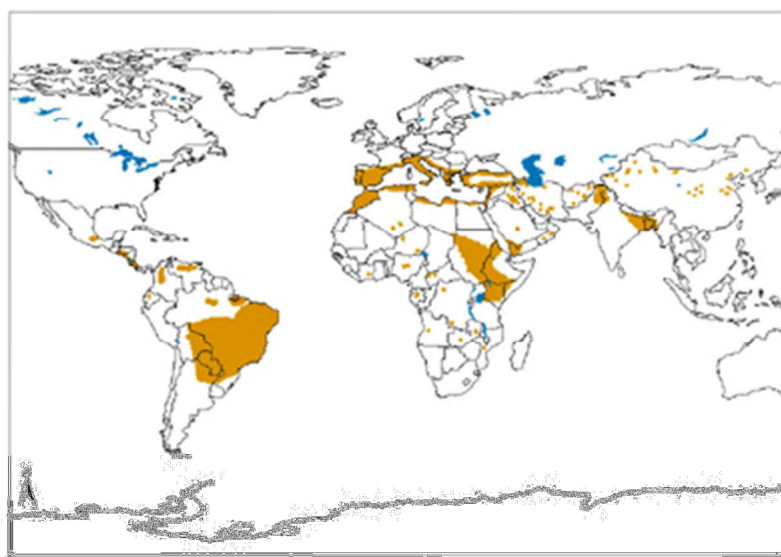


Figura 1: Distribuição geográfica da LV (Fonte: WHO, 2010).

São conhecidos como agentes etiológicos da LV a *L. infantum chagasi* nas Américas, no Sul da Europa, Norte da África e subcontinente indiano e a *L. donovani* no resto da Europa e África (Figura 2) (TESH, 1995). No Ceará, foi relatado que o principal agente etiológico, causador de LVC é *L. chagasi* (ALENCAR, 1959), que é considerado sinonímia de *L. infantum* (DANTAS-TORRES, 2006).

Os hospedeiros mamíferos das espécies de *Leishmania* incluem roedores, edentatos, carnívoros e primatas (WHO, 2010). A transmissão da infecção, para esses hospedeiros, ocorre através da picada de insetos fêmeas infectadas da ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (Figura 3) (SHARMA; SINGH, 2008).

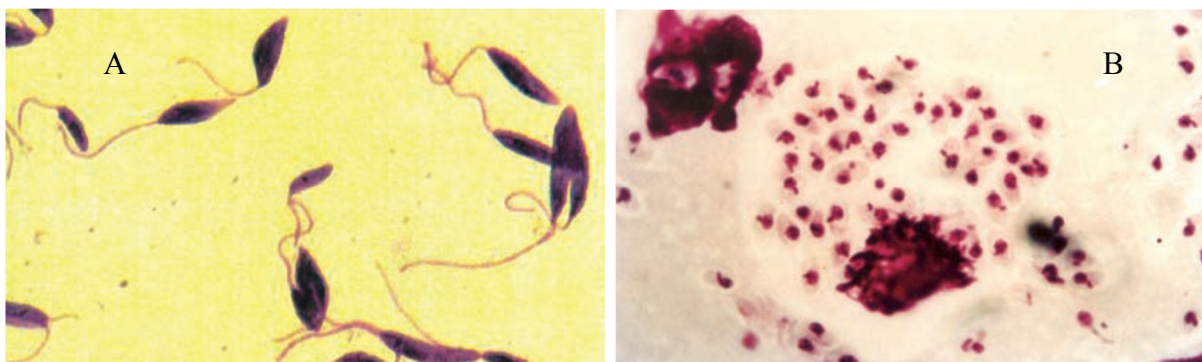


Figura 2: Agente etiológico da LV, protozoários do gênero *Leishmania* na sua forma promastigota (A) e amastigota (B) (Fonte: BRASIL, 2006).



Figura 3: Fêmeas de *Phlebotomus argentipes* (A), *Lutzomyia longipalpis* (B e C), vetores das *Leishmania* (Fonte: BRASIL, 2006, SHARMA; SINGH, 2008).

O cão é o principal reservatório doméstico de *L. infantum* (FREITAS et al, 2013). Os canídeos também são os principais reservatórios no ambiente silvestre, destacando-se as raposas (SHAW, 2003). Gambás e ratos são incriminados como reservatórios silvestres da LV no Novo Mundo, pois já foram encontrados naturalmente infectados por *L. chagasi* (CORREDOR et al., 1989; ZULUETA et al., 1999).

O ciclo biológico da *Leishmania* é heteroxeno e digenético, tendo uma fase no aparelho digestivo do flebotomíneo fêmea, onde atravessa estágios morfológicos de diferenciação para se tornar a forma infectante promastigota metacíclica, e outra fase no hospedeiro mamífero, que adquire o parasito através da picada do inseto infectado (Figura 4) (KAYE; SCOTT, 2011).

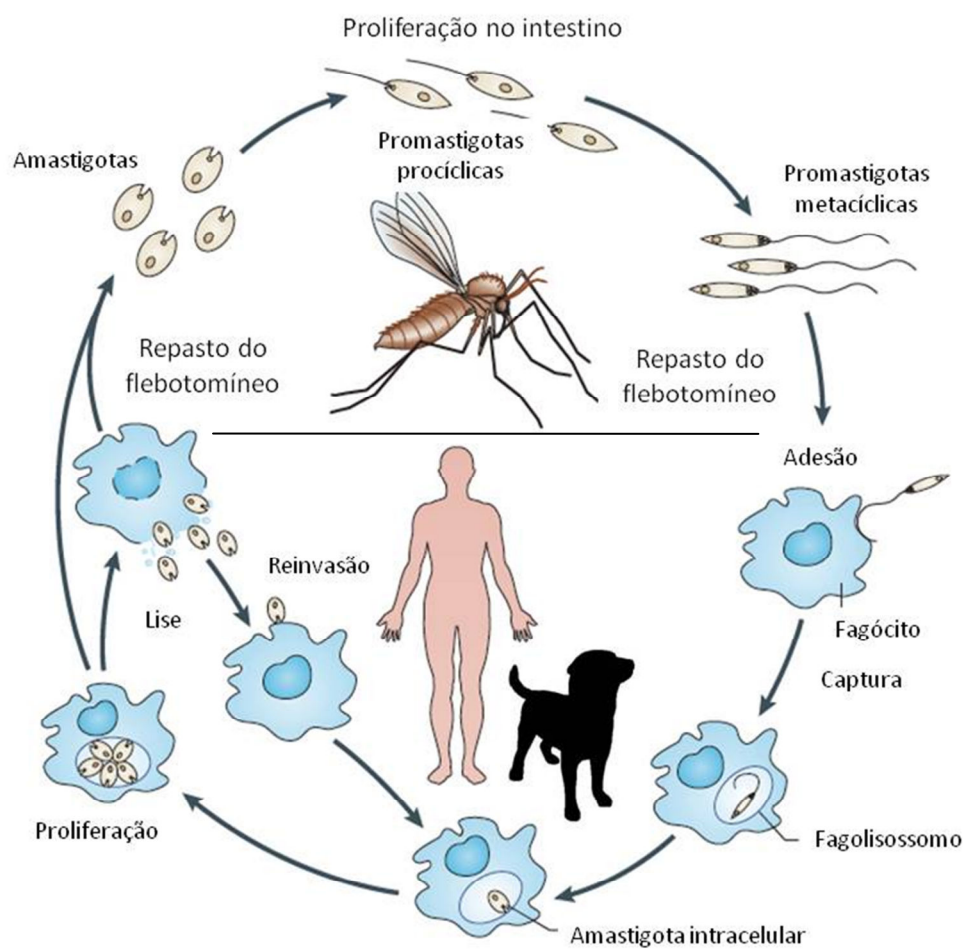


Figura 4: Ciclo biológico do gênero *Leishmania*. *Leishmania* promastigotas procíclicas se diferenciam no flebotomíneo em formas metacíclicas infectantes não replicativas. Durante a alimentação do inseto, este regurgita as formas infectantes do parasito que são fagocitadas por células de defesa do mamífero. Depois de estabelecer residência intracelular, as formas promastigotas metacíclicas se diferenciam em amastigotas. *Leishmania* amastigotas se replicam até a lise da célula infectada, permitindo a infecção de células vizinhas. O ciclo se completa quando o flebotomíneo se alimenta de sangue contendo fagócitos infectados e as formas amastigotas se convertem em promastigotas no intestino do inseto (Fonte: KAYE; SCOTT, 2011, adaptado).

As primeiras células a serem recrutadas para o local da inoculação do parasito são os neutrófilos (CHARMOY et al, 2010). Os neutrófilos ou polifononucleares (PMN) são fagócitos especializados dotados de capacidades antimicrobianas que fazem deles exterminadores de micróbios proeminentes no sistema imune (AMULIC et al., 2012). Os PMNs aniquilam os microrganismos de várias formas (Figura 5), dentre elas existe a fagocitose, a liberação de fatores antimicrobianos e a formação de redes extracelulares de neutrófilos, do inglês *neutrophil extracellular traps* (NET) (RITTER; FRISCHKNECHT; ZANDBERGEN, 2009).

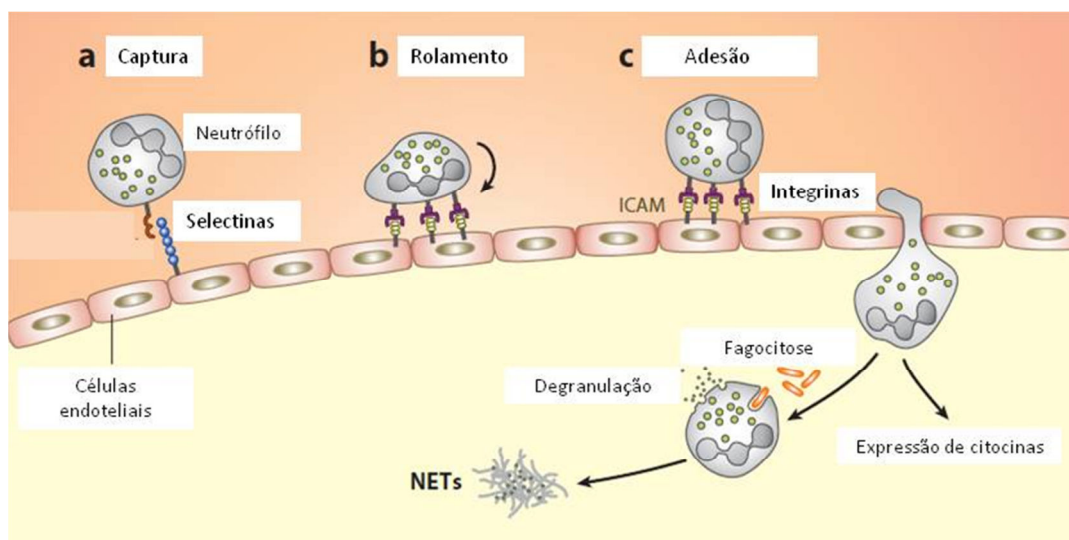


Figura 5: Recrutamento dos neutrófilos ao local da inflamação (inoculação do parasito). Após migrarem os neutrófilos podem secretar citocinas para recrutar outras células imunes e iniciar suas atividades microbicidas: Fagocitose mediada por receptores, liberação de fatores microbicidas pela degranulação e formação das NETs (Fonte: AMULIC et al., 2012, adaptado).

As NETs são formadas pela estimulação dos PMNs a entrarem em um processo de morte programada chamada NETose. Este processo faz com que os PMNs liberem sua cromatina descondensada para o espaço extracelular formando uma rede fibrosa de DNA, histonas, grânulos antimicrobianos e proteínas citoplasmáticas. Esta rede aprisiona bactérias e fungos aniquilando-os pela exposição a uma alta concentração de fatores antimicrobianos (Figura 6) (AMULIC et al., 2012).

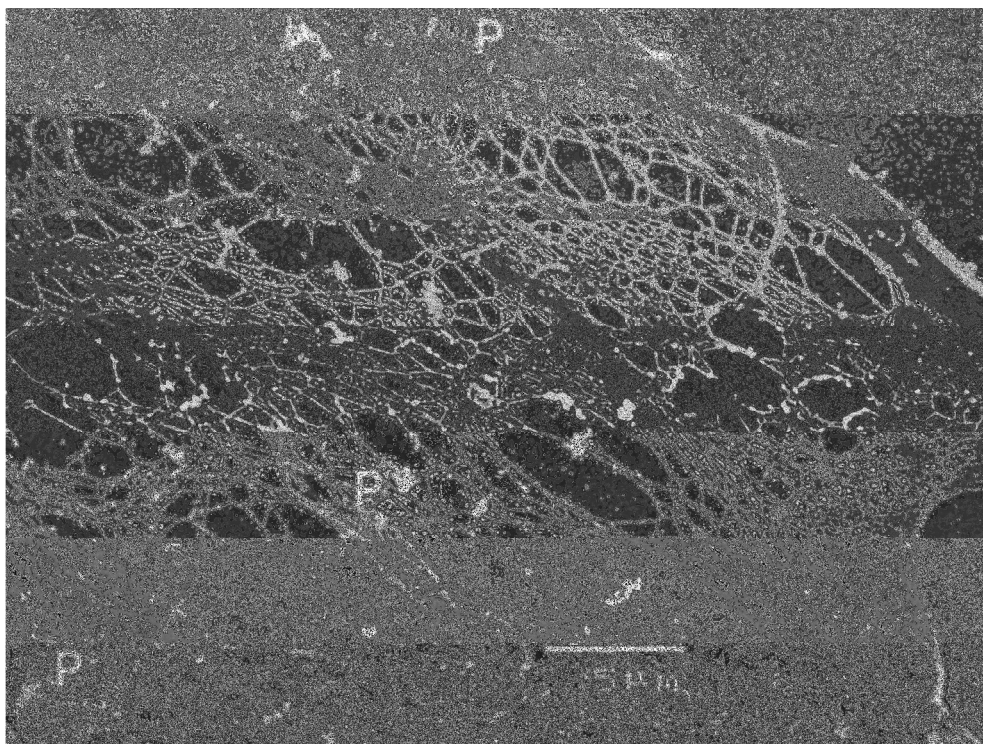


Figura 6: Uma NET aprisiona três formas promastigotas (P) de *L. amazonensis*. Fotomicrografia eletrônica de varredura (Fonte GUIMARÃES-COSTA et al., 2009).

Espécies de *Leishmania* podem evadir-se dos mecanismos antimicrobianos dos PMNs retardando a apoptose programada e inibindo suas atividade fagocíticas. Essa evasão permite a sobrevivência dentro dos PMNs por tempo limitado sem haver multiplicação do parasito (AGA et al, 2002, LASKAY; ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003). Durante esse período, a *Leishmania* deve entrar silenciosamente no macrófago, que irá fagocitar o neutrófilo marcado para a morte programada tal qual faz fisiologicamente (Figura 7) (LASKAY; ZANDBERGEN; SOLBACH, 2008, PETERS et al., 2008, RITTER; FRISCHKNECHT; ZANDBERGEN, 2009, CHARMOY et al., 2010) Dentro do macrófago que a *Leishmania* se replica e sobrevive por longos períodos (KAYE; SCOTT, 2011).

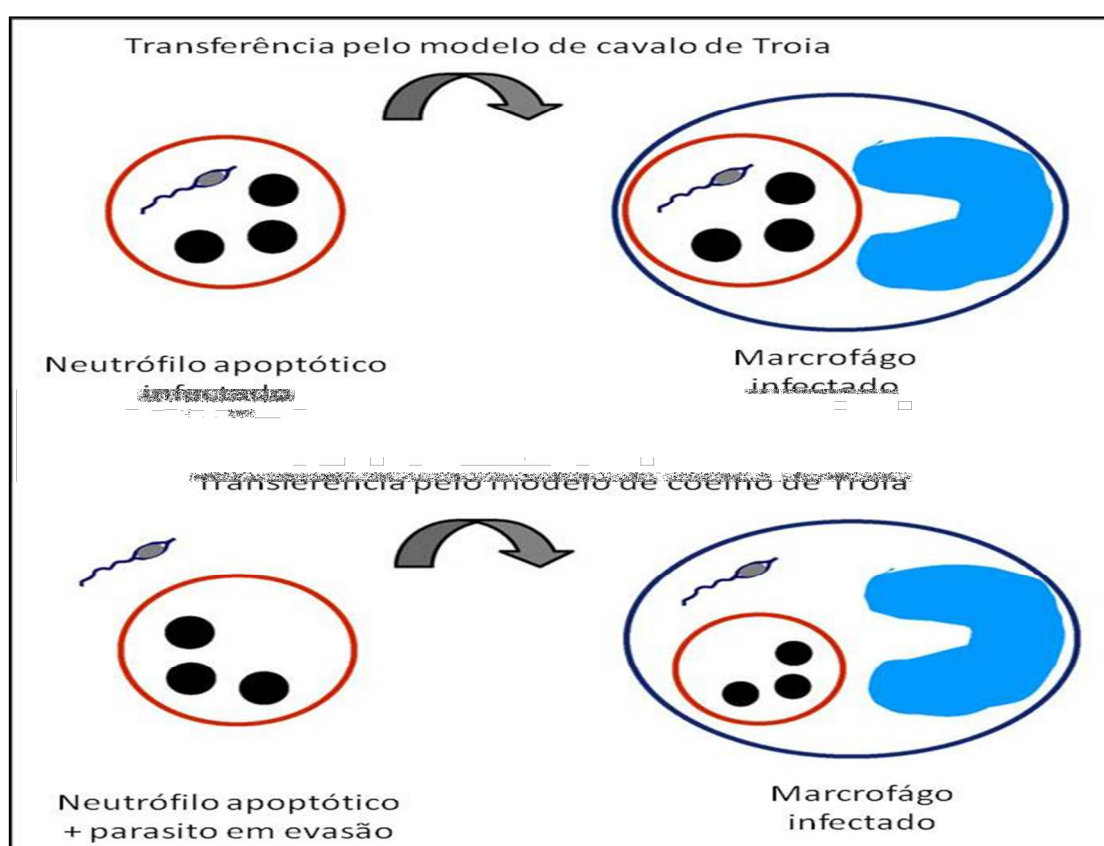


Figura 7: Modelos de transferência do parasito *Leishmania* dos neutrófilos para os macrófagos. Dependendo da espécie, os neutrófilos podem servir como cavalos de Troia ou como coelho de Troia (Fonte: RITTER; FRISCHKNECHT; ZANDBERGEN, 2009, adaptado)

Após ser fagocitado por macrófagos, o parasito continua seu desenvolvimento (CHARMOY et al, 2010). No fagolisossomo, a forma promastigota transforma-se em amastigota, escapando dos mecanismos de defesa celular, persistindo e proliferando no interior de células do sistema imunológico (REILING et al, 2010; KAYE; SCOTT, 2011).

O estabelecimento da infecção implica que o parasito tenha de ser internalizado por células do sistema fagocítico e resistido à ação microbicida (RITTIG; BOGDAN, 2000) e a apresentação

clínica da doença vai depender da espécie do parasito e da resposta imune do hospedeiro (KAYE; SCOTT, 2011). Com isso podemos dizer que o elemento patogênico primário na LVC é a infecção, sobrevivência e multiplicação do parasito no interior das células do sistema mononuclear fagocitário (MARQUES, 2008).

Depois de se multiplicarem dentro dos fagócitos no local da infecção, os parasitos podem deixar a pele através da migração de células apresentadoras de antígenos e se disseminarem para os linfonodos ou infectar fagócitos de outros órgãos como baço, fígado e medula óssea, causando uma doença crônica e às vezes fatal (GOTO; PRIANTI, 2009).

Após os primeiros dias de infecção, a imunidade contra *Leishmania spp.* é mediada por linfócitos T auxiliares CD4⁺ (Th). Para ativar as células T e estimular a diferenciação dessas, três sinais são necessários: processamento e apresentação do antígeno, expressão de moléculas coestimulatórias e a produção de citocinas pela célula hospedeira. Esses três fatores irão determinar se o hospedeiro desenvolve uma resposta protetora ou não (KAYE; SCOTT, 2011).

Os linfócitos Th, após sua ativação pela ligação de citocinas aos receptores de membrana e consequente ativação de fatores de transcrição intracelulares, podem produzir padrões de citocinas e de receptores distintos que nos fazem classifica-los em Th1, Th2, Th17, entre outros (Figura 8). As citocinas são polipeptídios produzidos em resposta a antígenos invasores que medeiam e regulam as repostas imunológicas e inflamatórias. Sua síntese é iniciada por sinais que ativam as células e assim começam a transcrição dos genes, produzindo os RNAs mensageiros que codificam as citocinas, que são na sua maioria instáveis, de modo que a síntese é transitória e a secreção é um evento breve e autolimitado por não serem armazenadas (TISONCIK et al., 2012, WEAVER et al., 2013).

A resposta efetiva contra *Leishmania* é induzida pela Interleucina 12 (IL-12). A IL-12 é uma citocina pró inflamatória que favorece a diferenciação das células T CD4⁺ em Th1, forma um link entre a imunidade inata e a adquirida e estimula a produção de IFN- γ (THINCHIERI, 2003). Este tipo de resposta, também conhecido como imunidade mediada por células, ativa macrófagos através do IFN- γ produzido pelas células Th1, resultando na morte do parasito ((HARRUS et al., 1999, ALEXANDER; BRYSON, 2005, CARRILLO; MORENO, 2009). As citocinas apontadas protetoras contra a LVC são IFN- γ e TNF- α (ALVES et al., 2009, CARRILLO; MORENO, 2009). A produção de óxido nítrico a partir da L-arginina, pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), é uma das principais formas de eliminar o parasito, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (SISTO et al., 2001).

