

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**AÇÃO DA DOXICICLINA E *Artemisia annua* L. EM
CULTURA DE CÉLULAS DH82 INFECTADAS COM
Ehrlichia canis: ESTUDO ULTRAESTRUTURAL**

Fernanda Ferreira Genaro

Médica Veterinária

Uberlândia - Minas Gerais - Brasil
2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**AÇÃO DA DOXICICLINA E *Artemisia annua* L. EM
CULTURA DE CÉLULAS DH82 INFECTADAS COM
Ehrlichia canis: ESTUDO ULTRAESTRUTURAL**

**Fernanda Ferreira Genaro
Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária - UFU, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias (Saúde animal).

**UBERLÂNDIA – MG
Dezembro de 2009**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

G324a Genaro, Fernanda Ferreira, 1980-
Ação da doxiciclina e *Artemisia annua* L. em cultura de células
DH82 infectadas com *Ehrlichia canis* [manuscrito] : estudo ultraestrutural
/ Fernanda Ferreira Genaro. - 2009.
91 f. : il.

Orientador: Marcelo Emílio Beletti.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Inclui bibliografia.
1. Erliquiose - Tratamento - Teses. 2. Artemisia - Teses. 3. Doxiciclina
- Teses. I. Beletti, Marcelo Emílio. II. Universidade Federal
de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
III. Título.

CDU: 616.98-08:579.881.3

Dedicatória

Este trabalho é dedicado à minha mãe Marlene, que mesmo não estando mais presente, me deixou os ensinamentos de amor, honestidade e força, sem os quais não teria chegado até aqui.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Sebastião e Marlene (*in memorian*), aos meus irmãos Gino e Marco, ao meu esposo Cassiano, ao meu sobrinho Arthur e aos meus animais de estimação Mingau, Tituquinha, Jimmy, Nala e Sandy, partes de mim e que me apoiaram muito nos momentos difíceis.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti, que apesar dos inúmeros contra-tempos se mostrou sempre disponível em ajudar e ensinar.

Ao técnico Marcelo A. Levenhagen do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Ciências Biomédicas e alunas da pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicada: Rosiane Nascimento, Susana Elisa Reick e Juliana Martins, pessoas essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao coordenador do curso de pós-graduação em Medicina Veterinária Prof. Dr. André Luiz Quagliatto Santos pela compreensão diante dos imprevistos.

Ao Prof. Dr. Antônio Vicenti Mundim grande incentivador a pesquisa, que desde a residência até os dias de hoje vem me ajudando, tanto na área acadêmica quanto profissional.

Ao Prof. Dr. José Roberto Mineo e à pós-graduanda Cristina Carmo Rostkowska por terem participado do projeto, cedendo o extrato de *Artemisia annua* L.

À colega Sirlei Manzan pela ajuda durante todo o período da pós-graduação, como profissional e como amiga.

SUMÁRIO

	Páginas
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
I- INTRODUÇÃO.....	1
II- REVISÃO DE LITERATURA.....	2
II.1- Agente etiológico.....	2
II.2- Vias de transmissão.....	4
II.2.1-Vetores.....	4
II.2.2- Transfusão sanguínea e fomentos.....	5
II.3-Patogenia e sinais clínicos.....	6
II.4-Diagnóstico.....	8
II.5- Ocorrência.....	11
II.6- Tratamento.....	13
II.7- Prognóstico e prevenção.....	16
III- MATERIAL E MÉTODO.....	17
III.1- Cultura de células.....	17
III.2- Parasito.....	17
III.3- Doxíciclina.....	18
III.4- <i>Artemisia annua</i> L.....	18
III.5- Protocolo dos medicamentos.....	19
III.6- Microscopia eletrônica.....	20
III.7- Local de execução.....	21
IV- RESULTADOS.....	21
IV.1- Controle.....	21
IV.2-Doxíciclina - 2 horas.....	33
IV.3- Doxíciclina - 24 horas.....	44
IV.4- <i>Artemisia annua</i> L. - 2 horas.....	55
IV.5- <i>Artemisia annua</i> L. - 24 horas.....	64
V- DISCUSSÃO.....	69
V.1- Controle.....	69
V.2-Doxíciclina - 2 horas.....	70
V.3- Doxíciclina - 24 horas.....	71
V.4- <i>Artemisia annua</i> L. - 2 horas.....	72
V.5- <i>Artemisia annua</i> L. - 24 horas.....	73
VI- CONCLUSÕES.....	73
VII- REFERÊNCIAS.....	74

AÇÃO DA DOXICICLINA E *Artemisia annua* L. EM CULTURA DE CÉLULAS DH82 INFECTADAS COM *Ehrlichia canis*: ESTUDO ULTRAESTRUTURAL

RESUMO – O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da infusão da planta *Artemisia annua* L. em cultura de *Ehrlichia canis* em células DH82, avaliando as alterações ultraestruturais deste tratamento em comparação ao tratamento convencional com doxiciclina, buscando uma alternativa eficaz para animais que não podem ser tratados com tetraciclina e seus derivados, além de custos mais acessíveis para o proprietário. Neste experimento foram utilizadas culturas de células DH82 infectadas com *Ehrlichia canis*, avaliadas duas e 24 horas após a adição da substância testada, distribuídas da seguinte forma: grupo controle; grupo doxiciclina e grupo *Artemisia annua* L. Após os tratamentos as células da cultura foram retiradas das garrafas por tripsinização e os “pellets” formados pelo processo de centrifugação, preparados para avaliação ultraestrutural, em microscopia eletrônica de transmissão. À avaliação do material pode-se notar que a *Artemisia annua* L. possuiu atividade anti-erlíquia, mas a Doxiciclina foi mais eficiente que esta. Sendo que as duas drogas se mostraram levemente tóxicas para células DH82.

Palavras-chave: artemisinina; cultura de células; erliquiose; microscopia eletrônica de transmissão; tetraciclina

EFFECT OF THE DOXYCYCLINE E *Artemisia annua* L. IN DH82 CELLS CULTURE INFECTED BY *Ehrlichia canis*: AN ULTRASTRUCTURAL STUDY

ABSTRACT - The goal of this job was to evaluate the effect of the infusion of *Artemisia annua* L. plant in culture of *Ehrlichia canis* in DH82 cells, analyzing the ultra-structural alterations of this treatment against the canonical treatment with Doxycycline, seeking an efficient alternative for animals that cannot be treated with tetracycline and its products, furthermore to present more affordable to the animal owners. In this experiment it was utilized cultures of DH82 cells infected with *Ehrlichia canis*, evaluated two and twenty four hours after addition of analyzed substance, distributed as follows: Control group, Doxycycline group and *Artemisia annua* L. group. After treatments the cell cultures were removed from the bottles by means of "trypsinization" and the pellets produced by the centrifugation process, prepared to ultrastructural evaluation by transmission electron microscopy. The evaluation of the material shows that the *Artemisia annua* L. has anti-ehrlichiose activity; however, the Doxycycline has shown more efficiency than that one, while both drugs showed to be slightly toxic for DH82 cells.

Key-words: Artemisinin; cell culture; Ehrlichiosis; tetracycline; transmission electron microscopy

I-INTRODUÇÃO

Cães são animais domésticos que convivem intimamente conosco, seres humanos. Esta relação estreita exige cuidados com estes animais, tanto para preservar a saúde destes como visando à saúde pública. Neste contexto, algumas observações recentes sobre carrapatos de cães e doenças por eles transmitidas suscitam uma atenção especial e necessidade de uma investigação mais profunda.

A Erliquiose Monocítica Canina (EMC), também denominada Pancitopenia Tropical Canina, Trombocitopenia Cíclica Infecciosa Canina, Doença do Cão Rastreador, Febre Hemorrágica Canina e Tifo Canino, é uma patologia relativamente comum em várias espécies de animais domésticos e recentemente foi confirmada como uma importante zoonose. Seu agente etiológico, do gênero *Ehrlichia*, com destaque para a espécie *Ehrlichia canis*, é um dos bioagentes de grande importância transmitidos por carrapatos de cães (MACHADO, 2006).

A erliquiose é uma doença relativamente comum nos cães do município de Uberlândia, Minas Gerais (WALDEMARIN et al., 2003) e apesar de ser uma patologia rotineira, muitos aspectos acerca desta ainda são pouco conhecidos.

Um desses aspectos é com relação ao tratamento da doença, que tem como antibióticos de eleição as tetraciclinas, em especial a tetraciclina semi-sintética doxiciclina. Não existe uma alternativa clara de tratamento para crianças (filhotes), mulheres grávidas (cadela gestantes), ou indivíduos alérgicos, onde as tetraciclinas são contra-indicadas (KLEIN et al., 1997).

Produtos derivados da planta *Artemisia annua* L. são frequentemente utilizados como método alternativo no tratamento da malária em humanos (RIDDER et al., 2008) e têm demonstrado alguma capacidade de inibir a replicação de outros organismos intracelulares, como por exemplo *Toxoplasma gondii* (JONES-BRANDO et al., 2006; D'ANGELO et al., 2009). Assim, estes produtos poderiam compor uma alternativa de tratamento para erliquiose canina, caso comprovada sua ação sobre *Ehrlichia canis*.

Buscando atender esta parcela de animais que não podem usar as tetraciclinas e propor uma alternativa mais barata e eficaz para o tratamento da erliquiose canina, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da infusão da

planta *Artemisia annua* L em cultura de *Ehrlichia canis* em células DH82, avaliando as alterações ultra-estruturais deste tratamento em comparação ao tratamento convencional com doxiciclina.

II- REVISÃO DE LITERATURA

II.1- Agente etiológico (*Ehrlichia* sp.)

O agente etiológico da EMC pertence ao gênero *Ehrlichia*, que é formado por bactérias gram-negativas pertencentes à família *Anaplasmataceae*, sendo elas parasitas intracelulares obrigatórios que infectam os leucócitos e as plaquetas do hospedeiro (ANDEREG e PASSOS, 1999; AUTRAN DE MORAIS et al., 2004).

A Erliquiose foi descrita pela primeira vez em cães na África, especificamente na Argélia, em 1935. No Brasil a doença foi diagnosticada pela primeira vez por Costa em Belo Horizonte, em 1973, e, posteriormente, em Curitiba por Kavinski, em 1988 (COUTO, 1998; ORIÁ et al., 2004).

Várias espécies de *Ehrlichia* podem parasitar o cão, como a *Ehrlichia canis* (cepa mononuclear), a *Ehrlichia equi* (cepa neutrofílica e agente da erliquiose granulocitotrópica eqüina), a *Ehrlichia platys* (cepa plaquetária) e a *Ehrlichia chaffeensis* (agente causador da erliquiose monocítica humana). Experimentalmente, a inoculação de *Ehrlichia risticii*, o agente da febre eqüina de Potomac, induziu doença leve ou subclínica em cães e gatos (ANDEREG; PASSOS, 1999). Manna e colaboradores (2004), descreveram a primeira caracterização molecular de uma cepa de *E. equi* isolada, em um cão no sul da Itália, apresentando claudicação aguda do membro anterior direito, disorexia, leucocitose, trombocitopenia e anemia.

Ehrlichia tem sido usado comumente para se referir a várias espécies da família *Anaplasmataceae*, que incluem o gênero *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Wolbachia* e *Neorickettsia*. Estudos moleculares levaram ao reconhecimento do gênero *Ehrlichia*, que incluem *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. (Cowdria) ruminatum*, e *E. muris*. O *Anaplasma phagocytophilum* foi formado pela combinação de *E. phagocytophila* e

E. equi no gênero com *A. marginale* e *A.* (formalmente *Ehrlichia*) *platys*. No gênero *Neorickettsia*, *N.* (formalmente *Ehrlichia*) *risticii* e *N.* (formalmente *Ehrlichia*) *sennetu* formaram a *N. helminthoeca* (WALKER, 2006).

Em 2001, Dumler et al. relataram que bactérias dos gêneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Cowdria*, *Neorickettsia* foram previamente classificadas na posição taxonômica baseadas em características morfológicas, ecológicas, epidemiológicas e clínicas, todavia, recentes análise genéticas dos genes 16S rRNA, genes da proteína de choque térmico *groESL* e genes de proteínas de superfície têm indicado que as designações taxonômicas existentes apresentavam falhas. Todas as seqüências dos genes 16S rRNA e *groESL* depositadas no “GenBank”¹ antes de 2000 e seqüências selecionadas depois disso foram alinhadas e árvores filogenéticas foram construídas. Os autores propuseram então, que todos os membros da tribo *Ehrlichieae* e *Wolbachieae* fossem transferidos para a família Anaplasmataceae e que a estrutura da tribo da família Rickettsiaceae fosse eliminada. O gênero *Anaplasma* deveria abranger também *Anaplasma* (*Ehrlichia*) *phagocytophila*, *Ehrlichia equi* e o agente HGE, *Anaplasma* (*Ehrlichia*) *bovis* e *Anaplasma* (*Ehrlichia*) *platys*; o gênero *Ehrlichia* deveria incluir *Ehrlichia* (*Cowdria*) *ruminantium* e o gênero *Neorickettsia*, incluiria também *Neorickettsia* (*Ehrlichia*) *sennetsu* e *Neorickettsia* (*Ehrlichia*) *risticii*.

Estas alterações propostas por Dumler et al. (2001) foram homologadas e corrigidas em 2002². A espécie *Anaplasma phagocytophila* teve seu nome corrigido para *Anaplasma phagocytophilum* (combinação de *Ehrlichia phagocytophyla*, *Ehrlichia equi* e HGE). Na mesma lista de notificação, o corpo editorial observou que tanto a espécie *Anaplasma bovis*, quanto *Anaplasma platys*, que foram propostas como novas combinações, seriam novas espécies, pois seus respectivos basônimos *Ehrlichia bovis* e *Ehrlichia platys* não possuíam suporte na nomenclatura, sendo acrescentado o complemento sp. nov. (MACIEIRA, 2003).

Dagnone (2006) relatou que em 2004, Uilenberg e colaboradores descreveram que freqüentemente seqüências gênicas de pequenas porções do genoma são utilizadas para mudanças taxonômicas prematuras, negligenciando a

¹ www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=nucleotide

² LIST EDITOR: Notification list: Notification that new names and new combinations have appeared in volume 51, part 6, of the IJSEM. IJSEM, v. 52. p. 5-6, 2002

taxonomia polifásica, a qual deveria também analisar características fenotípicas. Mencionaram também que deste modo, recentes modificações de membros da família Anaplasmataceae propostas por Dumler et al. (2001), deveriam ser analisadas com precaução, uma vez que algumas diversidades em outras seqüências poderiam não justificar tais reclassificações, devendo-se realizar uma abordagem cautelosa e balanceada para a taxonomia, levando-se em consideração informações genotípicas moleculares, a mais extensa possível, para diferentes genes, como também, para características fenotípicas.

