

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

CAIO SANTOS PENNACCHI

PAPEL DAS CITOCINAS NA PROTEINÚRIA DA ERLIQUIOSE AGUDA E
SUBCLÍNICA EM CÃES

Uberlândia
2023

CAIO SANTOS PENNACCHI

PAPEL DAS CITOCINAS NA PROTEINÚRIA DA ERLIQUIOSE AGUDA E
SUBCLÍNICA EM CÃES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias

Área de concentração: Clínica Médica e Investigação Etiológica

Orientador: Prof. Dr. Leandro Zuccolotto Crivellenti

Uberlândia
2023

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

P412 2023	<p>Pennacchi, Caio Santos, 1994- PAPEL DAS CITOCINAS NA PROTEINÚRIA DA ERLIQUIOSE AGUDA E SUBCLÍNICA EM CÃES [recurso eletrônico] / Caio Santos Pennacchi. - 2023.</p> <p>Orientador: Leandro Zuccolotto Crivellenti. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.73 Inclui bibliografia.</p> <p>1. Veterinária. I. Crivellenti, Leandro Zuccolotto, 1983-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 619</p>
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências
 Veterinárias
 BR 050, Km 78, Campus Glória , Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 2512-6811 - www.ppgcv.famev.ufu.br - mesvet@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	CIÊNCIAS VETERINÁRIAS				
Defesa de:	DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO PPGCVET Nº 05/2023				
Data:	06 fevereiro de 2023	Hora de início:	09:00	Hora de encerramento:	10:55
Matrícula do Discente:	12112MEV005				
Nome do Discente:	CAIO SANTOS PENNACCHI				
Título do Trabalho:	PAPEL DAS CITOCINAS NA PROTEINÚRIA DA ERLIQUIOSE CLÍNICA E SUBCLÍNICA EM CÃES				
Área de concentração:	SAÚDE ANIMAL				
Linha de pesquisa:	CLÍNICA MÉDICA, CIRURGIA E MORFOLOGIA				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	AVALIAÇÕES CLÍNICAS, EPIDEMIOLÓGICAS, DIAGNÓSTICAS E TERAPÊUTICAS DAS MOLÉSTIAS CLÍNICAS DOS ANIMAIS DOMÉSTICOS				

Reuniu-se por videoconferência a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Senhores: Matheus Matioli Mantovani - FAMEV/UFU; Priscylla Tatiana Chalfun Guimarães Okamoto - UNESP; Leandro Zuccolotto Crivellenti - FAMEV/UFU, orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. Leandro Zuccolotto Crivellenti, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o candidato. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o candidato:

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Leandro Zuccolotto Crivellenti, Membro de Comissão**, em 06/02/2023, às 10:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Matheus Matioli Mantovani, Professor(a) do Magistério Superior**, em 06/02/2023, às 10:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Priscylla Tatiana Chalfun Guimarães Okamoto, Usuário Externo**, em 07/02/2023, às 16:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4220249** e o código CRC **28D82434**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela oportunidade de trilhar meu caminho como médico veterinário, e poder fazer o meu melhor para a saúde e bem-estar aos animais.

Agradeço aos meus pais Lucas Pennacchi e Laura Santos por todo o apoio durante minha vida, e principalmente durante a minha formação. Também agradeço à minha esposa Fernanda Nastri pelo incentivo diário e parceria. Em especial, sou grato e dedico todos os esforços à nossa filha Marcela Pennacchi, e nossos eternos companheiros Tony e Toddy por trazer imensa alegria à nossa vida.

Agradeço aos professores Dr. Leandro Z. Crivellenti e Dra. Sofia B. Crivellenti, pelo incentivo e pelas imensuráveis lições aprendidas, também agradeço pela confiança no meu trabalho e oportunidade de ser um profissional melhor.

Muito obrigado à Universidade Federal de Uberlândia, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPCVET UFU), que me acolheu nesta instituição, assim como, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo incentivo à pesquisa e ao Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária (HV-FAMEV), que contribuiu imensamente para o meu aprimoramento profissional acadêmico e prático como médico veterinário.

RESUMO

A erliquiose canina é uma doença infecciosa causada pela bactéria *Ehrlichia spp.*, descrita em todo o mundo. Cães portadores de erliquiose são mais predispostos a desenvolverem lesão renal aguda e conseqüentemente doença renal crônica. Variações na resposta inflamatória causada pelo hospedeiro resultam em diferentes fases, sendo a aguda, subclínica e crônica. Em cada uma delas, é possível que ocorra o desenvolvimento de comorbidades multissistêmicas, sendo as glomerulonefrites comumente observadas. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a fisiopatogenia da proteinúria e da lesão renal aguda na erliquiose canina, analisando o perfil de citocinas inflamatórias e correlacionando com os parâmetros renais, em pacientes caninos infectados espontaneamente com *E. canis* na fase aguda e subclínica. Através da maior compreensão da fisiopatogenia da doença, é possível promover avanços nos tratamentos na medicina veterinária e humana. Para a realização do estudo, foram recrutados 58 cães com raça, idade, sexo e pesos variados foram alocados em três grupos distintos. Após avaliação clínica e laboratorial, 18 animais foram inseridos no grupo de cães hígidos (Grupo controle-GC). Os cães com diagnóstico molecular positivo estritamente para *E. canis*, com presença de manifestações clínicas foram inseridos no grupo de animais com doença aguda (GDA; n=24), e aqueles com diagnóstico molecular e sorológico positivos estritamente para *E. canis*, porém, sem sinais e manifestações clínicas, foram considerados com doença subclínica (GSC; n=16). Foram avaliadas as citocinas TNF α , IL-4, IL-6, INF- γ e IL-10. Todas as citocinas apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0,0001$) em relação aos grupos supracitados. TNF α , IL-4, IL-6 e INF- γ evidenciaram um padrão aumentado no GDA e GSC. Houve correlação positiva entre TNF α , INF- γ e IL-10 e a proteinúria no GDA, bem como a correlação negativa da IL-10 com a proteinúria no GSC. Desta forma, conclui-se que o TNF α e INF- γ estão relacionados à inflamação aguda da doença, enquanto a IL-10 parece atenuar as manifestações clínicas, mas não a proteinúria. Em ambas as fases, tais citocinas apresentam potencial em causar proteinúria, e conseqüentemente levar ao quadro de lesão renal em cães infectados.

Palavras-chave: hemoparasitose, interleucinas, IL-10, INF- γ , TNF- α

ABSTRACT

Canine ehrlichiosis is an infectious disease caused by the bacteria *Ehrlichia* spp., described worldwide. Dogs with ehrlichiosis are more predisposed to develop acute kidney injury and consequently chronic kidney disease. Variations in the inflammatory response caused by the host result in different phases, being acute, subclinical and chronic. In each of them, the development of multisystemic comorbidities is possible, with glomerulonephritis being commonly observed. Thus, the present study aimed to evaluate the pathophysiology of proteinuria and acute kidney injury in canine ehrlichiosis, analyzing the profile of inflammatory cytokines and correlating them with renal parameters in canine patients spontaneously infected with *E. canis* in the acute and subclinical phases. Through a better understanding of the pathophysiology of the disease, it is possible to promote advances in treatments in veterinary and human medicine. To carry out the study, 58 dogs of varying breed, age, sex and weight were recruited and allocated into three distinct groups. After clinical and laboratory evaluation, 18 animals were included in the group of healthy dogs (Control Group-CG). Dogs with a strictly positive molecular diagnosis for *E. canis*, with the presence of clinical manifestations were included in the group of animals with acute disease (ADG; n=24), and those with a strictly positive molecular and serological diagnosis for *E. canis*, however, without clinical signs and manifestations, they were considered to have subclinical disease (SCG; n=16). The cytokines TNF α , IL-4, IL-6, INF- γ and IL-10 were evaluated. All cytokines showed statistical differences (p<0.0001) in relation to the aforementioned groups. TNF α , IL-4, IL-6 and INF- γ showed an increased pattern in GDA and GSC. There was a positive correlation between TNF α , INF- γ and IL-10 and proteinuria in the GDA, as well as a negative correlation between IL-10 and proteinuria in the GSC. Thus, it is concluded that TNF α and INF- γ are related to the acute inflammation of the disease, while IL-10 seems to attenuate the clinical manifestations, but not proteinuria. In both phases, such cytokines have the potential to cause proteinuria, and consequently lead to kidney damage in infected dogs.

Keywords: hemoparasitosis, interleukins, IL-10, INF- γ , TNF- α

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 Hematoma em região abdominal de paciente com trombocitopenia imunomediada secundário à infecção por *E. canis* 13
- FIGURA 2 Interação entre algumas citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-10) e seus efeitos inibitórios (-) ou estimulatórios (+) 18

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Valores médios (pg/ml) das citocinas TNF α , IL-4, IL-6, IL-10 e INF- γ de cães espontaneamente infectados com <i>E. canis</i> em fase aguda e subclínica. Dados paramétricos foram representados por média \pm desvio padrão, e parâmetros com distribuição não normal estão descritos por seus valores medianos (mínimo-máximo) 30
----------	--

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT – Alanina aminotransferase

DRC – Doença Renal Crônica

FA – Fosfatase alcalina

GC – Grupo controle

GDA – Grupo doença aguda

GSC – Grupo doença crônica

IFN γ – Interferon gama

IL-4 – Interleucina 4

IL-6 – Interleucina 6

IL-10 – Interleucina 10

PCR – Reação em cadeia da polimerase

RPC – Razão proteína/creatinina urinária

TNF α – Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1.	Erliquiose monocítica canina.....	12
2.2.	Injúria renal em cães secundária à <i>Ehrlichia spp.</i>	15
2.3.	Citocinas pró/anti-inflamatórias e suas repercussões renais.....	16
2.3.1.	Interleucinas 4, 6, 10 (IL-4, IL-6 e IL-10) e Interferon gama (INF- γ)	17
2.3.3.	Fator de necrose tumoral (TNF- α)	18
	REFERÊNCIAS.....	19

CAPÍTULO 2

1	ARTIGO.....	25
	ANEXO 1 - GUIDE FOR AUTHORS – VETERINARY PARASITOLOGY.....	37

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

A erliquiose monocítica canina é causada por uma bactéria gram-negativa, intracelular obrigatória, denominada *Ehrlichia spp.* Sua transmissão ocorre através da picada de carrapatos infectados, e acomete cães de vários locais em todo o mundo (MYLONAKIS; HARRUS; BREITSCHWERDT, 2019). Ocorre o período de incubação, e a progressão da doença pode ser assintomática, subclínica, aguda ou crônica, que são classificadas de acordo com sinais clínicos e alterações em exames complementares (HARRUS; WANER; NEER, 2011). A ação do sistema imunológico, influenciado pelas citocinas pode ter uma importante correlação com a diferença entre as fases descritas (TAJIMA; RIKIHISA, 2005; FARIA et al., 2011).