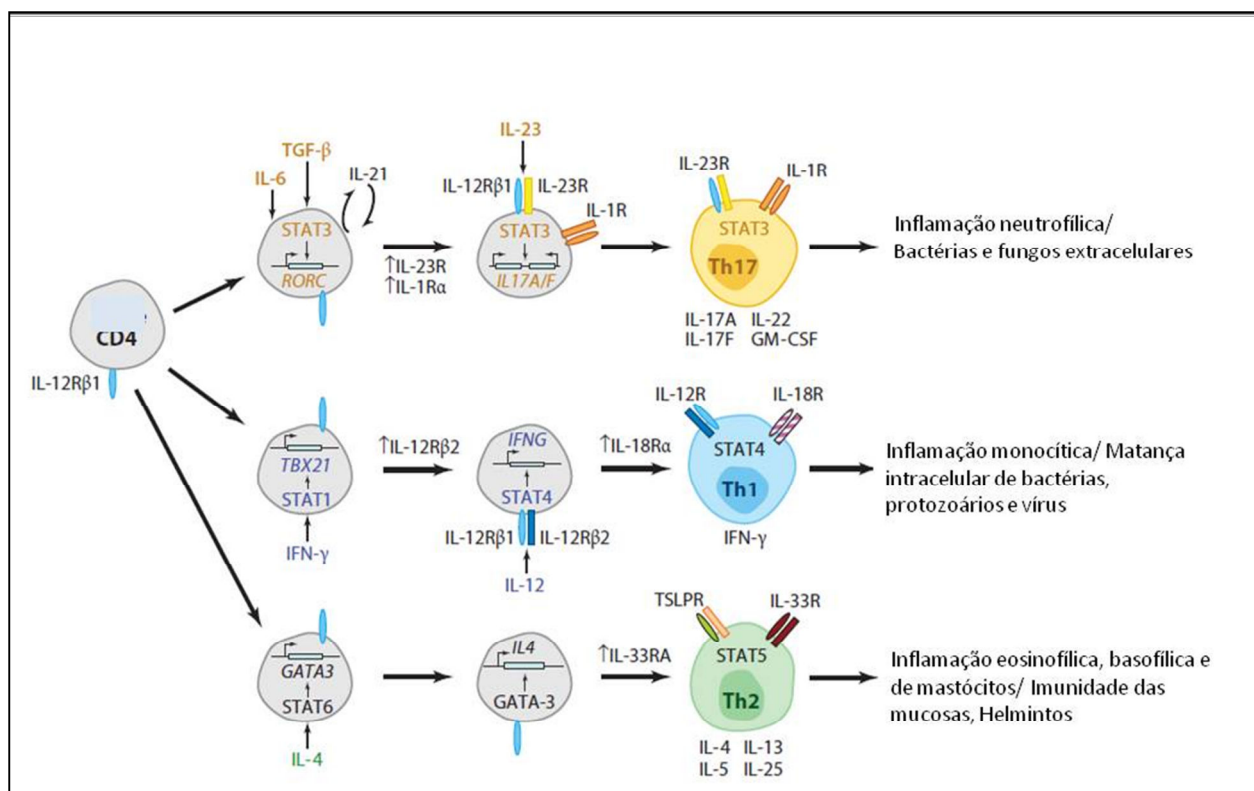


Figura 8: Ilustração da diferenciação dos linfócitos T auxiliares em Th1, Th2 e Th17 (Fonte WEAVER et al., 2013, adaptado).

Por outro lado, a manifestação da doença é caracterizada por uma resposta imune humoral com imunossupressão contra o parasito (REIS et al., 2006). A imunidade humoral é definida como a imunidade medida por anticorpos, proteínas da família das imunoglobulinas (Ig) que se dividem em cinco classes: IgG, IgM, IgA, IgE, IgD (TIZARD, 2002). Muitos estudos foram realizados para elucidar o papel do perfil das imunoglobulinas na LVC, principalmente na relação das subclasses de IgG: IgG1, IgG2 (COURA-VITAL, 2011, FREITAS et al., 2012), no entanto a associação de uma determinada subclasse a susceptibilidade a doença é controversa (BARBIÉRI, 2006).

Hoje o papel das citocinas características da resposta mediada por Th2 (IL-4, IL-13, IL-5, IL-25) é discutido e é dito que pode ter uma função na proteção contra LV. A IL-4 desempenha um importante papel na susceptibilidade a leishmaniose na indução cutânea de *Leishmania major* (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002), por esse motivo os níveis de IL-4 no soro de pacientes humanos com LV tem sido investigado. Nesses pacientes os níveis de IL-4 variam, estando presente em alguns pacientes e em outros não. A IL-13 também está relacionada com a susceptibilidade, sendo detectada no soro em alguns estudos (GOTO; PRIANTI, 2009).

A IL-10 é uma citocina chave em limitar a resposta mediada por Th1 e prevenir danos ao hospedeiro, no entanto em grandes quantidades ela inibe a resposta imune mediada por células facilitando o desenvolvimento de doenças crônicas (LEAVY, 2007). Ela foi identificada como uma importante citocina na susceptibilidade a LV e LC em humanos, além de estar associada à

persistência dos parasitos nas lesões (BELKAID et al., 2001, ALEXANDER; BRYSON, 2005). A IL-10 é um inibidor de macrófagos e células dendríticas ativadas e sua função é prevenir danos exagerados causados por respostas inflamatórias e imunológicas (OUYANG et al., 2011).

A produção de IL-12 por macrófagos e células dendríticas ativados é inibida pela IL-10, logo IL-10 diminui a produção de IFN- γ e regula negativamente a resposta contra microrganismos intracelulares, diminuindo a produção de espécies reativas ao oxigênio (TRINCHIERI, 2001). Animais geneticamente deficientes para IL-10 morrem rapidamente quando infectados com patógenos como *Toxoplasma gondii* ou *Trypanosoma cruzi*. Nestes estudos, a morte é causada por uma superprodução de citocinas pró-inflamatórias (GAZZINELLI et al., 1996; HUNTER et al. 1997). O IFN- γ e a IL-10 são ditos como as principais moléculas que determinarão a resolução da LV ou a manifestação da doença, respectivamente (CALDAS et al., 2005).

Murphy et al. (2001) mostraram que na ausência de IL-10, camundongos infectados por *L. donovani* desenvolveram uma resposta do tipo Th1, que por sua vez foi eficiente em controlar a infecção visceral. No mesmo estudo, os autores afirmam que a produção de IL-10 está correlacionada com a LV humana, sugerindo uma terapia que consiga reduzir os níveis de IL-10 ou bloquear os seus efeitos (MURPHY et al., 2001).

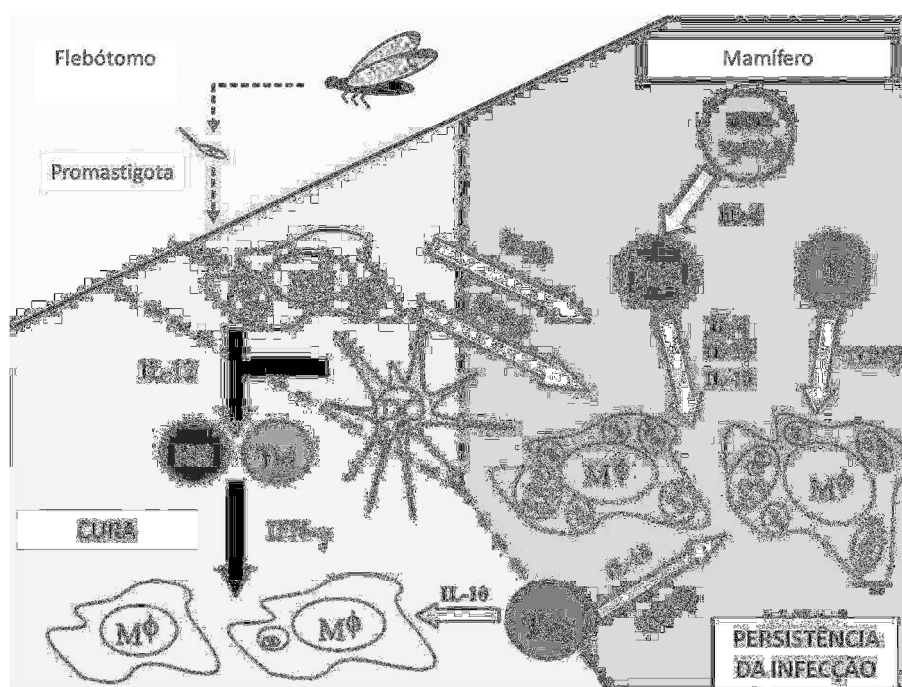


Figura 9: Modelos de resposta imunológica contra *Leishmania*. O flebotomíneo inocula as formas promastigotas da *Leishmania* no hospedeiro mamífero que são fagocitadas por macrófagos ou células dendríticas. Essas células podem detectar a presença do parasito e produzir IL-12, que irá estimular a diferenciação de células Th1 e a consequente produção de IFN- γ , com posterior ativação dos macrófagos e aumento da capacidade fagocítica, aniquilando o parasito. Outra opção é a produção de IL-10 e TGF- β pelos macrófagos devido aos mecanismos de defesa da *Leishmania*, isso induzirá uma produção de IL-4, IL-13 e IL-10 por linfócitos Th2, que irão inibir a atividade fagocítica do macrófago e estimular a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos (Fonte: ALEXANDER; BRYSON, 2005).

Cães que falhem em aniquilar o parasito pela resposta imunológica podem desenvolver LVC. Caquexia, conjuntivite e onicogribose são os sinais clínicos mais frequentes em áreas urbanas, seguidas de lesões com crostas ao redor dos olhos e pontas de orelhas, alopecia, lesões ulcerativas, hiperqueratose e esfoliação (Figura 9) (QUEIROZ et al., 2009).



Figura 10: Exemplos de cães com LVC mostrando caquexia, conjuntivite, onicogribose e lesões ulcerativas (Fonte: arquivo pessoal).

O diagnóstico da LVC em áreas endêmicas baseado nos sinais clínicos isoladamente, não é suficiente para identificar um cão infectado devido a pouca especificidade dos sinais (CAMARGO; LANGONI, 2006), tornando a utilização de exames laboratoriais essencial para confirmar a infecção, podendo ser realizada pelo exame parasitológico ou sorológico (BRASIL, 2006). Outras metodologias estão sendo desenvolvidas com técnicas variadas como a citometria de fluxo (SANTIAGO et al., 2008, KER et al., 2013) e a reação em cadeia da polimerase (PCR) (MANNA et al., 2008, REIS et al., 2013).

O exame parasitológico é o método seguro de diagnóstico, já que o parasito é visualizado diretamente na lamina. A especificidade do método é de 100% e a sensibilidade em torno de 80% para cães sintomáticos e menor ainda para cães assintomáticos. Sua desvantagem é a baixa sensibilidade e pouca praticidade da coleta do material, que exige punção de medula óssea, fígado, baço, linfonodos ou biopsia de pele, o que torna inviável para a saúde pública. Os métodos sorológicos, de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o Ensaio Imunoenzimático (ELISA), são os mais utilizados na rotina (BRASIL, 2006). Testes baseados em imunocromatografia rápida têm sido desenvolvidos e apresentam elevada sensibilidade para cães sintomáticos, com desempenho superior ao ELISA, sendo atualmente utilizado como triagem pelo ministério da saúde (QUEIROZ JÚNIOR, 2011).

O tratamento de cães não é uma medida recomendada no Brasil, pois não diminui a importância do cão como reservatório do parasito (BRASIL, 2006). No entanto em outros países o tratamento é realizado principalmente com antimonio de glucantime, miltefosine e

marbofloxacin. Cães tratados permanecem infectados por um longo período, sendo o tratamento utilizado apenas para prolongar a vida do animal e melhorar sua condição clínica (MANNA et al., 2008, WOERLY et al., 2009, ROUGIER et al., 2012).

Logo a LVC permanece sendo um problema de saúde pública e afeta o bem estar humano. O proprietário do cão fica aflito com a apresentação da doença pelo seu companheiro de estimação e com o risco de transmissão para seus familiares. Além disso, cães acometidos ficam expostos a outras infecções já que o sistema imunológico fica comprometido. Outra possibilidade é que uma infecção previa por *Ehrlichia spp.* facilite o desenvolvimento da infecção por *Leishmania infantum*. Nos dois casos a coinfeção só piora o prognóstico do animal existem poucos estudos sobre a imunopatologia da coinfeção.

2.2 ERLIQUIOSE

Erliquiose é a doença causada por espécies de bactérias Gram negativas, intracelulares obrigatórias, pleomórficas medindo de 0,3 a 0,5 X 0,8 a 2,0 µm, do gênero *Ehrlichia* os quais parasitam leucócitos circulantes de animais domésticos e silvestres, inclusive do homem (DUMLER et al., 2001, RIKIHISA, 2006). *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* e *E. (Cowdria) ruminantium* são exemplos dessas espécies de microrganismos (DUMLER et al., 2001).

A EMC tem como agente etiológico a *E. canis* que tem predileção por infectar monócitos (Figura 10) (WANER; HARRUS, 2000). Antigamente costumava-se classificar as espécies de *Ehrlichia* em formas monocíticas (*E. canis*, *E. risticii*), formas granulocíticas (*E. ewingii* e *E. equi*) e formas trombocíticas (*Anaplasma platys*), no entanto essa divisão se mostrou um pouco falha, pois a infecção por uma espécie pode ocorrer em mais de um tipo celular (COHN, 2003).

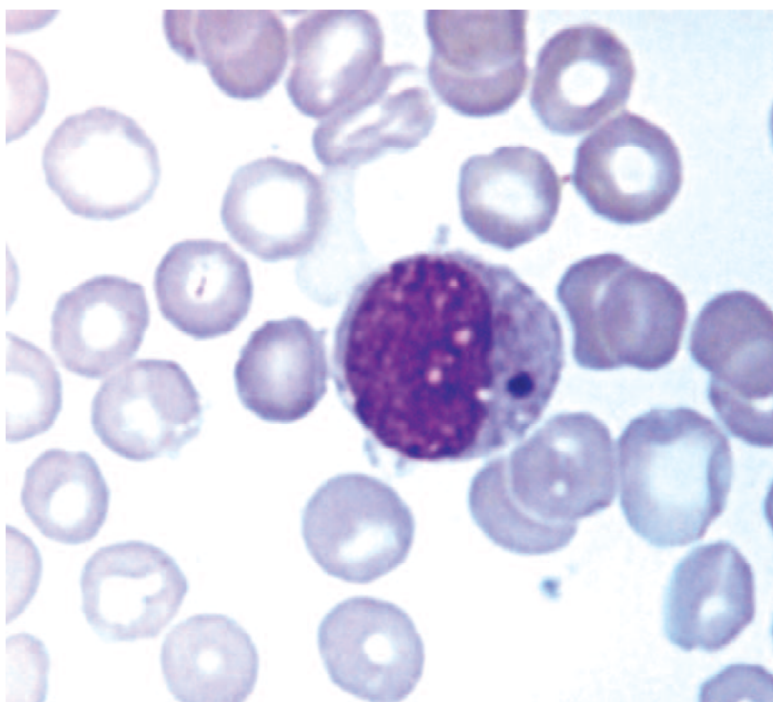


Figura 11: *E. canis* dentro de um macrófago de um cão infectado experimentalmente. Coloração Wright-Giemsa, aumento 100x (Fonte: VIEIRA et al., 2011).

A EMC tem sido reconhecida mundialmente, sendo mais abundante em climas tropicais e subtropicais. É considerada uma das doenças mais importantes que acometem os cães, podendo causar infecções graves e fatais (NAKAGHI et al., 2008; SAITO, 2009). No Brasil, a EMC foi diagnosticada pela primeira vez em Belo Horizonte, Minas Gerais (COSTA et al., 1973), sendo hoje considerada endêmica principalmente nas áreas urbanas (LABRUNA; PEREIRA, 2001) variando a soropositividade de 4,8 a 70% (Figura 11) (AGUIAR et al., 2007, SAITO et al., 2008, TANIKAWA et al., 2013, VIEIRA et al., 2011).



Figura 12: Ilustração geográfica da prevalência sorológica e molecular de infecções por *Ehrlichia spp.* em cães no Brasil (Fonte: VIEIRA et al., 2011).

O principal vetor da espécie *E. canis* em todo o mundo é o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* infectado (GRAY et al., 2013). Carrapatos são animais do filo Arthropoda, que abrange seres invertebrados com exoesqueleto quitinoso rígido, corpo segmentado e membros articulados divididos em duas classes: Insecta e Arachnida. A classe Arachnida difere da classe Insecta pelo fato de o adulto ter quatro pares de patas e corpo composto por cefalotórax e abdômen em vez de três pares de patas e cabeça, tórax e abdômen bem definidos. Logo o *R. sanguineus* está incluso na classe Arachnida (URQUHART et al., 1996).

O ciclo de vida do *R. sanguineus* está dividido em três fases: larva, ninfa e adulto. Por ser uma espécie em que as mudas das fases ocorre no ambiente, ele é denominado um carrapato de três hospedeiros, que cada estágio de desenvolvimento tem lugar em hospedeiros diferentes (Figura 12). Os adultos machos diferem das fêmeas por possuírem um escudo quitinoso que cobre toda a superfície dorsal, a fêmea apresenta este escudo somente em uma pequena área, permitindo a dilatação do abdômen após a alimentação (Figuras 13 e 14) (Urquhart, 1996).



Figura 13: Ciclo de vida do carrapato *R. sanguineus* (Fonte: <http://caofacil.com.br/blog/erliquiose-canina/>).



Figura 14: Carrapato *R. sanguineus* adulto fêmea ingurgitada.
(Fonte: <http://i1.treknature.com/photos/286/rhipicephalussanguineus.jpg>)

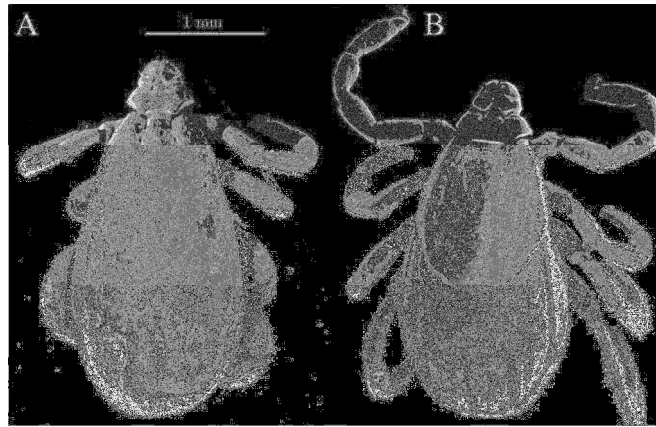


Figura 15: Carrapato *R. sanguineus* adulto macho (A) e fêmea (B) (Fonte: GRAY et al., 2013).



Figura 16: Infestação por carrapato *R. sanguineus* em um cão (Fonte: GRAY et al., 2013)

Este vetor evoluiu como um parasito de carnívoros em climas quentes e com a domesticação do cão foi capaz de colonizar habitações humanas e caninas. É, portanto o carrapato mais comum no mundo e mais prevalente em climas tropicais e subtropicais, motivo que leva a EMC ser mais comum nesses climas (GRAY et al., 2013).

A contaminação de carrapatos por *E. canis* comumente ocorre quando os carrapatos se alimentam nos estágios larval ou ninfal em cães durante a fase aguda da EMC (BREMER et al., 2005). Após se infectarem, as larvas e ninfas mantêm a bactéria por transmissão transestadial fazendo com que todas as fases do ciclo de vida do carrapato possam transmitir a doença (WANER; HARRUS, 2000). A transmissão transovariana da fêmea ingurgitada para os ovos não ocorre. Há relatos que a infecção do carrapato em cães apresentando a fase crônica da doença não foi efetiva (LEWIS et al., 1977). Após se infectar, o vetor pode transmitir o parasito por até 155 dias (WANER; HARRUS, 2000).

Os cães se contaminam no momento do repasto do *R. sanguineus*, onde o microrganismo se dissemina a partir do intestino para os hemócitos e para a glândula salivar (HARRUS; BARK; WANER, 1997). Embora a infecção natural seja principalmente durante o repasto sanguíneo de carrapatos infectados, a transmissão de *E. canis* também pode ocorrer por transfusões sanguíneas de um cão infectado para outro suscetível (BORIN et al., 2009), já que a transmissão da *E. canis* é mecânica e não biológica (WANER; HARRUS, 2000).

Após a infecção pela *E. canis* no cão, ela passa a se multiplicar em monócitos por fissão binária. Nos primeiros três dias, formam-se estruturas compactas, chamadas corpúsculos iniciais, a continuação da replicação do microrganismo forma as mórulas, que podem ser observadas na fase aguda da EMC, 7-12 dias após a infecção. As células mononucleares infectadas liberam os corpúsculos elementares por exocitose ou lise, que irão infectar outras células, disseminando-se pelo organismo do hospedeiro dentro de 8 a 20 dias, tempo que corresponde ao período de incubação (ALMOSNY, 2002, GREENE, 2006).

Instalada no hospedeiro, a EMC pode ser dividida em três fases, aguda, subclínica e crônica, com manifestações clínicas multissistêmicas que variam de intensidade (WANER; HARRUS, 2000). Os cães acometidos na fase clínica podem apresentar apatia, anorexia, febre, vômito, alopecia, secreção oculonasal, esplenomegalia, mucosas pálidas, petequias, gastroenterite, epistaxe e uveíte, persistindo por duas a quatro semanas (Figura 16) (MOREIRA et al., 2003, CASTRO et al., 2004, NAKAGUI et al., 2008, SOUSA; ALMEIDA, 2008, BORIN et al., 2009, MANOEL, 2010). Após essa fase, os cães podem resolver a infecção, partir para a fase subclínica ou vir a óbito (WANER; HARRUS, 2000, CASTRO et al., 2004, SAITO, 2009).