II.2- Vias de Transmissão

II.2.1- Vetores

Os carrapatos são artrópodes pertencentes à ordem *Acari*, dentro da classe *Arachnida*. No mundo estão descritas 867 espécies de carrapatos, divididas em três famílias que são a *Ixodidae* (683 espécies), a *Argasidae* (183 espécies) e a *Nutallialidae* (1 espécie) (LABRUNA apud GUIMARÃES et al., 2004). Eles são ectoparasitos obrigatórios e o hábito hematofágico dos mesmos os transforma em vetores de vários agentes infecciosos, como protozoários, vírus e bactérias, tanto para humanos como para animais (CUPP, 1991).

Dentre as várias enfermidades infecciosas transmitidas por carrapatos ao homem e animais, nos diversos continentes, incluem-se algumas de extrema importância, como a borreliose de Lyme, a febre maculosa, encefalites virais, a erliquiose, a anaplasmoze, a babesiose e a teileriose (ESTRADA-PEÑA; JONGEJAN, 1999; JONGEJAN; UILENBERG, 2004). Considerando a longevidade excepcional destes acarinos, os mesmos se tornam não apenas vetores, mas com frequência também, reservatórios de agentes infecciosos (LABUDA; NUTTALL, 2004).

A fauna brasileira de carrapatos contemporânea possui aproximadamente 61 espécies descritas (BARROS-BATTESTI et al., 2006). Embora informações sobre a maioria das espécies sejam escassas, algumas estão associadas a malefícios consideráveis. Mais recentemente o aparecimento ou reemergência de doenças transmitidas por carrapatos a humanos, particularmente a erliquiose e riquetsioses,

se tornou motivo de preocupação adicional com a saúde pública (TELFORD III ; GOETHERT, 2004).

O *Rhipicephalus sanguineus* é o vetor da erliquiose canina. Possui hábitos nidículas, termo de origem latina que significa: nidi (nidus=ninho); cola (cola=que habita). Portanto, carrapato nidícula é aquele que vive no ninho, toca ou abrigo de seu hospedeiro e, quando não está em parasitismo, encontra-se sob a forma de vida livre no ambiente onde vive o cão (LABRUNA et al., 2001). Ele se infecta ao ingerir sangue com leucócitos parasitados de animais doentes. Isto geralmente ocorre na segunda ou terceira semana de infecção no cão, pois é a fase aguda da doença, onde existe uma maior porcentagem de leucócitos infectados. No *R. sanguineus*, a *E. canis* multiplica-se nas hemácias da glândula salivar (LEGATZKI; JORGE, 2002). Segundo Swango e colaboradores (1992), os microorganismos podem persistir nos carrapatos por mais de cinco meses. Semelhantemente, Rikihisa (1991) relatou que o carrapato adulto pode transmitir *E. canis* no máximo por 155 dias após ter sido infectado.

A literatura brasileira descreve que foram encontrados exemplares das espécies *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma aureolatum* e *Amblyomma brasiliensis* naturalmente infectados pela *Rickettsia rickettsii*, retirados de cães do meio rural. Embora estudos futuros devam esclarecer tais fatos, deve-se considerar a possibilidade de que os cães do meio rural, constantemente expostos aos carrapatos do gênero *Amblyomma* e muitas vezes atendidos em clínicas veterinárias com um provável quadro de erliquiose, possam estar apresentando na verdade, o quadro clínico de febre maculosa (PEREIRA; LABRUNA, 1998). Também foi demonstrado que o *Amblyomma americanum* e o *Otobius megnini* são vetores em potencial da erliquiose canina (ANDEREG; PASSOS, 1999).

II.2.2- Transfusão sangüínea e fomentos

Outra forma de transmissão da doença é a transfusão sanguínea de um cão infectado para um cão suscetível, ou utilização de material que contenha sangue de animal infectado. A transmissão através de transfusão sanguínea proveniente de

cães cronicamente infectados há mais de cinco anos é descrita por Swango e colaboradores (1992).

II.3- Patogenia e sinais clínicos

O microorganismo da EMC replica-se nas células mononucleares, principalmente no sistema fagocítico mononuclear nos linfonodos, baço e medula óssea, resultando em hiperplasia dessa linhagem celular e organomegalia (linfadenopatia, esplenomegalia e hepatomegalia). A trombocitopenia decorrente da destruição periférica de plaquetas, acompanhada ou não de anemia e leucopenia (ou leucocitose) é comum durante esta fase (SWANGO et al., 1992).

O ciclo de desenvolvimento de *E. canis* em monócitos caninos tem três estágios que podem ser observados microscopicamente. No primeiro os corpos elementares adentram nos monócitos por fagocitose (NYNDO et al., 1971; DAVOUST, 1993; RISTIC; HOLAND, 1993). Segundo Nyndo et al. (1971) a fusão fagolisossomal não ocorre em células infectadas, permitindo aos corpos elementares crescerem e se dividirem dentro dos limites do fagossomo, onde a multiplicação ocorre por divisão binária. Conforme Davoust (1993) a primeira fase do ciclo é caracterizada pela penetração no monócito do corpo elementar, que se multiplica até atingir um tamanho de 0,2 a 0,6 μm , fase que dura dois dias, já para Ristic e Holand (1993) o primeiro estágio é representado por corpos elementares um pouco menores, com 0,2 a 0,4 μm de diâmetro.

Em um segundo estágio, do terceiro ao quinto dia pós-infecção um pequeno número de corpos elementares em agrupamentos de 1 a 2 μm de diâmetro, denominados corpúsculos iniciais são observados como inclusões pleomórficas (RISTIC; HOLAND, 1993). Para Davoust (1993) o corpo inicial é um amontoado de corpos elementares acoplados com tamanho que varia de 0,4 a 2 μm , todavia Ristic e Holand (1993) descreveram que os corpos iniciais são pouco maiores (0,5 a 4 μm de diâmetro).

E finalmente, no terceiro estágio, entre o sétimo e o décimo segundo dia subsequente, ocorrem crescimento adicional e multiplicações e os corpúsculos iniciais dão vida à mórula; uma aglomeração de corpos elementares, que na microscopia óptica têm aspecto de “amora” que tipifica o gênero (NYNDO et al., 1971). Segundo Ristic e Holand (1993) as mórulas são corpos de inclusão maiores inalteráveis (4 a 6 μm de diâmetro). Muitas mórulas podem coexistir em um monócito e cada mórula contém vários corpos elementares. Depois de 3 ou 4 dias, as mórulas são separadas do citoplasma pelos vacúolos e os corpos elementares são liberados pela ruptura do monócito, ou então são liberadas por exocitose e o ciclo infeccioso é repetido (NYNDO et al., 1971; DAVOUST, 1993).

A EMC é caracterizada por três fases: aguda, subclínica e crônica, e se desenvolve após um período de incubação de 8 a 20 dias (ANDEREG; PASSOS, 1999). Os sinais clínicos mais freqüentes na fase aguda são apatia, anorexia, depressão, febre, perda de peso, cianose, estertores pulmonares, equimoses e vômitos. Todas essas alterações levam a um aumento dos níveis plasmáticos de alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, de proteína c-reativa (CRP) e de alfa-1-ácido glicoproteínas (AAG), sendo que a pesquisa dos níveis de CRP e AAG auxilia na avaliação da gravidade dos danos inflamatórios do fígado (ANDEREG; PASSOS, 1999).

A fase subclínica instala-se quando o cão sobrevive à fase aguda. Esta fase está associada à persistência da *E. canis* no hospedeiro, demonstrada através da PCR e de altos níveis de anticorpos no soro, sugerindo uma constante estimulação do sistema imune por antígenos, e dura aproximadamente de 6 a 9 semanas, progredindo para a fase crônica (ANDEREG; PASSOS, 1999). Couto (1998) considera que os animais na fase subclínica ficam assintomáticos, apresentando apenas alterações hematológicas e bioquímicas suaves. Casos de glomerulonefrite foram também descritos nesta fase. Em alguns casos observam-se complicações como depressão, agravamento da perda de peso, mucosas pálidas, hemorragias, infecções secundárias e edema nos membros. Alterações neurológicas como ataxia, disfunção motora, hiperestesia localizada e tremores são provavelmente causados por infiltração celular ou devido a hemorragias nas meninges, no parênquima cerebral ou na medula espinhal (COUTO, 1998 e SWANGO, et al., 1992).

Couto (1998) descreveu que os sinais da fase crônica podem ser: perda de peso, pirexia, sangramento espontâneo, palidez devido à anemia, linfadenopatia generalizada, hepatoesplenomegalia, uveíte anterior ou posterior, sinais neurológicos causados por meningoencefalomielite e edema intermitente de membros. A erliquiose crônica ocorre em cães que não conseguem eliminar o agente. Ocorre ainda hipergamaglobulinemia pela persistente estimulação antigênica, sendo sugestiva de resposta imune mediada por células (SWANGO et al., 1992).

Os sintomas clínicos na fase crônica são reflexos das alterações fisiopatológicas resultantes da grave anemia e da infiltração perivascular de muitos sistemas orgânicos com células linforeticulares e plasmócitos (SWANGO et al., 1992). Couto (1998) alerta que os sinais clínicos, os sintomas e as anormalidades laboratoriais nos cães com erliquiose crônica podem lembrar um mieloma múltiplo ou leucemia linfocítica crônica. Sinais clínicos de uveíte são encontrados em cães com erliquiose em qualquer fase da doença (ORIÁ et al., 2004).

As anormalidades hematológicas e bioquímicas na fase crônica são geralmente acentuadas e incluem mono, bi ou pancitopenia devido à hipoplasia da medula óssea, plasmocitose, linfocitose ocasionalmente composta de grandes linfócitos granulares, hiperglobulinemia causada por gamopatia policlonal (ou, menos freqüentemente, monoclonal), hipoalbuminemia e proteinúria (COUTO, 1998).

Harrus e colaboradores (2001), pesquisaram a presença de imunocomplexos no soro de cães naturalmente e experimentalmente infectados por *Ehrlichia canis*. Observaram imunocomplexos circulantes em 2 dos 10 cães naturalmente infectados e em 2 dos experimentalmente infectados, sugerindo que a enfermidade possa ser mediada por imunocomplexos.

II.4- Diagnóstico

O diagnóstico da EMC tem aumentado devido ao maior conhecimento sobre a doença, a expansão geográfica de sua ocorrência e a melhoria das técnicas de

diagnóstico. O prognóstico dos animais com erliquiose é melhor nos estágios iniciais da infecção. Testes mais sensíveis oferecem maior eficiência à pesquisa e identificação de animais portadores (ANDEREG; PASSOS, 1999).

Um diagnóstico presuntivo da doença pode ser feito geralmente com base na história e sintomas clínicos. Trombocitopenia e anemia não regenerativa são os achados hematológicos mais freqüentes, tanto nos casos agudos, como nos casos crônicos. A anemia pode ser regenerativa, quando há infecção concomitante com *Babesia canis*. Pancitopenia e hipoplasia da medula óssea são geralmente encontradas nos casos crônicos (SWANGO et al., 1992).

Na fase aguda da doença ocorre a inclusão citoplasmática da *Ehrlichia*, formando a mórula, que normalmente é identificada em pequena porcentagem de leucócitos e por um curto período (BOUNOUS et al., 1990). Desta forma pode-se visualizar o agente em esfregaços de sangue total e periférico. As mórulas coram-se em púrpura-azulada com coloração de Giemsa e são encontradas transitoriamente e em pequenos números na fase precoce da infecção. A identificação do microorganismo na citologia por aspiração com agulha fina do baço, dos linfonodos e dos pulmões é possível, mas extremamente improvável. Encontra-se freqüentemente presente plasmocitose nestas amostras citológicas (COUTO, 1998).

O diagnóstico pode ser feito por métodos indiretos através de pesquisa de anticorpos. Na técnica de imunofluorescência indireta (IFI), anticorpos anti-*E. canis* podem ser detectados entre 2 e 3 semanas após a infecção e se elevam a níveis máximos por volta dos três meses após a infecção (SWANGO et al., 1992). Embora a IFI seja considerada como “padrão ouro”, pode aparecer reação cruzada entre outras espécies de *Ehrlichia* (WANER et al., 2001).

Outra opção diagnóstica é o teste de *Western Immunoblotting*, que é quase tão sensível quanto a IFI, mas tem a grande vantagem da objetividade da leitura, pois não sofre influência da subjetividade do operador, como ocorre na IFI. Trata-se, porém, de uma técnica cara, que consome mais tempo e necessita de uma tecnologia mais avançada que a IFI (ANDEREG; PASSOS, 1999).

Waner e colaboradores (1995), realizaram um estudo utilizando o método de ELISA tipo sanduíche ou de captura para o diagnóstico. O ELISA apresenta como vantagem a alta sensibilidade, além de ter custo relativamente baixo. Essas

qualidades fazem com que seja um ensaio amplamente empregado na detecção de antígenos e anticorpos, bem como na quantificação de anticorpos produzidos em diversas doenças bacterianas, fúngicas e virais, humanas ou veterinárias (MADRUGA et al., 2001).

O dot-ELISA é um ensaio de imunoadsorção enzimático desenvolvido em fase sólida. A principal vantagem desse tipo de teste é a rapidez na obtenção de resultados e sua simplicidade, não demandando equipamentos sofisticados na sua execução (MADRUGA et al., 2001). O dot-blot ELISA foi empregado por ANDEREG e PASSOS (1999), demonstrando ser uma técnica sensível para a detecção de anticorpos no soro e dispensa o emprego de equipamentos caros.

Kits comerciais para o diagnóstico da erliquiose canina, como o Immunocomb®-BIOGAL, se baseiam no princípio do dot-blot-Elisa, capaz de determinar anticorpos IgG específicos para o parasito (ANDEREG; PASSOS, 1999). Outros testes rápidos de “dot-Elisa” realizados na clínica (como o Snap 3DX e o Dip-S-Ticks), são práticos e de baixo custo, e tendem a tornar-se o exame de rotina para o diagnóstico de erliquiose (AUTRAN de MORAES et al., 2004).