A fase aguda da erliquiose canina ocorre geralmente após 10 a 14 dias após infecção, e é marcada por hipertermia, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia e emaciação (UNVER et al., 2009). Os achados histopatológicos estão associados a vasculite, infiltrado mononuclear e glomerulonefrite associada (DE CASTRO et al., 2004). Na fase subclínica da doença, os animais não apresentam sinais clínicos e as alterações em exames complementares geralmente são ausentes ou discretas (WANER, et al. 1997). Esta fase é caracterizada por níveis elevados de anticorpos séricos, devido à contenção da bactéria nos tecidos, exercida pela resposta imune do indivíduo infectado (IQBAL; RIKIHISA, 1994). A constante estimulação do sistema imunológico provavelmente induz a deposição de imunocomplexos nos rins, o que pode causar glomerulonefrite (HARRUS et al., 2001) e acelerar a progressão da doença renal crônica.

As alterações histopatológicas renais mais evidentes em cães com erliquiose incluem as glomerulonefrites proliferativas e membranoproliferativas, nefrite e fibrose intersticial, infiltrado linfohistioplasmocitário em diversos graus no interstício, regiões perivasculares e periglomerulares, compatíveis com os distúrbios imunomediados e inflamatórios causados pela enfermidade (SILVA et al., 2016). A fase subclínica pode ser marcada por proliferação de células mesangiais, glomerulosclerose segmentar focal, glomérulos isquêmicos, fibrose intersticial leve a moderada e atrofia tubular (CRIVELLENTI et al., 2021). Devido a todos os danos renais secundários supracitados, os pacientes caninos acometidos com erliquiose possuem mais chances de desenvolver doença renal crônica (BURTON et al., 2020).

Frente a estes achados, observam-se variações de resposta diante ao mesmo agente em momentos distintos da doença. O que poderia corroborar com tratamentos diferentes para impedir ou reduzir a progressão de lesão renal. O presente estudo teve como objetivo aprofundar

os conhecimentos sobre a fisiopatogenia da proteinúria, avaliando o perfil de citocinas inflamatórias e correlacionando com parâmetros de avaliação renal, em pacientes caninos infectados espontaneamente com *E. canis* na fase clínica aguda e subclínica. O aprimoramento do conhecimento da fisiopatogenia da doença permite avanços em sua terapêutica, contribuindo para a medicina veterinária e humana, visto que os seres humanos também são acometidos por outras espécies de ehrlichia e rickettsias (ISMAIL; MCBRIDE, 2017).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Erliquiose monocítica canina

A *Ehrlichia spp.* é uma bactéria gram-negativa, intracelular obrigatória, que se replica principalmente em monócitos, macrófagos e neutrófilos (AGUIAR et al., 2020). As demais espécies derivadas incluem a *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris euclarensis*, *E. ruminantium* e *E. minasensis* (DUMLER et al., 2001). A erliquiose monocítica canina ocorre pela infecção por *E. canis*, enquanto a forma monocitotrópica é secundária à *E. chaffeensis*, e a granulotrópica, pela *E. ewingii* (BEALL et al., 2012).

A distribuição desses patógenos foi previamente documentada em todo o mundo, porém, áreas tropicais e subtropicais são consideradas endêmicas e a prevalência pode atingir até 88%, em países como o Brasil (VIEIRA et al., 2011). O principal vetor é o carrapato marrom do cão, *Rhipicephalus sanguineus*, mas também pode ser transmitida por outros carrapatos (JOHNSON et al., 1998; OLANO; WALKER, 2002). A bactéria é inoculada no hospedeiro pela secreção salivar do vetor infectado (MOREIRA et al., 2003), mas a transmissão também pode ocorrer de maneira indireta, via transfusões de sangue ou hemocomponentes contendo mórulas de *Ehrlichia spp.* (WARDROP et al., 2016). Contraditoriamente, a transmissão via perinatal não foi documentada até o momento (TAQUES et al., 2016).

O período de incubação da *E. canis* varia entre 8 a 20 dias. As fases em que a doença pode se desenvolver inclui a aguda (2 a 4 semanas), subclínica, ou crônica, que são classificadas de acordo com sinais clínicos e alterações em exames complementares (HARRUS; WANER; NEER, 2011). Muitos cães não tratados ou sob terapias inadequadas podem desenvolver a fase subclínica da erliquiose, e essa pode persistir meses a anos (BURTON et al., 2020).

A intensidade das manifestações clínicas pode variar com os estágios da doença, tipo da cepa infectante, susceptibilidade e resposta imune do hospedeiro (DINIZ; MOURA DE AGUIAR, 2022). Os sinais são multissistêmicos e inespecíficos, incluindo apatia, febre,

prostração, letargia, perda de peso, linfadenopatia, anorexia e esplenomegalia, possivelmente acompanhadas de focos de hemorragia (WOODY; HOSKINS, 1991). O sangramento pode ser cutâneo, no caso de petéquias, equimoses ou hematomas (figura 1), assim como na forma de epistaxe, hematúria ou em qualquer outro local (BAI et al., 2017). Quadros agudos mais severos podem resultar em falha múltipla de órgãos e morte (NAIR et al., 2016).

A trombocitopenia é um achado laboratorial que pode estar associado a qualquer fase da erliquiose monocítica canina, uma vez que seu decaimento está relacionado ao consumo pelo organismo, destruição imunomediada, sequestro de plaquetas pelo baço ou redução da sua produção nos casos de hipoplasia medular (BRANDAO et al., 2006). Outras alterações hematológicas comuns são leucopenia e anemia normocítica e normocrômica, usualmente não regenerativa ou até mesmo pancitopenia importante (DE CASTRO et al., 2004). As anormalidades bioquímicas comumente encontradas incluem aumento da atividade da alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina, hiperglobulinemia e proteinúria (HARRUS; WANER; NEER, 2011; NAIR et al., 2016).



Figura 1. Hematoma em região abdominal de paciente com trombocitopenia imunomediada secundário à infecção aguda por *E. canis*. Fonte: arquivo pessoal.

Na fase subclínica da erliquiose canina, nota-se aumento de anticorpos séricos (IQBAL; RIKIHISA, 1994), e os animais não apresentam sinais clínicos nem alterações laboratoriais importantes como anemia, trombocitopenia, leucocitose, hiperproteinemia com hipergamaglobulinemia (WANER et al., 1997). A constante estimulação do sistema imunológico na erliquiose provavelmente induz deposição de imunocomplexos nos rins, o que pode causar glomerulonefrite (HARRUS et al., 2001) e acelerar a progressão da doença renal crônica (BURTON et al., 2020).

Os quadros crônicos podem se desenvolver em alguns cães e geralmente é observado perda de peso, uveíte, hifema ou demais lesões oculares, miocardites, arritmias cardíacas, discrasias sanguíneas, edema articular, déficit neurológico ou convulsões e glomerulopatias com graus variados, podendo evoluir para síndrome nefrótica (PANCIERA; EWING; CONFER, 2001; DINIZ et al., 2008; BURTON et al., 2020; DINIZ; MOURA DE AGUIAR, 2022).

A suspeita diagnóstica deve ser considerada frente ao histórico clínico e achados laboratoriais, associados ou não à presença de sinais clínicos (DAGNONE; MORAIS; VIDOTTO, 2001). A combinação de técnicas moleculares e sorológicas aumentam as chances de otimizar o diagnóstico confirmatório para *Ehrlichia spp.* e outras rickettsias, visto que o parasita pode desencadear diferentes fases no hospedeiro (MAGGI et al., 2013). Uma alternativa relativamente simples e acessível de pesquisar tal agente, conta com o esfregaço sanguíneo de amostras obtidas da punção de vasos periféricos do pavilhão auricular dos cães suspeitos (BORIN; CRIVELLENTI; FERREIRA, 2009).

O teste sorológico pode ser feito por alguns kits rápidos, como o Snap 4Dx Plus® – IDEXX, ou então por ensaios de imunofluorescência. No primeiro se obtém um resultado rápido, custo relativamente acessível e de fácil armazenamento e execução da técnica. Possui elevada sensibilidade para detecção de *E. canis* e *E. ewingii*, além de ser reagente para outras rickettsias (LIU et al., 2018). Na análise sorológica por imunofluorescência é possível detectar os títulos de anticorpos, porém, possui maior tempo de execução e deve ser realizado em ambiente laboratorial com equipamentos e kits específicos para a análise (DINIZ; MOURA DE AGUIAR, 2022). Os exames moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), permitem obter resultados altamente precisos mesmo nos períodos mais recentes de infecção, ou seja, nos primeiros 7-14 dias (RODRIGUEZ-ALARCON et al., 2020).

O tratamento deve ser instituído para cães que apresentem suspeita clínica, alterações laboratoriais e detecção direta do agente (*Ehrlichia spp.*) e/ou persistência de elevados títulos de anticorpos com intervalos de 2 a 3 semanas. A presença isolada de anticorpos, não

acompanhada de PCR positivo, pode indicar exposição prévia e resolução autolimitante da infecção. Nesse cenário, mesmo a presença de elevados títulos podem ser resultado de um processo infeccioso que foi debelado (DINIZ; MOURA DE AGUIAR, 2022).

As tetraciclinas são consideradas a terapia de escolha, e a doxiciclina é a mais indicada. Durante a fase aguda da erliquiose monocítica canina, a doxiciclina atua reduzindo o estresse oxidativo, além de eliminar o parasita. A dose recomendada pode variar de 5 mg/kg a cada 12 horas ou 10 mg/kg a cada 24 horas, durante 21 a 28 dias (EDDLESTONE et al., 2007).

Os cuidados com a prescrição da doxiciclina incluem fornecê-la junto do alimento comercial, evitar oferecer leite, queijo e derivados ou antiácidos associados, pois reduzem a absorção e biodisponibilidade. Cerca de duas semanas após o início da antibioticoterapia, é esperado que as anormalidades do hemograma retornem aos valores basais ou estejam próximas do valor de referência (MYLONAKIS; HARRUS; BREITSCHWERDT, 2019; DINIZ; MOURA DE AGUIAR, 2022).