Animais tratados ou não podem evoluir para a fase subclínica de seis a nove semanas após inoculação e manter uma infecção persistente por meses ou anos (BARTSCH; GREENE, 1996, DAVOUST et al., 2005). Nesta fase, os cães se apresentam clinicamente saudáveis e aqueles imunocompetentes podem eliminar o parasito e cessarem a doença, não entrando na fase crônica (WANER; HARRUS, 2000, BREITSCHWERDT, 2004). Cães na fase subclínica são identificados pelos títulos elevados de anticorpos anti-*E. canis* ou pela contagem reduzida de plaquetas (WANER et al., 1997, BULLA et al., 2004).

A fase crônica apresenta sinais clínicos semelhantes aos observados na fase aguda da doença (HUXSOLL et al., 1970; ALMOSNY, 2002), porém caracteriza-se por supressão medular, sangramentos e alta letalidade (DAGNONE et al., 2003). O hemograma pode sugerir uma EMC na fase crônica quando apresenta anemia não regenerativa, leucopenia e trombocitopenia (HUXSOLL et al., 1970; MYLONAKIS et al., 2004). A aplasia medular tem sido implicada como um dos indicadores de mau prognóstico (HARRUS et al., 1997) e os cães cronicamente infectados

geralmente não respondem bem a terapia contra o microrganismo, levando à doença fatal (MYLONAKIS et al., 2004).



Figura 17: Cão com EMC sem sinais aparentes, com histórico de hiporexia e emagrecimento (A) e com apatia, hiporexia e alopecia (B) (Fonte: arquivo pessoal).

O diagnóstico é baseado na anamnese, nos sinais clínicos e resultados de testes laboratoriais (HARRUS; WANER, 2011). Em cães de áreas endêmicas, a contagem de plaquetas e a sorologia são bons testes de triagem e devem ser realizados rotineiramente para identificar cães em fases assintomáticas (BULLA et al, 2004). Apesar da demonstração da mórula de *E. canis* em monócitos de esfregaços de sangue periférico, de medula óssea ou da papa de leucócitos em microscopia de luz ser suficiente para concluir o diagnóstico da EMC, essa técnica oferece baixa sensibilidade, variando de 4 a 34% (HARRUS; WANER, 2011).

A detecção de anticorpos anti-*E. canis* pode indicar infecção, embora isoladamente não seja conclusiva. Sete dias após infecção inicial, anticorpos séricos específicos já podem ser detectados através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI), porém alguns cães podem não ser soropositivos até 28 dias após infecção (WANER et al., 1995). A RIFI é considerada o padrão ouro dentro dos exames sorológicos disponíveis para detectar o contato com *E. canis*, já que anticorpos anti-*Ehrlichia* podem ser detectados por meses ou anos após tratamento e eliminação do parasito (BARTSCH; GREENE, 1996).

Avanços na área de biologia molecular têm proporcionado métodos altamente específicos e sensíveis, para identificação direta do agente etiológico da EMC. Entre estas técnicas, destaca-se a reação em cadeia da polimerase (PCR), que possibilita um diagnóstico preciso e seguro (DOYLE et al., 2005).

O tratamento da erliquiose canina consiste do uso de antibióticos da família das tetraciclinas e a doxiciclina na dose de 10mg/KG a cada 24 horas, por um período de pelo menos três semanas é

a primeira escolha (WANER; HARRUS, 2000). Cães em estágio crônico severo são de difícil cura sendo o prognóstico mais favorável quanto mais cedo for iniciado o tratamento (CODNER; FARRIS-SMITH, 1986; WANER et al., 1997; NEER; HARRUS, 2006). Um protocolo de prevenção foi proposto para cães que serão expostos a áreas de endêmicas, sendo constituído de uma dose diária de 100mg de doxixiclina por dia junto com a refeição (DAVOUST et al., 2005).

Estudos têm mostrado que a patogênese da EMC está associada com mecanismos imunológicos mais do que ao efeito direto da bactéria (HARRUS et al, 1999). As concentrações de proteínas totais, globulina total, α -2 globulina, β -2 globulina e γ globulina apresentam-se elevadas em cães infectados e a concentração de anticorpos anti-*E. canis* não está associada com o aumento γ globulinas na EMC. Essa observação associada à presença de gamopatia policlonal, sugere que *E. canis* induz a produção de anticorpos não específicos (MATUS; LEIFER; HURVITZ, 1987).

Como já foi dito, a produção de anticorpos anti-*Ehrlichia* pode perdurar por um período prolongado após contato com o parasito, no entanto estes anticorpos não são protetores, já que cães tratados e curados são susceptíveis a nova infecção mesmo com alta concentração de anticorpos (DAVIDSON et al., 1978).

Algumas anormalidades como a trombocitopenia e a presença de plaquetas gigantes observadas na EMC envolvem mecanismos imunológicos e inflamatórios relacionados ao aumento no consumo de plaquetas e diminuição na meia vida, provavelmente por sequestro esplênico. Cães esplenectomizados apresentam alterações clínicas mais brandas, mostrando o envolvimento do sistema imune na patologia da EMC (HARRUS et al., 1998).

A resposta imune humoral mediada por Th2, com elevada produção de anticorpos, caracteriza a fase aguda da doença (Figura 17) (HARRUS et al., 1996, GANTA et al., 2004, Vieira et al., 2011). Essa gamopatia pode resultar em trombocitopatia em cães infectados devido a presença de plaquetas associadas à IgG ou anticorpos contra proteínas plaquetárias (WANER et al., 1995). O fator de inibição da migração plaquetária (PMIF), uma citocina sérica, foi encontrada na EMC e seu nível foi inversamente proporcional a contagem de plaquetas. O PMIF tem sido associado a cepas mais virulentas e é produzido por linfócitos quando expostos a monócitos infectados (NEER; HARRUS, 2006).

É dito que a resposta imune celular é o componente mais importante do sistema imune para promover proteção contra *E. canis* (HARRUS et al, 1999). No entanto, as espécies do gênero *Ehrlichia* conseguem persistir por longos períodos nos mamíferos, essa persistência ocorre por uma afinidade entre o parasito e as células alvo, que falham em eliminá-lo. Já foi visto que o complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II) é essencial para eliminar as infecções por *Ehrlichia spp.* (GANTA et al., 2002).

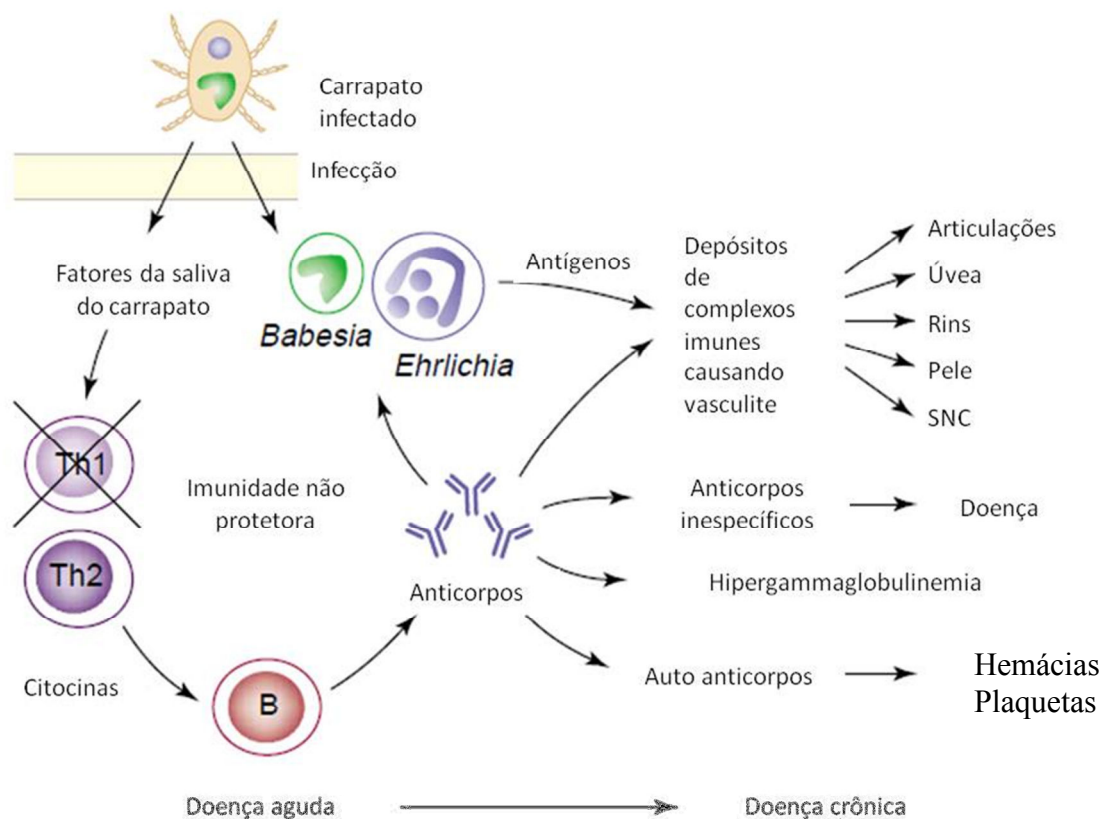


Figura 18: Resposta não protetora contra *Ehrlichia spp.* com bloqueio da resposta Th1, produção de citocinas do tipo Th2, estímulo da produção de anticorpos por células B, com formação de hipergamaglobulinemia com consequente formação de auto anticorpos contra hemácias e plaquetas e depósito de complexos imunes nas articulações, úvea, rins, pele e sistema nervoso central (SNC) (Fonte: SHAW et al., 2001).

Na erliquiose induzida em camundongos, foi visto que uma proteção estava associada à produção de $\text{INF-}\gamma$ e a doença grave e fatal associada ao aumento nos níveis séricos de $\text{TNF-}\alpha$. Uma menor produção de $\text{TNF-}\alpha$ foi relacionada com uma sobrevivência prolongada dos animais estudados (ISMAIL et al., 2004).

3. JUSTIFICATIVA

Os vetores artrópodes *Lutzomyia longipalpis* e *Rhipicephalus sanguineus* são comuns no Brasil, bem como as doenças transmitidas por eles, a LVC e a EMC, logo a incidência da coinfeção de cães por *Leishmania-Ehrlichia* pode ser bastante elevada.

Os cães são altamente susceptíveis à infecção por *Leishmania infantum*, apresentando intenso parasitismo cutâneo e convivem próximo a humanos. Estas características os fazem importantes nesta zoonose. Estudos para entender os mecanismos patológicos e imunológicos da LVC podem contribuir em soluções preventivas da LV que não estejam relacionadas com o sacrifício de cães. A eutanásia dos cães infectados demonstra não ser uma forma efetiva de controle da LV (DITZE et al., 1997). Estes animais possuem vínculos afetivos com a família humana, tornando a maioria dos proprietários resistentes à medida de controle.

Fica evidente que o processo inflamatório causado pela EMC é um estresse para o animal e que seu sistema imune tenta resolver a infecção, mas nem sempre as ações imunes protegem o animal, podendo levar até ao agravamento do quadro clínico ou ao enfraquecimento da defesa contra novos patógenos, proporcionando o aparecimento de coinfeções.

Nesse contexto, o entendimento da imunopatologia da coinfeção por LVC e EMC pode fornecer bases para um tratamento ou uma manipulação do sistema imune que possibilite a cura do animal. As citocinas podem ainda ser biomarcadores da LVC, da EMC ou da coinfeção, constituindo uma ferramenta para monitorar o status clínico do animal.

4. HIPÓTESE CIENTÍFICA

As manifestações clínicas da EMC e da LVC estão associadas com o sistema imunológico e a coinfeção por estes patógenos piora a manifestação dos sinais clínicos e as alterações dos parâmetros hematológicos. Em cães infectados por *Ehrlichia spp.* níveis elevados de TNF- α devem estar associados a sintomatologia clínica enquanto que em cães infectados por *Leishmania infantum* a manifestação da doença deve estar associada a concentrações elevadas de IL-10. Já no grupo coinfectado espera-se uma resposta com elevação das duas citocinas em resposta a um alto comprometimento do sistema imunológico e complicação das manifestações clínicas.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo geral

Avaliar a influência da coinfecção natural por *Leishmania infantum* e *Ehrlichia spp.* sobre os sinais clínicos, parâmetros hematológicos e concentrações de TNF- α e IL-10 em cães.

5.2. Objetivos específicos

Mensurar a quantidade de TNF- α e IL-10 no soro de cães naturalmente infectados com *Ehrlichia spp.* isoladamente.

Avaliar os sinais clínicos de cães com LVC, EMC e coinfectados com *Leishmania-Ehrlichia*.

Comparar os parâmetros hematológicos de cães com LVC, EMC e coinfectados com *Leishmania-Ehrlichia* separados em sintomáticos e assintomáticos.

Mensurar a quantidade de TNF- α e IL-10 no soro de cães naturalmente coinfectados por *Leishmania infantum* e *Ehrlichia spp.* em cães sintomáticos e assintomáticos.

Buscar correlações entre sinais clínicos, parâmetros hematológicos e concentração de citocinas nos cães com LVC, EMC e coinfectados.

Avaliar a correlação das citocinas nos cães com LVC, EMC e coinfectados por *Leishmania-Ehrlichia*.

6. MATERIAL E MÉTODOS

Para que os experimentos se procedessem de acordo com os princípios éticos e as diretrizes internacionais para a pesquisa biomédica envolvendo animais e as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual do Ceará (CEUA) sob número de protocolo 12641308-8 antes de ser iniciado.

6.1. Animais

Foram utilizados 68 cães com peso variando de 5 a 40 kg e idade entre um a oito anos, de ambos os sexos, sem raça definida divididos em seis grupos:

1. Controle endêmico (CE = 15), constituído por cães negativos para *L. infantum* e *Ehrlichia spp.* residentes na área de estudo.
2. Controle não endêmico (CNE = 7) constituído por cães saudáveis, livres de patógenos criados em canil de laboratório.
3. Infectados com *Ehrlichia* (IE = 11) constituído por cães positivos para *Ehrlichia spp.* residentes na área de estudo.
4. Infectados com *Leishmania* (IL = 8) constituído por cães experimentalmente positivos para *Leishmania infantum* criados em canil de laboratório.
5. Coinfectado assintomático (COA = 16), constituído por cães positivos para *L. infantum* e *Ehrlichia spp.* sem sinais clínicos.
6. Coinfectado sintomático (COS = 11), constituído por cães positivos para *L. infantum* e *Ehrlichia spp.* com pelo menos três sinais clínicos de doença.

Para compor o CE, cães oriundos de proprietários particulares residentes em Fortaleza, Ceará, foram submetidos ao teste imunocromatográfico rápido Dual Path Platform (DDP®) e aqueles com teste positivo foram excluídos do experimento. Para descartar qualquer outra doença foi realizada uma avaliação clínica por médico veterinário bem como exames laboratoriais para constatar a boa saúde do animal. Os proprietários foram esclarecidos quanto os procedimentos a serem realizados mediante termo de responsabilidade do veterinário pesquisador e assinaram um termo de consentimento para autorização de amostras do cão na pesquisa (ANEXO II).

O CNE foi composto por cães livres de patógenos provenientes do Canil do Laboratório de Imunopatologia, do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

O IE foi composto por cães encaminhados para clínica veterinária com suspeita de ehrlichiose. Para confirmação da doença, foi realizado um exame parasitológico de aspirado de medula óssea e os animais positivos foram incluídos no grupo. Para verificar a ausência de

leishmaniose neste grupo, amostras de soro foram submetidas ao DDP[®], caso positivo, o animal era excluído do experimento.

Para compor o IL foram utilizados cães infectados experimentalmente provenientes do canil do Laboratório de Imunopatologia, do Núcleo de Pesquisas em Ciências biológicas (NUPEB) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

O COA e o COS foram compostos por animais capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses de Fortaleza-CE (CCZ) por aprestarem sorologia positiva nos testes DDP[®] e ELISA (títulos $\geq 1:40$). O diagnóstico parasitológico por aspirado de medula óssea foi realizado para confirmar a presença de formas amastigotas de *Leishmania spp.* e para visualização de mórulas de *Ehrlichia spp.* dentro das células do sistema imunológico. Exames clínicos foram realizados para diferenciar cães coinfectados sintomáticos de cães coinfectados assintomáticos seguindo o método de Quinnel et al, (2003) com modificações. Durante a avaliação, os sinais clínicos mais frequentes na região receberam escores de 0 a 2, onde 0 = ausente, 1 = leve e 2 = intenso. No caso, os sinais classificados mais frequentes para leishmaniose em Fortaleza foram: caquexia, onicogribose, conjutivite, alopecia, lesões ulcerativas, dermatites e linfadenopatia generalizada, seguindo uma ficha de avaliação clínica mostrada no anexo I (QUEIROZ et al., 2009). Foram considerados sintomáticos animais com a soma dos escores dos sinais acima de seis e assintomáticos aqueles que apresentaram soma igual ou menor que seis.

6.2. Colheita de sangue e soro

Amostras de sangue de todos os animais foram colhidas por punção da veia jugular ou da veia cefálica com seringa e agulha estéril após assepsia com álcool da região de coleta. Dois mL da amostra foram alocados em frascos com o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) para exames hematológicos e outros quatro mL foram conduzidos em frascos sem anticoagulante para obtenção do soro.

Os frascos foram acondicionados em isopor com gelo para transporte. As amostras de sangue em EDTA foram encaminhadas imediatamente ao laboratório de Patologia Clínica da FAVET-UECE para serem analisadas em aparelho de automação hematológica para uso veterinário. O aparelho mede os parâmetros hematológicos incluindo a contagem total das hemácias, hematócrito, hemoglobina, contagem total e diferencial de leucócitos, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), índice de anisocitose (RDW) e contagem de plaquetas. Além do aparelho de automação, foram realizados três esfregaços de cada amostra para confirmar a contagem diferencial, pesquisar por hematozoários e observar alterações na lâmina.

Já as amostras sem anticoagulante foram processadas no Laboratório de Imunologia e Bioquímica Animal da FAVET-UECE para obtenção do soro. Este foi obtido após centrifugação

das amostras a 1000g por 20 minutos. Após este tempo, o soro foi removido, testado imediatamente (DPP[®]) e separado em pelo menos duas alíquotas de 200µL para estocagem a -80° C. As amostras só foram descongeladas no momento da dosagem de citocinas.

6.3. Teste imunocromatográfico

O teste rápido qualitativo para detecção de anticorpos de cão para *Leishmania* em soro, plasma ou sangue total venoso, Dual Path Platform (DPP[®]), é um teste imunocromatográfico que permite a detecção rápida de anticorpos contra *Leishmania chagasi* e foi desenvolvido pela empresa nacional Bio-Manguinhos[®], Rio de Janeiro, Brasil. O teste é composto de uma membrana de nitrocelulose acoplada a um suporte descartável, uma ampola contendo o tampão de corrida, uma lanceta e uma alça coletora (5µL). Na membrana de nitrocelulose, são absorvidos o antígeno K28, formando a linha teste, e o anticorpo anti-IgG canino, constituindo a linha-controle. A bandeja destacável possui dois orifícios: um para aplicação da amostra adicionada de tampão (poço 1), outro para adição posterior de tampão (poço 2).

O teste DPP[®] foi realizado pela adição de 5 µL de soro ao poço 1, seguido da adição de 2 gotas do tampão. Após 5 minutos as linhas azuis controle (C) e teste (T) desaparecem e adiciona-se quatro gotas do tampão no poço 2. Passados 15 minutos, foi feita a leitura dos resultados. O teste foi dito negativo quando na área do controle apareceu uma linha vermelha e considerado positivo quando duas linhas vermelhas foram visualizadas, uma na área do controle e outra na área teste.

6.4. Quantificação de citocinas no Soro

As dosagens das citocinas TNF- α e IL-10 no soro foram realizadas com kits comerciais (R & D Systems, Billings, MT, EUA) pela técnica de ELISA sanduíche. Os kits utilizados foram o Canine TNF-alpha DuoSet (DY1507) e o Canine IL-10 DuoSet (DY735).

Os kits são compostos de um frasco de anticorpo de captura, um frasco com anticorpo de detecção, um frasco com o padrão recombinante e um frasco com estreptavidina conjugada a peroxidase de nabo (HRP).

6.4.1 Preparo das soluções para quantificação de citocinas

O procedimento de ELISA sanduíche requer o preparo de solução de tampão fosfato salino (PBS), solução de lavagem, diluente ou solução de bloqueio, solução de substrato e solução de parada.

O PBS foi feito a partir de 2,55g de NaH₂HPO₄2O, 11,83g de Na₂HPO₄, 87,60g de NaCl adicionados em um litro de água destilada em agitador. Essa mistura pronta corresponde ao PBS 10X. Deste PBS 10X, 600 mL foram diluídos em seis litros para formação de PBS 1X, que é o

recomendando para os procedimentos. Após diluição o pH foi mensurado e ajustado entre os valores de 7,2 a 7,4. Cinco litros de PBS 1X foram adicionados de 2µL de Tween 20 constituindo a solução de lavagem, outros 500 mL foram adicionados de 5g de albumina de soro bovino (BSA) constituindo a solução de bloqueio, os 500 mL restantes foram filtrados em filtro de papel e destes 50 mL foram filtrados novamente em filtros de 0,22µm contituindo o PBS 1X estéril para resuspensão dos anticorpos. A solução de substrato foi utilizada a Tetrametilbenzidina (TMB) substrato líquido do sistema de ELISA da SIGMA[®] (T0440). E ácido sulfúrico 2N (H₂SO₄) foi utilizado como solução de parada.