Outro método de diagnóstico é a reação em cadeia da polimerase (PCR), que é uma amplificação enzimática de uma sequência específica de DNA, visando à produção de milhões de cópias desta sequência em um tubo de ensaio. Ela possibilita uma nova estratégia na análise de genes por meio de um método simples e rápido de amplificação de seqüências, dispensando todas as trabalhosas etapas da clonagem gênica (FARAH, 2000). A técnica de PCR é efetiva na detecção de *E. canis* e outras espécies de erliquia. A erliquiose canina causada por *E. canis* pode ser detectada mais precocemente por PCR do que por outros métodos diagnósticos, sendo uma técnica que pode ajudar na diferenciação entre *E. platys* e demais agentes que infectam plaquetas. Para ser empregada no diagnóstico de animais suspeitos de determinada parasitose, deve-se aumentar a sensibilidade dos “primers”, que são uma seqüência alvo de DNA (IQBAL et al., 1994). Segundo Harrus e colaboradores (2004), em seu trabalho e também em outros estudos já foi demonstrada a evidência de que o baço abriga o DNA da Ehrlichia por mais tempo que o sangue. Assim aspirados de baço são preferíveis para o monitoramento de DNA Ehrlichial durante a terapia.

E. canis pode ser cultivada *in vitro* em células DH82 (*dog histiocytosis*), linhagem originária de monócitos caninos que foi adaptada em cultivo celular a partir de células obtidas de um caso de histiocitoma (WELLMAN et al., 1988). Até o momento, são vários os isolados de *E. canis* cultivados *in vitro* e geneticamente caracterizados na América do Norte e no Velho Mundo. No caso da América Latina, o isolamento *in vitro* de *E. canis* de cães tem sido reportado apenas no Brasil (TORRES et al., 2002) e na Venezuela (UNVER et al., 2001). No Brasil a *E. canis* foi isolada três vezes com sucesso na linhagem de células DH82 do sangue de cães infectados: a primeira no Rio de Janeiro, e as demais em Jaboticabal e São Paulo (AGUIAR, 2006).

O isolamento ajuda na caracterização do agente e permite a obtenção de um antígeno específico para uma área geográfica, possibilitando a realização de testes sorológicos específicos.

II.5- Ocorrência

Em um estudo retrospectivo sobre a casuística clínica de erliquiose em cães atendidos entre março de 1998 e setembro de 2001 em Belo Horizonte/ MG, foram analisadas 194 fichas clínicas de animais com suspeita de hemoparasitoses. Observou-se que em 31 cães foi diagnosticado *Ehrlichia canis* e em 21 *Ehrlichia platys*, por meio de exame parasitológico direto de esfregaços sanguíneos (MOREIRA et al., 2003).

Determinada região de Minas Gerais apresentou que, dentre os cães sadios submetidos ao teste de IFI, 15,7% e 17,8% eram reativos a *E. canis* e *E. chaffeensis*, respectivamente (GALVÃO et al., 2002). Estudos epidemiológicos em áreas rurais do mesmo estado, também através de IFI, indicaram 65,6% de cães reagentes para *E. canis* na região de Nanuque, 37,8% em Belo Horizonte, e 24,7% em Lavras (COSTA-JUNIOR et al., 2006). Em áreas rurais no município de Monte Negro, estado de Rondônia, através de IFI, foram observadas mais reações

positivas para *E. canis* em cães urbanos (37,0%) que em cães rurais (24,8%) (AGUIAR, 2006).

No Rio de Janeiro foram colhidas e testadas 2.553 amostras de soro de cães em um hospital veterinário com um kit comercial de ELISA (SNAP 3Dx®). Desse total, foram encontrados 505 cães (19,8%) reagentes a *E. canis* (LABARTHE et al., 2003). Outro estudo similar na cidade de Londrina-PR, usando o mesmo kit, foram encontrados 87 cães reagentes, perfazendo 23% da população estudada (TRAPP et al., 2006). Em Merida, capital do estado de Yucatan, México, com o emprego do mesmo kit, foram encontrados 53 animais positivos, ou 44,1% da população estudada (RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2005).

Em Viçosa-MG, 70 amostras de sangue de cães encaminhadas para hemograma em um hospital veterinário foram testadas quanto à presença de *E. canis* por *nested*-PCR. As taxas de infecção encontradas foram de 100% dos cães somente com trombocitopenia, 57,1% dos cães com anemia e trombocitopenia, 26,3% dos cães com anemia apenas, e de 29,4% para cães que não apresentavam nem anemia nem trombocitopenia (OLIVEIRA et al., 2006).

II.6-Tratamento

As tetraciclinas constituem as drogas de escolha para o tratamento de erliquiose canina (COUTO, 1998). Dentre estas, a doxiciclina, um derivado semi-sintético, é a mais utilizada (BARR, 1997), pois alcança uma elevada concentração sanguínea e tecidual, penetrando rapidamente na maioria das células (TROY; FORRESTER, 1990). Além disso, quando utilizada por via oral, a doxiciclina resulta em menor taxa de recidiva comparativamente às outras tetraciclinas (CODNER; FARRIS-SMITH, 1986). E ainda é menos nefrotóxica, sendo o medicamento preferível nas infecções crônicas com evidência de insuficiência renal (SWANGO et al., 1992).

O mecanismo de ação das tetraciclina é inibir a síntese protéica dos microorganismos sensíveis, ligando-se à subunidade 30S do ribossomo do microorganismo, impedindo que o RNA-transportador (RNAt) se fixe ao ribossomo, ocorrendo então a inibição da síntese protéica. A doxiciclina é mais lipofílica do que as outras tetraciclina, tendo melhor penetração nos tecidos, que resulta em um maior volume de distribuição, a despeito também de sua extensiva ligação com proteínas plasmáticas, aumentando sua atividade antimicrobiana *in-vitro* e *in-vivo* (PAIVA et al., 2007).

Couto (1998) recomenda a dose de 2,5 mg/kg a 5 mg/kg, via oral, a cada 12 horas, por 10 a 14 dias. Neer e colaboradores (2002) recomendam a doxiciclina na dose de 10mg/kg, uma vez ao dia durante 28 dias.

Apesar da droga melhorar efetivamente os sinais clínicos da doença, recentemente foi observado persistência da infecção por *E. canis* em cães tratados por 14 dias com doxiciclina (aproximadamente 10mg/kg, p.o., q.d.) (SCHAEFER et al, 2008). Este estudo demonstrou ainda que a rifampicina (aproximadamente 15mg/kg, p.o., q. 12h, dos dias 61-74 d.p.i) pode ser usada como uma alternativa para o tratamento da EMC.

Discrepâncias entre modelos experimentais sugerem que o modo de transmissão e a fase da doença influenciam na eficácia do antibiótico para eliminar a infecção por *E. canis*. (SCHAEFER et al., 2008).

Um tratamento de suporte deve ser fornecido ao animal. Em alguns casos é necessária a reposição de fluidos (fluidoterapia endovenosa) e transfusões sangüíneas em animais com anemia severa ou com hemorragias. Corticosteróides como a prednisolona na dose de 5 mg/kg diariamente durante 3 dias, ou acetato de metilprednisolona na dose de 2 mg/kg são benéficos no combate dos efeitos da trombocitopenia e dos distúrbios hemorrágicos (SWANGO et al., 1992).

Alguns autores (ADEYANJU; ALIU, 1982; BARR, 1997; TROY; FORRESTER, 1990) recomendam o uso do imidocarb no tratamento da EMC. Esta droga trata-se de uma carbanilida, cuja ação baseia-se na alteração morfológica e funcional do núcleo e do citoplasma do parasito (ANDRADE; SANTARÉM, 2002). Esta indicação é controversa, mais vale ressaltar que dada a possibilidade de transmissão de outras hemoparasitoses, como a babesiose canina, a qual pode ser feita pelo

repasto sanguíneo do mesmo vetor, é importante excluir esta e outras enfermidades, uma vez que a não utilização do imidocarb em tais situações, poderia comprometer a eficácia do tratamento empregado (SOUSA et al., 2005).

O tratamento mais utilizado para EMC é doxiciclina (10 mg/kg de peso corporal por dia) por 28 dias, recomendado na Declaração de Consenso em Ehrlichia do Grupo de Estudos de Doenças Infecciosas do American College of Veterinary Internal Medicine. Porém, segundo Harrus e colaboradores (2004) a duração do tratamento com doxiciclina para cães no quadro agudo da EMC pode ser reduzido para 16 dias. A diminuição do tratamento pode reduzir os custos, a probabilidade de efeitos colaterais e o risco de resistência ao antibiótico.

Também nos casos de pacientes com Erliquiose Granulocítica Humana (EGH) a droga de escolha é a doxiciclina. No entanto, alternativas para as tetraciclina são necessárias ou desejáveis para crianças com menos de 8 anos de idade, devido o potencial de descoloração dos dentes, em mulheres grávidas pelo perigo de toxicidade aos ossos do feto, para pacientes alérgicos ou com intolerância gástrica para estes compostos (MAURIN et al., 2003).

Schaefer e colaboradores (2007), confirmaram em seus estudos que o tratamento com doxiciclina (aproximadamente 10mg/kg, uma vez ao dia, por 14 dias) não eliminou totalmente a *E. canis* dos cães e as ninfas de *R. sanguineus* adquiriram infecção que persistiu através de seu ciclo biológico. Investigações anteriores também sugerem infecções persistentes após o tratamento com doxiciclina, com doses semelhantes, durante a fase subclínica da EMC.

Demonstrou-se que com quatro semanas de doxiciclina houve uma diminuição significativa nos títulos de IFA, um aumento significativo no número de plaquetas 16 dias após o tratamento, e não foi detectado DNA de *E. canis* após 16 dias de tratamento. Mas devido à variação específica na resposta terapêutica e os dados de eficácia conflitantes de cães e estudos de infecção experimental, tem-se sugerido que todos os cães sejam tratados com doxiciclina (10 mg/kg PO q24h) durante 4 semanas (EDDLESTONE et al., 2007).

A enrofloxacin foi utilizado com sucesso para tratar a infecção experimental em cães com *Rickettsia rickettsii*, na dose de 3,0 mg/kg cada 12h PO por 7 dias. Outras *Rickettsia* são sensíveis às fluoroquinolonas, e esta classe de antibióticos

atinge concentrações intracelulares terapêuticas. Assim, enrofloxacin foi considerada uma alternativa adequada para o tratamento da erliquiose canina. Houve poucos estudos *in vivo* para avaliar a eficácia das quinolonas contra diferentes espécies Ehrlichia. Estes estudos indicam que *E. sennetsu* e o agente da ehrliquiose granulocítica humana são sensíveis às fluoroquinolonas *in vitro* e, portanto, poderia ser suscetível a essas drogas *in vivo*. Após culturas de sangue positivas, Neer e colaboradores (1999) apresentaram que a enrofloxacin oral (5 a 10 mg / kg cada 12h PO por 21 dias) não é um tratamento eficaz para a infecção por *E. canis* induzida experimentalmente.

Ehrlichioses e anaplasmoses são doenças infecciosas graves e emergentes que são de grande preocupação médica. Os dados clínicos sobre o tratamento destas doenças são limitados, e Ehrlichia e Anaplasma são considerados como organismos altamente resistentes, pois apenas duas drogas sempre são eficazes no tratamento: doxiciclina e rifampicina (BRANGER et al., 2004).

A *Artemisia annua* L. é uma erva pertencente à família Asteraceae e é endêmica no norte da China (BILIA et al., 2006). Seus compostos ativos, a artemisinina e seus derivados, como artemeter, originalmente desenvolvidos para o tratamento da malária (RIDDER et al., 2008), têm demonstrado alguma capacidade de inibir a replicação do *Toxoplasma* *in vitro* (JONES-BRANDO et al., 2006; D'ANGELO et al., 2009). Artemisinina geralmente está presente nas folhas e flores da planta nas concentrações que variam de 0,01% a 1,4% do peso seco (BILIA et al., 2006) e a farmacopeia atual da República Popular da China lista oficialmente a erva seca de *A. annua* L. como um remédio para febre e malária na dose diária de 4,5-9 g de erva seca para ser preparado como uma infusão de chá com água fervente (RATH et al. 2004). Recentemente, Lans e colaboradores (2007), observaram o uso extensivo da infusão de *A. annua* L. como medicamento etnoveterinário, onde foi utilizado para o tratamento de lombrigas, vermes e giardia em suínos e obtendo-se 81,6-83,2% de supressão para o desenvolvimento de *Cryptosporidium parvum*.

Artemisia annua L. foi descrita pela primeira vez em 1972 por pesquisadores chineses, seu princípio ativo a Artemisinina (também chamado qinghaosu, QHS) é um agente anti-malarial muito importante, ao qual o parasita da malária ainda não

desenvolveu resistência. Seu modo de ação baseia-se na presença de uma endoreação aos peróxidos, acessível ao ataque eletrofílico. A ruptura desse vínculo, sob a influência de agentes bioquímicos próprios do parasita, leva à formação de radicais livres de peróxido altamente reativos, que podem então participar na morte das células parasitárias. No entanto, os detalhes do mecanismo de ação QHS ainda estão sendo debatidos (NOVAK; KOVAC, 2003).

II.7- Prognóstico e prevenção

O prognóstico dos animais é favorável nos estágios iniciais da doença e com o tratamento apropriado. Quando a medula óssea encontra-se severamente hipoplásica, como ocorre em formas crônicas da doença e em animais com complicações clínicas, o prognóstico é de desfavorável a grave (ANDEREG; PASSOS, 1999).

O controle de infestações pelo *R. sanguineus* constitui a base da prevenção contra a erliquiose. Deve ser realizado o controle da infestação de carrapatos sobre o hospedeiro e também o controle ambiental, pois foi verificado que, em um determinado instante, apenas 5% dos carrapatos *R. sanguineus* de uma determinada população estarão sobre o hospedeiro, enquanto os 95% restantes estarão no ambiente onde vive o cão. Dessa forma, o controle poderá ser realizado pela dedetização do ambiente com produtos à base de piretróides, ou pelo uso de produtos carrapaticidas de longa ação, ou de efeitos preventivos sobre os próprios cães. Os princípios ativos das formulações carrapaticidas disponíveis no mercado brasileiro para esse propósito são os organofosforados, o amitraz, os piretróides, o fipronil, a selamectina e a associação de propoxur e flumethrin (COUTO, 1998).