O uso de glicocorticoides é controverso, pois pode induzir à outras alterações hematológicas. Ainda hoje, seu uso tem sido considerado de forma empírica, principalmente nos casos onde não seja observada resposta clínica, laboratorial ou na suspeita de mielossupressão (SILVA et al., 2021). A terapia suporte com sulfato ferroso, filgrastim e ácido fólico pode ser necessária para pacientes mielossuprimidos. De maneira semelhante, pode ser necessário incluir reposição hidroeletrólítica, analgésica, antipirética, orexigênica, antiemética e correções de hemocomponentes de alguns pacientes mais gravemente acometidos (DINIZ; MOURA DE AGUIAR, 2022).

O prognóstico de cães portadores de erliquiose crônica é considerado reservado, principalmente os casos onde foram constatadas mielossupressão e pancitopenia (MYLONAKIS; HARRUS; BREITSCHWERDT, 2019). Segundo um estudo realizado por Shipov e colaboradores (2008), a presença de leucopenia e anemia severa, hipocalemia e aumento do tempo de tromboplastina parcial ativada, servem de ferramentas prognósticas para pacientes caninos com erliquiose em qualquer estágio da doença.

2.2. Lesão renal em cães secundária à *Ehrlichia* spp.

Diversas evidências científicas permitem relacionar a erliquiose canina ao desenvolvimento tanto da doença renal crônica, quanto a aguda em cães (CODNER et al., 1992; LUCKSCHANDER; KLEITER; WILLMANN, 2003; SILVA et al., 2016). Ademais, por ser uma afecção com manifestações e acometimento multissistêmico, também há um maior risco

de surgirem comorbidades no miocárdio (DINIZ et al., 2008), oculares (LEIVA; NARANJO; PEÑA, 2005), neurológicas (THOMAS, 2000) e entre outros tecidos (DE CASTRO et al., 2004; NAIR et al., 2016).

As consequências clínicas da erliquiose canina estão diretamente relacionadas à fase da doença, cepa infectante da *E. canis*, susceptibilidade do hospedeiro e resposta imune (DINIZ; MOURA DE AGUIAR, 2022). Na fase aguda, as células mononucleares infectadas tendem a infiltrar o endotélio vascular de vários tecidos, inclusive o parênquima renal, resultando em vasculite local (SIMPSON, 1974). Teoriza-se que, a medida em que há aumento de imunoglobulinas pelo processo infeccioso, ocorre a formação de imunocomplexos que se depositam nos rins, resultando em glomerulonefrite e predispondo o animal à proteinúria e perda de função renal (FRANK; BREITSCHWERDT, 1999).

A maioria dos cães portadores de erliquiose apresentam algum grau de lesão renal. Um estudo realizado por Silva e colaboradores (2016), detectou a presença de lesões tubulointersticiais, glomerulares membranoproliferativas e nefrite intersticial em cães infectados com *E. canis* em fase aguda. Além disso, também foi relatada moderada a elevada quantidade de células linfoplasmocitárias, indicando um alto potencial imunogênico na fisiopatogenia da lesão renal em cães com erliquiose canina. Segundo Crivellenti et al., (2021), cães portadores de erliquiose na fase subclínica também podem apresentar importantes lesões histológicas. As características dessas anormalidades incluem proliferação de células mesangiais, glomerulosclerose segmentar focal, glomérulos isquêmicos, fibrose intersticial leve a moderada e atrofia tubular.

Embora existam evidências de que a fase subclínica possa ser marcada por elevados níveis de anticorpos (IQBAL; RIKIHISA, 1994) e citocinas (TAJIMA; RIKIHISA, 2005), ainda são escassos os estudos que correlacionaram esses achados ao desenvolvimento direto de lesão renal em cães.

2.3. Citocinas pró/anti-inflamatórias e suas repercussões renais

O sistema imune atua de maneira complexa e meticulosa para manter o organismo em homeostase e seguro de patógenos e/ou respostas inflamatórias exacerbadas. Uma ferramenta eficiente na sinalização celular é através das citocinas (OPAL; DEPALO, 2000).

Algumas das principais citocinas envolvidas no desenvolvimento da erliquiose canina são o interferon gama ($INF-\gamma$), fator de necrose tumoral- α ($TNF\alpha$) e outras interleucinas, tais como IL-4, IL-6 e IL-10 (TAJIMA; RIKIHISA, 2005; FARIA et al., 2011). A seguir, estão

descritas informações gerais referentes à relevância, comportamento e efeitos dessas moléculas no organismo animal.

2.3.1. Interleucinas 4, 6, 10 (IL-4, IL-6 e IL-10) e Interferon gama (INF- γ)

O termo interleucina é empregado para descrever moléculas oriundas principalmente de leucócitos, que participam da comunicação celular (MUELLER; HARTMANN, 2021). A interleucina 6 (IL-6) é uma citocina produzida por diversas células incluindo monócitos, células endoteliais, adipócitos, células renais mesangiais e fibroblastos. Essa estimula a replicação de linfócitos T, diferenciação de linfócitos B para síntese de anticorpos e a síntese de proteínas de fase aguda como o fibrinogênio e da proteína C reativa. Também exerce papel fundamental na glomerulopatia proliferativa mesangial, por estimular a proliferação das células renais mesangiais e causar hipertrofia renal patológica (SINGH, et al. 2022). Na doença renal crônica humana, a IL-6 é reconhecida como um dos melhores preditores inflamatórios e seus níveis elevados são justificados pela alta produção na doença, assim como pela diminuição da taxa de filtração glomerular, o que diminui sua excreção (LIU; ZENG; LI, 2022).

A interleucina 10 (IL-10) é sintetizada a partir de linfócitos e monócitos, e tem potencial anti-inflamatório a nível local ou sistêmico. É regulada de maneira efetiva frente à resposta imunológica, portanto, sua secreção geralmente ocorre algumas horas após a sinalização de outras citocinas e fatores pró-inflamatórios, garantindo a amenização da inflamação em diversos níveis (MEISEL et al., 1996). O aumento da IL-10 interfere na modulação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- α , assim como descrito na figura 2.

Nos pacientes urêmicos, a constante estimulação de monócitos parece estar correlacionada à maior produção de IL-10, quando comparados aos indivíduos saudáveis (MORITA et al., 1997). Outra característica relacionada aos pacientes doentes renais humanos em estágio avançado, é que a redução da taxa de filtração glomerular eleva a concentração de IL-10 devido a menor metabolização e excreção renal (BRUNET et al., 1998).

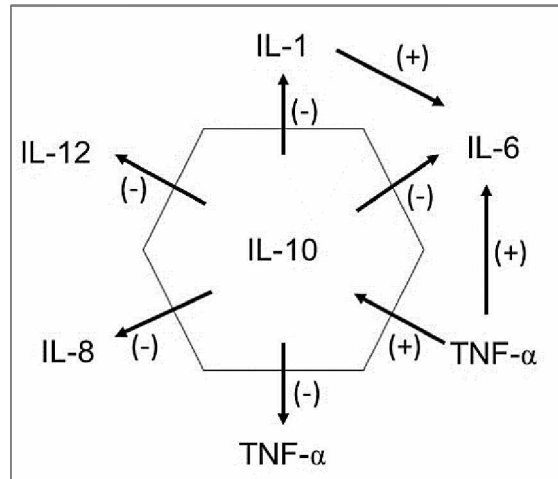


Figura 2. Interação entre algumas citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-10) e seus efeitos inibitórios (-) ou estimulatórios (+). Adaptado de Stevinkel et al., 2005.

Considerado como um subgrupo das interleucinas, o interferon gama (INF- γ) é uma proteína que participa da imunidade inata e adaptativa (KLOTZ et al., 2017). É produzido predominantemente pelas células natural killer ativadas durante processos infecciosos, principalmente os virais (MUELLER; HARTMANN, 2021). Outras interleucinas, como a IL-12, IL-15 e IL-18 regulam e interferem na sua síntese (PEGRAM et al., 2011). Apesar de conter a replicação viral, o INF- γ aumenta a apresentação de antígenos dos linfócitos Th1 e amplifica o reconhecimento imunogênico. Também participa da ativação de macrófagos, aumentando sua ligação aos receptores Toll-like, que potencializam a resposta imunológica à patógenos (HU; IVASHKIV, 2009; MUELLER; HARTMANN, 2021).

2.3.3. Fator de necrose tumoral (TNF- α)

O fator de necrose tumoral (TNF- α) é uma proteína com efeito pró-inflamatório. Este é produzido pelos linfócitos T, mas também por células endoteliais vasculares, tubulares renais e células mesangiais (MAJID, 2011). Sua síntese está relacionada à processos inflamatórios, citotóxicos ou eventos apoptóticos (MEHAFFEY; MAJID, 2017).

Em humanos, o TNF α é altamente correlacionado ao desenvolvimento de glomerulopatias (OBERG et al., 2004). Além disso, alguns modelos experimentais evidenciaram que a inibição farmacológica de TNF- α atenuou o desenvolvimento das lesões glomerulares em ratos (KARKAR; SMITH; PUSEY, 2001). Segundo Meisel e colaboradores (1996), a IL-10 pode modular e reduzir a resposta inflamatória causada pelo TNF α (figura 2).