6.4.2 ELISA sanduíche

O primeiro passo para realização do ELISA foi acrescentar um mL de solução PBS 1X estéril ao frasco de anticorpos de captura de cada kit. Com isso, os anticorpos de captura ficaram nas concentrações indicadas pelo fabricante, no caso 180µg/mL para IFN-γ, 360µg/mL para IL-10, 500µg/mL para TNF-α e 720µg/mL para IL-4.

Após diluir os anticorpos de captura em 1mL de PBS 1X estéril, foi feita a sensibilização da placa de 96 poços de 100µL da Costar[®] com 25µL por poço dos anticorpos de captura na concentração de uso indicado no kit, no caso 1µg/mL para INF-γ, 4µg/mL para IL-10, 1µg/mL para TNF-α e 4µg/mL para IL-4, e deixadas incubadas *overnight*.

No dia seguinte foi realizada a lavagem da placa com adição de 25µL/poço de solução de lavagem com posterior aspiração, repetindo o processo seis vezes. Essa etapa e todas as etapas de lavagem foram feitas dessa forma em aparelho de automação de lavagem de placas. Terminada a lavagem, a placa foi secada e batida suavemente na bancada revestida de papel toalha, para posterior instilação de 75µL/poço de solução de bloqueio. A solução de bloqueio contendo BSA impede que a placa se ligue inespecificamente a outra proteína, caso os anticorpos de captura não tenham se ligado a toda a superfície da placa. A placa então foi coberta com fita adesiva e incubada por uma hora em temperatura ambiente.

Durante incubação foi realizada a diluição do padrão recombinante, que é a proteína alvo do kit (INF-γ, IL-10, TNF-α e IL-4) que vem para podermos realizar a curva padrão da leitura. Foram feitas sete diluições para realização da curva, cada citocina com sua concentração inicial indicada no kit, diluídas seis vezes pela metade. As concentrações usadas estão descritas na tabela 1:

Tabela 1: Concentrações de diluição usadas no padrão recombinante para realização da curva padrão de cada citocina.

INF- γ	IL-10	TNF- α	IL-4
2000pg/ml	2000pg/mL	4000pg/mL	4000pg/mL
1000pg/mL	1000pg/mL	2000pg/mL	2000pg/mL
500pg/mL	500pg/mL	1000pg/mL	1000pg/mL
250pg/mL	250pg/mL	500pg/mL	500pg/mL
125pg/mL	125pg/mL	250pg/mL	250pg/mL
62,5pg/mL	62,5pg/mL	125pg/mL	125pg/mL
31,25pg/mL	31,25pg/mL	62,5pg/mL	62,5pg/mL

Terminada a hora de incubação, as placas foram novamente lavadas para a adição de 25 μ L/poço de padrão recombinante ou da amostra e homogeneizadas por um minuto para posterior incubação por uma hora e meia. Foram utilizadas duas placas por citocina a ser mensurada de forma que o desenho das placas ficou como ilustra o exemplo da figura 19. Todas as placas receberam o padrão recombinante nas concentrações descritas na tabela 1 no intuito de comprovar a técnica.

	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>8</u>	<u>9</u>	10	11	12
A	2000pg/mL		AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS
B	1000pg/mL		AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS
C	500pg/mL		AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS
D	250pg/mL		AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS
E	125pg/mL		AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS
F	62,5pg/mL		AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS
G	31,25pg/mL		AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS
H	PBS 1X		AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS	AMOSTRAS

Figura 20: exemplo de desenho de placa para realização de ELISA sanduíche.

Durante incubação das placas com as amostras, os frascos de anticorpos de detecção foram adicionados de um mL de PBS 1X estéril e os anticorpos foram posteriormente diluídos para as concentrações recomendadas para uso que foi de 4 μ g/mL para INF- γ , 200ng/mL para IL-10, 200ng/mL para TNF- α e 4 μ g/mL para IL-4.

Terminado o tempo de incubação, as placas foram lavadas, adicionadas de 25 μ L/poço de anticorpo de detecção propriamente diluído, tampadas com fita adesiva e papel alumínio, homogeneizadas por um minuto e levadas para incubação por uma hora e meia.

Finalizando a incubação com os anticorpos de detecção, as placas foram novamente lavadas e adicionados 25µL/poço de estreptavidina, diluída em 1:200 em solução de bloqueio, para nova incubação tampadas com fita adesiva e papel alumínio por vinte minutos.

Passados os 20 minutos, mais um processo de lavagem foi feito para adição de 25µL/poço da solução de substrato e as placas foram levadas novamente para incubação tampadas com fita adesiva e papel alumínio por trinta minutos para posterior lavagem. Após a lavagem, 12,5µL/poço de solução de parada foi adicionado e a placa levada para homogeneização e incubação por 20 minutos tampadas com fita adesiva e papel alumínio.

Terminado o período da última incubação, as placas foram levadas para leitura em espectrofotômetro de luz regulado o comprimento de onda em 450nm dentro de trinta minutos.

6.5. Ensaio Imuno Enzimático (ELISA)

O ELISA possibilita a análise de grande quantidade de amostras e detecta baixos títulos de anticorpos. Essa técnica é utilizada pelo CCZ para confirmação do diagnóstico do DPP[®], através do kit EIE-leishmaniose-canina-Bio-Manguinhos. São considerados positivos títulos de ELISA $\geq 1:40$. Neste estudo os testes de ELISA foram todos realizados pelo CCZ.

6.6. Diagnóstico Parasitológico

Consistiu em puncionar a medula óssea da região proximal do fêmur, com uma agulha fina (40x12 ou 15x15 hipodérmica) estéril acoplada a uma seringa de 10 ml, também estéril, para aspiração de uma amostra. Após a coleta de medula, esta foi alocada em lâmina de vidro e realizado dois esfregaços. Os esfregaços foram corados com o Panótico Rápido LB e as lâminas observadas em microscopia de luz no aumento de 1000x com óleo de imersão para visualização direta do parasito. As lâminas foram consideradas positivas para *Leishmania* quando observadas as formas amastigotas dentro de macrófagos e positivas para *Ehrlichia* quando visualizadas mórulas do parasito dentro de células imunológicas. O Panótico Rápido LB, segundo o fabricante (Laborclin), é um conjunto de coloração rápida em hematologia que se baseia no princípio de coloração hematológica estabelecida por Romanowsky.

6.7. Análise estatística

Os sinais clínicos observados nos animais foram expressos em percentagem e média dos escores clínicos. Os dados de hematimetria e concentrações séricas de TNF- α e IL-10 foram expressos em média e desvio padrão. Para comparação dos grupos estudados foi utilizado o teste t não pareado no estudo com dois grupos e o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste Dunn no trabalho com seis grupos. A influência dos níveis séricos de TNF- α sobre os de IL-10 foi analisada por regressão linear e sua correlação (ρ) dada pelo teste de correlação de Spearman. Todas as análises foram feitas utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism 5.0, num nível de significância de 5%.

7. CAPITULO 1

Níveis séricos de TNF- α e IL-10 em cães naturalmente infectados por *Erlichia spp.*

Serum TNF- α and IL-10 in naturally *Erlichia spp.* infected dogs

Adam Leal Lima¹, Glauco Jonas Lemos Santos¹, Bruno Mendes Roatt², Alexandre Barbosa Reis², José Claudio Carneiro de Freitas¹, Diana Célia Sousa Nunes-Pinheiro¹

Acta Scientiae Veterinariae

ISSN 1679-9216. Qualis CAPES: B1 Submetido em novembro de 2013.

ANEXO IV

¹Laboratório de Imunologia e Bioquímica Animal (LIBA), Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Faculdade de Veterinária (FAVET), Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, CE, Brazil.

²Laboratório de Imunopatologia, Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas (NUPEB), Instituto de Ciências Exatas e Biológicas (ICEBII), Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto, MG, Brazil.

CORRESPONDENCE: A. L. Lima & D. C. S. Nunes-Pinheiro [adamlima86@hotmail.com & diana.pinheiro@uece.br Phone +55 (85) 3101-9859]. Programa de Pós- graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará. CEP 60714-903 Fortaleza, CE, Brazil.

Serum TNF- α and IL-10 in naturally *Ehrlichia spp.* infected dogs

Abstract

Background: Canine ehrlichiosis (CE) is a disease caused by *Ehrlichia canis* and dogs can present variable clinical manifestations, ranging from subclinical, to acute or chronic illness. The cellular immune response mediated by Th1 cells is related with the control of *Ehrlichia spp.* infection while the humoral response, mediated by Th2, with high production of antibodies, characterize the acute phase of EC. The balance between Th1 and Th2 can be measured by cytokines. TNF is associated with inflammatory responses while IL-10 inhibits exacerbated tissue damage from inflammation. This study aimed to evaluate serum levels of TNF- α and IL-10 in dogs naturally infected by *Ehrlichia spp.*

Materials, methods & results: Twenty five dogs varying in age, sex and race were divided in two groups: Control (CT, n = 14) and Naturally *Ehrlichia spp* infected dogs (EH, n = 11). *Ehrlichia spp* infection was confirmed by the presence of parasite morulae in bone marrow aspirates. Blood samples were collected for hematological analysis and serum dosages of TNF- α and IL-10 were done by ELISA sandwich technique. The results were expressed by mean and standard deviations. ANOVA was done followed by Tukey test and Spearman correlation test was used when applicable. Alopecia (45%), generalized lymphadenopathy (36%), onychogryphosis (27%) and conjunctivitis (27%) were the most frequent clinical signs in the EH group. No difference was found between studied groups in hematological parameters. The mean concentration of TNF- α was 43.3 ± 16.9 pg/mL in CT and 41.1 ± 3.8 pg/mL in EH, and IL-10 was 20.2 ± 8.4 pg/mL in CT and 21.0 ± 5.1 pg/mL in EH. No significant differences were found between serum levels of the cytokines measured. The results suggest a weak negative correlation between the cytokines in CT ($\rho = -0.12$) and a positive correlation in EH ($\rho = 0.07$). In both groups, serum levels of TNF- α showed a negative influence on the serum levels of IL-10 ($y = 22.40 - 0.04x$ in CT and $y = 26.32 - 0.13x$ in EH).

Discussion: The visualization of parasite morulae in blood smears is conclusive for the diagnostic of EC, however *E. canis* can only be detected for a short period in monocytes. Based on this, we believe that the evaluated EH dogs were all in the beginning of the acute phase of the disease. The animals did not present anemia, leukocytosis or thrombocytopenia, that can be justified by the early infection associated with the absence of clinical signs presentation in EH group. As reported, thrombocytopenia would be an important finding in endemic areas for CE. Our results did not show significant differences in serum concentrations of TNF- α and IL-10 between the studied groups. Similar results were observed in mice infected by *E. chaffeensis*, where the TNF- α and IL-10 serum dosages did not differ between groups. TNF- α and IL-10 are cytokines that represent Th1 and Th2 activities respectively. Th1 response was associated with ehrlichiosis protection in mice with production of INF- γ , but not of TNF- α . Lastly, the correlation and regression analysis between TNF- α and IL-10 showed that the presence of infection by *Ehrlichia spp.* alters the mechanism of how this cytokines are regulated. It suggests that the parasite interferes in the immune response of the host. Furthermore, we can infer that in early stage ehrlichiosis TNF- α and IL-10 are not associated with clinical manifestations of the disease. Possibly, other involved mediators may be used as immunological markers. In our studies, we can infer that in early stage ehrlichiosis, TNF- α and IL-10 are not associated with the disease.

Keywords: Canine Ehrlichiosis, TNF- α , IL-10, Biomarkers.

Introduction

Canine ehrlichiosis (CE) is a disease caused by microorganisms of the *Ehrlichia canis* species transmitted by *Rhipicephalus sanguineus* [1]. The seropositivity varies from 4,8% to 70% all over the world and many dogs in Brazil are affected by the illness [1,23,26,29,31].

This disorder has a variety of clinical manifestations that can present as acute, subclinical or chronic [27,33] with diverse clinical signs [3,18,21]. The hematological findings in experimental CE includes anemia, leukocytosis and thrombocytopenia [5,20]. In endemic areas for CE, thrombocytopenia can be a strong indicator of infection [4], as antiplatelet antibodies are found in the acute phase of the disease [11].

The humoral immune response, mediated by Th2 cells, with high production of antibodies, characterize the acute phase of the disease [9,14,31], while the cellular immune response by Th1 cells is related to the control of the infection by *Ehrlichia spp.* [15]. The balance between Th1 and Th2 cells has been studied in many pathologies and their activities are measured through the cytokines.

Tumor Necrosis Factor (TNF) is a cytokine that increases inflammatory actions and interferes in the immune response [7] and Interleukin-10 (IL-10) is another cytokine that inhibits the immune system preventing tissue damage caused by exacerbated inflammatory responses [22]. TNF- α was detected in dogs with severe acute ehrlichiosis caused by *E. canis* and in mice infected by *E. chaffeensis*, these last had a peak production two days prior to death due to infection [15,16].

To try to understand the role of cytokines in the EC, this study aimed to evaluate serum levels of TNF- α and IL-10 in dogs naturally infected by *Ehrlichia spp.*

Materials and methods

Study population

Twenty five dogs weighing 5 to 40 kg and aged one to eight years, of both sexes, undefined breed, were used and divided into two groups: Control (CT, n = 14) and Naturally *Ehrlichia spp* infected dogs (EH, n = 11).

CT group was composed of dogs from private owners in Fortaleza, Ceará, submitted to clinical evaluation by a veterinarian followed by laboratory tests. Previously, the owners were informed about the procedures to be performed by term of responsibility of the veterinary research and a consent form to permit sampling of the dog was used.

Naturally *Ehrlichia spp* infected dogs were included in EH group after infection confirmation by the visualization of the characteristic parasite morulae in smears from bone marrow aspirates. These dogs did not present *Leishmania spp.* amastigotes in bone marrow aspirate smears and were also negative for *Leishmania* infection in immunoassay dual path platform¹.

The clinical signs evaluated were: cachexia, onychogryphosis, conjunctivitis, alopecia, ulcerative lesions, dermatitis and generalized lymphadenopathy. Scores were assigned from 0 to 2, where 0 = absent, 1 = mild 2 = severe. Dogs with scores above six were considered symptomatic for EC [24].

Blood sampling

Blood sample from all animals was collected by venipuncture and distributed into vials containing anticoagulant ethylenediaminetetraaceticacid (EDTA) for hematological evaluation and into vials without anticoagulant were processed to obtain sera, aliquoted and stored at -80 °C until cytokine evaluation.

The blood samples in EDTA were immediately sent to the Laboratory of Clinical Pathology, Faculty of Veterinary Medicine of the State University of Ceará, to be analyzed in an automation hematologic veterinary machine. Smears of peripheral blood were prepared for the differential count of leukocytes, hematozoa research and observation of cellular changes.

Cytokine dosages

TNF- α and IL-10 levels in serum were detected using commercial kits² by sandwich ELISA following the manufacture instructions. The kits used were Canine TNF-alpha DuoSet (DY1507)² and Canine DuoSet IL-10 (DY735)².

Statistical analysis

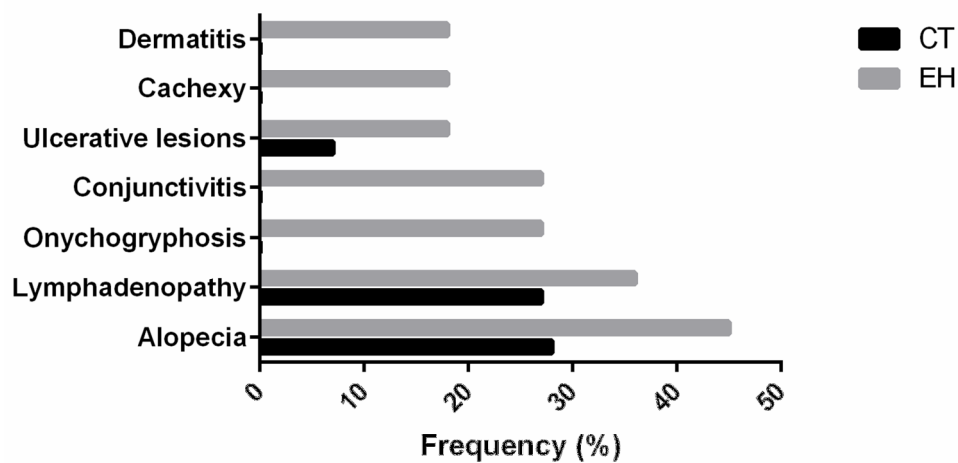
Results were expressed as mean and standard deviation. To detect differences within the groups unpaired t test was used for hematological parameters and cytokine concentration.

A significant difference was accepted when the p value was less than 0.05. Spearman correlation test and linear regression were used. All analysis were realized using the software GraphPad Prism 5.0.

Results

The most frequent clinical signs in EH animals were alopecia (45%), generalized lymphadenopathy (36%), onychogryphosis (27%) and conjunctivitis (27%). In the CT group alopecia was observed (29%) and generalized lymphadenopathy (29%) (Figure 1).

Figure 1: Frequency of clinical signs observed in control dogs (CT) and naturally *Ehrlichia* spp. infected dogs (EH).



EH animals showed no anemia, leukocytosis / leukopenia and thrombocytopenia, and then the results of the complete blood count of the affected animals did not differ significantly from the CT group (Table 1). The parameters evaluated were according to the reference values for the species in both groups [19].

As for the measurement of cytokines, TNF- α concentrations were 43.3 ± 16.9 pg/mL for CT animals and 41.1 ± 3.8 pg/mL for EH animals and IL-10 concentrations were 20.2 ± 8.4 pg/mL in the CT group and 21.0 ± 5.1 pg/mL in the EH group. There was no significant difference between groups (Figure 2).

Table 1: Hematological and biochemical parameters of control dogs (CT) and naturally *Ehrlichia spp.* infected dogs (EH).

Parameters (unit)	CT (X ± dp)	EH (X ± dp)
Hematological		
Red blood count (x10 ³ /dL)	7.06 ± 0.8	6.35 ± 1.42
Hemoglobin (g/dL)	16.88 ± 1.9	14.89 ± 4.2
Hematocrit (%)	48.07 ± 4.4	43.84 ± 11.9
White blood cells (x10 ³ /dL)	15.22 ± 5.2	14.99 ± 13.1
Neutrophil (%)	66.57 ± 10.5	76.27 ± 10.3
Lymphocyte (%)	20.79 ± 8.9	13.18 ± 8.2
Eosinophil (%)	6.79 ± 3,8	3.91 ± 5.7
Monocyte (%)	5.86 ± 3.06	6.55 ± 4.2
Platelets (x10 ³ /dL)	213.4 ± 64.8	172.5 ± 89.6
Biochemical		
Total protein (g/dL)	6.87 ± 1.10	7.11 ± 1.6

Figure 2: Serum concentrations of TNF- α and IL-10 in control dogs (CT) and naturally *Ehrlichia spp.* infected dogs (EH).

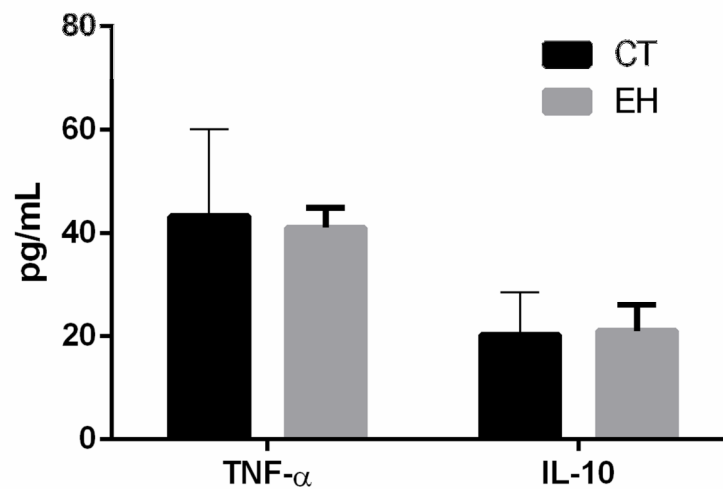
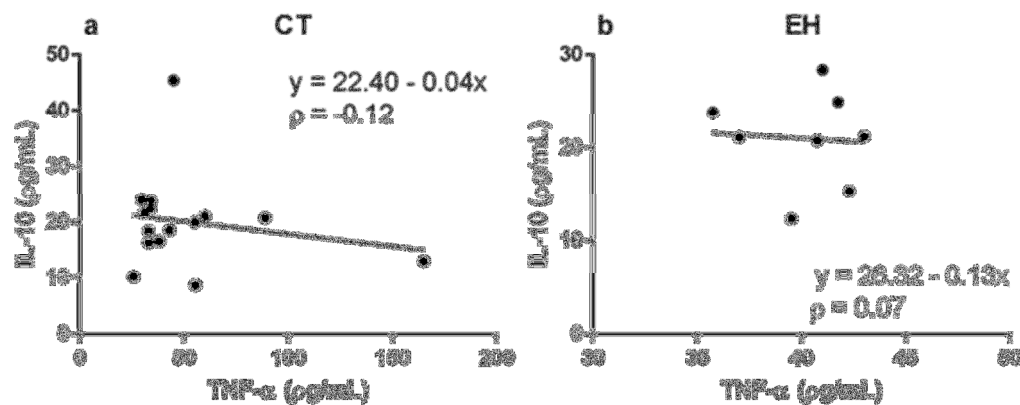


Figure 3 represents the correlation between IL-10 and TNF- α serum levels in control animals and in dogs naturally infected with *Ehrlichia spp.* The results of this analysis suggest a weak negative correlation between the cytokines in CT ($\rho = -0.12$) (Figure 3a) and a positive

correlation in EH ($\rho = 0.07$) (Figure 3b). In both groups (CT and EH), serum levels of TNF- α showed a negative influence on the serum levels of IL-10 ($y = 22.40 - 0.04x$ and $y = 26.32 - 0.13x$, respectively).