De acordo com Autran de Moraes e colaboradores (2004), cães doentes que foram tratados não desenvolvem imunidade persistente contra a erliquiose e são susceptíveis a reinfecção tanto por cepas homólogas quanto por cepas heterólogas. Nenhuma vacina, até o momento, foi desenvolvida na proteção de cães com erliquiose canina (ANDEREG ; PASSOS,1999).

III- MATERIAL E MÉTODOS

III.1- Cultura de células

Os macrófagos caninos (DH82) foram obtidos da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, E.U.A.) e cultivados em Frascos de 25 cm³ com meio DEMEM (Dulbecco's, Modified Eagle's, Sigma Aldrich®) acrescido de 5% de soro fetal bovino (Nutricell ®) em uma incubadora umidificada a 37 °C e 5% de CO₂. A metodologia utilizada de cultivo seguiu as orientações de Aguiar (2006).

III.2- Parasito

A cepa de *E. canis* isolado São Paulo utilizada foi obtida da Coleção de riquetsias e erlíquias do Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/ USP).

A cepa foi multiplicada em monocamadas de células DH82 (ATCC number: CRL-10389) e mantidas a 37°C e 5% de CO₂. Para o crescimento e manutenção celular utilizou-se meio DEMEM (Dulbecco's, Modified Eagle's, Sigma Aldrich®) acrescido de 5% de soro fetal bovino (Nutricell ®), renovado parcialmente a cada 3-4 dias.

III.3- Doxíciclina

Neste experimento utilizou-se o antibiótico doxíciclina (Doxy Suspensão®, CEPAV) na concentração de 1µg/mL, seguindo as diluições recomendadas na bula do medicamento, levando-se em consideração que no tratamento de erliquiose canina utiliza-se 10 mg por quilo de peso vivo.

III.4- *Artemisia annua* L.

A planta *Artemisia annua* L. foi cultivada na UFU pelo Laboratório de Imunologia. Elas foram colhidas antes do período de floração para maior concentração de artemisinina. As partes aéreas e de solo foram secas e armazenadas a baixa umidade. Então, foi preparada a infusão *A. annua* L. a partir de 10 g de ervas secas em 100 mL de água destilada fervente. A mistura foi brevemente agitada e coberta por 10 min. (RATH et al., 2004), o material vegetal foi removido por filtração (Filtro papel), e em seguida realizou-se nova filtração (Filtro Ultra-fino) em fluxo de UV. Todos os procedimentos para o preparo da infusão foram realizados em frascos âmbar e protegidos da luz para evitar a degradação da artemisinina. A infusão foi preparada 1 hora antes da realização do experimento com a mesma.

A concentração da infusão utilizada na cultura de *Ehrlichia canis* foi de 2.500µg/mL, seguindo os melhores resultados obtidos no trabalho de Oliveira e colaboradores (2009) em cultura de *Toxoplasma gondii*.

III.5- Protocolo dos medicamentos

Os grupos adotados foram: controle, somente cultura de *Ehrlichia canis*; doxiciclina, adição de doxiciclina ao meio e artemísia, adição de artemísia ao meio. (Quadro 1).

Nº de culturas <i>E.canis</i>	Taxa de infecção	Tempo do experimento	Tratamento utilizado	Denominação
1	69 %	2 h	—	Controle - 2h
1	60%	24 h	—	Controle - 24h
1	70%	2 h	Doxiciclina	Doxiciclina - 2h
1	63%	24 h	Doxiciclina	Doxiciclina - 24h
1	66%	2 h	<i>Artemisia annua</i>	Artemisia - 2h
1	70%	24 h	<i>Artemisia annua</i>	Artemisia - 24h

Quadro1- Protocolo de medicamentos, contendo o número de culturas de células DH82 infectadas por *E.canis* utilizadas em cada experimento, com suas respectivas taxas de infecção, tempo de cada experimento e tratamento utilizado e a denominação com que foram citadas no decorrer do texto.

As taxas de infecção das garrafas contendo células DH82 infectadas com *E. canis* foram acompanhadas. Para isso coletou-se com auxílio de um “cell-scraper” uma pequena amostra da cultura de *E.canis*. Este material foi transferido para uma lâmina de vidro para microscopia e em seguida corada com o protocolo de Panótico, para avaliar-se a taxa de infecção. A taxa foi obtida contando-se cem células DH82, sendo identificadas como parasitadas (presença de mórulas) e não parasitadas. Após verificar que a taxa de infecção estava entre 60-70%, descartou-se todo meio de cultura da garrafa. Foi então colocado meio novo e nas garrafas reservadas para a doxiciclina e *Artemisia annua* L foi acrescido ao meio de cultura os medicamentos nas concentrações descritas anteriormente. As culturas que continham *Artemisia annua* L ficaram protegidas da luz sempre que estavam fora da estufa, por meio de papel alumínio ao redor das garrafas de cultura. Em seguida as garrafas foram levadas novamente para estufa e mantidas a 37°C e 5% de CO₂, por 2 e 24 horas. Quando se atingiu o tempo desejado, o meio de cultura foi totalmente substituído por 5 mL de meio sem soro, lavado várias vezes e desprezado ao final desta. Adicionou-se 750µL de tripsina, para descolamento das células da garrafa, e incubou por 10 minutos na estufa 5% de CO₂. Após o qual as garrafas foram lavadas várias vezes com meio de cultura a 10%. Depois disto o meio foi colocado em tubo com fundo cônico e levado à centrífuga para três ciclos de 10 minutos a 50 g. Entre estes ciclos o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 5 mL de meio de cultura

com 10% de soro fetal para retirada da tripsina. No último ciclo de centrifugação o sobrenadante foi descartado e acrescentou-se 3 mL de glutaraldeído a 2% em solução tampão fosfato 0,1M, pH 7,2 para fixação do material, iniciando o processamento do mesmo para posterior avaliação ultra-estrutural do material em microscópio eletrônico de transmissão.

III.6- Microscopia Eletrônica

Após um período de fixação de duas horas as células foram homogeneizadas na solução fixadora, em microtubos de dois mL e centrifugados em 50 g por 10 minutos. Após o descarte do sobrenadante, acrescentou-se tampão fosfato 0,1M, pH 7,2 até completar dois mL e realizou-se nova centrifugação em 50 g por 5 minutos e descarte do sobrenadante. Este procedimento foi repetido três vezes. Em seguida foi adicionado agar neutro 4% aquecido em aproximadamente 60°C. Antes que a solução de agar se solidificasse, o microtubo foi agitado vigorosamente. Com o resfriamento do material, formou-se um pequeno bloco de agar misturado com o pellet que foi retirado do frasco e cortado em fragmentos de aproximadamente 1 mm³. A partir desta etapa o material foi processado como se fosse fragmento de órgão.

A pós-fixação foi feita com tetróxido de ósmio 1% durante 30 minutos e tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 1,25% por mais 30 minutos. Posteriormente realizou-se desidratação em acetona e inclusão em resina Epon (Fluka, Suíça).

Finalmente, utilizando-se ultramicrotomo e navalha de diamante foram obtidos cortes ultrafinos, colhidos em grades de cobre malha 200, contracordados com acetado de uranila (Merck, Darmstadt, Alemanha) como descrito por Watson (1958) e citrato de chumbo (Merck, Darmstadt, Alemanha) (REYNOLDS, 1963). A avaliação do material foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão EM-109, (Zeiss, Alemanha).

III.7- Local de execução

Todos os procedimentos descritos anteriormente foram realizados no Laboratório de Cultura Celular e no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Ciências Biomédicas.

IV- RESULTADOS

IV.1- Controle

No material controle, as células DH82, independente de estarem ou não infectadas, tenderam a apresentar formato esférico, com núcleo variando de esférico a elíptico, geralmente com uma única edentação, levemente excêntrico, contendo um ou dois nucléolos, cromatina predominantemente frouxa (eucromatina) e pouca cromatina densa (heterocromatina) formando um anel escuro junto ao envoltório nuclear. A superfície das células apresentava grande número de projeções digitiformes, muitas vezes tendendo a envolver material externo, tal como debris celulares e mesmo *E. canis* (Fig. 1 e 2).

No citoplasma observaram-se muitas mitocôndrias, retículo endoplasmático granular e liso, lisossomos em quantidade variável, vacúolos de tamanhos e formas variados e eventualmente aparelho de Golgi (Fig. 2 a 10).

As mitocôndrias geralmente eram estruturas alongadas com cristas em forma de pregas atravessando quase que totalmente a matriz mitocondrial, a qual possuía eletrondensidade semelhante ao citoplasma. O retículo endoplasmático granular e liso em pequena quantidade estava distribuído homogeneamente pelo citoplasma (Fig. 3). Em células infectadas, tanto as mitocôndrias como o retículo endoplasmático aparentemente tendiam a se concentrar ao redor do vacúolo parasitóforo (Fig. 4).

Os lisossomos apresentavam-se com conteúdo eletrondenso e eventualmente era possível observar material reticulado geometricamente simétrico. Muitas vezes foi possível observar conteúdo eletrólúcido na forma de gotículas em meio ao material eletrondenso (Fig. 5).

Os vacúolos não parasitóforos continham material muito variado, geralmente com aparência de debris celulares ou material granular eletrondenso (Fig. 6).

Ainda no material controle composto por células DH82 infectadas por *E. canis* foram observadas bactérias no interior de vacúolos parasitóforos, geralmente formando mórulas (Fig. 7 e 8) e eventualmente isoladas. Mais raramente foram observadas *E. canis* livres em meio a debris celulares (Fig. 9). Foram observadas dois tipos de mórulas: mais frequentemente com erlíquias maiores e claras (Fig. 7) e raramente aquelas preenchidas por erlíquias menores e densamente compactadas (Fig. 8). Em ambas as formas as bactérias tendiam a ser esféricas e possuíam dupla membrana, sendo a membrana interna lisa e a externa ondulada (Fig. 7). Entre as bactérias de mórulas constituídas por erlíquias claras foi possível observar material variando de homogêneo levemente eletrondenso, passando por claro granular, chegando a límpido e totalmente eletrólúcido. Já as mórulas formadas por erlíquias densas apresentavam espaços maiores entre as bactérias, preenchidos com material granular claro. O protoplama tanto de células claras como densas estava preenchido com material levemente granular fino, com grânulos mais escuros e maiores semelhantes à ribossomas e material fibrilar provavelmente DNA (Fig. 7). Somente erlíquias claras foram observadas realizando divisão binária (Fig. 10).

Aparentemente no controle com 24 horas existia maior número de mórulas com erlíquias densamente compactadas (Fig. 8).

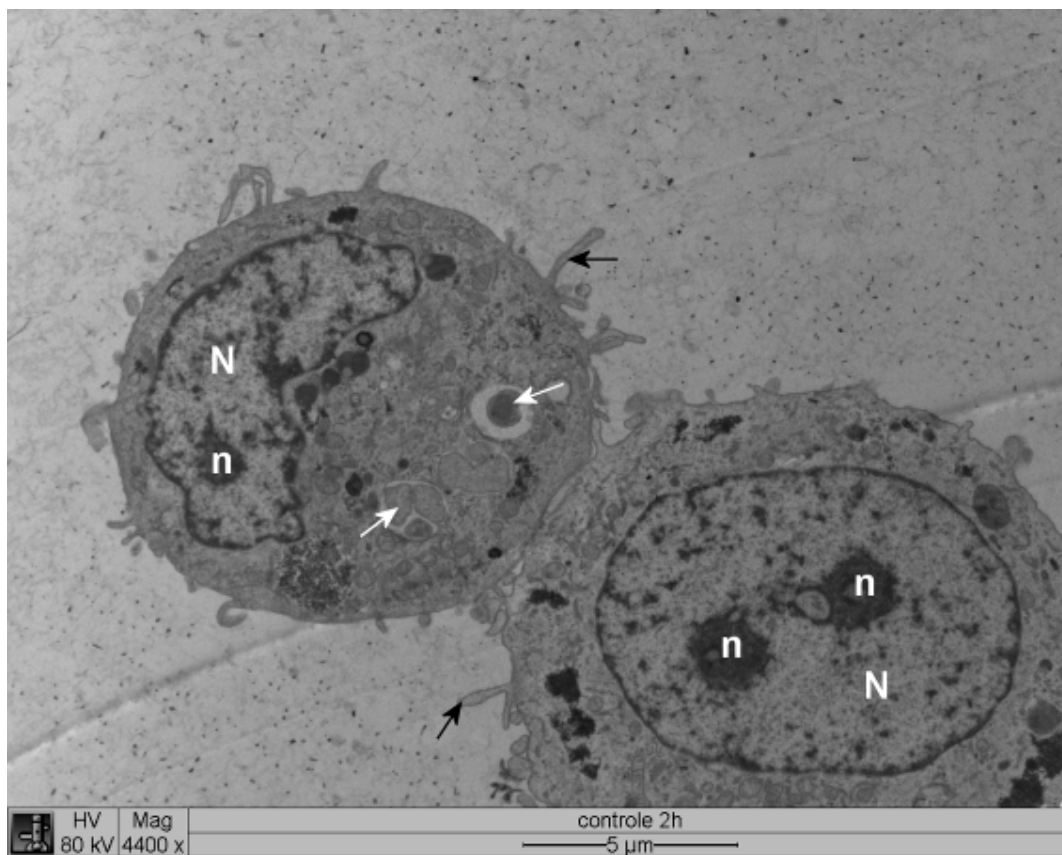


Figura 1- Eletromicrografia de cultura de células DH82 infectadas com *E. canis*. Seta branca: *E. canis* no interior de vacúolos parasitóforos; seta preta: projeções citoplasmáticas; N: núcleo; n: nucléolo.