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, D. M.; RODRIGUES, F. P.; RIBEIRO, M. G.; DOS SANTOS, B.; MURARO, L. S.; TAQUES, I. I. G. G.; CAMPOS, A. N. S.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; DA COSTA VIEIRA, R. F.; TAKAHIRA, R. K. Uncommon Ehrlichia canis infection associated with morulae in neutrophils from naturally infected dogs in Brazil. **Transboundary and emerging diseases**, v. 67, n. 2, p. 135–141, 2020. <https://doi.org/10.1111/tbed.13390>
- BAI, L.; GOEL, P.; JHAMBH, R.; KUMAR, P.; JOSHI, V. G. Molecular prevalence and haemato-biochemical profile of canine monocytic ehrlichiosis in dogs in and around Hisar, Haryana, India. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 41, n. 3, p. 647-654, 2017. <https://doi.org/10.1007/s12639-016-0860-8>
- BEALL, M. J.; ALLEMAN, A. R.; BREITSCHWERDT, E. B.; COHN, L. A.; COUTO, C. G.; DRYDEN, M. W.; GUPTILL, L. C.; IAZBIK, C.; KANIA, S. A.; LATHAN, P.; LITTLE, S. E.; ROY, A.; SAYLER, K. A.; STILLMAN, B. A.; WELLES, E. G.; WOLFSON, W.; YABSLEY, M. J. Seroprevalence of Ehrlichia canis, Ehrlichia chaffeensis and Ehrlichia ewingii in dogs in North America. **Parasites & Vectors**, v. 5, p. 29, 2012. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-29>
- BORIN, S.; CRIVELLENTI, L. Z.; FERREIRA, F. A. Epidemiological, clinical, and hematological aspects of 251 dogs naturally infected with Ehrlichia spp. morulae. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 566-571, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352009000300007>
- BRUNET, P.; CAPO, C.; DELLACASAGRANDE, J.; THIRION, X.; MEGE, J. L.; BERLAND, Y. IL-10 synthesis and secretion by peripheral blood mononuclear cells in haemodialysis patients. **Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 13, n. 7, p. 1745–1751, 1998. <https://doi.org/10.1093/ndt/13.7.1745>
- BURTON, W.; DRAKE, C.; OGEER, J.; BUCH, J.; MACK, R.; MCCRANN, D.; COYNE, M. J. Association Between Exposure to *Ehrlichia spp.* and Risk of Developing Chronic Kidney Disease in Dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 56, p. 159–164, 2020. <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-7012>
- CODNER, E. C.; CACECI, T.; SAUNDERS, G. K.; SMITH, C. A.; ROBERTSON, J. L.; MARTIN, R. A.; TROY, G. C. Investigation of glomerular lesions in dogs with acute experimentally induced Ehrlichia canis infection. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 12, p. 2286–2291, 1992. PMID: 1476309
- CRIVELLENTI, L. Z.; CINTRA, C. A.; MAIA, S. R.; SILVA, G. E. B.; BORIN-CRIVELLENTI, S.; CIANCIOLO, R.; ADIN, C. A.; TINUCCI-COSTA, M.; PENNACCHI, C. S.; SANTANA, A. E. Glomerulotubular pathology in dogs with subclinical ehrlichiosis. **PLoS ONE**, v. 16, n. 12, p. e0260702, 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260702>
- DAGNONE, A. S.; MORAIS, H. S. A.; VIDOTTO, O. Erliquiose nos animais e no homem. **Ciências Agrárias**, v. 22, n. 2, p. 191 – 201, 2001. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2001v22n2p191>

DE CASTRO, M. B.; MACHADO, R. Z.; AQUINO, L. P.; ALESSI, A. C.; COSTA, M. T. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinico pathological and immunopathological findings. **Veterinary Parasitology**, v. 119, n. 1, p. 73-86, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.10.012>

DINIZ, P. P. V. P., MOURA DE AGUIAR, D. Ehrlichiosis and Anaplasmosis: An Update. **The Veterinary clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 52, n. 6, p. 1225–1266, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2022.07.002>

DINIZ, P. P. V. P.; DE MORAIS, H. S.; BREITSCHWERDT, E. B.; SCHWARTZ, D. S. Serum cardiac troponin I concentration in dogs with ehrlichiosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 5, p. 1136–1143, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2008.0145.x>

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 2145–65, 2001. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2145>

EDDLESTONE, S. M.; DINIZ, P. P. V. P.; NEER, T. M.; GAUNT, S. D.; CORSTVET, R.; CHO, D.; HOSGOOD, G.; HEGARTY, B.; BREITSCHWERDT, E. B. Doxycycline clearance of experimentally induced chronic Ehrlichia canis infection in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, n. 6, p. 1237–1242, 2007. <https://doi.org/10.1892/07-061.1>

FARIA, J. L. M.; MUNHOZ, T. D.; JOÃO, C. F.; VARGAS-HERNÁNDEZ, G.; ANDRÉ, M. R.; PEREIRA, W. A. B.; MACHADO, R. Z.; TINUCCI-COSTA, M. Ehrlichia canis (Jaboticabal strain) induces the expression of TNF- α in leukocytes and splenocytes of experimentally infected dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 71-74, 2011. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612011000100015>

FRANK, J. R.; BREITSCHWERDT, E. B. A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, n. 3, p. 194–201, 1999. [http://doi.org/10.1892/0891-6640\(1999\)013<0194:arsoei>2.3.co;2](http://doi.org/10.1892/0891-6640(1999)013<0194:arsoei>2.3.co;2)

HARRUS, S.; DAY, M.J.; WANER, T.; BARK, H. Presence of immune-complexes, and absence of antinuclear anti-bodies, in sera of dogs naturally and experimentally infected with Ehrlichia canis. **Veterinary Microbiology**, v. 83, p. 343-349, 2001. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(01\)00431-x](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(01)00431-x)

HARRUS, S.; WANER, T.; NEER, M. Ehrlichia canis infection. In: Greene CE, editor. **Infectious diseases of the dog and the cat**. 4th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2011. p. 227–38. <https://doi.org/10.1111/jsap.12021>

IQBAL, Z.; RIKIHISA, Y. Application of the polymerase chain reaction for the detection of Ehrlichia canis in tissues of dogs. **Veterinary Microbiology**, v. 42, p. 281-287, 1994. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)90059-0](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)90059-0)

ISMAIL, N.; MCBRIDE, J.W. Tick-Borne Emerging Infections: Ehrlichiosis and Anaplasmosis. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 37, n. 2, p. 312 -340, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2017.01.006>

HU, X.; IVASHKIV, L. B. Cross-regulation of Signaling Pathways by Interferon- γ : Implications for Immune Responses and Autoimmune Diseases. **Immunity**, v. 31, n. 4, p. 539-550, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.09.002>

JOHNSON, E. M.; EWING, S. A.; BARKER, R. W.; FOX, J. C.; CROW, D. W.; KOCAN, K. M. Experimental transmission of Ehrlichia canis (Rickettsiales: Ehrlichieae) by Dermacentor variabilis (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 74, n. (2-4), p. 277-88, 1998. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(97\)00073-3](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(97)00073-3)

KARKAR, A. M., SMITH, J.; PUSEY, C. D. Prevention and treatment of experimental crescentic glomerulonephritis by blocking tumour necrosis factor-alpha. **Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 16, n. 3, p. 518-524, 2001. <https://doi.org/10.1093/ndt/16.3.518>

KLOTZ, D.; BAUMGÄRTNER, W.; GERHAUSER, I. Type I interferons in the pathogenesis and treatment of canine diseases. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 191, p. 80-93, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2017.08.006>

LEIVA, M.; NARANJO, C.; PEÑA, M. T. Ocular signs of canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study in dogs from Barcelona, Spain. **Veterinary Ophthalmology**, v. 8, n. 6, p. 387-393, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2005.00409.x>

LIU, J.; DREXEL, J.; ANDREWS, B.; EBERTS, M.; BREITSCHWERDT, E.; CHANDRASHEKAR, R. Comparative evaluation of 2 in-clinic assays for vector-borne disease testing in dogs. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 33, n. 4, p.114-8, 2018. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2018.09.003>

LIU, G.W.; ZENG, J.E.; LI, L.F. Correlation analysis of serum IGF-1 and IL-6 and urinary albumin/creatinine ratio in patients with type 2 diabetic kidney disease. **Frontiers in Endocrinology**, n. 3, 2022. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1082492>

LUCKSCHANDER, N.; KLEITER, M.; WILLMANN, M. Renal amyloidosis caused by Ehrlichia canis. **Schweizer Archiv für Tierheilkunde**, v. 145, n. 10, p. 482-485, 2003. <https://doi.org/10.1024/0036-7281.145.10.482>

MAGGI, R. G.; MASCARELLI, P. E.; HAVENGA, L. N.; NAIODOO, V.; BREITSCHWERDT, E. B. Co-infection with Anaplasma platys, Bartonella henselae and Candidatus Mycoplasma haematoparvum in a veterinarian. **Parasites & Vectors**, v. 6, p. 103, 2013. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-103>

MAJID, D. S. A. Tumor necrosis factor- alpha and kidney function: Experimental findings in mice. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 691, p. 471–480, 2011. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6612-4_48

MEHAFFEY, E.; MAJID, D. S. A. Tumor necrosis factor-a, kidney function, and hypertension. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 313: F1005–F1008, 2017. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00535.2016>

MEISEL, C.; VOGT, K.; PLATZER, C.; RANDOW, F.; LIEBENTHAL, C.; VOLK, H. D. Differential regulation of monocytic tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 expression. **European Journal of Immunology**, v. 26, n. 7, p. 1580–1586, 1996. <https://doi.org/10.1002/eji.1830260726>

MOREIRA, S. M.; BASTOS, C. V.; ARAUJO, 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. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352003000200003>

MORITA, Y.; YAMAMURA, M.; KASHIHARA, N.; MAKINO, H. Increased production of interleukin-10 and inflammatory cytokines in blood monocytes of hemodialysis patients. **Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology**, v. 98, n. 1, p. 19–33, 1997. PMID: 9434312

MUELLER, R. S.; HARTMANN, K. Interferon therapies in small animals. **The Veterinary Journal**, v. 271, p. 105648, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2021.105648>

MYLONAKIS, M.E.; HARRUS, S.; BREITSCHWERDT, E.B. An update on the treatment of canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). **The Veterinary Journal**, v. 246, p. 45-53, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.01.015>

NAIR, A. D.; CHENG, C.; GANTA, C. K.; SANDERSON, M. W.; ALLEMAN, A. R.; MUNDERLOH, U. G.; GANTA, R. R. Comparative experimental infection study in dogs with *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *Anaplasma platys* and *A. phagocytophilum*. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. e0148239, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148239>

OBERG, B. P.; MCMENAMIN, E.; LUCAS, F. L.; MCMONAGLE, E.; MORROW, J.; IKIZLER, T. A.; HIMMELFARB, J. Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. **Kidney International**, v. 65, n. 3, p. 1009-1016, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00465.x>

OLANO, J. P.; WALKER, D. H. Human ehrlichioses. **The Medical Clinics of North America**, v. 86, n. 2, p. 375–92, 2002. [https://doi.org/10.1016/s0025-7125\(03\)00093-2](https://doi.org/10.1016/s0025-7125(03)00093-2)

OPAL, S. M.; DEPALO, V. A. Anti-inflammatory cytokines. **Chest**, v. 117, n. 4, p. 1162–1172, 2000. <https://doi.org/10.1378/chest.117.4.1162>

PANCIERA, R. J.; EWING, S. A.; CONFER, A. W. Ocular histopathology of Ehrlichial infections in the dog. **Veterinary Pathology**, v. 38, n. 1, p. 43–6, 2001. <https://doi.org/10.1354/vp.38-1-43>

PEGRAM, H. J.; ANDREWS, D. M.; SMYTH, M. J.; DARCY, P. K.; KERSHAW, M. H. (2011). Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. **Immunology and Cell Biology**, v. 89, n. 2, p. 216–224, 2011. <https://doi.org/10.1038/icb.2010.78>