Figure 3: Correlation between serum IL-10 and TNF- α in control dogs (CT) (a) and naturally *Ehrlichia spp.* infected dogs (EH) (b).



Discussion

CE is a disease that affects many organs and tissues, with varying clinical manifestations [3,21,30]. In this study, the most frequent clinical signs in EH group were alopecia (45%), generalized lymphadenopathy (36%), onychogryphosis (27%) and conjunctivitis (27%). These data are consistent with other studies that showed apathy, anorexia, fever, vomiting, alopecia, secretion oculonasal, splenomegaly, pale mucous membranes, petechiae, gastroenteritis, epistaxis and uveitis as clinical findings of CE [3,5,13,18,20,21,28]. There are reports that apathy and reductions in ingestion of food are associated with the increase of body temperature in dogs with ehrlichiosis [25]. Regarding the categorization of clinical signs, in the present study, we found only one EH animal with symptomatic clinical scores equal to eight.

All EH animals showed the morulae of *Ehrlichia spp.* in the bone marrow aspirate smears. The visualization of the parasite morulae in blood smears is conclusive for the diagnosis of CE [13]. It is known that *E. canis* can only be detected in a short period of time in monocytes, not being found during the subclinical or chronic stages of the disease [21]. These information reflects that the EH dogs were more likely in an early clinical phase of the disease, because the replication of the microorganism with formation of morulae occurs seven to twelve days following infection [2] and the incubation period is 8 to 20 days [20].

In this study, the values from red blood count (RBC), hematocrit (HT) and hemoglobin (HB) did not differ between EH and CT. In studies with dogs experimentally infected with *E. canis*, the decrease of RBC, HT and HB was observed two weeks after infection with posterior normalization on day 50 [5,25]. Normocytic and normochromic anemia was reported in 84% of naturally infected dogs [3], characterizing a chronic infectious disease. Other authors have reported this situation in other chronic diseases [8]. Anemia or pancytopenia are laboratorial findings in the chronic phase of CE, however mild decrease in the RBC can occur in acute stage [12]. Thus, this data indicates early stages of CE in EH animals.

Our results showed that white cell count did not statistically differ between CT and EH. Leukocyte changes were reported only in symptomatic naturally infected by *E. canis* dogs [18]. The platelet count within the normal parameters can be justified by the recent infection associated to the absence of clinical signs presentation in EH group. As reported, thrombocytopenia would be an important finding in endemic areas for CE [4,6]. Some authors describe thrombocytopenia seven days after natural infection and two weeks after experimental studies [5,25].

TNF- α and IL-10 are cytokines that represent activities of Th1 and Th2 immune responses, respectively. In our study the serum levels of TNF- α and IL-10 did not differ between groups. To our knowledge, this is the first report of TNF- α and IL-10 in dogs naturally infected by *Ehrlichia spp.* The intracellular parasites infection control has been strongly associated with cellular immune response [9,32]. Although TNF- α is important to control intracellular infections, at high

concentrations it may cause toxic shock syndrome [15]. In animal models of infection with *Ehrlichia spp.* the increase in serum TNF- α is strongly associated with severe and fatal disease while a lower production of this cytokine was associated with a prolonged survival of the animals studied [15]. In an experimental study, with the exception of one dog that peaked relevant production 21 days after infection and died after declining levels of the cytokine on day 42, the dogs showed a slight increase in the production of TNF- α [25]. Protection against ehrlichiosis in mice was associated with a Th1-type response by the production of INF- γ but not TNF- α [15].

For *Ehrlichia spp.* infection control the body requires signaling for cellular immune responses, which cannot be produced in excess and consequently to be detrimental for the host. Then, we studied serum levels of IL-10, that is a key cytokine to limiting strong Th1 immune responses and has central importance during the resolution of inflammation [17,22].

In our work, IL-10 levels did not differ between groups. Similar results were observed in mice infected by *E. chaffeensis*, that the serum levels of IL-10 did not increase [10]. However, in experimental EC, it emphasizes an increase of IL-10 and TNF- α in the same dog [25]. As our animals were probably in the early stage of the disease and the levels of TNF- α were not increased, consequently the IL-10 levels were not increased as well.

The association between TNF- α and IL-10 showed that the infection with *Ehrlichia spp.* can induce alterations on cytokines regulation. It suggests that the microorganism, or the inoculation mechanism, interferes with the host immune response, favoring the establishment of the disease. Furthermore, this work demonstrates that early stage CE possibly show no clinical manifestations associated with changes in TNF- α and IL-10 serum concentrations.

Conclusions

Through the results, we can infer that in early stage ehrlichiosis, TNF- α and IL-10 are not associated with the disease. Possibly, other involved mediators may be used as immunological markers. In this view, additional studies should be performed, including the dosage of other cytokines and long term follow-up of infected dogs, allowing the use of cytokines as a tool for the

evaluation of the different stages of CE and hence an understanding of the immunopathogenesis of the disease.

SOURCES AND MANUFACTURERS

1. Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
2. R&D Systems, Billings, MT, EUA.

Funding. The first author had a master scholarship provided by the Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) and Centro de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

Ethical approval. This study was approved by the The Ethics Committee for Animal Use of the State University of Ceará (CEUA/UECE), protocol nº 12641308-8.

Declaration of Interest. The authors declare that there is no conflict of interest.

References

- 1 Aguiar D.M., Cavalcante G.T., Pinter A., Gennari S.M., Camargo L.M.A. & Labruna M.B. 2007.** Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil. *Journal of medical entomology*. 44(1): 126-132.
- 2 Almosny N.R.P. 2002.** *Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses*. 1.ed. Rio de Janeiro: L. F. Livros, pp.135.
- 3 Borin S., Crivelent L.Z. & Ferreira, F.A. 2009.** Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de *Ehrlichia spp.* naturalmente infectados. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 61(3): 566-571.
- 4 Bulla C., Takahira R.K., Araújo, J.P.Jr., Trinca L.A., Lopes R.S. & Wiedmeyer C.E. 2004.** The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. *Veterinary research*. 35(1): 141-146.
- 5 Castro, M.B., Machado, R.Z., Aquino L.P.C., Alessi A.C. & Costa M.T. 2004.** Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. *Veterinary parasitology*. 119(1): 73-86.
- 6 Cortese L., Terrazzano G., Piantedosi D., Sica M., Prisco M., Ruggiero G. & Ciaramella P. 2011.** Prevalence of anti-platelet antibodies in dogs naturally co-infected by *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*. *The Veterinary journal*. 188(1): 118-121.
- 7 Croft M. 2010.** Control of immunity by the TNFR-related molecule OX40 (CD134). *Annual review of immunology*. 28: 57-78.
- 8 Freitas J.C.C., Nunes-Pinheiro D.C.S., Lopes-Neto B.E., Santos G.J.L., Abreu C.R.A., Braga R.R., Campos R.M & Oliveira L.F. 2012.** Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 45(1): 24-29.
- 9 Ganta R.R., Cheng C., Wilkerson M.J. & Chapes S. 2004.** Delayed clearance of *Ehrlichia chaffeensis* infection in CD4+ T-cell knockout mice. *Infection and Immunity*. 72(1): 159-167.

- 10 Ganta R.R., Wilkerson M.J., Cheng C., Rokey A.M. & Chapes S.K. 2002.** Persistent *Ehrlichia chaffeensis* Infection Occurs in the Absence of Functional Major Histocompatibility Complex Class II Genes. *Infection and Immunity*. 70(1): 380-388.
- 11 Gaunt S.D., Corstvet R.E., Berry C.M. & Brennan B. 1996.** Isolation of *Ehrlichia canis* from dogs following subcutaneous inoculation. *Journal of Clinical Microbiology*. 34(6): 1429-1432.
- 12 Harrus S., Kass P.H., Klement E. & Waner T. 1997.** Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. *The Veterinary Record*. 141(14): 360-363.
- 13 Harrus S. & Waner T. 2011.** Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. *The Veterinary journal*. 187(3): 292-6.
- 14 Harrus S., Waner T., Avidar Y., Bogin E., Peh H. & Bark H. 1996.** Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. *Veterinary parasitology*. 66(3-4): 241-9.
- 15 Ismail N., Soong L., McBride J.W., Valbuena G., Olano J.P., Feng H. & Walker D.H. 2004.** 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*. 172(3): 1786-800.
- 16 Ismail N. & Walker D.H. 2005.** Balancing protective immunity and immunopathology: a unifying model of monocytotropic ehrlichiosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1063: 383-94.
- 17 Leavy O. 2007.** T helper cells: Self-control by TH1 cells. *Nature Reviews Immunology*. 7(3): 171-171.
- 18 Manoel C. S. 2010.** Alterações clínicas, hematológicas e sorológicas de cães infectados por *Ehrlichia canis*. 65f. São Paulo, SP. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária). Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária, Universidade de São Paulo.

- 19 Meinloth J.H. & Clinkenbeard K.D. 2000.** Normal hematology of the dog In: Feldman B.F., Zinkl J.G. & Jain N.C. (Eds). *Schalm's veterinary hematology*. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp.1057-1063.
- 20 Moreira S. M., Bastos C.V., Araújo, R.B., Santos M. & Passos L.M.F. 2003.** Retrospective study (1998-2001) on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, MG, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 55(2): 141-147.
- 21 Nakagui A.C.H., Machado R.Z., Costa M.T., André M.R. & Baldani C.D. 2008.** Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. *Ciência Rural, Santa Maria*. 38(3): 766-770.
- 22 Ouyang W., Rutz S., Crellin N.K., Valdez P.A. & Hymowitz S.G. 2011.** Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annual review of immunology*. 29: 71-109.
- 23 Potkonjak A., Savic S., Jurisic A., Petrovic A., Suvajdzic L., Lako B., Milosevic N. & Novakovic Z. 2013.** Seroepidemiological Research of Canine Monocytic Ehrlichiosis in the Autonomous Province of Vojvodina, Serbia. *Acta Scientiae Veterinariae*. 41(1106): 1-8.
- 24 Quinnell R.J., Courtenay O., Garcez L.M., Kaye P.M., Shaw M.A., Dye C. & Day M.J. 2003.** IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 91(3-4): 161-168.
- 25 Saito T.B. 2009.** Estudo da erliquiose em cães expostos a carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* experimentalmente infectados. 127f. São Paulo, SP. Tese (doutorado em medicina veterinária) - Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária, Universidade de São Paulo.
- 26 Saito T.B., Cunha-Filho N.A., Pacheco R.C., Ferreira F., Pappen F.G., Farias N.A.R., Larsson C.E & Labruna M.B. 2008.** Canine infection by rickettsiae and ehrlichiae in southern Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 79(1): 102-108
- 27 Shaw S. E., Day M.J., Birtles R.J. & Breitschwerdt E.B. 2001.** Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends in parasitology*. 17(2): 74-80.

- 28 Sousa V.R.F. & ALMEIDA A.B.P.F.de. 2008.** Co-infecção entre leishmaniose visceral e ehrlichiose monocítica em cães de Cuiabá. *Acta Scientiae Veterinarie*. 36(2): 113-117.
- 29 Tanikawa A., Labruna M.B., Costa A., Aguiar D.M., Justiniano S.V., Mendes R.S., Melo A.L.T., Alves C.J. & Azevedo S.S. 2013.** *Ehrlichia canis* in dogs in a semiarid region of Northeastern Brazil: serology, molecular detection and associated factors. *Research in veterinary science*. 94(3): 474-477.
- 30 Tommasi A.S., Otranto D., Dantas-Torres F., Capelli G., Breitschwerdt E.B & Caprarris D. 2013.** Are vector-borne pathogen co-infections complicating the clinical presentation in dogs? *Parasites & vectors*. 6(97): 1-5.
- 31 Vieira R.F.D.C., Biondo A.W., Guimarães A.M.S., Santos A.P.dos, Santos R.P., Dutra L.H., Diniz P.P.V.P., Morais H.A., Messick J.B., Labruna M.B. & Vidotto O. 2011.** Ehrlichiosis in Brazil. *Revista brasileira de parasitologia veterinária*. 20(1): 1-12.
- 32 Winslow G.M., Yager E., Shilo K., Volk E., Reilly A. & CHU F.K. 2000.** Antibody-mediated elimination of the obligate intracellular bacterial pathogen *Ehrlichia chaffeensis* during active infection. *Infection and Immunity*. 68(4): 2187-2195.
- 33 Woody B.J. & Hoskins J.D. 1991.** Ehrlichial diseases of dogs. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 21: 75-98.

8. CAPITULO II

Coinfecção natural por *Leishmania infantum* e *Ehrlichia spp.* e sua influência sobre os sinais clínicos, parâmetros hematológicos e níveis séricos de TNF- α e IL-10

Natural coinfection by *Leishmania infantum* and *Ehrlichia spp.* in dogs and its influence on clinical signs, hematological parameters and serum levels of TNF- α and IL-10

Adam Leal Lima, Glauco Jonas Lemos Santos, Bruno Mendes Roatt, Alexandre Barbosa Reis, José Claudio Carneiro de Freitas, Diana Célia Sousa Nunes-Pinheiro

Veterinary Parasitology

ISSN: 0304-4017. Qualis capes: A1

A ser submetido

¹Laboratório de Imunologia e Bioquímica Animal (LIBA), Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Faculdade de Veterinária (FAVET), Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, CE, Brazil.

²Laboratório de Imunopatologia, Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas (NUPEB), Instituto de Ciências Exatas e Biológicas (ICEBII), Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto, MG, Brazil.

CORRESPONDENCE: A. L. Lima & D. C. S. Nunes-Pinheiro [adamlima86@hotmail.com & diana.pinheiro@uece.br Phone +55 (85) 3101-9859]. Programa de Pós- graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará. CEP 60714-903 Fortaleza, CE, Brazil.

Coinfecção natural por *Leishmania infantum* e *Ehrlichia spp.* e sua influência sobre os sinais clínicos, parâmetros hematológicos e níveis séricos de TNF- α e IL-10

Resumo

A erliquiose canina (EC) e a leishmaniose visceral canina (LVC) são doenças sistêmicas que podem acometer um mesmo animal, agravando a patologia das enfermidades isoladamente. EC é causada por microrganismos intracelulares obrigatórios Gram negativos da espécie *Ehrlichia canis*. Os parasitos do gênero *Ehrlichia* podem induzir alterações no sistema imunológico do hospedeiro para favorecer sua replicação intracelular e sobrevivência, fazendo com que cães infectados apresentem uma resposta com altos títulos de anticorpos não protetores ou um aumento de IL-8, IL-1 β e TNF- α , levando ao agravamento da enfermidade. A LVC no Brasil é causada pelo protozoário *Leishmania infantum*. Este gênero de protozoários também afeta a atividade imunológica do hospedeiro de diversas formas para promover a sua replicação e sobrevivência. Tem sido relatado que as citocinas IL-10 e TGF- β estão associadas com a progressão da doença e animais com resposta predominantemente mediada por Th1, com aumento da produção de IFN- γ controlam a progressão da enfermidade. A LVC e a EC são enfermidades sistêmicas que possuem sinais clínicos semelhantes. Nestas condições, a coinfecção pode potencializar a patogenia, complicar o diagnóstico, o tratamento e prognóstico do animal. Logo, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da coinfecção natural por *L. infantum* em cães naturalmente infectados por *Ehrlichia spp* os níveis séricos das citocinas TNF- α e IL-10. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual do Ceará (CEUA) sob número de protocolo 12641308-8 antes de ser iniciado. Foram utilizados 68 cães com peso variando de 5 a 40 kg e idade entre um e oito anos, de ambos os sexos, sem raça definida, divididos em seis grupos: Controle endêmico (EC, n = 15), Controle laboratorial (NEC, n = 07), Infectados com *Ehrlichia spp.* (IE, n = 11), Infectados com *Leishmania infantum* (IL, n = 08), Coinfectado assintomático (COA, n = 16) e Coinfectado sintomático (COS, n = 11). Amostras de sangue dos animais foram coletadas para exames hematológicos e para obtenção de soro usado nas dosagens das citocinas realizadas com kits comerciais pela técnica de ELISA sanduíche. Para comparação dos grupos estudados foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste Dunn. A influência dos níveis séricos de TNF- α sobre os de IL-10 foi analisada por regressão linear e sua correlação (ρ) dada pelo teste de correlação de Spearman. Todas as análises foram feitas utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism 5.0, num nível de significância de 5%. Os grupos IE, COA e COS apresentaram níveis séricos de TNF- α mais elevados ($41,1 \pm 3,8$, $40,8 \pm 7,6$, $39,5 \pm 11,3$ pg/mL) que os grupos CNE e IL ($18,0 \pm 20,7$, $13,7 \pm 6,18$ pg/mL). As concentrações de IL-10 se mostraram maiores nos grupos IL ($26,9 \pm 7,92$) e COA ($25,1 \pm 11,5$). IL-10 e TNF- α demonstraram uma correlação positiva nos grupos COA e COS

(colocar valores de p) e uma correlação negativa no grupo IE. Podemos concluir que neste estudo a coinfeção por *Ehrlichia spp.* e *Leishmania infatum* em cães piora a manifestação clínica das doenças CE e LVC isoladamente e que provavelmente o sistema imune está envolvido. As citocinas TNF- α e IL-10 desempenham algum papel na resposta imunológica nesta coinfeção, mas mais estudos são necessários para elucidar seus papéis neste quadro.

Introdução

O Brasil possui abundância de vetores artrópodes para doenças infecciosas em humanos e animais devido ao seu clima tropical (WHO, 2010, TOMMASI et al., 2013). A erliquiose canina (EC) e a leishmaniose visceral canina (LVC) são doenças sistêmicas transmitidas por vetores e podem acometer um mesmo animal, agravando a patologia das enfermidades isoladamente (MEKUZAS et al., 2009).

O carrapato marrom, *Rhipicephalus sanguineus*, é o vetor da EC que é causada por microrganismos intracelulares obrigatórios Gram negativos da espécie *Ehrlichia canis* (AGUIAR et al., 2007). Os principais sinais clínicos de cães portadores da doença são: apatia, diminuição do apetite, vômito, secreção oculonasal, esplenomegalia, desidratação, perda de peso, diarreia e hepatomegalia (BORIN et al., 2009). Os parasitos do gênero *Ehrlichia* podem induzir alterações no sistema imunológico do hospedeiro para favorecer sua replicação intracelular e sobrevivência (RIKIHISA, 2006), fazendo com que cães infectados apresentem uma resposta com altos títulos de anticorpos não protetores (HARUS et al., 1996) ou um aumento de IL-8, IL-1 β ou TNF- α , levando ao agravamento da enfermidade (UNVER; HUANG; RIKIHISA, 2006, SAITO, 2009).

A LVC no Brasil é causada pelo protozoário *Leishmania infantum* e é transmitida por insetos da espécie *Lutzomyia longipalpis*. Cães acometidos pela doença podem apresentar caquexia, onicogribose, conjuntivite, alopecia, lesões ulcerativas, dermatites e linfadenopatia generalizada (QUEIROZ et al., 2009, NASCIMENTO et al., 2013). Este gênero de protozoários afeta a atividade imunológica do hospedeiro de diversas formas para promover a sua replicação e sobrevivência (KAYE; SCOTT, 2011). Tem sido relatado que citocinas IL-10 e o TGF- β , estão associadas com a progressão da doença (ALVES et al., 2009) e a proteção da doença é observada em animais com resposta predominantemente mediada por Th1 com aumento da produção de IFN- γ (TRIPATHI et al., 2007, MANNA et al., 2008).

Tem sido relatado que animais acometidos pela *Ehrlichia spp.* podem apresentar coinfeções com outros patógenos como *Leishmania infantum*, *Babesia spp.*, *Bartonella spp.*, *Cercopithifilaria spp.*, *Hepatozoon canis*, *Anaplasma platys*, *Dirofilaria immitis* e *Dirofilaria repens* (TOMMASI et al., 2013). A LVC e a EC são enfermidades sistêmicas que possuem sinais clínicos semelhantes (FREITAS et al., 2012, BORIN et al., 2009, CASTRO et al., 2004). Nestas condições a coinfeção pode potencializar a patogenia (SOUSA; ALMEIDA, 2008), complicar o diagnóstico, tratamento e prognóstico do animal (SHAW et al., 2001).

Logo este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da coinfeção natural por *L. infantum* em cães naturalmente infectados por *Ehrlichia spp* sobre os sinais clínicos, parâmetros hematológicos e níveis séricos de TNF- α e IL-10.

Material e métodos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual do Ceará (CEUA) sob número de protocolo 12641308-8 antes de ser iniciado.

População de estudo

Foram utilizados 68 cães com peso variando de 5 a 40 kg e idade entre um e oito anos, de ambos os sexos, sem raça definida, divididos em seis grupos: Controle endêmico (CE, n = 15), Controle laboratorial (NEC, n = 07), Infectados com *Ehrlichia spp.* (IE, n = 11), Infectados com *Leishmania infantum* (IL, n = 08), Coinfectado assintomático (COA, n = 16) e Coinfectado sintomático (COS, n = 11).