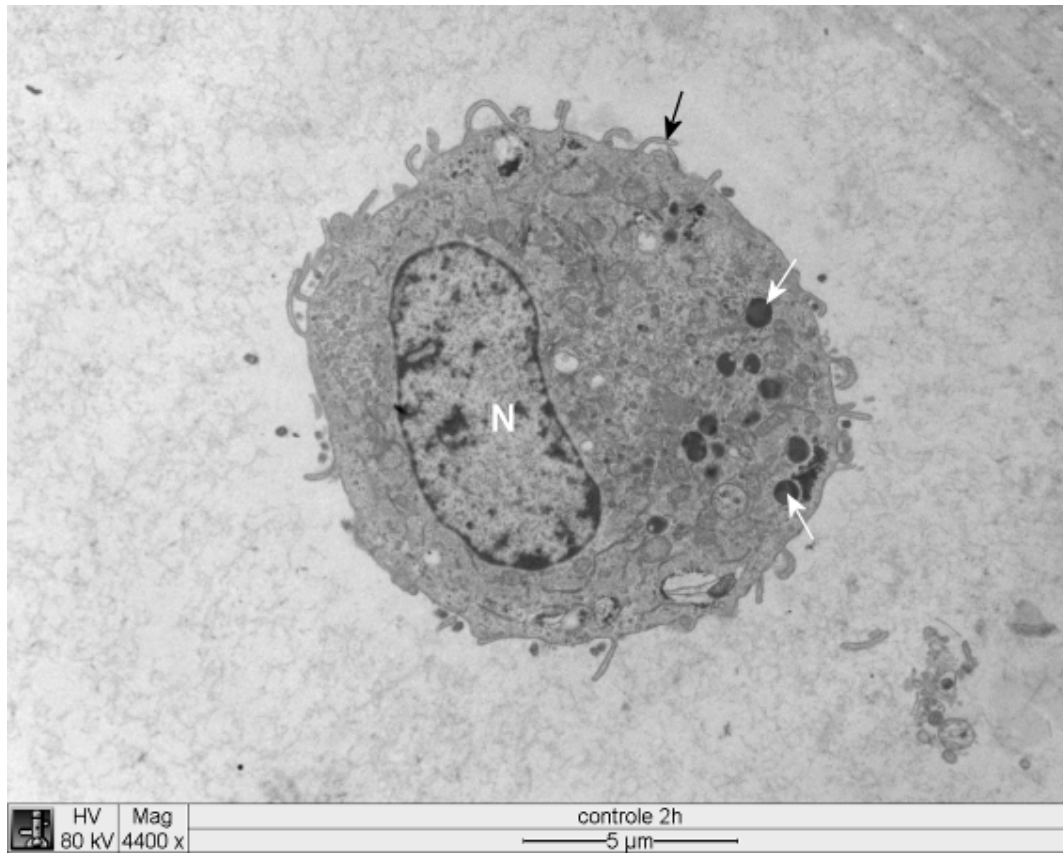


Figura 2- Eletromicrografia de cultura de células DH82 infectadas com *E. canis*. Seta branca: lisossomo; Seta preta: projeções citoplasmáticas; N: núcleo.

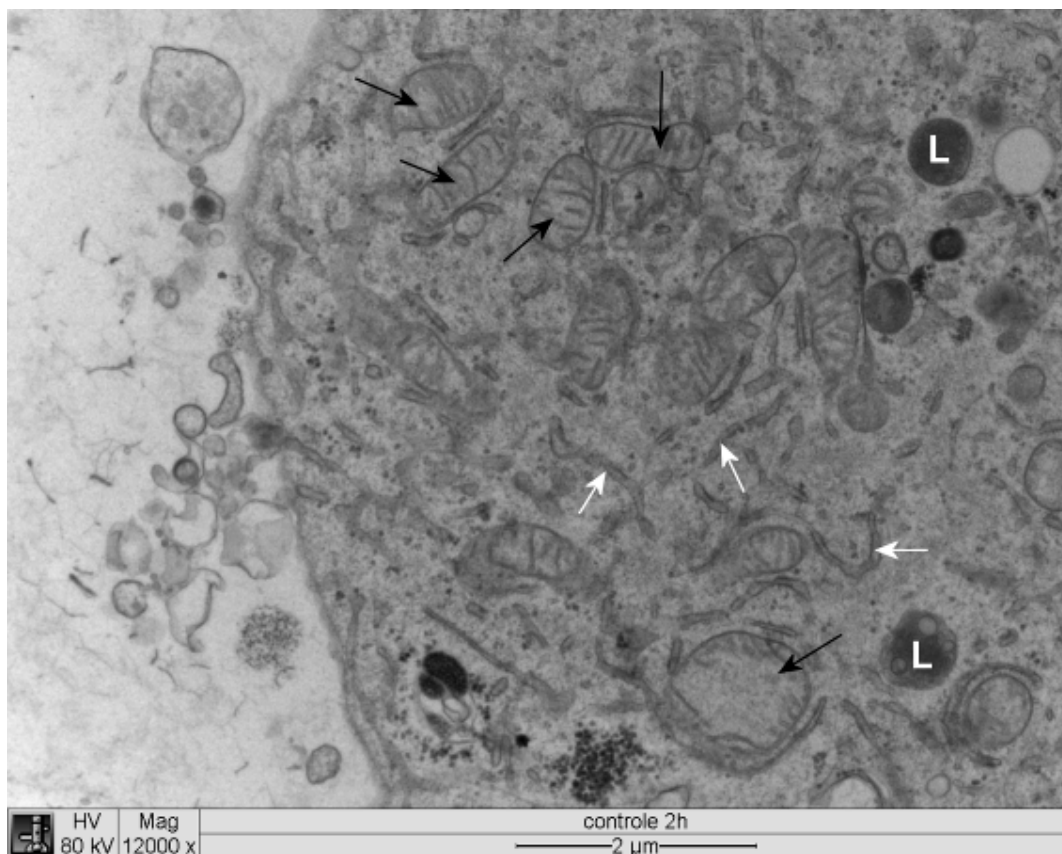


Figura 3- Eletromicrografia de cultura de células DH82 infectadas com *E. canis*. Seta branca: retículo endoplasmático; seta preta: mitocôndia; L: lisossomo.

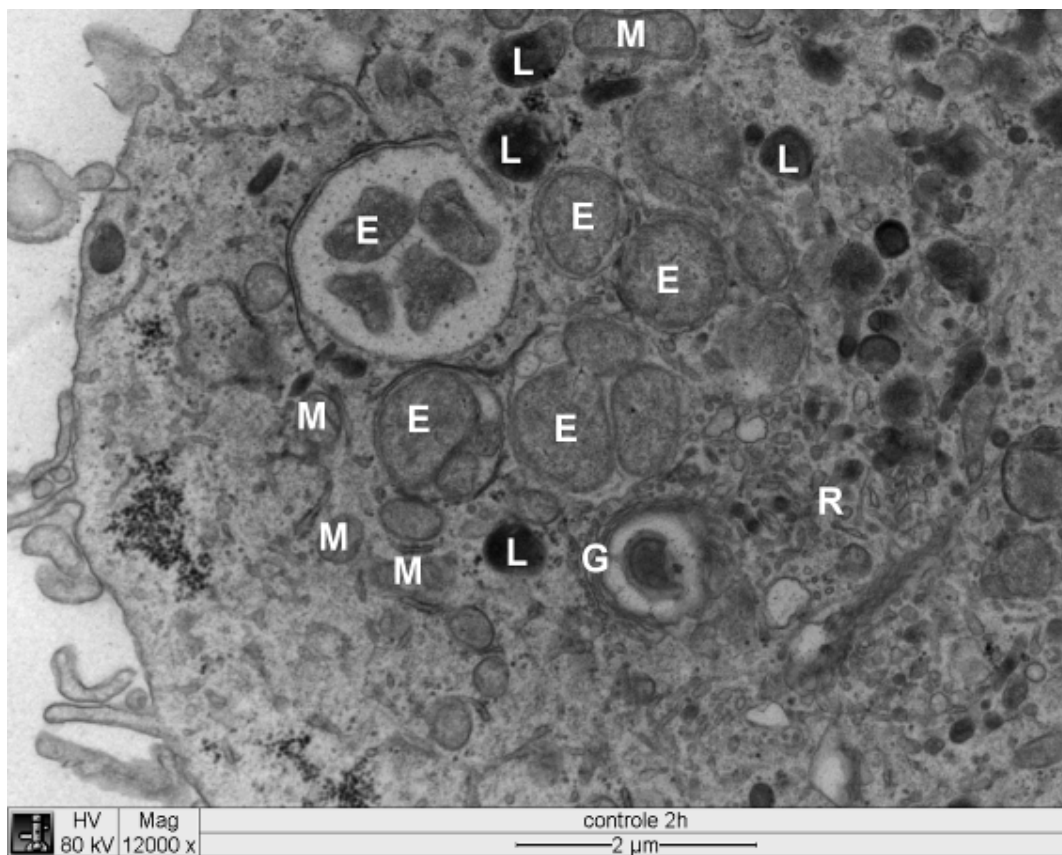


Figura 4- Eletromicrografia de cultura de células DH82 infectadas com *E. canis*. E: *E. canis* no interior de vacúolo parasitóforo; L: lisossomo; M: mitocôndria; R: região rica em retículo endoplasmático.

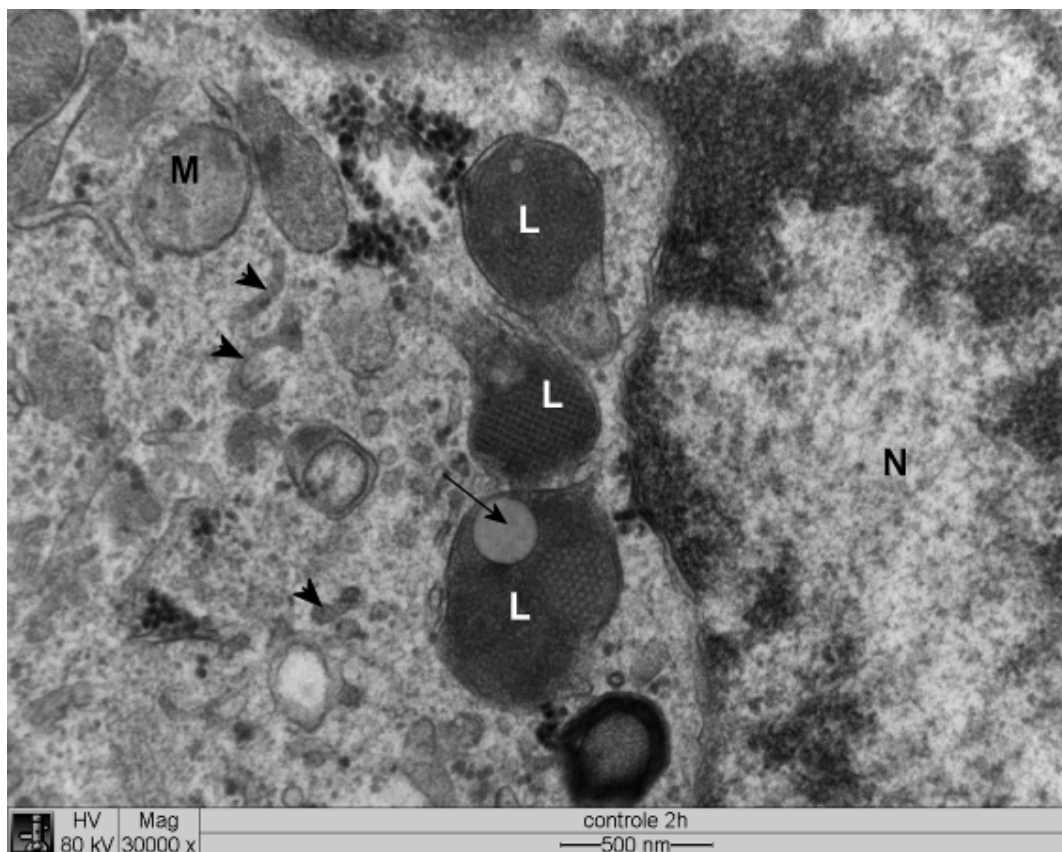


Figura 5- Eletromicrografia de cultura de células DH82 infectadas com *E. canis*. N: núcleo; M: mitocôndria; cabeça de seta: retículo endoplasmático; L: lisossomo com conteúdo reticular geometricamente simétrico; seta preta: conteúdo eletrólúcido no interior do lisossomo.

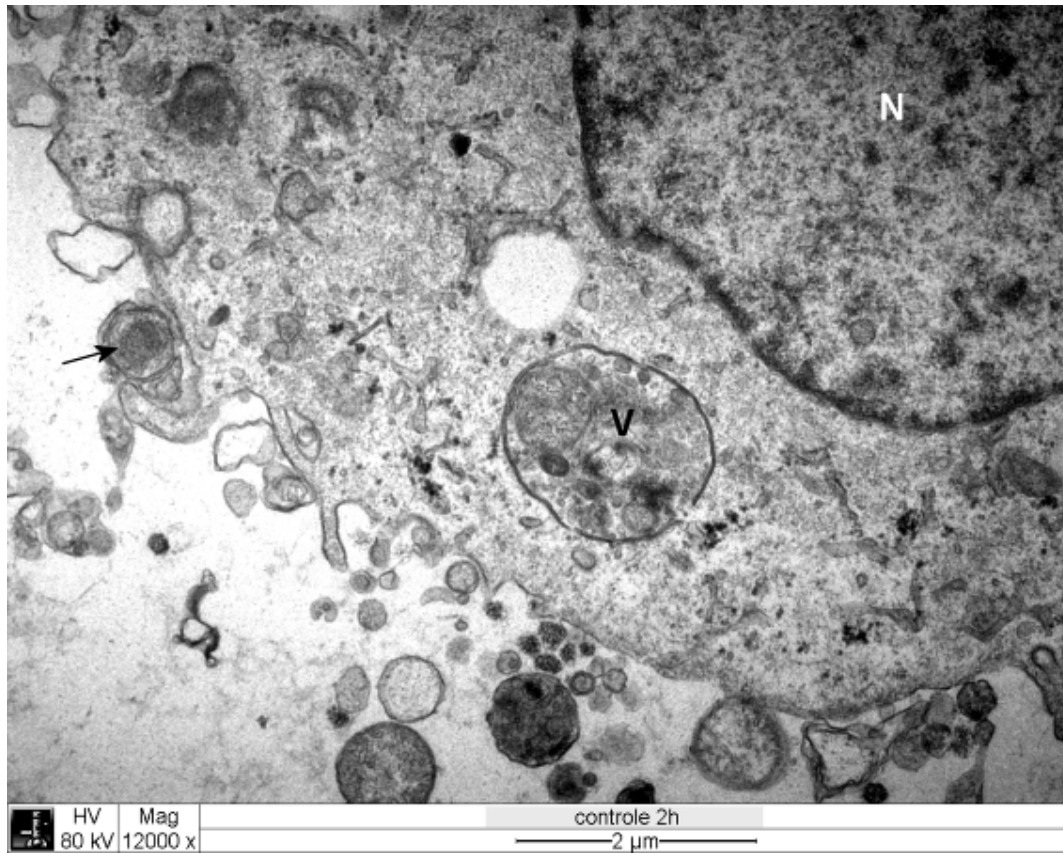


Figura 6- Eletromicrografia de cultura de células DH82 infectadas com *E. canis*. Seta preta: estrutura sugestiva de fagocitose; N: núcleo; V: vacúolo com material degradado.