RODRIGUEZ-ALARCON, C. A.; BERISTAIN-RUIZ, D. M.; OLIVARES-MUÑOZ, A.; QUEZADA-CASASOLA, A.; PÉREZ-CASIO, F.; ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, J. A.; TAPIA-ALANÍS, J.; LIRA-AMAYA, J. J.; RIVERA-BARRENO, R.; CERA-HURTADO, O. S.; IBANCOVICH-CAMARILLO, J. A.; SOON-GÓMEZ, L.; ADAME-GALLEGOS, J. R.; FIGUEROA-MILLÁN, J. V. Demonstrating the presence of Ehrlichia canis DNA from different tissues of dogs with suspected subclinical ehrlichiosis. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 1, p. 518, 2020. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04363-0>

SHIPOV, A.; KLEMENT, E.; REUVENI-TAGER, L.; WANER, T.; HARRUS, S. Prognostic indicators for canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 153, n. 1-2, p. 131-138, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.01.009>

SILVA, A. C. T.; SANTOS, J. R. S.; SILVA, R. M. N.; SANTANA, V. L.; MARTINS, F. S. M.; FALCÃO, B. M. R.; TANIKAWA, A.; ALMEIDA, T. M.; VAZ, A. F. M.; SOUZA, A. P. Prednisolone associated with doxycycline on the hematological parameters and serum proteinogram of dogs with ehrlichiosis. **Ciência Rural**, v. 51, n. 3, p. e20200335, 2021. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200335>

SILVA, L. S.; PINHO, F. A.; PRIANTI, M. G.; BRAGA, J. F. V.; PIRES, L. V.; FRANÇA, S. A.; SILVA, S. M. M. S. Renal histopathological changes in dogs naturally infected with Ehrlichia canis. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 9, n. 1, p. 2–15, 2016.

SIMPSON, C. F. Relationship of Ehrlichia canis-infected mononuclear cells to blood vessels of lungs. **Infection and Immunity**, v. 10, p. 590-596, 1974. <https://doi.org/10.1128/iai.10.3.590-596.1974>

SINGH, J.; JAIN, A.; BHAMRA, R.; RATHI, V.; DHINGRA, A.K. The Mechanistic Role of Different Mediators in the Pathophysiology of Nephropathy: A Review. **Current Drug Targets**, n. 24, 2022. <https://dx.doi.org/10.2174/1389450124666221026152647>

STENVINKEL, P.; KETTELER, M.; JOHNSON, R. J.; LINDHOLM, B.; PECOITS-FILHO, R.; RIELLA, M.; GIRNDT, M. IL-10, IL-6, and TNF- α : Central factors in the altered cytokine network of uremia —The good, the bad, and the ugly. **Kidney International**, v. 67, n. 4, p. 1216–1233, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00200.x>

TAJIMA, T.; RIKIHISA, Y. Cytokine responses in dogs infected with Ehrlichia canis Oklahoma strain. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1063, p. 429-32, 2005. <https://doi.org/10.1196/annals.1355.078>

TAQUES, I. I. G. G.; BARBOSA, T. R.; MARTINI, A. C.; PITCHENIN, L. C.; BRAGA, Í. A.; DE MELO, A. L. T.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; DE AGUIAR, D. M. Molecular assessment of the transplacental transmission of Toxoplasma gondii, Neospora caninum, Brucella canis and Ehrlichia canis in dogs. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 49, p. 47–50, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.09.002>

THOMAS, W. B. Inflammatory diseases of the central nervous system in dogs. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 13, n. 3, p. 167–178, 1998. [https://doi.org/10.1016/S1096-2867\(98\)80038-8](https://doi.org/10.1016/S1096-2867(98)80038-8)

UNVER, A.; RIKIHISA, Y.; KARAMAN, M.; OZEN, H. An acute severe ehrlichiosis in a dog experimentally infected with a new virulent strain of Ehrlichia canis. Clinical microbiology and infection. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 15, n. 2, p. 59–61, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02634.x>

VIEIRA, R. F.; BIONDO, A. W.; GUIMARÃES, A. M.; DOS SANTOS, A. P.; DOS SANTOS, R. P.; DUTRA, L. H.; DINIZ, P. P. V. P.; DE MORAIS, H. A.; MESSICK, J. B.; LABRUNA, M. B.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 20, n. 1, p. 1–12, 2011. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612011000100002>

WANER, T.; HARRUS S.; BARK H.; BOGIN E.; AVIDAR Y.; KEYSARY A. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 69, p. 307–317, 1997. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(96\)01130-2](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(96)01130-2)

WARDROP, K. J.; BIRKENHEUER, A.; BLAIS, M. C.; CALLAN, M. B.; KOHN, B.; LAPPIN, M. R.; SYKES, J. Update on canine and feline blood donor screening for blood-borne pathogens **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 30, n. 1, p. 15–35, 2016. <https://doi.org/10.1111/jvim.13823>

WOODY, B.J.; HOSKINS, J.D. Ehrlichial diseases of dogs. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 21, p. 75-98, 1991. [https://doi.org/10.1016/s0195-5616\(91\)50009-7](https://doi.org/10.1016/s0195-5616(91)50009-7)

CAPÍTULO 2

1 ARTIGO

PAPEL DAS CITOCINAS NA PROTEINÚRIA DA ERLIQUIOSE NA FASE AGUDA CLÍNICA E SUBCLÍNICA EM CÃES

Resumo

A erliquiose canina é uma doença infecciosa causada pela bactéria *Ehrlichia spp.*, descrita em todo o mundo, entretanto, é considerada endêmica principalmente em áreas tropicais e subtropicais. Cães portadores de erliquiose são mais predispostos a desenvolverem uma série de comorbidades e distúrbios multissistêmicos, principalmente associados a lesão renal aguda e predispor à doença renal crônica. Variações na resposta inflamatória do hospedeiro resultam em diferentes fases: aguda, subclínica e crônica. Em cada uma delas, é possível que ocorra o desenvolvimento de comorbidades multissistêmicas, sendo as glomerulonefrites comumente observadas. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a fisiopatogenia da proteinúria e da lesão renal aguda correlacionando o perfil de citocinas inflamatórias com parâmetros de avaliação renal, em pacientes caninos infectados espontaneamente com *E. canis* na fase clínica aguda e subclínica. Para isso, 58 cães com raça, idade, sexo e pesos variados foram alocados em três categorias distintas. Após uma triagem clínica e laboratorial minuciosa, 18 animais foram inseridos no grupo de animais hígidos (grupo controle - GC). Os cães com diagnóstico molecular positivo estritamente para *E. canis* e presença de manifestações clínicas foram inseridos no grupo de animais com doença ativa (GDA; n=24), e aqueles positivos tanto no diagnóstico molecular e sorológico, porém, sem sinais e manifestações clínicas, foram considerados com doença subclínica (GSC; n=16). Todas as citocinas apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0,0001$) em relação aos grupos supracitados. $TNF\alpha$, IL-4, IL-6 e $INF-\gamma$ evidenciaram um padrão aumentado no GDA e GSC. Houve correlação positiva entre $TNF\alpha$, $INF-\gamma$ e IL-10 e a proteinúria no GDA, bem como a correlação negativa da IL-10 com a proteinúria no GSC. Desta forma, conclui-se que o $TNF\alpha$ e $INF-\gamma$ estão relacionados à inflamação aguda da doença, enquanto a IL-10 parece atenuar as manifestações clínicas, mas não a proteinúria. Em ambas as fases, tais citocinas apresentam potencial em causar proteinúria, e conseqüentemente levar ao quadro de lesão renal em cães infectados.

Palavras-chave: hemoparasitose, interleucinas, imunologia, nefropatia

1. Introdução

A erliquiose canina é uma doença infecciosa causada pela bactéria intracelular gram-negativa *Ehrlichia spp.*, transmitida principalmente pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Dumler et al., 2001), sendo encontrada no mundo todo, e considerada endêmica principalmente em áreas tropicais e subtropicais (Aguilar et al., 2007; Silva et al., 2016).

A severidade das manifestações clínicas tende a variar de acordo com os três estágios da doença, sendo eles o agudo, subclínico (assintomático) ou crônico (de Castro et al., 2004). Os sinais são multissistêmicos e comumente aparecem na forma de letargia, disorexia, distúrbios gastrointestinais, perda de peso, anemia, febre, epistaxe e linfadenopatia (Nair et al., 2016).

Atualmente trabalhos tem demonstrado que cães portadores de erliquiose canina são mais predispostos a desenvolver lesões renais (Burton et al., 2020). Uma das teorias aceitas envolvem a cronicidade do depósito de imunocomplexos nos rins, resultando em glomerulonefrite e predispondo o animal a proteinúria e perda de função renal (Caster et al., 2014; Goldstein et al., 2013; Littman et al., 2013, Crivellenti et al., 2021). Como existem diferenças importantes de respostas frente a mesma doença, as interleucinas tem sido alvo importante tanto da patogênese quanto alvo terapêutico de vários agentes infectantes, como o coronavírus 2019 (COVID-19), o qual teve sua apresentação, patogenia e intensidade de sinais clínicos e lesão renal ligados a “*cytokine storm*” (Chueh et al, 2020; Ronco 2020).

A análise histopatológica da fase aguda da erliquiose sugere lesões mais complexas em regiões tubulointersticiais, glomerulares, especialmente a membranoproliferativas e nefrite intersticial, além de moderada a elevada quantidade de células linfoplasmocitárias, indicando um alto potencial imunogênico na fisiopatogenia nessa fase (Silva et al., 2016). Já as lesões encontradas na fase subclínica envolvem a proliferação de células mesangiais, sinequias, glomerulosclerose segmentar focal, glomérulos isquêmicos, fibrose intersticial leve a moderada e atrofia tubular e projeções de espículas semelhantes a glomerulopatia membranosa (Crivellenti et al., 2021). Essas disparidades podem ser semelhantes as alterações vistas na glomerulopatias de ordem imune em seres humanos, as quais citocinas são importantes componentes da fisiopatogenia das alterações renais (Zhao et al. 2022). Ainda dependendo da intensidade e tipo de citocinas produzidas, uma mesma doença (COVID-19) pode cursar com

quadros assintomáticos, brandos ou hiperagudos e levar ao comprometimento da função de múltiplos órgãos, sendo os rins um dos mais acometidos (Ronco et al., 2020).

Diante das disparidades das duas fases na mesma doença, buscou-se com esse trabalho investigar a patogênese da lesão renal e proteinúria através do perfil de citocinas inflamatórias que possam estar envolvidas no desenvolvimento de lesão renal em cães espontaneamente infectados com *E. canis* nas fases aguda e subclínica.