Para compor o CE, foram utilizados cães oriundos de proprietários particulares residentes em Fortaleza, Ceará, submetidos a uma avaliação clínica por médico veterinário com auxílio de exames laboratoriais para constar a boa saúde do animal. Os proprietários foram esclarecidos quanto os procedimentos a serem realizados mediante termo de responsabilidade do veterinário pesquisador e assinaram um termo de consentimento para autorização de coleta de amostras do cão.

O grupo CNE foi composto por cães livres de patógenos provenientes do Canil do Laboratório de Imunopatologia, do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), que também cederam os cães infectados experimentalmente com *L. infantum* para compor o grupo IL.

Cães naturalmente infectados com *Ehrlichia spp.* confirmados pela visualização da mórula característica do parasito em esfregaço de aspirado de medula óssea foram incluídos no grupo IE. Como critério de exclusão de LVC foi realizado o teste DPP[®].

Animais capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses de Fortaleza-CE (CCZ) com sorologia positiva para *L. infantum* através dos testes DPP[®] e ELISA (títulos $\geq 1:40$) foram utilizados para compor os grupos COA e COS. O diagnóstico parasitológico por aspirado de medula óssea foi realizado para confirmar a presença de formas amastigotas de *L. infantum* e de mórulas de *Ehrlichia spp.* Exames clínicos foram realizados para diferenciar cães coinfectados sintomáticos de cães coinfectados assintomáticos segundo Quinnel et al. (2003) com modificações. Os sinais clínicos caquexia, onicogribose, conjutivite, alopecia, lesões ulcerativas, dermatites e linfadenopatia generalizada receberam escores de 0 a 2, onde 0 = ausente, 1 = leve e 2 = intenso pois são os mais frequentes na LVC (QUEIROZ et al., 2009, FREITAS, 2012). Posteriormente os escores foram somados e aqueles cães com a soma acima de seis e Foram considerados sintomáticos.

Coleta de sangue

Amostras de sangue dos animais foram coletadas por venopunção jugular e distribuídas em frascos contendo o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) para exames

hematológicos e sem anticoagulante que foram centrifugados a 6000mil rpm por 10 min para obtenção de soro, aliquotados e estocados a -80°C até a dosagens das citocinas.

As amostras em EDTA foram encaminhadas imediatamente ao Laboratório de Patologia Clínica da FAVET-UECE para serem analisadas em aparelho de automação hematológica para uso veterinário. Esfregaços de sangue periférico foram realizados para a contagem diferencial, pesquisa de hematozoários e observar alterações celulares.

Dosagem da citocinas

As dosagens das citocinas TNF- α e IL-10 no soro foram realizadas com kits comerciais Canine TNF-alpha DuoSet (DY1507) e o Canine IL-10 DuoSet (DY735) (R & D Systems, Billings, MT, EUA) pela técnica de ELISA sanduíche de acordo com o manual do fabricante.

Análise estatística

Os sinais clínicos observados nos animais foram expressos em percentagem e média dos escores clínicos. Os dados de hematimetria e concentrações séricas de TNF- α e IL-10 foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. Para comparação dos grupos estudados foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste Dunn. A influência dos níveis séricos de TNF- α sobre os de IL-10 foi analisada por regressão linear e sua correlação (ρ) dada pelo teste de correlação de Spearman. Todas as análises foram feitas utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism 5.0, num nível de significância de 5%.

Resultados

Avaliação clínica

A Tabela 1 mostra os principais sinais clínicos nos grupos estudados. O grupo IE apresentou apenas três cães com escore clínico total ≥ 6 e os sinais clínicos mais frequentes foram alopecia (45%), linfadenopatia generalizada (36%), onicogrifose (27%) e conjuntivite (27%). Nos animais do grupo IL, onicogrifose, dermatites e linfadenopatia generalizada foram encontradas em 100% dos cães e somente três animais apresentavam escore clínico total < 6 . Em COA e COS os sinais mais observados foram onicogrifose (69%, 91%), caquexia (50%, 91%) e linfadenopatia generalizada (44%, 91%). As frequências dos sinais clínicos observados estão representadas na Figura 1.

Tabela 1: Média dos escores dos sinais clínicos dos grupos Controle Endêmico (CE), Infectados por *Ehrlichia spp.* (IE), Infectados por *L. infantum* (IL), Coinfectados Assintomáticos (COA) e Coinfectados Sintomáticos (COS).

Parâmetro	CE	CNE	IE	IL	COA	COS
Sinais clínicos						
Caquexia	0,00	0,00	0,27	0,5	0,71	1,2
Onicogrifose	0,13	0,00	0,45	1,12	0,82	1,5
Conjuntivite	0,00	0,00	0,45	0,62	0,35	1,5
Alopecia	0,47	0,00	0,55	1,00	0,35	1,5
Lesões Ulcerativas	0,07	0,00	0,27	0,37	0,35	1,4
Dermatites	0,00	0,00	0,18	1,12	0,35	1,4
Linfadenopatia Generalizada	0,27	0,00	0,45	1,25	0,65	1,2
Total	0,93	0,00	2,64	6,00	3,59	9,7

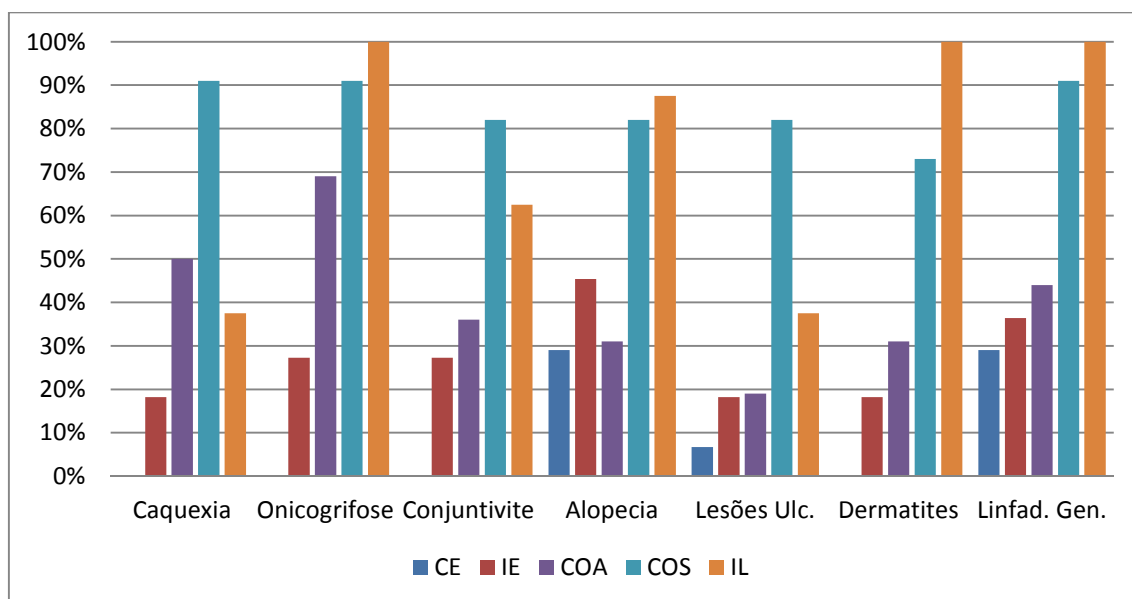


Figura 1: Frequência dos sinais clínicos observados nos grupos Controle Endêmico (CE), Infectados por *Ehrlichia spp.* (IE), , Coinfectados Assintomáticos (COA) Coinfectados Sintomáticos (COS) e Infectados por *L. infantum* (IL).

Avaliação Hematológica e bioquímica

Os valores hematimétricos estão apresentados na Tabela 2 e Figura 2. A contagem das hemácias dos grupos IL ($4,72 \pm 0,6 \times 10^3/\text{dL}$), COA ($4,81 \pm 1,7 \times 10^3/\text{dL}$) e COS ($3,46 \pm 0,6 \times 10^3/\text{dL}$) mostrou-se inferior ao grupo IE ($6,35 \pm 1,4 \times 10^3/\text{dL}$). O mesmo comportamento foi observado na concentração de HB em que IL ($10,21 \pm 1,4 \text{ g/dL}$), COA ($11,16 \pm 3,9 \text{ g/dL}$) e COS ($8,03 \pm 1,5 \text{ g/dL}$) diferem de IE ($14,89 \pm 4,2 \text{ g/dL}$).

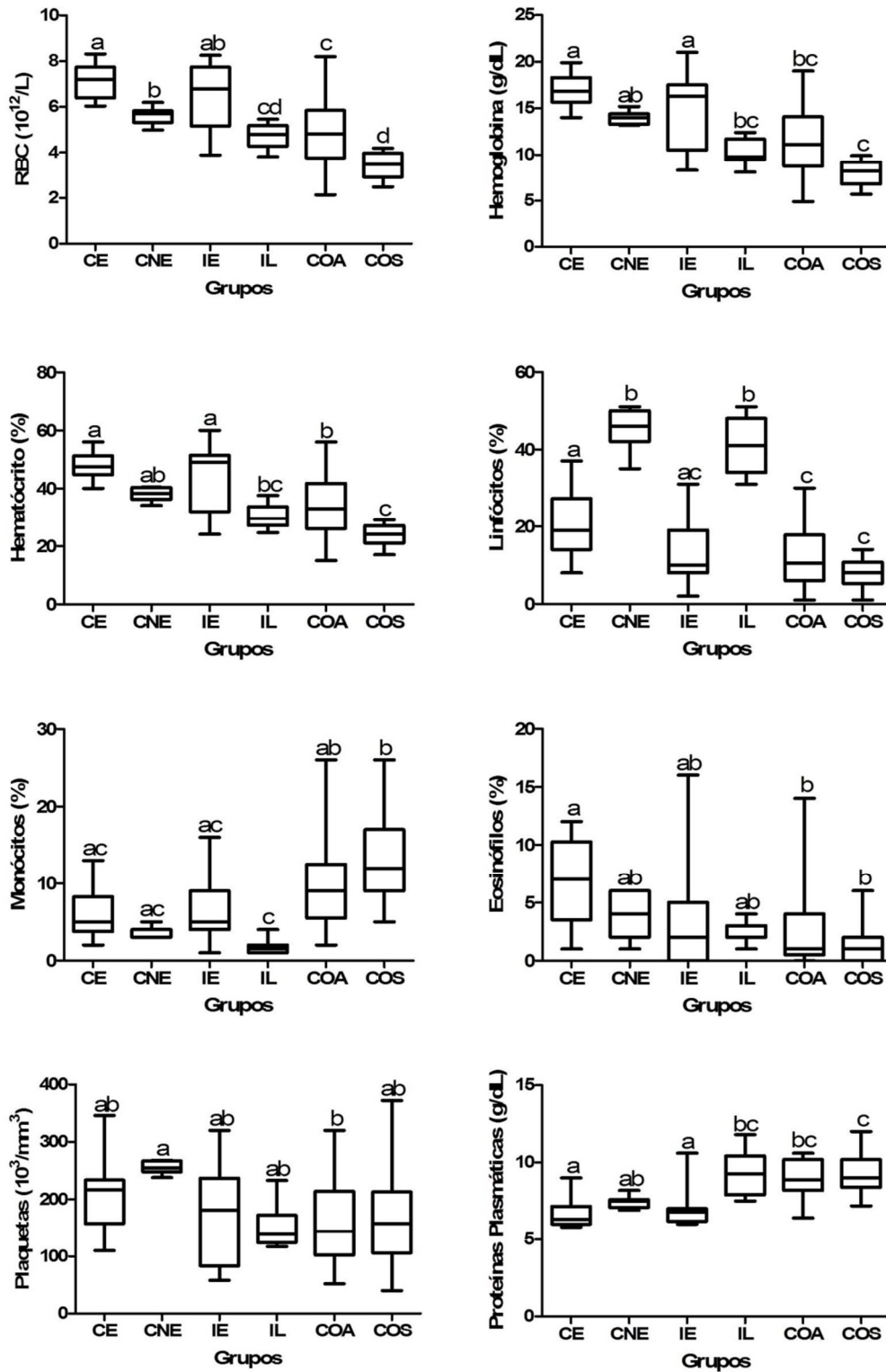
A contagem total de leucócitos não diferiu estatisticamente entre os grupos. A contagem de neutrófilos segmentados foi menor nos grupos CNE e IL ($44,75 \pm 5,7$ e $50,53 \pm 8,14$ %). Foi observada linfopenia nos grupos COA e COS ($11,56 \pm 10,5$, $7,91 \pm 4,2$). O grupo COS apresentou eosinopenia ($1,55 \pm 2,3$) e monocitose ($13,18 \pm 6,5$) enquanto que o grupo IL apresentou monocitopenia ($1,75 \pm 1,04$).

Na contagem de plaquetas percebemos uma grande variação nos valores individuais nos animais com exceção do grupo CNE, que apresentou um desvio padrão bem menor que o dos outros grupos ($\pm 11,2$). As proteínas plasmáticas encontram-se aumentadas nos animais COA ($8,95 \pm 1,2$) e COS ($9,36 \pm 1,5$) em relação ao CE ($6,87 \pm 1,1$) e IE ($7,11 \pm 1,6$). As proteínas séricas se demonstraram elevadas nos animais IL ($9,31 \pm 1,45$), COA ($8,95 \pm 1,2$) e COS ($9,36 \pm 1,5$).

Tabela 2: parâmetros hematológicos e bioquímicos (média $\pm$ desvio padrão) nos grupos Controle Endêmico (CE), Controle Não Endêmico (CNE), Infectados por *Ehrlichia spp.* (IE), Infectados por *L. infantum* (IL), Coinfectados Assintomáticos (COA) e Coinfectados Sintomáticos (COS).

Parâmetro	CE	CNE	IE	IL	COA	COS
Hemácias	7,00	5,62	6,35	4,72	4,81	3,46
(RBC)	$\pm 0,8$	$\pm 0,4$	$\pm 1,4$	$\pm 0,6$	$\pm 1,7$	$\pm 0,6$
Hemoglobina	16,88	13,96	14,89	10,21	11,16	8,03
	$\pm 1,8$	$\pm 0,7$	$\pm 4,2$	$\pm 1,4$	$\pm 3,9$	$\pm 1,4$
Hematócrito	48,07	38,01	43,84	30,41	33,19	23,73
	$\pm 4,3$	$\pm 2,42$	$\pm 11,9$	$\pm 4,23$	$\pm 11,7$	$\pm 4,0$
Leucócitos	15,22	9,31	14,99	8,60	14,74	16,74
totais	$\pm 5,2$	$\pm 0,9$	$\pm 13,1$	$\pm 3,4$	$\pm 6,51$	$\pm 4,05$
Segmentados	66,57	44,57	76,27	50,63	76,31	77,18
	$\pm 10,5$	$\pm 5,7$	$\pm 10,3$	$\pm 8,14$	$\pm 10,5$	$\pm 4,5$
Linfócitos	20,79	45,39	13,18	40,75	11,56	7,91
	$\pm 8,9$	$\pm 5,6$	$\pm 8,2$	$\pm 7,4$	$\pm 10,5$	$\pm 4,2$
Eosinófilos	6,79	4,14	3,91	2,38	2,88	1,55
	$\pm 3,8$	$\pm 2,0$	$\pm 5,7$	$\pm 0,9$	$\pm 3,5$	$\pm 2,3$
Monócitos	5,86	3,57	6,55	1,75	8,38	13,18
	$\pm 3,1$	$\pm 0,8$	$\pm 4,2$	$\pm 1,04$	$\pm 4,1$	$\pm 6,5$
Plaquetas	213,000	256,000	172,440	152,88	155,500	171,270
totais	$\pm 64,8$	$\pm 11,2$	$\pm 89,6$	$\pm 37,9$	$\pm 70,5$	$\pm 93,1$
Proteínas	6,87	7,79	7,11	9,31	8,95	9,36
plasmáticas	$\pm 1,1$	$\pm 0,41$	$\pm 1,6$	$\pm 1,45$	$\pm 1,2$	$\pm 1,5$

Figura 2: Parâmetros hematológicos e bioquímicos nos grupos nos grupos Controle Endêmico (CE), Controle Não Endêmico (CNE), Infectados por *Ehrlichia spp.* (IE), Infectados por *L. infantum* (IL), Coinfectados Assintomáticos (COA) e Coinfectados Sintomáticos (COS). Letras diferentes representam diferença estatística entre os grupos.



Dosagens de citocinas

Quanto às dosagens de citocinas, os valores das concentrações séricas estão na Tabela 3. Os grupos IE, COA e COS apresentaram níveis séricos de TNF- α mais elevados ($41,1 \pm 3,8$, $40,8 \pm 7,6$, $39,5 \pm 11,3$ $\mu\text{g/mL}$) que os grupos CNE e IL ($18,0 \pm 20,7$, $13,7 \pm 6,18$ $\mu\text{g/mL}$) (Figura 3). As concentrações de IL-10 se mostraram maiores nos grupos IL ($26,9 \pm 7,92$) e COA ($25,1 \pm 11,5$). IL-10 e TNF- α demonstraram uma correlação positiva nos grupos IL, COA e COS ($\rho = 0.43$ $\rho = 0.15$ e $\rho = 0.93$), sendo mais intensa em COS, e uma fraca correlação negativa no grupo IE ($\rho = 0.07$) (Figura 4).

Tabela 3: Concentrações séricas de TNF- α e IL-10 ($\mu\text{g/mL}$) nos grupos Controle Endêmico (CE), Controle Não Endêmico (CNE), Infectados por *Ehrlichia spp.* (IE), Infectados por *L. infantum* (IL), Coinfectados Assintomáticos (COA) e Coinfectados Sintomáticos (COS).

Citocina ($\mu\text{g/mL}$)	CE	CNE	IE	IL	COA	COS
TNF- α	$43,3 \pm 16,9$	$18,0 \pm 20,7$	$41,1 \pm 3,8$	$13,7 \pm 6,18$	$40,8 \pm 7,6$	$39,5 \pm 11,3$
IL-10	$20,2 \pm 8,4$	$13,8 \pm 4,2$	$21,0 \pm 5,1$	$26,9 \pm 7,92$	$25,1 \pm 11,5$	$25,4 \pm 12,4$

Figura 3: Concentrações séricas de TNF- α e IL-10 nos grupos Controle Endêmico (CE), Controle Não Endêmico (CNE), Infectados por *Ehrlichia spp.* (IE), Infectados por *L. infantum* (IL), Coinfectados Assintomáticos (COA) e Coinfectados Sintomáticos (COS).

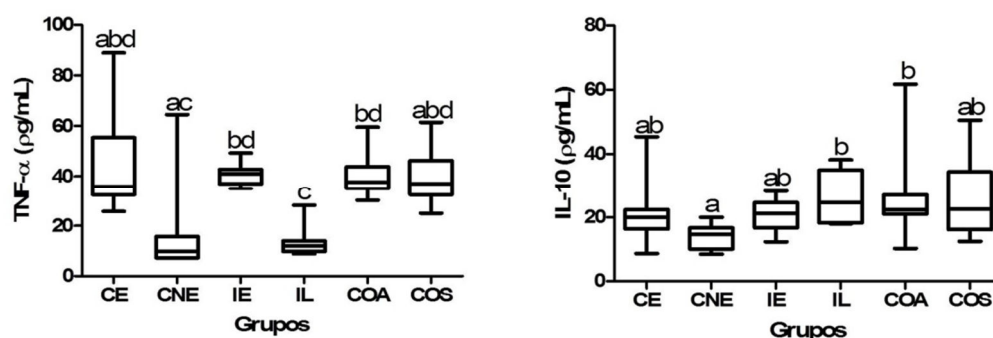
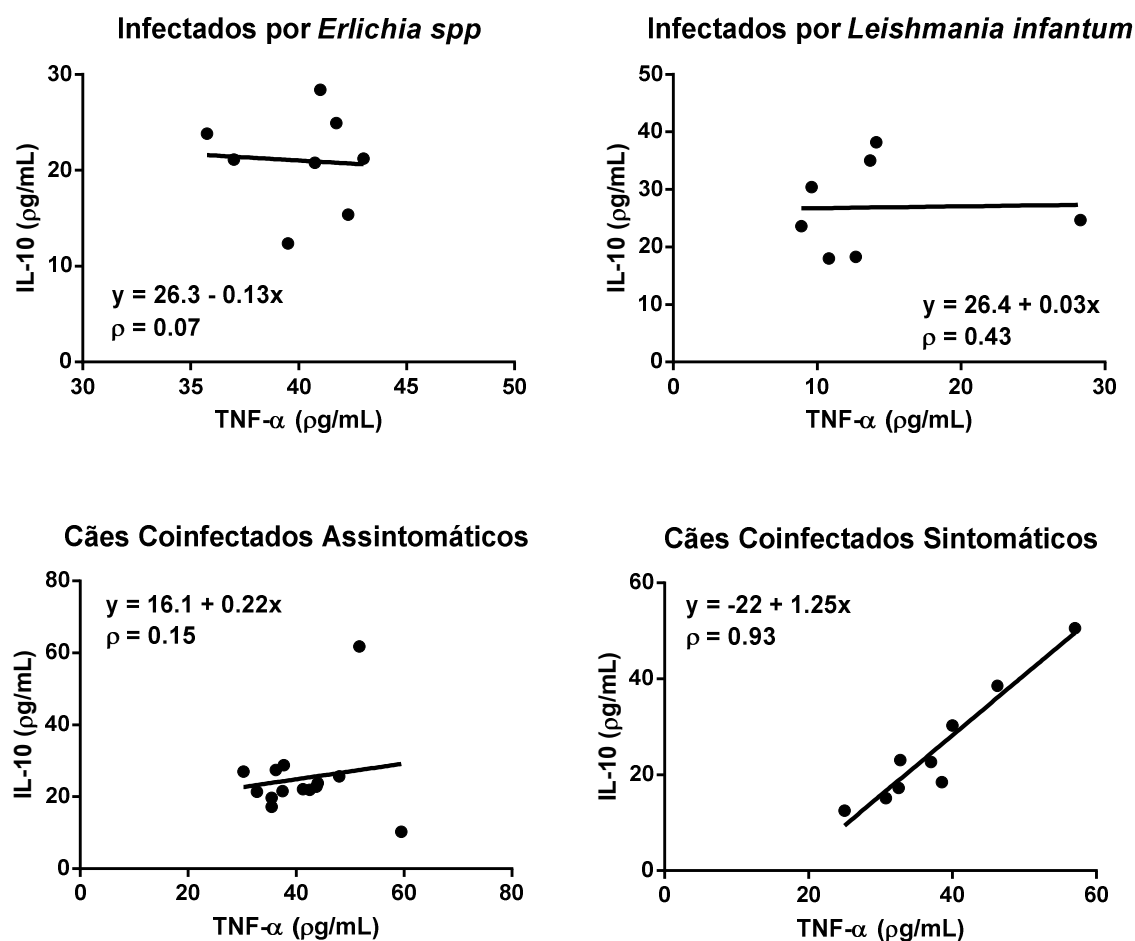


Figura 4: Correlação de IL-10 e TNF α séricos nos grupos Infectados por *Ehrlichia spp.* (IE), Infectados por *L. infantum* (IL), Coinfectados Assintomáticos (COA) e Coinfectados Sintomáticos (COS).