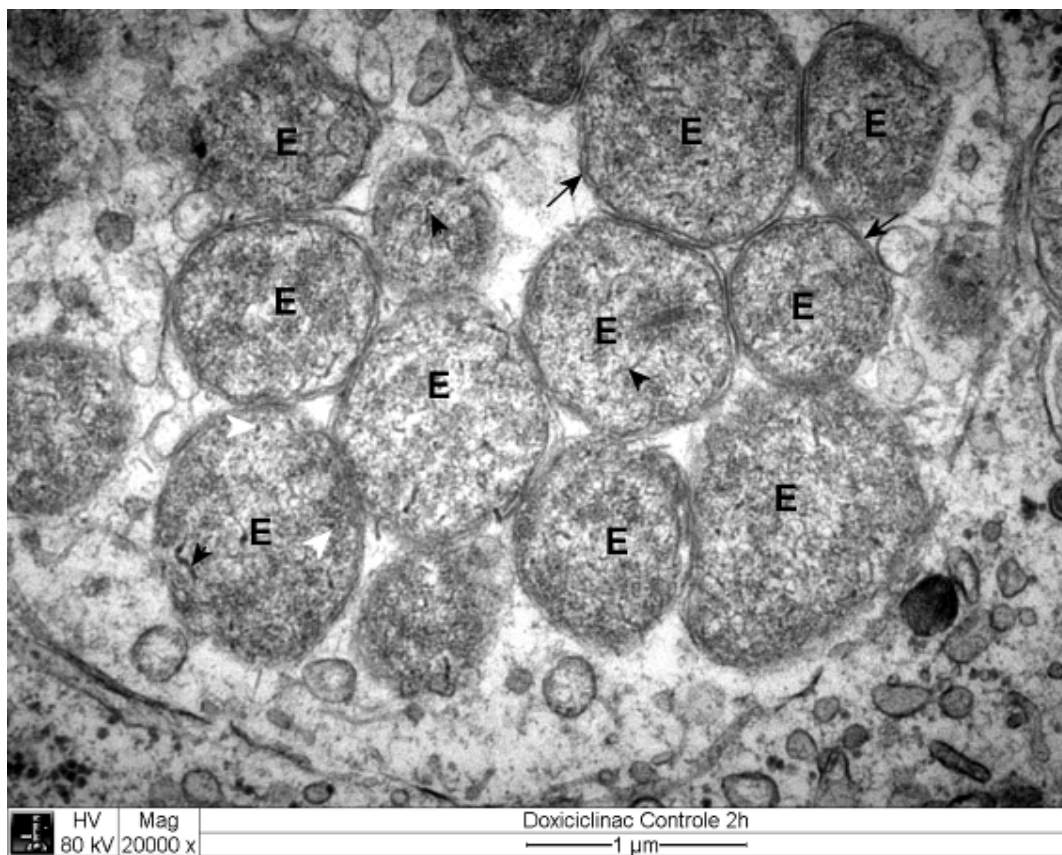


Figura 7- Eletromicrografia de cultura de células DH82 infectadas com *E. canis*. E: *E. canis* tipo clara no interior de vacúolo parasitóforo; seta preta: membrana citoplasmática dupla; cabeça de seta preta: material fibrilar no interior da *E. canis*; cabeça de seta branca: ribossomo.

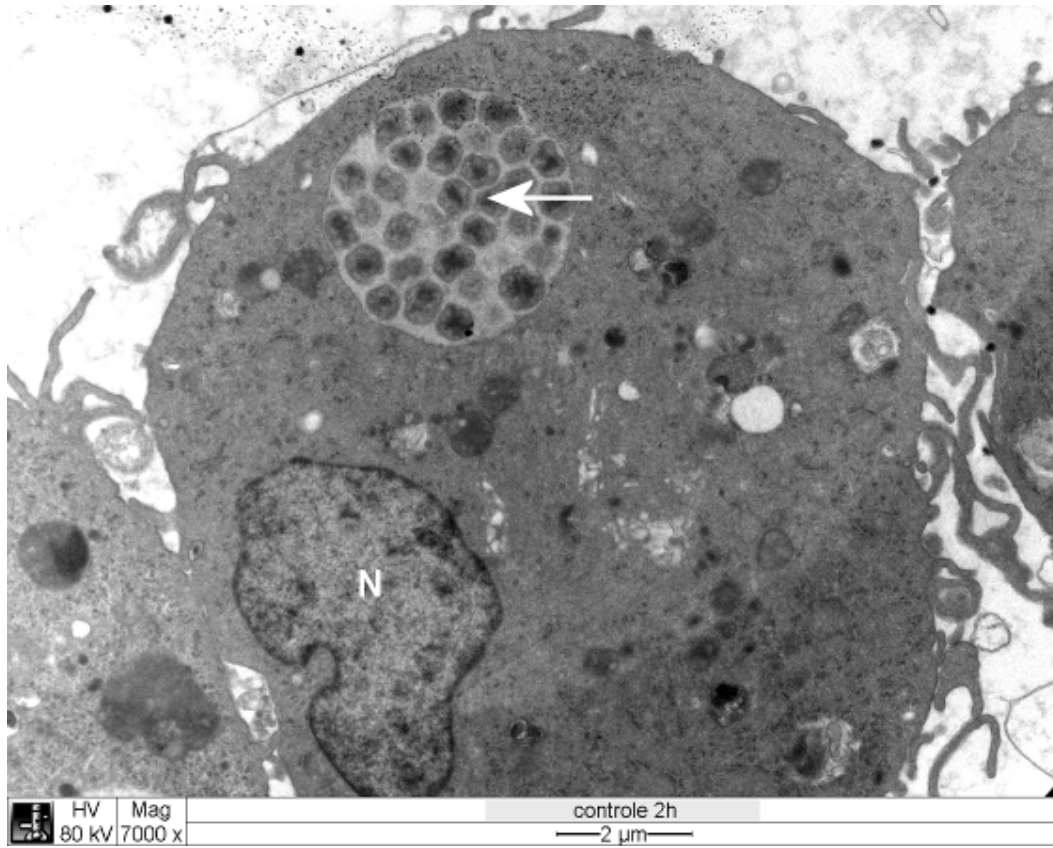


Figura 8- Eletromicrografia de cultura de células DH82 infectadas com *E. canis*. Seta branca: Mórula composta por *E. canis* densas no interior de vacúolo parasitóforo; N: núcleo.

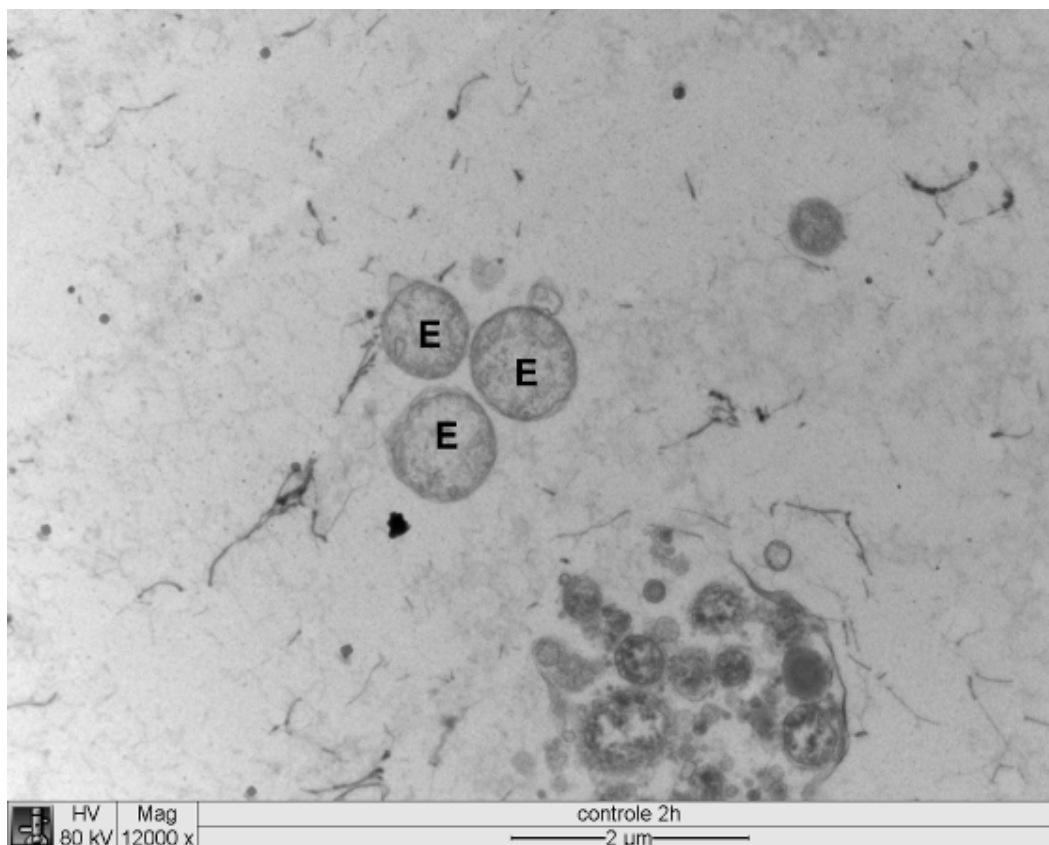


Figura 9- Eletromicrografia de cultura de células DH82 infectadas com *E. canis*. E: *E. canis* livres no meio de cultura.

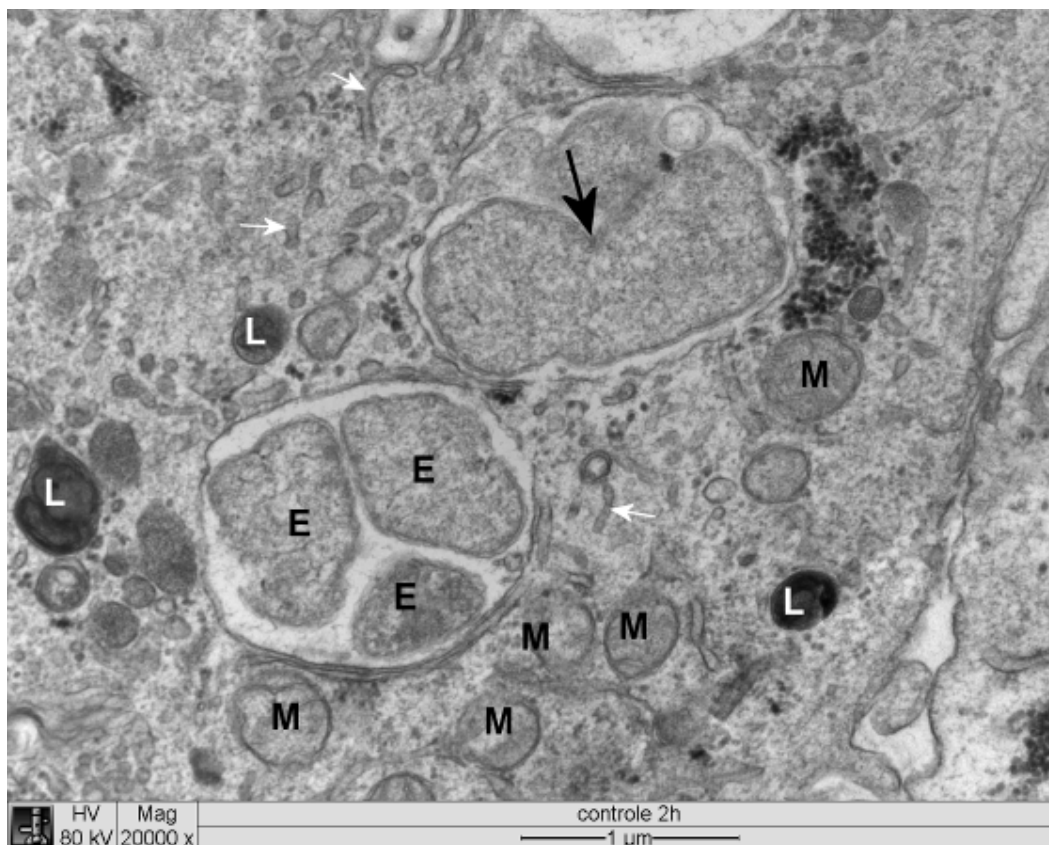


Figura 10- Eletromicrografia de cultura de células DH82 infectadas com *E. canis*. E: *E. canis* clara no interior de vacúolo parasitóforo; L: lisossomo; M: mitocôndria; seta branca: retículo endoplasmático; seta preta: figura sugestiva de *E. canis* clara em processo de divisão.

IV.2- Doxíciclina - 2 horas

Após duas horas, a cultura de células DH82 infectadas por *E. canis* apresentavam células de forma e núcleos semelhantes aos das controle (Fig. 11). Algumas células apresentavam projeções mais largas e curtas, no entanto foi possível observar estruturas que claramente representavam processos de fagocitose ativa (Fig. 12 e 13). Muitas mitocôndrias tornaram-se mais esféricas (Fig. 13). O retículo endoplasmático liso formado por pequenas vesículas e túbulos irregulares aparentemente estavam mais abundante (Fig. 14). A maioria das células apresentava regiões no citoplasma com acúmulo de substância granular eletrondensa não envolvida por membrana (Fig. 14). Algumas vezes o material estava envolvendo vacúolos com erlíquias degeneradas (Fig. 15) e às vezes aparentemente estava saindo do interior desses vacúolos (Fig. 16).

A grande maioria das mórulas apresentava sinais de alteração. Raramente foram observadas células com mórulas aparentemente normais. Algumas mórulas apresentavam erlíquias com coloração e membranas normais, mas com formas maiores e irregulares (Fig. 17). Outras possuíam mórulas compostas por bactérias em estágio avançado de desagregação e fragmentação (Fig. 18). Muitas vezes grandes vacúolos eram observados contendo resíduos que pouco lembrava erlíquias sendo, semelhantes às estruturas mais degradadas encontradas em mórulas ainda identificáveis como tal. Esses vacúolos possuíam conteúdo mais eletrondenso comparado ao das mórulas em início de degradação (Fig. 19). Em algumas células foi observada a fragmentação da membrana do vacúolo parasitóforo, formando pequenas vesículas (Fig. 20).