2. Material e métodos

2.1. Desenho experimental

Estudo observacional analítico prospectivo. O presente estudo foi conduzido após aprovação do Comitê de Ética Veterinário (protocolo 010290/14 e 069/15).

2.2. Critérios de elegibilidade e grupos experimentais

Os 58 cães inseridos no estudo foram recrutados de áreas consideradas endêmicas para erliquiose canina. Os mesmos apresentaram raça, idade, sexo e pesos (> 1 kg) variáveis. Todos os animais tiveram os parâmetros fisiológicos avaliados durante a inspeção clínica, bem como, foram submetidos a análises laboratoriais (hemograma, creatinina, ureia, alanina aminotransferase – ALT, fosfatase alcalina – FA, fósforo, cálcio, albumina, proteína total, sódio, potássio, urinálise e razão proteína/creatinina urinária – RPC), moleculares (PCR com pesquisa para *E. canis*, *Anaplasma sp.* e *Babesia sp.*) e sorológicas (Immunocomb® - Biogal, Israel commercial kit, com sensibilidade de 0,86% e especificidade de 0,98% para *E. canis*, e ELISA Test-ITTM para leptospirose canina com análise de IgM e IgG - Biogal, Israel commercial kit, incluindo a avaliação das cepas *L. icterohaemorrhagiae*, *L. canicola*, *L. pomona* e *L. grippotyphosa*).

Cães que apresentaram neoplasias, endocrinopatias, outros processos inflamatórios e infecciosos em trato geniturinário, algum exame molecular e/ou sorológico reagente para as demais doenças infecciosas supracitadas (que não a *E. canis*) de maneira concomitante não foram incluídos no estudo.

A partir desta triagem, três subgrupos foram determinados. Os cães hígidos, sem alterações clínicas, físicas, laboratoriais e não reagentes para os exames moleculares e sorológicos supracitados, foram incluídos no grupo controle negativo (GC). Cães espontaneamente infectados com *Ehrlichia canis* (detectado no exame molecular, independente do resultado sorológico), com presença da doença clinicamente ativa (apatia, hiporexia ou anorexia, letargia, febre, perda de peso, êmese, secreção ocular, linfadenomegalia, abdominalgia, hepato e/ou esplenomegalia, hemorragias, petéquias e epistaxe) associada as alterações laboratoriais como anemia, trombocitopenia, leucocitose, hiperproteinemia com hipergamaglobulinemia, foram alocados para o grupo de doença aguda (GDA). Por último, o grupo de cães espontaneamente infectados com *Ehrlichia canis*, determinada após avaliação molecular e sorológica, sem associação de doença clinicamente ativa, compuseram o grupo de doença subclínica (GSC). O GC, GDA e GSC foi composto por 18, 24 e 16 cães, respectivamente.

O exame molecular de reação em cadeia da polimerase (PCR) avaliou o gene rRNA 16S da *E. canis* e os primers utilizados foram o ECC (59-AGAACGAACGCTGGCGGCAAGCC-39) e ECB primer (59-CGTATTACCGCGGCTGCTGGC-39), seguido por HE-3 primer (59-TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCT) e ECA primer (59-CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGAA-39).

Análise de marcadores inflamatórios

Todos os pacientes foram submetidos à dosagem de citocinas séricas, incluindo o fator de necrose tumoral alfa (TNF α), interferon gama (IFN γ), interleucinas 4, 6 e 10 (IL-4, IL-6 e IL-10, respectivamente). A sua quantificação foi realizada a partir do método imunoenzimático tipo sanduíche (ELISA), com anticorpos monoclonais Quantikine HS (R&D System, Minneapolis, Minnesota, USA).

2.3. Análises estatísticas

A estatística descritiva e distribuição de frequência das variáveis foi realizada em todos os grupos. As citocinas inflamatórias e grupos de tratamentos que mostraram distribuição normal, foram submetidas à análise de variância (ANOVA) para dados paramétricos. Dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e múltipla comparação de Dunns. A distribuição de normalidade foi avaliada por meio dos testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk, com significância estabelecida para $p < 0,05$. A análise de correlação das citocinas e RPC também foram submetidas ao teste de normalidade pelo Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Os dados paramétricos foram analisados pelo teste de Pearson e não paramétricos por Spearman. Todos os cálculos foram realizados através do software GraphPad Prism 5.0.

3. Resultados

Os cães saudáveis (GC) apresentaram idade média de 1,2 anos (variando de 3 meses a 5 anos), peso médio de 12,6 kg ($\pm 2,54$), e composto por 33,3% de fêmeas e 66,6% de machos. Os animais sem raça definida foram predominantemente observados, representando 88,8% das raças, além destes, apenas um Fila Brasileiro (5,6%) e Pastor Alemão (5,6%) foram incluídos neste grupo. Dentre os animais com manifestações subclínicas (GSC), foi observado média de 2,5 anos de idade (variando de 6 meses a 8 anos), peso médio de 11,4 kg ($\pm 1,66$), e 62,5% de

fêmeas e 37,5% de machos. Em relação às raças, os cães sem raça definida continuaram sendo os mais acometidos (62,5%), seguido de Poodles (18,75%), Boxers (12,5%) e apenas um cão da raça Dachshund (6,25%). O grupo de cães com manifestações clínicas de erliquiose canina (GDA) apresentou idade média de 2,8 anos (com variação de 3 meses a 8 anos), peso médio de 11,9 kg ($\pm 2,08$), composto por 70,8% de fêmeas e 29,2% de machos. Neste grupo, os cães sem raça definida seguiram mais frequentes (58,3%), então o Rottweiler e Poodle (12,5% cada), e Blue Heeler (8,3%). Apenas um indivíduo das raças Pitbull e Shih-Tzu (4,2% cada) foram observados.

As concentrações (pg/ml) das citocinas pró-inflamatórias $TNF\alpha$, IL-4, IL-6 e $INF-\gamma$ foram mais evidentes no grupo de GDA, moderadamente elevadas no GSC e inferiores no GC. Este padrão foi inversamente observado com os valores (pg/ml) da IL-10 (anti-inflamatória) e, portanto, se mostraram maiores no GC, moderados no GSC e relativamente inferiores no GDA. Os valores de média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo pertinentes à cada item estão descritos na tabela 1, a seguir.

As citocinas $TNF\alpha$, IL-4, IL-6 e IL-10 foram analisadas de maneira pareada ao GC, GDA e GSC, e todas apresentaram relevante diferença estatística ($p < 0,0001$) na análise de variância (ANOVA), quando comparadas aos três grupos supracitados. O $INF-\gamma$ foi avaliado pelo teste de Kruskal-Wallis e também evidenciou diferença estatística com $p < 0,0001$ para cada grupo testado. Os animais com erliquiose aguda apresentaram os maiores valores de citocinas pró-inflamatórias ($TNF\alpha$, IL-4, IL-6 e $INF-\gamma$), seguida pelos animais subclínicos. A IL-10 apresentou os menores valores nos animais com doença aguda, em seguida nos com doença subclínica e por último o grupo controle.

A média obtida na razão da RPC no grupo de animais saudáveis (GC) foi de 0,11 ($\pm 0,05$), enquanto a mediana, mínima e máxima do GDA foi 0,25 (0,02-2,5) e 0,19 (0,06-2,2) no GSC. Tais parâmetros diferiram estatisticamente no GC, quando comparados aos GSC e

GDA ($P = 0,0035$), entretanto, não houve diferença entre os grupos GDA e GSC isoladamente. Nenhum animal do GC apresentou valor de RPC superior a 0,2, já os grupos GDA tiveram 12 (50,0%) e o GSC tiveram sete (43,75%) cães nessas condições. Valores superiores a 0,5 foram encontrados em sete (29,16%) e quatro (25,0%) indivíduos do GDA e GSC, respectivamente.

Tabela 1. Valores médios (pg/ml) das citocinas TNF α , IL-4, IL-6, IL-10 e INF- γ de cães espontaneamente infectados com *E. canis* em fase clínica aguda e subclínica.

	Grupo controle	Grupo doença aguda	Grupo doença subclínica
TNFα	75,0 \pm 7,73 ^a	174,2 \pm 14,07 ^b	146,9 \pm 11,61 ^c
IL-4	44,2 \pm 5,18 ^a	162,6 \pm 14,60 ^b	130,0 \pm 6,36 ^c
IL-6	52,7 \pm 5,48 ^a	143,1 \pm 14,00 ^b	106,8 \pm 12,97 ^c
IL-10	72,2 \pm 11,22 ^a	31,4 \pm 9,84 ^b	54,6 \pm 9,77 ^c
INF-γ	61,5 (57-80) ^a	164,0 (129-187) ^b	138,5 (117-155) ^c
RPC	0,10 (0,05-0,24) ^a	0,25 (0,02-2,5) ^b	0,19 (0,06-2,2) ^b
CREAT	1,1 \pm 0,22 ^a	0,8 \pm 0,27 ^b	0,96 \pm 0,23 ^{a,b}
UREIA	34,5 \pm 11,97 ^a	30,0 (14,9-82,2) ^a	28,0 (17,0-58,0) ^a

TNF α : fator de necrose tumoral α ; IL-4: interleucina 4; IL-6: interleucina 6; IL-10: interleucina 10; INF- γ : interferon γ ; CREAT: creatinina. Letras distintas evidenciam diferenças estatísticas entre os grupos. Dados paramétricos foram representados por média \pm desvio padrão, e parâmetros com distribuição não normal estão descritos por seus valores medianos (mínimo-máximo).

Houve correlação entre a RPC e as citocinas TNF α ($r=0,48$; $p < 0,0085$), INF- γ ($r=0,37$; $p < 0,035$) e IL-10 ($r=0,3857$; $p < 0,0313$) nos cães sintomáticos (GDA). No GSC também foi observado correlação negativa da IL-10 ($r= -0,47$; $p < 0,0319$) com a RPC.

4. Discussão

Dada a importância e necessidade em determinar os processos inflamatórios que podem resultar em danos renais envolvidos na fisiopatogenia da erliquiose canina, o nosso estudo permitiu avaliar o perfil de citocinas em cães espontaneamente infectados com *E. canis* nas fases aguda e subclínica, e correlacionar com parâmetros de avaliação renal.