Discussão

Tem sido relatado que a EC e LVC podem ser agravadas pela sua coinfeção (SHAWN et al., 2001, MEKUSAS et al., 2009). Em nosso estudo, os animais coinfectados sintomáticos apresentaram maior intensidade de sinais clínicos que os animais com EC e LVC isoladamente, logo a coinfeção agrava a manifestação clínica dessas doenças provavelmente pelo maior comprometimento da resposta imunológica (SOUSA; ALMEIDA, 2008, CORTESE et al., 2011, TOMMASI et al., 2013).

No grupo IE, a apresentação mais leve da doença pode ser explicado pela fase da CE. Sabe-se que a visualização da mórula de *Ehrlichia spp.* em esfregaços de medula óssea só é possível em um curto período de tempo, não sendo encontrada durante os estágios subclínicos ou crônicos da doença (NAKAGUI et al., 2008). Essas informações nos levam a crer que os cães IE estavam no início da fase aguda da doença.

A apresentação clínica no grupo IL foi mais intensa do que em IE e COA provavelmente pelo fato dos cães IL estarem há pelo menos 6 meses infectados. Os sinais observados estão de acordo com outros estudos em LVC (QUEIROZ et al., 2009, FREITAS et al., 2012b).

Os hemogramas demonstraram que os grupos IL, COA e COS apresentarem valores inferiores de hemácias, hematócrito e hemoglobina em relação aos grupos controles e IE. Em estudos com cães infectados experimentalmente por *E. canis*, a diminuição do número de hemácias, do hematócrito e da concentração de hemoglobina só foram observadas duas semanas após infecção (SAITO, 2009, CASTRO et al., 2004). Anemia, hemoglobinemia e trombocitopenia foram relatadas em outros estudos com cães sintomáticos para LVC, no entanto cães assintomáticos podem não apresentar alterações no hemograma (ROUGIER et al., 2012, SOUSA; ALMEIDA, 2008, FREITAS et al., 2012b). Anemia normocítica normocrômica foi relatado como um biomarcador da progressão clínica da LVC (REIS et al., 2009).

A contagem de leucócitos na EC pode apresentar-se diminuída na fase crônica ou em cães sintomáticos (WANER et al., 1995, CASTRO et al., 2004, MANOEL, 2010). Na LVC, leucopenia só é observada em estágios avançados da manifestação da doença (REIS et al., 2006). Em nosso estudo as contagens de leucócitos não diferiram entre os grupos, concordando com outros estudos de coinfeção por *Ehrlichia-Leishmania* em que não foram observadas alterações na contagem total de leucócitos (SOUSA; ALMEIDA et al., 2008).

Um comportamento inverso de neutrófilos e linfócitos foi observado (Figura 2). Aumento na contagem de neutrófilos (FREITAS et al., 2012b) e linfopenia (REIS et al., 2006) foi detectado em cães sintomáticos para LVC, enquanto que cães assintomáticos para LVC demonstraram aumento na contagem de linfócitos (REIS et al., 2006). Diminuição do número de neutrófilos e linfócitos foi relatada na EC aguda experimental (CASTRO et al., 2004, SAITO, 2009). Em nosso trabalho linfopenia foi constada no grupo COS que também demonstrou aumento na contagem de monócitos significativa em relação aos outros grupos e aos valores de referência da espécie (MEINLOTH, CLINKENBEARD, 2000).

Os monócitos são as células alvo de ambos os parasitos estudados neste trabalho (DUMLER et al., 2001, KAYE; SCOTT, 2011) embora outros estudos não tenham detectado diferenças na quantidade destas células nas enfermidades isoladamente (BORIN et al., 2009, SAITO, 2009, FREITAS et al., 2012), monocitose foi detectada na CE experimental (CASTRO et al., 2004) e na LVC (REIS et al., 2006). Observa-se grande variação no comportamento dessas células nestas enfermidades, onde fatores não elucidados devem estar envolvidos.

Eosinopenia também é um achado comum em cães sintomáticos para LVC (REIS et al., 2006) e para CE (CASTRO et al., 2004, BORIN et al., 2009) e foi encontrado somente no grupo

COS do nosso estudo. Nota-se que o grupo COS apresentava alterações mais severas nos exames laboratoriais, demonstrando um agravamento da manifestação clínica das doenças isoladamente.

Em nosso estudo, as contagens de plaquetas variaram bastante individualmente, provavelmente pelos cães estarem em diferentes fases da EC e da LVC. Diminuição da contagem de plaquetas é comum nas duas enfermidades isoladas (CASTRO et al., 2004, SAITO, 2009, FREITAS et al., 2012b). É dito que na EC a trombocitopenia ocorre por produção de anticorpos antiplaquetários (WANER et al., 1995) e que em áreas endêmicas, a trombocitopenia pode ser um forte indicativo da infecção por *Ehrlichia canis* (BULLA et al., 2004).

As proteínas séricas aumentadas na EC e na LVC estão relacionadas com o aumento na produção de gamaglobulinas (HARRUS et al., 1996, WANER et al., 1997, FREITAS et al. 2012a), no entanto a função das imunoglobulinas ou das células B na leishmaniose visceral ainda não está elucidada (GOTO ; LINDOSO, 2004, ALEXANDER; BRYSON, 2005, GOTO; PRIANTI, 2009). Já na erliquiose, é dito que a participação da resposta humoral é importante na proteção contra esses microrganismos (LI et al., 2002). Em nosso trabalho as proteínas séricas estavam aumentadas nos grupos IL, COA e COS. Era esperado um aumento na concentração das proteínas no grupo IE, no entanto a fase inicial da doença talvez não tenha dado oportunidade para ocorrer elevação na produção de imunoglobulinas.

As citocinas são um grupo de proteínas que são secretadas para comunicação e sinalização intercelular e dentre suas funções está o controle da resposta imunológica (CROFT, 2010, TISONCIK et al., 2012). As manifestações clínicas da CE e LVC são comumente associadas a desordens do sistema imune (CASTRO et al, 2004, KAYE; SCOTT, 2011). É dito que o controle da infecção por estes parasitos intracelulares é mediado pela resposta imune celular (HARRUS et al., 1999, ALEXANDER; BRYSON, 2005), com produção de IFN- γ (CARRILLO; MORENO, 2009, ISAMAIL et al, 2004). Já a progressão da LVC está associada com a produção de IL-10 e TGF- β (ALVES et al., 2009). Na erliquiose, a doença grave e fatal está fortemente associada com o aumento nos níveis séricos de TNF- α , enquanto que uma menor produção dessa citocina foi relacionada com uma sobrevivência prolongada dos animais estudados (ISMAIL et al., 2004).

A família do TNF está relacionada com respostas pró inflamatórias e ativação de células T citotóxicas (CROFT, 2010, TISONCIK et al., 2012). Em nosso trabalho foi demonstrado uma maior concentração sérica de TNF- α nos grupos CE, IE, COA e COS. Outros estudos detectaram a produção de IL-1 β , IL-8, INF- γ e TNF- α em cães experimentalmente infectados (UNVER; HUANG; RIKIHISA, 2006). Já na LVC, a proteção da doença foi associada com a produção de INF- γ e TNF- α (ALVES et al., 2009, CARRILO; MORENO, 2009). No grupo IL a TNF- α estava em concentrações semelhantes à encontrada no grupo NEC, isso pode ser explicado pelos poucos

animais assintomáticos no grupo IL, mas o reduzido número de animais neste grupo não permite a separação do mesmo em sintomáticos e assintomáticos para melhor análise.

Uma segunda hipótese é que os cães que estão em uma área endêmica estão em constante contato com carrapatos infectados por *E. canis* (LABARTHE et al., 2003, TANIKAWA et al., 2013). Essa ideia justificaria a diferença relativa nos grupos controles EC e NEC, já que os cães NEC eram de laboratório e desprovidos do contato com *Rhipicephalus sanguineus*. Outros estudos demonstraram que cães podem ser soropositivos sem desenvolver infecção e anticorpos anti-*Ehrlichia* são encontrados por meses e até anos após o tratamento e eliminação do microrganismo (BARTSCH; AGREENE, 1996, DAVOUST et al., 2005).

Em nosso trabalho os grupos IL e COA apresentaram aumento na produção de IL-10 quando comparados com CNE. No grupo IL este aumento se deve à manifestação clínica da LVC (ALEXANDER; BRYSON, 2005, ALVES et al., 2009). A associação com a IL-10 e a progressão da leishmaniose visceral em humanos também é conhecida (NYLEN; SACKS, 2007). Outros pesquisadores afirmam que o bloqueio da ação da IL-10 e TGF- β pode ser útil na terapia da LVC, já que essas citocinas foram associadas com cães sintomáticos para a doença (ALVES et al., 2009). Na EC experimental, um único cão apresentou um pico de produção de TNF- α seguido da produção de IL-10 e óbito (SAITO, 2009).

A função central da IL-10 é proteger os órgãos e tecidos do dano causado por infecções e respostas inflamatórias (OUYANG et al., 2011). Nos cães COA esta citocina deve estar aumentada para tentar compensar os efeitos inflamatórios das duas doenças associadas, já que uma resposta inflamatória exagerada também seria deletéria para o hospedeiro (OUYANG et al., 2011).

Podemos observar com nossos achados que a coinfeção *Leishmania-Ehrlichia* agrava a manifestação clínica de uma doença isoladamente e que o aparecimento da sintomatologia clínica deve ter o envolvimento da resposta imune do hospedeiro. Já que os dois parasitos estudados alteram o sistema imunológico do mamífero infectado de formas diferentes, a presença dos dois microrganismos dificulta a realização de uma resposta protetora.

Conclusão

Podemos concluir que a coinfeção por *Ehrlichia spp.* e *Leishmania infatum* em cães agrava a manifestação clínica das doenças CE e LVC isoladamente e que provavelmente o sistema imune está envolvido. As citocinas TNF- α e IL-10 desempenham algum papel na resposta imunológica nesta coinfeção, no entanto estudos com mais animais, separando os grupos em sintomáticos e assintomáticos e abrangendo maior quantidade de citocinas por um período de monitoramento mais prolongado seria uma grande ferramenta para elucidar o papel do sistema imunológico na patologia da coinfeção por *Leishmania-Ehrlichia*.

Referencias

- AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; PINTER, A.; et al. Prevalence of Ehrlichia canis (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in dogs and Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil. **Journal of medical entomology**, v. 44, n. 1, p. 126–32, 2007.
- ALEXANDER, J.; BRYSON, K. T helper (h)1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm. **Immunology letters**, v. 99, n. 1, p. 17–23, 2005.
- ALVES, CÍNTIA F; AMORIM, I. F. G. DE; MOURA, E. P.; et al. Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with Leishmania (Leishmania) chagasi. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 128, n. 4, p. 349–58, 2009.
- 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 International Medicine**, v.10, p. 271-274, 1996.
- BORIN, S.; CRIVELENT, L. .; FERREIRA, F. . Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de Ehrlichia spp. naturalmente infectados. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v. 61, n. 3, p. 566–571, 2009.
- BULLA, C.; KIOMI TAKAHIRA, R.; PESSOA ARAÚJO, J.; et al. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with Ehrlichia canis in an endemic area. **Veterinary research**, v. 35, n. 1, p. 141–6, 2004.
- CARRILLO, E.; MORENO, J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1-3, p. 67–70, 2009.
- CASTRO, M. B.; MACHADO, R. Z.; AQUINO, D. L. P. C. T.; ALESSI, A. C.; COSTA, M. T. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Veterinary parasitology**, v. 119, n. 1, p. 73–86, 2004.
- CORTESE, L.; TERRAZZANO, G.; PIANTEDOSI, D.; et al. Prevalence of anti-platelet antibodies in dogs naturally co-infected by Leishmania infantum and Ehrlichia canis. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 188, n. 1, p. 118–21, 2011. Elsevier Ltd.
- CROFT, M. Control of immunity by the TNFR-related molecule OX40 (CD134). **Annual review of immunology**, v. 28, p. 57–78, 2010.
- DAVOUST, B.; KEUNDJIAN, A.; ROUS, V.; MAURIZI, L.; PARZY, D. Validation of chemoprevention of canine monocytic ehrlichiosis with doxycycline. **Veterinary microbiology**, v. 107, n. 3-4, p. 279–83, 2005.
- DUMLER, J. S.; BARBET, A F.; BEKKER, C. P.; et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combi. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 51, n. Pt 6, p. 2145–65, 2001
- FREITAS, J. C. C. DE, LOPES-NETO, B. E., DE ABREU, C. R. A., COURA-VITAL, W., BRAGA, S. L., REIS, A. B., & NUNES-PINHEIRO, D. C. S. Profile of anti-Leishmania antibodies related to clinical picture in canine visceral leishmaniasis. **Research in veterinary science**, 93(2), 705–9, 2012a.

FREITAS, J. C. C. DE; NUNES-PINHEIRO, D. C. S.; EUGÊNIO, B.; et al. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 24–29, 2012b.

GOTO, H.; PRIANTI, M. D. G. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, n. 5, p. 241–246, 2009.

GOTO, H., LINDOSO, J. A. L. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. Brazilian journal of medical and biological research = **Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica** ... [et al.], 37(4), 615–23. 2004

HARRUS, S.; WANER, T.; AVIDAR, Y.; et al. Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. **Veterinary parasitology**, v. 66, n. 3-4, p. 241–9, 1996.

ISMAIL, N.; SOONG, L.; MCBRIDE, J. W.; et al. 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. **Journal of immunology** (Baltimore, Md. : 1950), v. 172, n. 3, p. 1786–800, 2004.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–15, 2011. Nature Publishing Group..

LABARTHE, N.; CAMPOS PEREIRA, M. DE; BARBARINI, O.; et al. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* infections in Brazil. **Veterinary therapeutics : research in applied veterinary medicine**, v. 4, n. 1, p. 67–75, 2003.

LI, J. S., CHU, F., REILLY, A., WINSLOW, G. M. Antibodies highly effective in SCID mice during infection by the intracellular bacterium *Ehrlichia chaffeensis* are of picomolar affinity and exhibit preferential epitope and isotype utilization. **J. Immunol.** 169:1419–1425, 2002.

MANNA, L., REALE, S., PICILLO, E., VITALE, F., & GRAVINO, A. E. Interferon-gamma (INF-gamma), IL4 expression levels and *Leishmania* DNA load as prognostic markers for monitoring response to treatment of leishmaniotic dogs with miltefosine and allopurinol. **Cytokine**, 44(2), 288–92, 2008.

MANOEL, C. S. **Alterações clínicas, hematológicas e sorológicas de cães infectados por *Ehrlichia canis***. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária). Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária, Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, 2010.

MEINLOTH J.H., CLINKENBEARD K.D. Normal hematology of the dog In: Feldman B.F., Zinkl J.G. & Jain N.C. (Eds). **Schalm's veterinary hematology**. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp.1057-1063, 2000.

MEKUZAS, Y.; GRADONI, L.; OLIVA, G.; FOGLIA MANZILLO, V.; BANETH, G. *Ehrlichia canis* and *Leishmania infantum* co-infection: a 3-year longitudinal study in naturally exposed dogs. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 15 Suppl 2, p. 30–1, 2009.

NAKAGHI, A. C. H.; MACHADO, R. Z.; TINUCCI, C. M.; ROGÉRIO, A. M.; BALDANI, C. D. Canine ehrlichiosis: clinical , hematological , serological and molecular aspects. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 766–770, 2008.

NASCIMENTO, M. S. L.; ALBUQUERQUE, T. D. R.; DO-VALLE-MATTA, M. A.; et al. Naturally *Leishmania infantum*-infected dogs display an overall impairment of chemokine and chemokine receptor expression during visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 153, n. 3-4, p. 202–208, 2013.

NYLEN, S.; SACKS, D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. **Trends Immunol.** 28, 378–384, 2007.

OUYANG, W.; RUTZ, S.; CRELLIN, N. K.; VALDEZ, P. A.; HYMOWITZ, S. G. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. **Annual review of immunology**, v. 29, p. 71–109, 2011.

QUEIROZ, P. V. S.; MONTEIRO, G. R. G.; MACEDO, V. P. S.; et al. Canine visceral leishmaniasis in urban and rural areas of Northeast Brazil. **Research in veterinary science**, v. 86, n. 2, p. 267–73, 2009.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; GARCEZ, L. M.; et al. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 91, n. 3-4, p. 161–168, 2003.

REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in veterinary science**, v. 81, n. 1, p. 68–75, 2006.

REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 128, n. 1-3, p. 87–95, 2009.

RIKIHISA, Y. Ehrlichia subversion of host innate responses. **Current opinion in microbiology**, v. 9, n. 1, p. 95–101, 2006.

ROUGIER, S.; HASSEINE, L.; DELAUNAY, P.; MICHEL, G.; MARTY, P. One-year clinical and parasitological follow-up of dogs treated with marbofloxacin for canine leishmaniosis. **Veterinary parasitology**, v. 186, n. 3-4, p. 245–53, 2012.

SAITO, T. B.; CUNHA-FILHO, N. A.; PACHECO, R. C.; et al. Canine infection by rickettsiae and ehrlichiae in southern Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 79, n. 1, p. 102–8, 2008.

SAITO, T. B. **Estudo da erliquiose em cães expostos a carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* experimentalmente infectados**. Tese. (Doutorado em Medicina Veterinária). Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária, Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, 2009.

SHAW, S. E.; DAY, M. J.; BIRTLES, R. J.; BREITSCHWERDT, E. B. Tick-borne infectious diseases of dogs. **Trends in parasitology**, v. 17, n. 2, p. 74–80, 2001.

SOUSA, V. R. F.; ALMEIDA, A. B. P. F. Co-infecção entre leishmaniose visceral e ehrlichiose monocítica em cães de Cuiabá. **Acta Scientiae Veterinarie**, v. 36, n. 2, p. 113–117, 2008.

TANIKAWA, A.; LABRUNA, M. B.; COSTA, A.; et al. Ehrlichia canis in dogs in a semiarid region of Northeastern Brazil: serology, molecular detection and associated factors. **Research in veterinary science**, v. 94, n. 3, p. 474–7, 2013.

TISONCIK, J. R.; KORTH, M. J.; SIMMONS, C. P.; et al. Into the eye of the cytokine storm. **Microbiology and molecular biology reviews** : MMBR, v. 76, n. 1, p. 16–32, 2012.

TRIPATHI, P.; SINGH, V.; NAIK, S. Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 51, n. 2, p. 229–42, 2007.

TOMMASI, A. S. DE; OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F.; et al. Are vector-borne pathogen co-infections complicating the clinical presentation in dogs? **Parasites & vectors**, v. 6, p. 97, 2013.

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. 482–6, 2006.

WANER, T.; HARRUS, S.; WEISS, D. J.; BARK, H.; KEYSARY, A. Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 48, n. 1-2, p. 177–82, 1995.

WANER, T.; HARRUS, S.; BARK, H.; et al. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. **Veterinary parasitology**, v. 69, n. 3-4, p. 307–17, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases**, Geneva, p. 91-106, 2010.

9. CONCLUSÕES

Nos cães em estágios iniciais da EC, TNF- α e IL-10 parecem não estar associados ao curso da doença, possivelmente outros mediadores devem estar envolvidos e sirvam como biomarcadores. A coinfeção por *Ehrlichia spp.* e *Leishmania infantum* em cães agrava a manifestação clínica da LVC e da EC isoladamente. Há participação do sistema imunológico com provável participação de TNF- α e IL-10.

Estudos com mais animais e dosagem de mais citocinas por um período mais prolongado de monitoramento devem ser feitos e serviriam de grande ferramenta para elucidar o papel do sistema imunológico na patologia da coinfeção por *Leishmania-Ehrlichia*.

10. PERSPECTIVAS

A EC e a LVC são doenças endêmicas no nosso país e sua coinfecção é bastante comum em Fortaleza. A LVC é um grande problema de saúde pública e estudos em cães, que são os principais reservatórios urbanos da doença, são de grande valia para tentar melhorar o controle da LV. A EC pode estar desempenhando um papel potencializador na transmissão e patogenia da LVC, já que a *E. canis* interfere no sistema imunológico do hospedeiro e compromete a defesa do mesmo contra *L. infantum*. Este fato pode complicar as medidas atualmente utilizadas no controle da LVC, já que os efeitos da EC não são considerados.