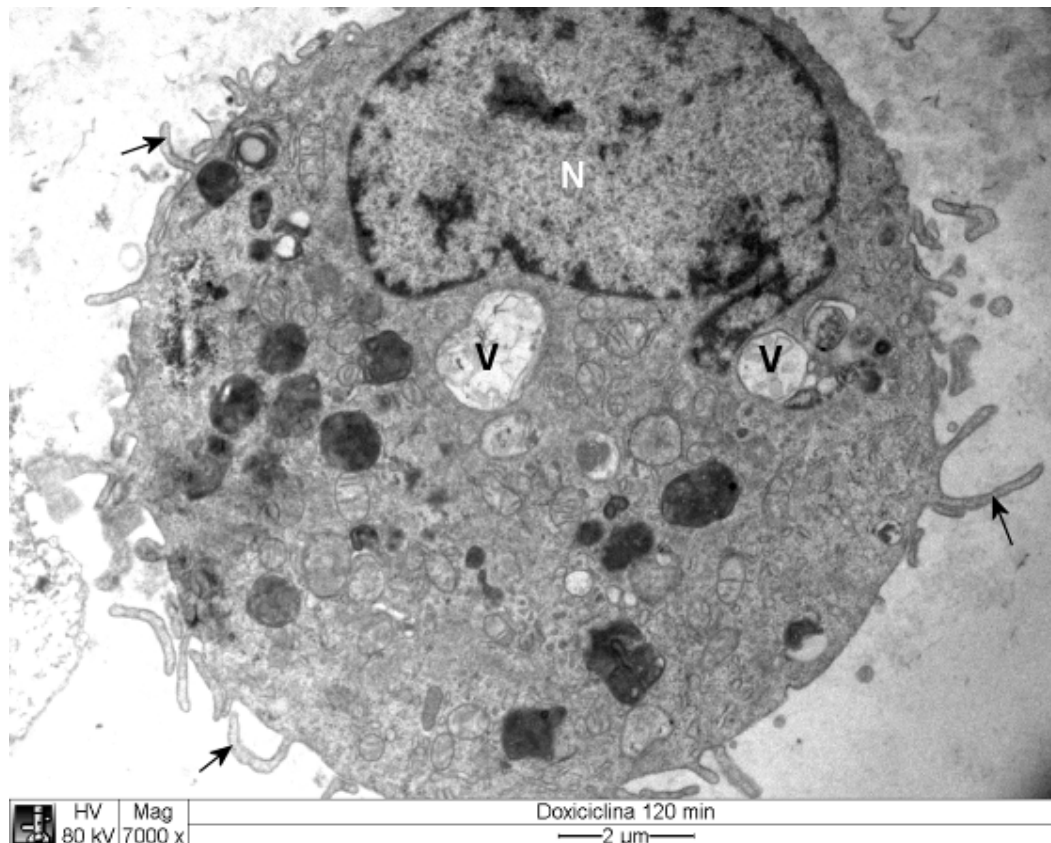


Figura 11- Eletromicrografia de cultura de células DH82 infectadas com *E. canis*, duas horas após a adição de doxiciclina no meio de cultura. N: núcleo; V: vacúolo com material degradado; .seta preta: projeções citoplasmáticas digitiformes.

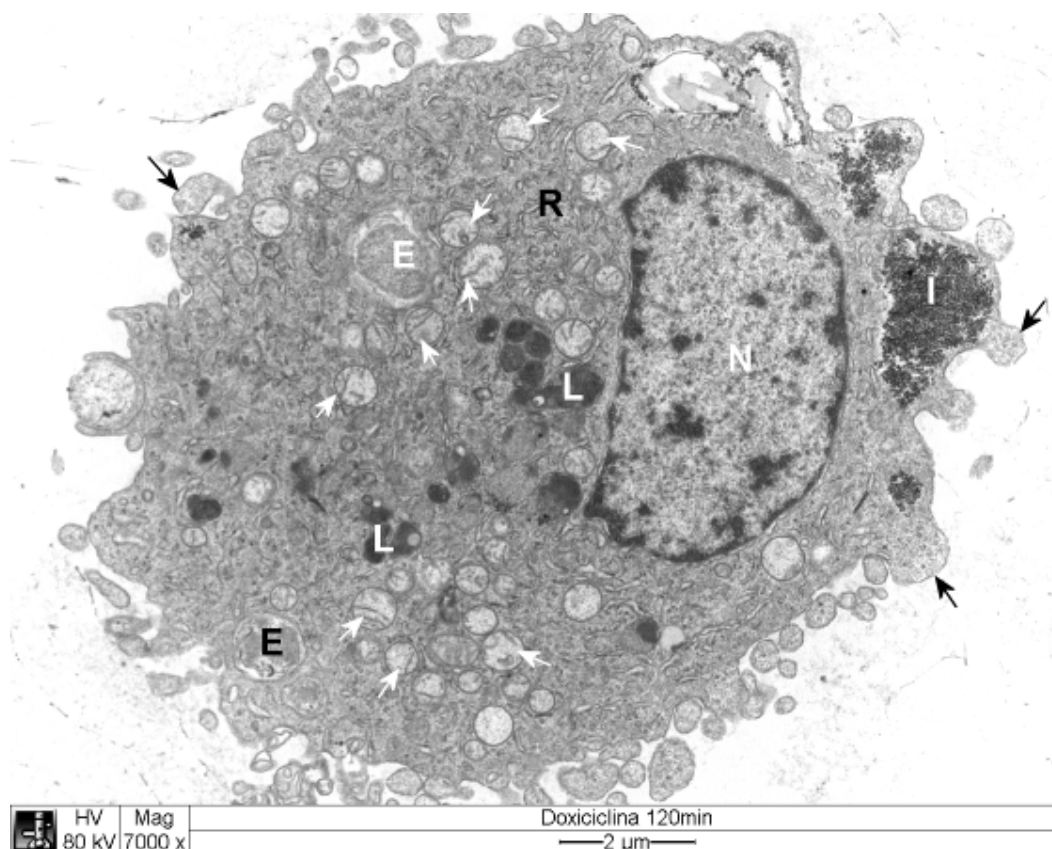


Figura 12- Eletromicrografia de cultura de células DH82 infectadas com *E. canis*, duas horas após a adição de doxiciclina no meio de cultura. N: núcleo; L: lisossomo; seta branca: mitocôndria; seta preta: projeções citoplasmáticas; E: *E. canis* no interior de vacúolo parasitóforo; R: região rica em retículo endoplasmático; I: inclusão citoplasmática eletrondensa granular.

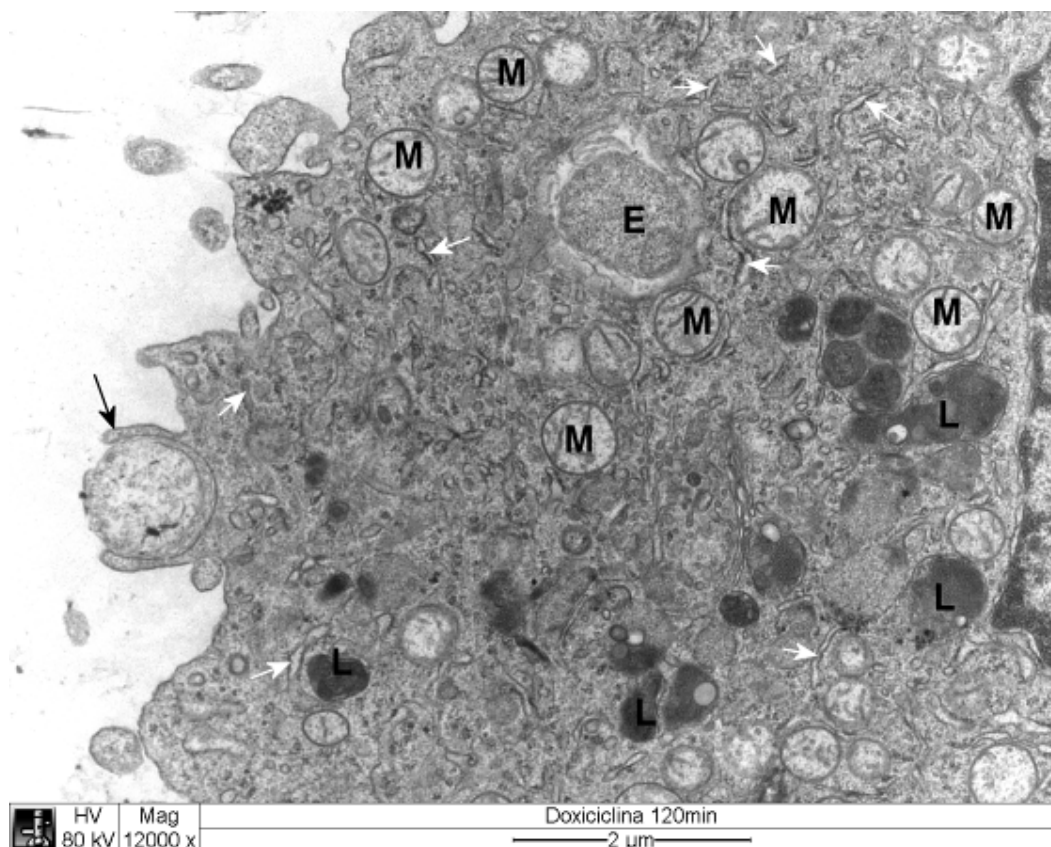


Figura 13- Eletromicrografia de cultura de células DH82 infectadas com *E. canis*, duas horas após a adição de doxiciclina no meio de cultura. L: lisossomo; M: mitocôndria; E: *E. canis* no interior de vacúolo parasitóforo; seta preta: estrutura sugestiva de fagocitose.

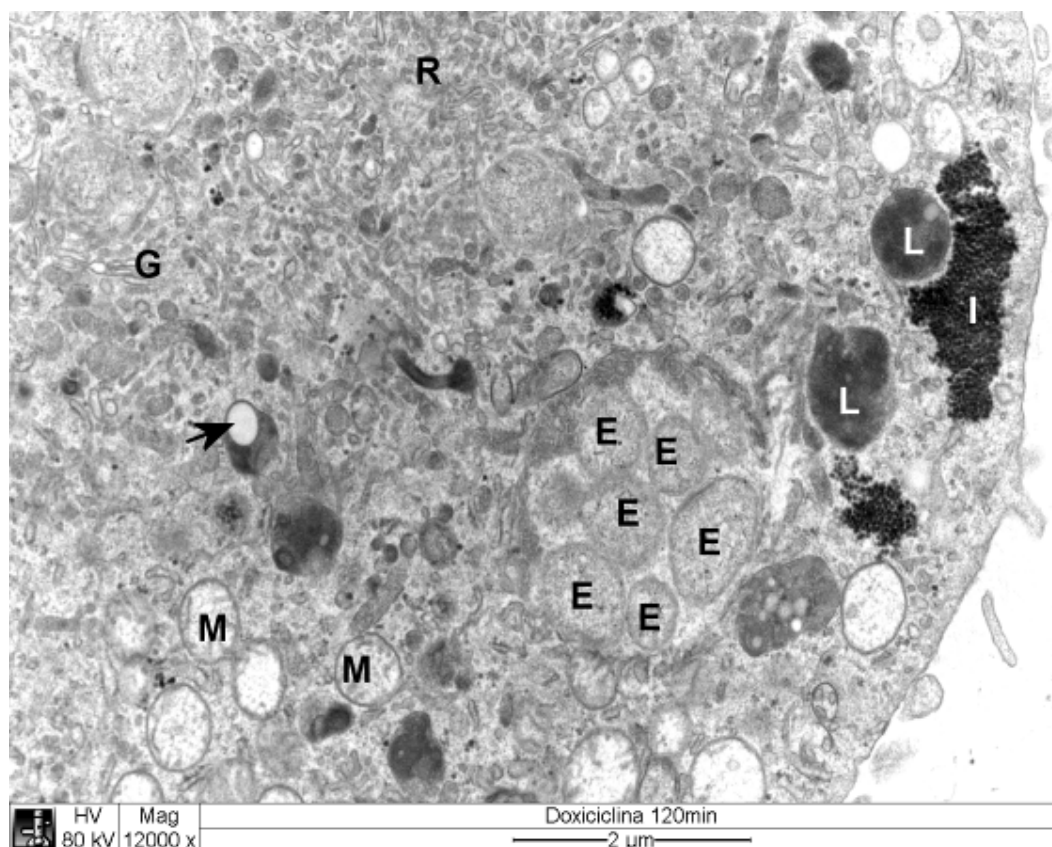


Figura 14- Eletromicrografia de cultura de células DH82 infectadas com *E. canis*, duas horas após a adição de doxiciclina no meio de cultura. G: Aparelho de Golgi; L: lisossomo; M: mitocôndria; seta preta: material eletrólúcido no interior de lisossomo; E: *E. canis* clara no interior de vacúolo parasitóforo; R: região rica em retículo endoplasmático; I: inclusão citoplasmática eletrondensa granular.