As citocinas com potenciais pró-inflamatórios mensuradas foram $\text{TNF}\alpha$, IL-4, IL-6 e $\text{INF}\gamma$, e todas mostraram um padrão aumentado no GDA e GSC, sendo os patógenos, dentre outros fatores, considerados um dos principais gatilhos para a ativação de cascatas inflamatórias (Fajgenbaum and June, 2020). Em seres humanos é possível definir que na nefrite membranosa existe uma ativação importante do $\text{TNF}\alpha$, semelhante ao que foi descrito na fase subclínica, a qual apresenta progressão da perda de função e inflamação ativa (Burton et al., 2020; Crivellenti et al., 2021) e na fase aguda em que existe a infiltração celular inflamatória e lesão túbulo intersticial, sendo essa uma provável via de proteinúria, mas não de diferenciação entre as fases.

O aumento de $\text{TNF}\alpha$, IL-6 e entre outras citocinas, resultam na quimiotaxia de células inflamatórias para os túbulos renais, exacerbando a proteinúria e lesão deste órgão (Kalavrizioti et al., 2015; Zhao et al., 2022). Em nosso estudo, o aumento de $\text{TNF}\alpha$ e $\text{INF}\gamma$ foi correlacionado à proteinúria em cães portadores de erliquiose aguda. Esse achado justifica e parece estar envolvido no desenvolvimento de lesões membranoproliferativas, nefrite intersticial e infiltrado linfoplasmocitário, observados em outros estudos (Silva et al., 2016), mas não com a fase subclínica, a qual apresenta pouca celularidade, evidenciando que possa existir citocinas atenuantes para esse processo como visto pela IL-10. Isso também é relatado em artrite induzida em ratos em que a IL-10 reduz significativamente a presença de polimorfonucleares (principal diferença entre as glomerulopatias membranoproliferativas e membranosas) (Bober et al. 2000).

As citocinas IL-6 e IL-4 não demonstraram uma correlação com a proteinúria, no entanto indicam importante inflamação sistêmica e podem contribuir na gênese das alterações renais,

assim como visto na nefropatia membranosa em camundongos “*Heymann nephritis*” a qual a IL-4 é um ponto crucial (Spicer, 2001). Neste estudo não ficaria respondido ainda a diferença entre as fases, já que nas duas os aumentos das interleucinas são semelhantes, inclusive com maior concentração na fase aguda. Dessa forma, acreditamos que modelos experimentais induzidos apresentam importante diferença das doenças “naturais”, sendo um dos principais pontos para a diferenciação a IL-10.

É visto, mesmo no início da glomerulopatia membranosa em humanos, o aumento expressivo da IL-10 e sua relação com a proliferação das células B e produção de anticorpos (Zhao et al., 2022), assim como o descrito anteriormente na fase subclínica, em que existe intensa quantidade de anticorpos detectáveis na circulação (Crivellenti et al. 2021). Essas características da IL-10 provavelmente são as que diferenciam as fases, sendo a subclínica semelhante as doenças crônicas, mas progressivas e lentas, em que a IL-10 participa na atenuação da IL-6, a qual apresenta comportamento mais agudo e com sinais clínicos aparentes. O mesmo ocorre em seres humanos com artrite reumatoide em que a IL-10 inibe os sinais clínicos promovidos pela IL-6, porém com a perpetuação da cronicidade lesional é mantida (Zhao et al., 2022).

Assim, acreditamos que a IL-10 reduz os sinais clínicos e alterações laboratoriais rotineiramente avaliados, no entanto mantém altas concentrações de anticorpos, proteinúria e mantendo assim, constante a lesão renal.

5. Conclusão

O envolvimento de citocinas inflamatórias na erliquiose canina na fase subclínica e aguda são diferentes. O $TNF\alpha$ e $INF-\gamma$ estão relacionados à inflamação aguda da doença, enquanto a IL-10 parece atenuar os efeitos das citocinas inflamatórias, bem como, a manifestação clínica dos pacientes, mas sem a capacidade de reduzir a proteinúria. Em ambas

as fases, tais citocinas apresentam potencial em causar proteinúria, e consequentemente levar ao quadro de lesão renal em cães infectados.

REFERÊNCIAS

- Aguiar, D.M., Cavalcante, G.T., Pinter, A., Gennari, S.M., Camargo, L.M., Labruna, M.B. (2007). Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil. *J. Med. Entomol.* 44(1), 126–132. <https://doi.org/10.1093/jmedent/41.5.126>
- Bober, L. A., Rojas-Triana, A., Jackson, J. V., Leach, M. W., Manfra, D., Narula, S. K., & Grace, M. J. (2000). Regulatory effects of interleukin-4 and interleukin-10 on human neutrophil function ex vivo and on neutrophil influx in a rat model of arthritis. *Arthritis Rheum.* 43(12), 2660–2667. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200012\)43:12<2660::AID-ANR5>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200012)43:12<2660::AID-ANR5>3.0.CO;2-4)
- Caster, D.J., Summersgill, J.T., Pauksakon, P., Massung, R.F., Shieh, W.J., McLeish, K.R. (2014). Mixed cryoglobulinemia and secondary membranoproliferative glomerulonephritis associated with ehrlichiosis. *CEN Case Reports.* 3(2), 178–182. <https://doi.org/10.1007/s13730-014-0113-6>
- Chueh, T.I., Zheng, C.M., Hou, Y.C., Lu, K.C. (2020). Novel Evidence of Acute Kidney Injury in COVID-19. *J. Clin. Med.* 9(11), 3547. <https://doi.org/10.3390/jcm9113547>
- Crivellenti, L.Z., Cintra, C.A., Maia, S.R., Silva, G.E.B., Borin-Crivellenti, S., Cianciolo, R., Adin, C.A., Tinucci-Costa, M., Pennacchi, C.S., Santana, A.E. (2021). Glomerulotubular pathology in dogs with subclinical ehrlichiosis. *PLoS ONE*, 16(12), e0260702. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260702>
- de Castro, M.B., Machado, R.Z., de Aquino, L.P., Alessi, A.C., Costa, M.T. (2004). Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. *Vet. Parasitol.* 119(1), 73–86. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.10.012>

Dumler, J.S., Barbet, A.F., Bekker, C.P., Dasch, G.A., Palmer, G.H., Ray, S.C., Rikihisa, Y., Rurangirwa, F.R. (2001). Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. *IJSEM*, 51(Pt 6), 2145–2165. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2145>

Fajgenbaum, D. C., June, C. H. (2020). Cytokine Storm. *N. Engl. J. Med.* 383(23), 2255–2273. <https://doi.org/10.1056/NEJMra2026131>

Goldstein, R.E., Brovida, C., Fernández-Del Palacio, M.J., Littman, M.P., Polzin, D.J., Zatelli, A., Cowgill, L.D. (2013). Consensus recommendations for treatment for dogs with serology positive glomerular disease. *J Vet Intern Med.* 27 Suppl 1, S60-S66. <https://doi.org/10.1111/jvim.12232>

Kalavrizioti, D., Gerolymos, M., Rodi, M., Kalliakmani, P., Provatopoulou, S., Eleftheriadis, T., Mouzaki, A., Goumenos, D. S. (2015). T helper (Th)-cytokines in the urine of patients with primary glomerulonephritis treated with immunosuppressive drugs: Can they predict outcome?. *Cytokine*, 76(2), 260–269. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.08.002>

Littman, M.P., Daminet, S., Grauer, G.F., Lees, G.E., van Dongen, A.M. (2013). Consensus recommendations for the diagnostic investigation of dogs with suspected glomerular disease. *J. Vet. Intern. Med.*, 27 Suppl 1, S19–S26. <https://doi.org/10.1111/jvim.12223>

Meisel, C., Vogt, K., Platzer, C., Randow, F., Liebenthal, C., & Volk, H. D. (1996). Differential regulation of monocytic tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 expression. *Eur. J. Immunol.* 26(7), 1580–1586. <https://doi.org/10.1002/eji.1830260726>

Nair, A.D., Cheng, C., Ganta, C.K., Sanderson, M.W., Alleman, A.R., Munderloh, U.G., Ganta, R.R. (2016). Comparative Experimental Infection Study in Dogs with Ehrlichia canis, E. chaffeensis, Anaplasma platys and A. phagocytophilum. *PLoS One*, 11(2), e0148239. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148239>

Ronco, C., Reis, T., Husain-Syed, F. (2020). Management of acute kidney injury in patients with COVID-19. *Lancet Respir Med.* 8, 738–42. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30229-0](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30229-0)

Silva, L.S., Pinho, F.A., Prianti, M.G., Braga, J.F.V., Pires, L.V., França, S.A., Silva, S.M.M.S. (2016). Renal histopathological changes in dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*. *Braz. J. Vet. Pathol.* 9(1), 2–15.

Spicer, S.T., Ha, H., Boyd, R.A., He, X.Y., Carter, N., Tran, G., Penny, M.J., Hodgkinson, S.J., Hall, B.M. (2001). Il-4 therapy prevents the development of proteinuria in active Heymann nephritis by inhibition of Tc1 cells. *J. Immunol.* 167(7), 3725–3733. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.7.3725>

Zhao, Q., Dai, H., Hu, Y., Jiang, H., Feng, Z., Liu, W., Dong, Z., Tang, X., Hou, F., Rui, H., Liu, B. (2022). Cytokines network in primary membranous nephropathy. *International Immunopharmacology*, 113(Pt A), 109412. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.10941>

ANEXO 1 - GUIDE FOR AUTHORS – VETERINARY PARASITOLOGY

Types of contribution

1. Original research papers (Regular Papers)
2. Review articles
3. Letters to the Editor
4. Book reviews

Original research papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review articles should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. They may be submitted or invited.

Letters to the Editor offering comment or useful critique on material published in the journal are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editors-in-Chief. It is hoped that the publication of such letters will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers.

Book reviews will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than 2 years old and were written in English.

Book reviews will be solicited by the Book Review Editor. Unsolicited reviews will not usually be accepted, but suggestions for appropriate books for review may be sent to one of the Book Review Editors noted below:

Dr G. Baneth

School of Veterinary Medicine,

Hewbrew University,

Rehovot,

Israel

gad.baneth@mail.huji.ac.il

Dr E. Papadopoulos

Faculty of Veterinary Medicine,

Aristotle University of Thessaloniki,

Thessaloniki,

Greece

eliaspap@vet.auth.gr

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

- We require that non-commercial product names are used throughout the text in submissions. You may include the commercial name(s) of products in the Material and Methods section, then use only the non-commercial name thereafter

For further information, visit our Support Center.

Ethics in publishing

Animal Welfare

Circumstances relating to animal experimentation must meet the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals as issued by the Council for the International Organizations of Medical Sciences. They are obtainable from the following URL: https://grants.nih.gov/grants/olaw/guiding_principles_2012.pdf. Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of Veterinary Parasitology. Please include an animal welfare statement under the heading "Animal welfare statement" at the end of the text.