Mais estudos com a coinfecção dessas enfermidades podem elucidar os mecanismos de como elas interagem produzindo assim conhecimento para um melhor controle de ambas. O tratamento da LVC ainda é assunto polêmico no Brasil, mas a legalização aparenta ser a evolução próxima. No tratamento das enfermidades isoladas, já existem complicações inerentes à natureza dos parasitos, com a interação dos dois microrganismos o prognóstico se torna mais desfavorável e o tratamento deve ser escolhido considerando a patogenia da coinfecção.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro : Elsevier, 2008.
- AGA, E.; KATSCHINSKI, D. M.; ZANDBERGEN, G. VAN; et al. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 169, n. 2, p. 898–905, 2002.
- AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; PINTER, A.; et al. Prevalence of *Ehrlichia canis* (*Rickettsiales: Anaplasmataceae*) in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (*Acari: Ixodidae*) ticks from Brazil. **Journal of medical entomology**, v. 44, n. 1, p. 126–32, 2007.
- ALENCAR, J. E. **Calazar canino: Contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil**. 1959. 342f. Tese - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 1959.
- ALEXANDER, J.; BRYSON, K. T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. **Immunology letters**, v. 99, n. 1, p. 17–23, 2005.
- ALMOSNY, N. R. P. **Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses**. Rio de Janeiro: L. F. Livros, 2002. 135 p.
- ALVAR, J.; YACTA YO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends in Parasitology**, v.22, n.12, p.552-557, 2006.
- ALVES, C. F. **Determinação do Perfil de Citocinas e Quantificação da Carga Parasitária em Cães Naturalmente Infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha & Chagas, 1937) Com e Sem Expressão Clínica da Leishmaniose Visceral**. 2008. 206f. Tese (Doutorado em Protozoologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2008.
- ALVES, CÍNTIA F; AMORIM, I. F. G. DE; MOURA, E. P.; et al. Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 128, n. 4, p. 349–58, 2009.
- AMULIC, B.; CAZALET, C.; HAYES, G. L.; METZLER, K. D.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. **Annual review of immunology**, v. 30, p. 459–89, 2012.
- ASSCHE, T.V.; DESCHACHT, M.; DA LUZ, R.A.I.; MAES, L.; COS, P. *Leishmania*–macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Radical Biology & Medicine**, v.51, p. 337-351, 2011.
- BALKWILL, F. **The Cytokine Network**. New York : Oxford University Press Inc, 2000. 199 páginas.
- BARBIÉRI, C.L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v.28, n.7, p.329-337, 2006.

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** 10, 271–274. 1996.

BELKAID, Y.; HOFFMANN, K.F.; MENDEZ, S.; KAMHAWI, S.; UDEY, M. C.; WYNN, T. A.; SACKS D. L. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 194, n.10, p.1497- 1506, 2001.

BORIN, S.; CRIVELENT, L. .; FERREIRA, F. . Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de Ehrlichia spp. naturalmente infectados. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v. 61, n. 3, p. 566–571, 2009.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Ministerio da Saude, 2006. 120 páginas.

BREITSCHERDT, E.B. Riquetsioses.In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. Doenças do Cão e do Gato. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2004, p.422-429.

BREMER, W. G.; SCHAEFER, J.J.; WAGNER, E.R.; EWING, S.A.; RIKIHISA, Y.; NEEDHAM, G.R.; JITTAPALAPONG, S.; MOORE, D.L.; STICH, R.W. Transstadial and intrastadial experimental transmission of Ehrlichia canis by male Rhipicephalus sanguineus.**Veterinary Parasitology**, v. 131, n. 1-2, p. 95-105, 2005.

BULLA, C.; KIOMI TAKAHIRA, R.; PESSOA ARAÚJO, J.; et al. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with Ehrlichia canis in an endemic area. **Veterinary research**, v. 35, n. 1, p. 141–6, 2004.

CALDAS, A.; FAVALI, C.; AQUINO, D.; et al. Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. **BMC infectious diseases**, v. 5, p. 113, 2005.

CAMARGO, L. B.; LANGONI, H. Impact of leishmaniasis on public health. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 12, n. 4, p. 546. 2006.

CARRILLO, E.; MORENO, J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1-3, p. 67–70, 2009.

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

CHARMOY, M.; AUDERSET, F.; ALLENBACH, C.; TACCHINI-COTTIE, F. The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by Leishmania parasites. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 1-8, 2010.

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.

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

CORREDOR, A.; GALLEGOS, J.F.; TESH, R.B.; PELEZ, D.; DIAZ, A.; MONTILLA, M.; PALU, M.T. *Didelphis marsupialis*, an apparent wild reservoir of *Leishmania donovani chagasi* in Colombia, South America. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.83, p.195, 1989.

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

COURA-VITAL, W.; MARQUES, M. J.; GIUNCHETTI, R. C.; et al. Humoral and cellular immune responses in dogs with inapparent natural *Leishmania infantum* infection. **Veterinary journal (London, England)**: 1997, v. 190, n. 2, p. e43-7, 2011.

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.

DANTAS-TORRES, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 117-8; discussion 118, 2006.

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.

DAVOUST, B.; KEUNDJIAN, A.; ROUS, V.; MAURIZI, L.; PARZY, D. Validation of chemoprevention of canine monocytic ehrlichiosis with doxycycline. **Veterinary microbiology**, v. 107, n. 3-4, p. 279-83, 2005.

DIETZE, R.; BARROS, G.B.; TEIXEIRA, L.; HARRIS, J.; MICHELSON, K.; FALQUETO, A.; COREY, R. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v.25, n.5, p.1240-2, 1997.

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 Diagnostics**, v.7, n.4, p. 504-510, 2005.

DUMLER, J. S.; BARBET, A F.; BEKKER, C. P.; et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combi. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 51, n. Pt 6, p. 2145-65, 2001.

FREITAS, J. C. C. DE; PINHEIRO, D. C. S. N. Aspectos celulares e moleculares da resposta imunitária a *Leishmania* spp Cellular and molecular aspects of immune response to *Leishmania* spp. **revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 109, n. 573-576, p. 11-20, 2010.

FREITAS, J. C. C. DE; SAMPAIO, A. P. F.; SANTOS, G. J. L.; LIMA, A. L.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S. Analysis of Seasonality , Tendencies and Correlations in Human and Canine Visceral Leishmaniasis. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 41, n. October, p. 1151, 2013.

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.

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.

GAZZINELLI, R.T., M. WYSOCKA, S. HIENY, T. SCHARTON-KERSTEN, A. CHEEVER, R. KUHN, W. MULLER, G. TRINCHIERI, AND A. SHER. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with Toxoplasma gondii succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by over- production of IL-12, IFN-gamma and TNF- alpha. **Journal of Immunology**, v. 157, p. 798–805. 1996.

GOTO, H.; LINDOSO, J.A. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 615-623, 2004.

GOTO, H.; PRIANTI, M. G. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo**, v. 51, n. 5, p. 241-246, 2009.

GRAY, J.; DANTAS-TORRES, F.; ESTRADA-PEÑA, A.; LEVIN, M. Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 4, n. 3, p. 171–80, 2013.

GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the dog and cat**. 3 Ed., St. Louis, Elsevier, 1387 p., 2006.

GUIMARÃES-COSTA, A. B.; NASCIMENTO, M. T. C.; FROMENT, G. S.; et al. Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 16, p. 6748–53, 2009.

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.; WANER, T.; KEYSARY, A; et al. Investigation of splenic functions in canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 62, n. 1, p. 15–27, 1998.

HARRUS, S.; WANER, T.; BARK, H.; JONGEJAN, F.; CORNELISSEN, A. W. C. A. 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. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. **Veterinary journal (London, England)**, v. 187, n. 3, p. 292–6, 2011.

HUNTER, C.A., L.A. ELLIS-NEYES, T. SLIFER, S. KANALY, G. GRUNIG, M. FORT, D. RENNICK, AND F.G. ARAUJO. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with Trypanosoma cruzi. **Journal of Immunology**, v. 158, p. 3311–3316, 1997.

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, 1970.

ISMAIL, N.; SOONG, L.; MCBRIDE, J. W.; et al. 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. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 172, n. 3, p. 1786–800, 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. 383–94, 2005.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews: Microbiology**, v. 9, p. 604-615, 2011.

KER, H. G.; COURA-VITAL, W.; AGUIAR-SOARES, R. D. D. O.; et al. Evaluation of a prototype flow cytometry test for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, v. 20, n. 12, p. 1792–8, 2013.

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

LASKAY, T.; ZANDBERGEN, G. VAN; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes – Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 5, p. 210–214, 2003.

LASKAY, T.; ZANDBERGEN, G. VAN; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. **Immunobiology**, v. 213, n. 3-4, p. 183–91, 2008.

MARQUES, M. I. L. M. **Leishmaniose canina**. 2008. 131p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, 2008.

LEAVY, O. T helper cells: Self-control by TH1 cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 3, p. 171–171, 2007.

LIRA, R. A., PAIVA CAVALCANTI, M., NAKAZAWA, M., FERREIRA, A. G. P., SILVA, E. D., ABATH, F. G. C., ALVES, L. C., SOUZA, W. V., GOMES, Y. M. Canine visceral leishmaniosis: A comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. **Veterinary Parasitology**, v. 137, Issue 1-2, p. 11-16, 2006.

MANNA, L.; REALE, S.; VITALE, F.; et al. Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 177, n. 2, p. 279–82, 2008.

MANOEL, C. S. **Alterações clínicas, hematológicas e sorológicas de cães infectados por *Ehrlichia canis***. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária). Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária, Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, 2010.

- 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.
- MOREIRA, S. M.; BASTOS, C. V.; ARAÚJO, R. B.; SANTOS, M.; PASSOS, L. M. F. Retrospective study (1998-2001) on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, MG, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 2, p. 141-147, 2003.
- MURPHY, M.L.; WILLE, U.; VILLEGAS, E.N.; HUNTER, C.A. & FARRELL, J.P. - IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. **European Journal of Immunology**, v. 31, p. 2848-2856, 2001.
- 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.
- NAKAGHI, A. C. H.; MACHADO, R. Z.; TINUCCI, C. M.; ROGÉRIO, A. M.; BALDANI, C. D. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 38, n. 3, p. 766-770, 2008.
- NEER, T. M.; HARRUS, S. Ehrlichiosis, Neorickettsiosis, Anaplasmosis, and Wolbachia Infection - Canine Monocytotropic Ehrlichiosis and Neorickettsiosis (E. canis, E. chaffeensis, E. ruminatum, 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
- OUYANG, W.; RUTZ, S.; CRELLIN, N. K.; VALDEZ, P. A; HYMOWITZ, S. G. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. **Annual review of immunology**, v. 29, p. 71-109, 2011.
- PETERS, N. C.; EGEN, J. G.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; KIMBLIN, S. K.; LAWYER, P.; FAY, M. P.; GERMAIN, R. N.; SACKS, D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, p. 970-974, 2008.
- QUEIROZ, P. V. S., MONTEIRO, G. R. G., MACEDO, V. P. S., ROCHA, M. A C., BATISTA, L. M. M., QUEIROZ, J. W., JERÔNIMO, S. M. B., ET AL. Canine visceral leishmaniasis in urban and rural areas of Northeast Brazil. **Research in veterinary science**, v. 86, n. 2, p. 267-73. 2009.
- QUEIROZ JÚNIOR, E. M. **Validação do teste imunocromatográfico rápido Dual Path Platform para o diagnóstico da leishmaníase visceral canina**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza, CE, 2011.
- REILING, L.; CHROBAK, M.; SCHMETZ, C.; CLOS, J. Overexpression of a single Leishmania major gene enhances parasite infectivity in vivo and in vitro. **Molecular Microbiology**, v.76, n.5, p.1175-1190, 2010.
- REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in veterinary science**, v. 81, n. 1, p. 68-75, 2006.

- REIS, L. E. S.; COURA-VITAL, W.; ROATT, B. M.; et al. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural *Leishmania infantum* infection. **Veterinary parasitology**, v. 197, n. 3-4, p. 498–503, 2013.
- RIKIHISA, Y. Ehrlichia subversion of host innate responses. **Current opinion in microbiology**, v. 9, n. 1, p. 95–101, 2006.
- RITTER, U.; FRISCHKNECHT, F.; van ZANDBERGEN, G. Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites?. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 11, p. 505-510, 2009.
- RITTIG, M. G.; BOGDAN, C. *Leishmania* – Host-Cell interaction: Complexities and alternative views. **Parasitology Today**, v. 16, p. 292-297, 2000.
- ROUGIER, S.; HASSEINE, L.; DELAUNAY, P.; MICHEL, G.; MARTY, P. One-year clinical and parasitological follow-up of dogs treated with marbofloxacin for canine leishmaniosis. **Veterinary parasitology**, v. 186, n. 3-4, p. 245–53, 2012.
- SACKS, D. & NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, p. 845-858, 2002.
- SAITO, T. B.; CUNHA-FILHO, N. A.; PACHECO, R. C.; et al. Canine infection by rickettsiae and ehrlichiae in southern Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 79, n. 1, p. 102–8, 2008.
- SAITO, T. B. **Estudo da erliquiose em cães expostos a carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* experimentalmente infectados**. Tese. (Doutorado em Medicina Veterinária). Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária, Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, 2009.
- SANTIAGO, M. D. A.; RIBEIRO, F. C.; MOUTA-CONFORT, E.; et al. Differentiation between canine cutaneous and visceral leishmaniasis by the detection of immunoglobulin G specific for *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* antigens using flow cytometry. **Veterinary parasitology**, v. 154, n. 3-4, p. 341–6, 2008.
- SARAVIA, N. G. L., VALDERRAMA, M., LABRADA, A. F., HOLGUIN, C., NAVAS, G., PALMA, A., WEIGLE, K. A. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. **Journal of Infectious Disease**, v. 159, p. 725-735, 1989.
- SHARMA, U.; SINGH, S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. **Journal of vector borne diseases**, v. 45, n. 4, p. 255–72, 2008.
- SHAW, J. J. Animal reservoirs of *Leishmania* in different ecological situations and their importance in the epidemiology of the disease. In: FARREL J., ed., **World Class Parasites: Leishmania**, v.4, Kluwer Academic Publishers. Boston, Dordrecht, London 2003.
- SHAW, S. E.; DAY, M. J.; BIRTLES, R. J.; BREITSCHWERDT, E. B. Tick-borne infectious diseases of dogs. **Trends in parasitology**, v. 17, n. 2, p. 74–80, 2001.
- SISTO, M.; BRANDONISIO, O.; PANARO, M.A.; ACQUAFREDDA, A.; LEOGRANDE, D.; FASANELLA, A.; TROTTA, T.; FUMAROLAL MITOLO, V. Inducible nitric oxide synthase expression in *Leishmania*- infected dog macrophages. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.24, p.247-254, 2001.

SOUSA, V. R. F.; ALMEIDA, A. DO B. P. F. DE. Co-infecção entre leishmaniose visceral e ehrlichiose monocítica em cães de Cuiabá ,. **Acta Scientiae Veterinarie**, v. 36, n. 2, p. 113–117, 2008.

TANIKAWA, A; LABRUNA, M. B.; COSTA, A; et al. *Ehrlichia canis* in dogs in a semiarid region of Northeastern Brazil: serology, molecular detection and associated factors. **Research in veterinary science**, v. 94, n. 3, p. 474–7, 2013.

TESH, R. Control of zoonotic visceral leishmaniasis. Is it time to change strategies ?. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.57, p. 287-292, 1995

TISONCIK, J. R.; KORTH, M. J.; SIMMONS, C. P.; et al. Into the eye of the cytokine storm. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 76, n. 1, p. 16–32, 2012.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**: uma introdução. 6. Ed. São Paulo: Roca, 2002. p. 140-153.

TOMMASI, A. S. DE; OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F.; et al. Are vector-borne pathogen co-infections complicating the clinical presentation in dogs? **Parasites & vectors**, v. 6, p. 97, 2013.

TRINCHIERI, G. Regulatory role of T cells producing both interferon gamma and interleukin 10 in persistent infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 194, p. 53-57, 2001.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nature reviews. Immunology**, v. 3, n. 2, p. 133–46, 2003.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A.M.; JENNINGS, F. W. **Parasitologia Veterinária**. 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. , 1996. p. 218-221.

VIEIRA, R. F. D. C.; BIONDO, A. W.; GUIMARÃES, A. M. S.; et al. Ehrlichiosis in Brazil. **Revista brasileira de parasitologia veterinária = Brazilian journal of veterinary parasitology : Órgão Oficial do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 1–12, 2011.

WEAVER, C. T.; ELSON, C. O.; FOUSER, L. A; KOLLS, J. K. The Th17 pathway and inflammatory diseases of the intestines, lungs, and skin. **Annual review of pathology**, v. 8, p. 477–512, 2013.

WANER, T.; HARRUS, S.; WEISS, D. J.; BARK, H.; KEYSARY, A. Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 48, n. 1-2, p. 177–82, 1995.

WANER, T.; HARRUS, S.; BARK, H.; et al. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. **Veterinary parasitology**, v. 69, n. 3-4, p. 307–17, 1997.

WANER, T.; HARRUS, S. Canine monocytic ehrlichiosis (CME). IN _____. **Recent advances in canine infectious disease**, 2000.

WOERLY, V.; MAYNARD, L.; SANQUER, A.; EUN, H.-M. Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniosis. **Parasitology research**, v. 105, n. 2, p. 463–9, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis**, Geneva, 2010. 186 páginas.

ZULUETA, A.M.; VILLARROEL, E.; RODRIGUES, N.; FELICIANGELI, M.D.; MAZZARRI, M.; REYES, O.; RODRIGUES, V.; CENTENO, M. Epidemiologic aspects of American visceral leishmaniasis in a endemic focus in Eastern Venezuela. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.61, n.6, p.945-950, 1999.

ANEXO I

FICHA DE AVALIAÇÃO INDIVIDUAL

Animal:

Grupo:

Data:

Peso:

Idade: Jovem

Adulto

Idoso

Estado geral: Bom Regular Ruim

Sinal	0 (ausente)	1 (leve)	2 (intenso)
Caquexia			
Onicogrífose			
Conjuntivite			
Alopecia			
Lesões Ulcerativas			
Dermatites			
Linfadenopatia Generalizada			

Observações: _____

ANEXO II



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
FACULDADE DE VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Laboratório de Imunologia e Bioquímica Animal- LIBA

Av. Paranjana, 1700 – Campus do Itaperi - CEP: 60.740-000 Fone: 3101.9833 ou 3101.9834

E-mail: diana.pinheiro@uce.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Eu _____

_____ RG nº _____, declaro estar ciente dos objetivos do projeto de pesquisa intitulado “**AVALIAÇÃO DE INTERFERON GAMA, FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMADOR BETA E INTERLEUCINA 10 EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania chagasi***”, que tem como pesquisador principal a Profa. Dra. Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro e declaro permitir a coleta de 8mL de sangue de meu cão, bem como a coleta de um linfonodo poplíteo do mesmo cão, para a realização de testes para avaliação do perfil de citocinas.

Fui informado que meus dados não serão revelados, sob qualquer hipótese, somente servirão para controle da pesquisa. Da mesma forma, estou ciente de que não terei qualquer gasto ou ganho financeiro por participar da pesquisa.

Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem nenhum prejuízo para mim e sem sofrer qualquer penalidade.

Declaro que uma cópia desse Termo de Consentimento Livre Esclarecido me foi entregue por membro do projeto de pesquisa e que qualquer dúvida a respeito poderei entrar em contato com os pesquisadores no Laboratório de Imunologia e Bioquímica Animal (LIBA) no endereço: Av. Paranjana, 1700 – Campus do Itaperi – 60.740-000 – Fortaleza-CE.

Fortaleza _____ de _____ 2012

Membro do projeto de pesquisa

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

Participante da pesquisa

ANEXO III



Comitê de Ética para o Uso de Animais
Av. Paranjana, 1700- Itaperi, fone: 3101-9890
e-mail: ceuauece@gmail.com
página na internet: www.uece.br/ceua



CERTIFICADO

Certificamos, para os devidos fins, que o **Projeto de Pesquisa** intitulado: "**Avaliação de interferon gama, fator de crescimento transformador beta e interleucina 10 em cães naturalmente infectados por Leishmania chagasi**" registrado sob número **12641308-8**, tendo como pesquisador principal **Adam Leal Lima** está de acordo com a legislação vigente e os **Princípios Éticos de Experimentação Animal** adotados pelo Comitê de Ética para o uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará sendo aprovado em 18 de novembro de 2012. Este certificado expira-se em 18 de novembro de 2016.

Fortaleza, 18 de novembro de 2012

Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento

Presidente CEUA- UECE

ANEXO IV



Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Veterinária
Acta Scientiae Veterinariae
ISSN 1679-9216 (on line)

Fax: +55 51 3308-7305
Phone: +55 51 3308-6964

lacte.ferreiro@ufrgs.br
<http://www.ufrgs.br/actavet/>



RECEBIMENTO DE ARTIGO

Porto Alegre, 14 de novembro de 2013.

Acusamos o recebimento do artigo e AA abaixo mencionados

Autores: Adam Leal Lima, Glauco Jonas Lemos Santos, Bruno Mendes Roatt, Alexandre Barbosa Reis, José Claudio Carneiro de Freitas & Diana Célia Sousa Nunes-Pinheiro

Título do Trabalho: Serum TNF- α and IL-10 in naturally *Ehrlichia* spp. infected dogs

O referido trabalho foi recebido para análise e está protocolado como ASV 178-2013.

Atenciosamente,

Laerte Ferreira
Editor - ASV