Declaration of competing interest

Corresponding authors, on behalf of all the authors of a submission, must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. All authors, including those without competing interests to declare, should provide the relevant information to the corresponding author (which, where relevant, may specify they have nothing to declare). Corresponding authors should then use this tool to create a shared statement and upload to the submission system at the Attach Files step. Please do not convert the .docx template to another file type. Author signatures are not required.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including

electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify compliance, your article may be checked by Crossref Similarity Check and other originality or duplicate checking software.

Preprints

Please note that preprints can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's sharing policy. Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information).

Preprint posting on SSRN

In support of Open Science, this journal offers its authors a free preprint posting service. Preprints provide early registration and dissemination of your research, which facilitates early citations and collaboration.

During submission to Editorial Manager, you can choose to release your manuscript publicly as a preprint on the preprint server SSRN once it enters peer-review with the journal. Your choice will have no effect on the editorial process or outcome with the journal. Please note that the corresponding author is expected to seek approval from all co-authors before agreeing to release the manuscript publicly on SSRN.

You will be notified via email when your preprint is posted online and a Digital Object Identifier (DOI) is assigned. Your preprint will remain globally available free to read whether the journal accepts or rejects your manuscript.

For more information about posting to SSRN, please consult the SSRN Terms of Use and FAQs.

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural

assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. When coding terminology is used, we recommend to avoid offensive or exclusionary terms such as "master", "slave", "blacklist" and "whitelist". We suggest using alternatives that are more appropriate and (self-) explanatory such as "primary", "secondary", "blocklist" and "allowlist". These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Reporting sex- and gender-based analyses

Reporting guidance

For research involving or pertaining to humans, animals or eukaryotic cells, investigators should integrate sex and gender-based analyses (SGBA) into their research design according to funder/sponsor requirements and best practices within a field. Authors should address the sex and/or gender dimensions of their research in their article. In cases where they cannot, they should discuss this as a limitation to their research's generalizability. Importantly, authors should explicitly state what definitions of sex and/or gender they are applying to enhance the precision, rigor and reproducibility of their research and to avoid ambiguity or conflation of terms and the constructs to which they refer (see Definitions section below). Authors can refer to the Sex and Gender Equity in Research (SAGER) guidelines and the SAGER guidelines checklist. These offer systematic approaches to the use and editorial review of sex and gender information in study design, data analysis, outcome reporting and research interpretation - however, please note there is no single, universally agreed-upon set of guidelines for defining sex and gender.

Definitions

Sex generally refers to a set of biological attributes that are associated with physical and physiological features (e.g., chromosomal genotype, hormonal levels, internal and external anatomy). A binary sex categorization (male/female) is usually designated at birth ("sex assigned at birth"), most often based solely on the visible external anatomy of a newborn. Gender generally refers to socially constructed roles, behaviors, and identities of women, men and gender-diverse people that occur in a historical and cultural context and may vary across societies and over time. Gender influences how people view themselves and each other, how

they behave and interact and how power is distributed in society. Sex and gender are often incorrectly portrayed as binary (female/male or woman/man) and unchanging whereas these constructs actually exist along a spectrum and include additional sex categorizations and gender identities such as people who are intersex/have differences of sex development (DSD) or identify as non-binary. Moreover, the terms "sex" and "gender" can be ambiguous—thus it is important for authors to define the manner in which they are used. In addition to this definition guidance and the SAGER guidelines, the resources on this page offer further insight around sex and gender in research studies.

Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. More details and an example.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the corresponding author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript has been accepted. While the Editor considers

the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal uses the Elsevier Article Transfer Service to find the best home for your manuscript. This means that if an editor feels your manuscript is more suitable for an alternative journal, you might be asked to consider transferring the manuscript to such a journal. The recommendation might be provided by a Journal Editor, a dedicated Scientific Managing Editor, a tool assisted recommendation, or a combination. If you agree, your manuscript will be transferred, though you will have the opportunity to make changes to the manuscript before the submission is complete. Please note that your manuscript will be independently reviewed by the new journal. More information.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement, it is recommended to state this.

Open access

Please visit our Open Access page for more information.

Elsevier Researcher Academy

Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's Author Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

A cover letter is required for each new submission. It should address the novelty and significance of the work and how it fits within the defined scope of Veterinary Parasitology. Essential information, issues of concern or potential problems, (such as other publications or submissions containing similar information) should be identified in the cover letter. Authors who submit papers based on local data/surveys will need to indicate why their paper is relevant to a broader readership.

Authors are invited to suggest the names of up to 5 referees (with email addresses) whom they feel are qualified to evaluate their submission. Submission of such names does not, however, imply that they will definitely be used as referees.

For queries concerning the submission process or journal procedures please visit the Elsevier Support Center. Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

Authors submitting hard copy papers will be asked to resubmit using Elsevier Editorial System.

Submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of the article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the Publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information.

Article Transfer Service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. More information about this can be found here: <https://www.elsevier.com/authors/article-transfer-service>.

Submit your article

Please submit your article via <https://www.editorialmanager.com/VETPAR/default.aspx>.

Queries

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our Support Center.

Peer review

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the

paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. More information on types of peer review.

If at all possible please refrain from sending chasers to the Editorial Office asking about the status of your paper under review, as the Editors aim to review your paper as efficiently as possible and the enquiry is unlikely to speed up the process.

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Manuscripts should have numbered lines with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the manuscript should be numbered. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

Manuscripts in general should be organized in the following order:

Title (should be clear, descriptive and not too long)

Name(s) of author(s)

Complete postal address(es) of affiliations

Full telephone, Fax No. and e-mail address of the corresponding author

Present address(es) of author(s) if applicable

Complete correspondence address including e-mail address to which the proofs should be sent

Abstract

Keywords (indexing terms), normally 3-6 items. Please refer to last index (Vol. 100/3-4).

Introduction

Material studied, area descriptions, methods, techniques

Results

Discussion

Conclusion

Acknowledgments and any additional information concerning research grants, etc.

References

Tables

Figure captions

Tables (separate file(s))

Figures (separate file(s)).

Titles and subtitles should not be run within the text. They should be typed on a separate line, without indentation. Use lower-case letter type.

SI units should be used.

Elsevier reserves the privilege of returning to the author for revision accepted manuscripts and illustrations which are not in the proper form given in this guide.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering).

Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon

abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The abstract should be clear, descriptive and not more than 400 words.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531×1328 pixels (h \times w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5×13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site.

Formulae

1. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.
2. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.
3. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.
4. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Powers of e are often more conveniently denoted by exp.
5. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca^{2+} , not as Ca^{++} .
6. Isotope numbers should precede the symbols e.g. ^{18}O .
7. The repeated use of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P_2O_5).

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the International Code of Botanical Nomenclature, the

International Code of Nomenclature of Bacteria, and the International Code of Zoological Nomenclature.

2. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.
3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.
4. For chemical nomenclature, the conventions of the International Union of Pure and Applied Chemistry and the official recommendations of the IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature should be followed.
5. For the denomination of parasitic diseases or infections, authors are advised to consult the Standardized Nomenclature of Animal Parasitic Diseases (SNOAPAD) published in 1988 in *Veterinary Parasitology* (Kassai, T. et al., 1988. *Vet. Parasitol.* 29, 299-326).

Submission of sequence data to databases

New nucleotide or amino acid sequence data must be deposited in publicly accessible databases, such as GenBank™, EMBL or DDJB, and an accession number obtained and submitted to the Publisher (at the latest) together with the final, revised manuscript. The accession number should appear in a separate paragraph in the Materials and Methods section (example: Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the GenBank™, EMBL and DDBJ databases under the accession numbers: **XXXX, XXXX**). In order for automatic links to be made between papers and databases, authors should type the accession number in bold, underlined text. Letters in the accession number should always be capitalised. When published they will appear in normal type.

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to <https://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.

2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.
3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.
4. Each table should occupy a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.
5. Each table should have a brief and self-explanatory title.
6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.
7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.
8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where

available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Preprint references

Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, the formal publication should be used as the reference. If there are preprints that are central to your work or that cover crucial developments in the topic, but are not yet formally published, these may be referenced. Preprints should be clearly marked as such, for example by including the word preprint, or the name of the preprint server, as part of the reference. The preprint DOI should also be provided.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software.

Reference Style

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.
2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed – if necessary – by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that..." "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989, pp. 12–16)".
3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never

be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.

4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on author's names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates – publications of the same author with one co-author – publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1974a, 1974b, etc.

5. Use the following system for arranging your references:

a. For periodicals

Lanusse, C.E., Prichard, R.K., 1993. Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. *Vet. Parasitol.* 49, 123–158.

b. For edited symposia, special issues, etc., published in a periodical

Weatherley, A.J., Hong, C., Harris, T.J., Smith, D.G., Hammet, N.C., 1993. Persistent efficacy of doramectin against experimental nematode infections in calves. In: Vercruysse, J. (Ed.), *Doramectin – a novel avermectin*. *Vet. Parasitol.* 49, 45–50.

c. For books

Blaha, T. (Ed.), 1989. *Applied Veterinary Epidemiology*. Elsevier, Amsterdam, 344 pp.

d. For multi-author books

Wilson, M.B., Nakane, P.K., 1978. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: Knapp, W., Holubar, K., Wick, G. (Eds.), *Immunofluorescence and Related Staining Techniques*. North Holland, Amsterdam, pp. 215–224.

6. Abbreviate the titles of periodicals mentioned in the list of references in accordance with BIOSIS Serial Sources, published annually by BIOSIS. The correct abbreviation for this journal is *Vet. Parasitol.*

7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.

8. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".
9. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.
10. Web references may be given. As a minimum, the full URL is necessary. Any further information, such as Author names, dates, reference to a source publication and so on, should also be given.
11. Articles available online but without volume and page numbers may be referred to by means of their Digital Object identifier (DOI) code.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions here to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research

data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project. Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page.

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Research Elements

This journal enables you to publish research objects related to your original research – such as data, methods, protocols, software and hardware – as an additional paper in Research Elements. Research Elements is a suite of peer-reviewed, open access journals which make your research objects findable, accessible and reusable. Articles place research objects into context by providing detailed descriptions of objects and their application, and linking to the associated original research articles. Research Elements articles can be prepared by you, or by one of your collaborators.

During submission, you will be alerted to the opportunity to prepare and submit a Research Elements article.

More information can be found on the Research Elements page.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.