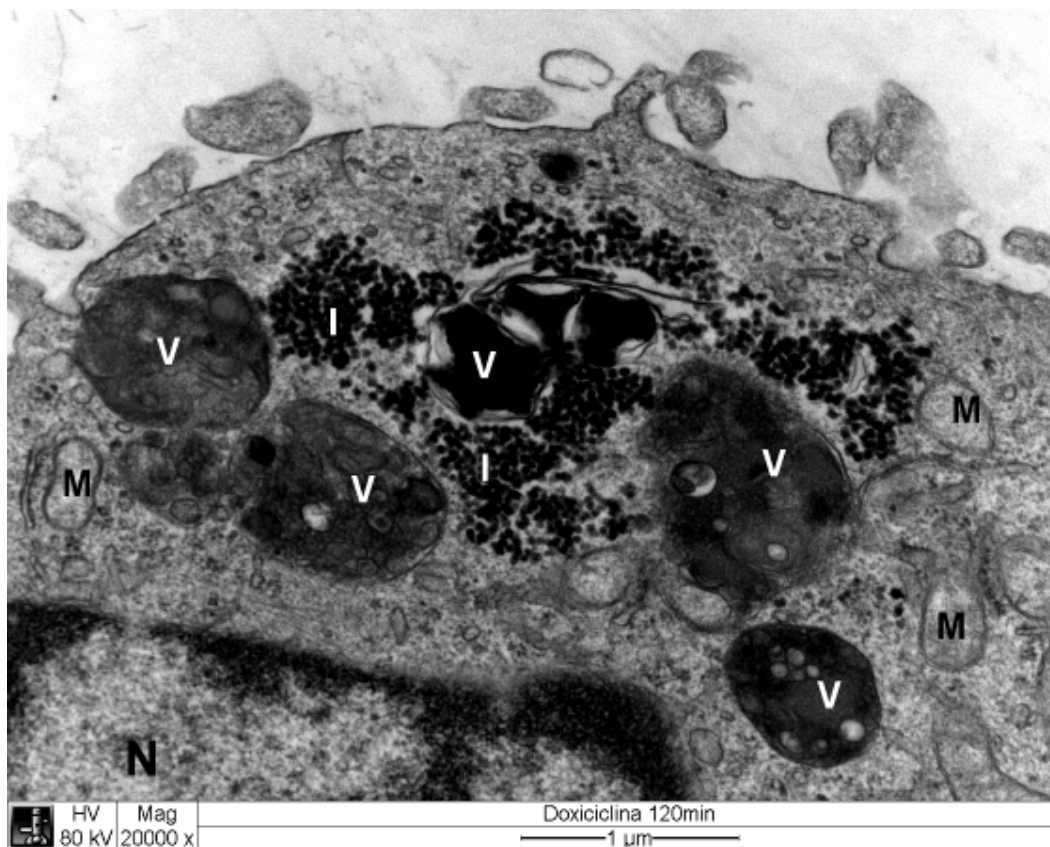


Figura 15- Eletromicrografia de cultura de células DH82 infectadas com *E. canis*, duas horas após a adição de doxiciclina no meio de cultura. N: núcleo; M: mitocôndria; V: vacúolo com material degradado; I: inclusão citoplasmática eletrondensa granular.

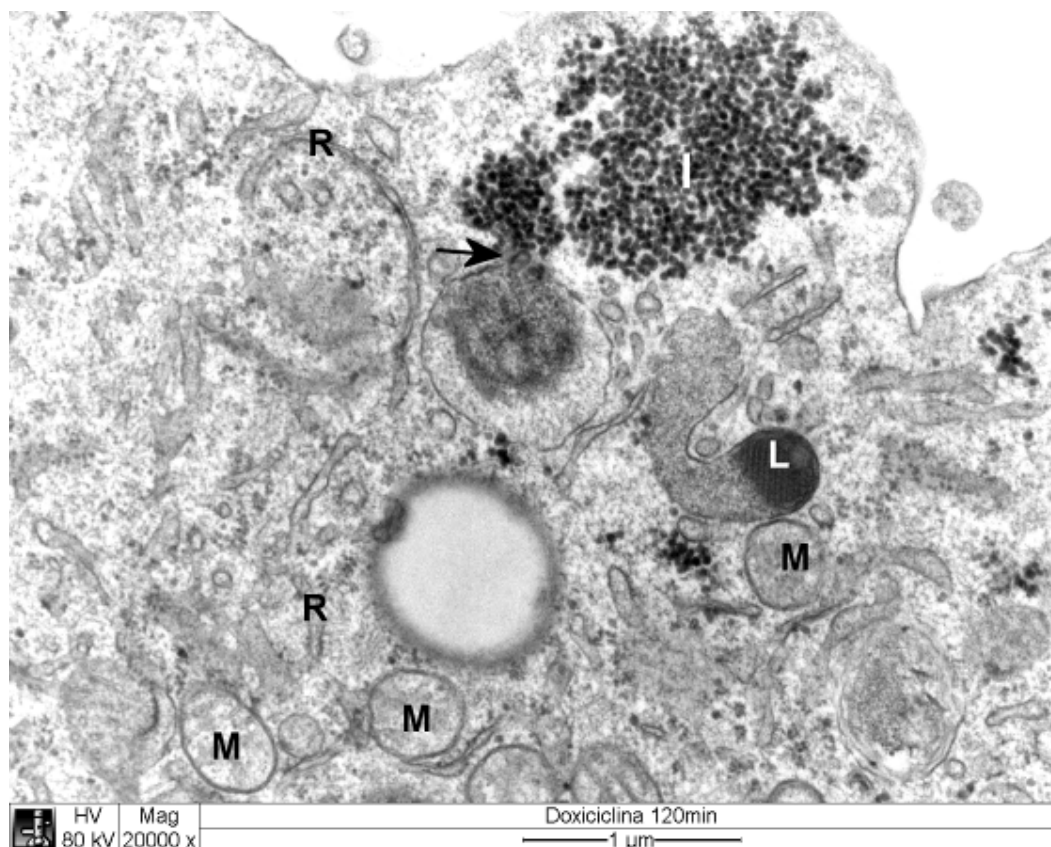


Figura 16- Eletromicrografia de cultura de células DH82 infectadas com *E. canis*, duas horas após a adição de doxiciclina no meio de cultura. L: lisossomo; R: retículo endoplasmático; I: inclusão citoplasmática eletrondensa granular; seta preta: região de aparente extravasamento de material eletrondenso.

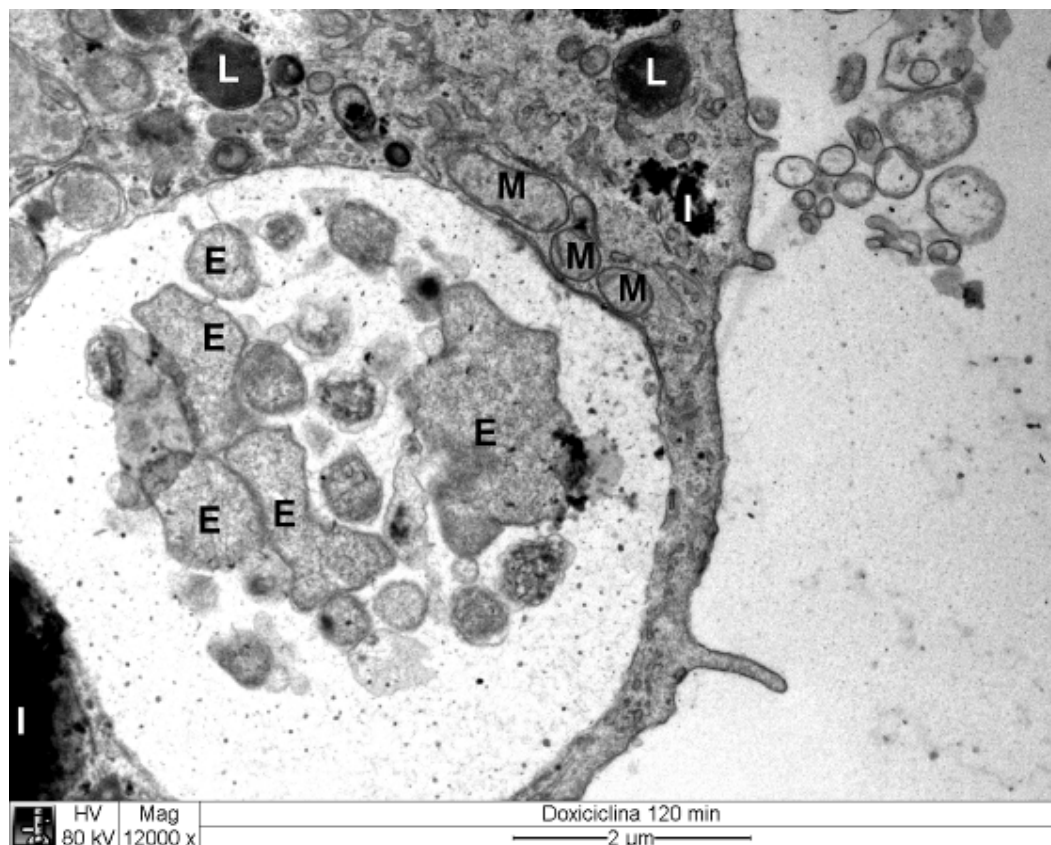


Figura 17- Eletromicrografia de cultura de células DH82 infectadas com *E. canis*, duas horas após a adição de doxiciclina no meio de cultura. L: lisossomo; M: mitocôndria; E: *E. canis* clara com forma irregular no interior de vacúolo parasitóforo; I: inclusão citoplasmática eletrondensa granular.

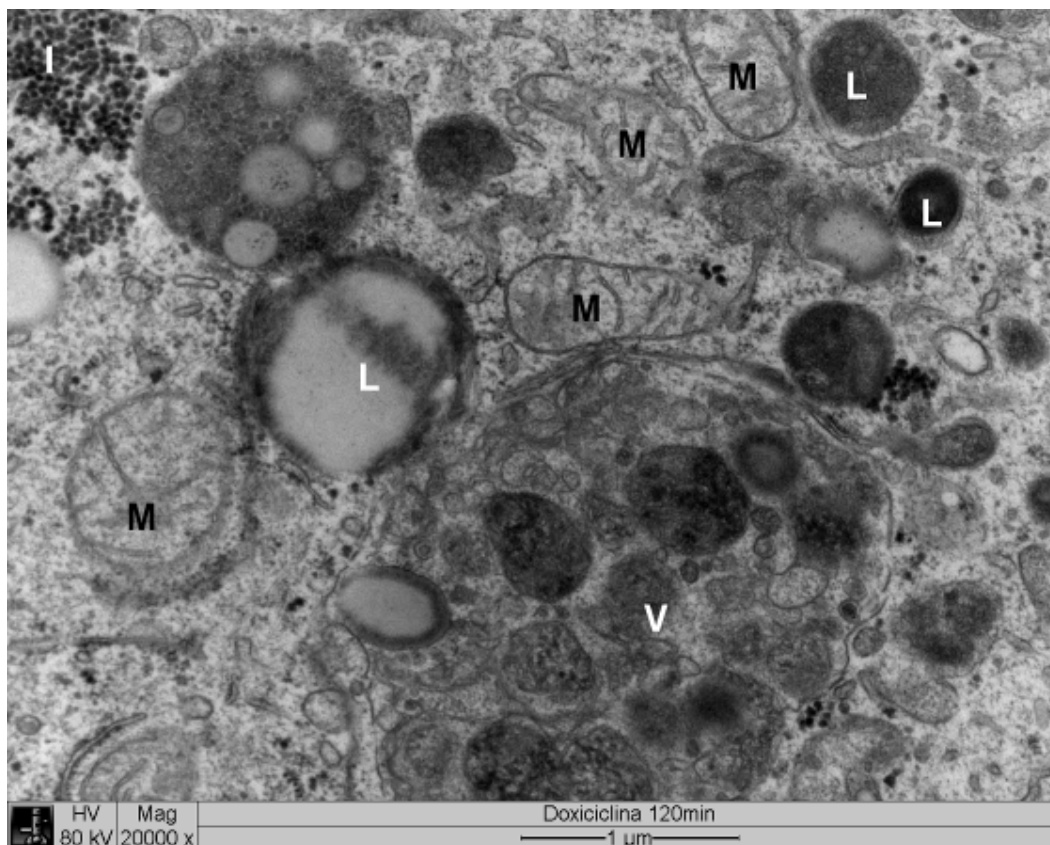


Figura 18- Eletromicrografia de cultura de células DH82 infectadas com *E. canis*, duas horas após a adição de doxiciclina no meio de cultura. L: lisossomo; M: mitocôndria; V: vacúolo contendo *E. canis* em diversos graus de degradação; I: inclusão citoplasmática eletrondensa granular.

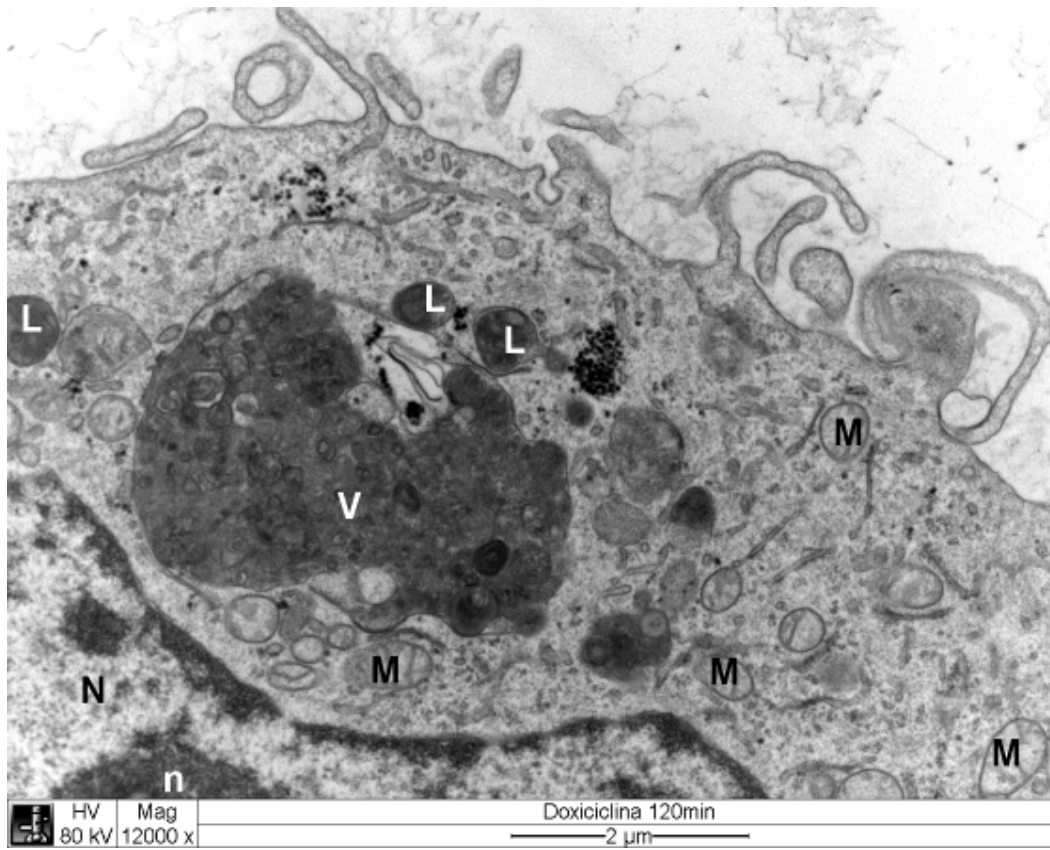


Figura 19- Eletromicrografia de cultura de células DH82 infectadas com *E. canis*, duas horas após a adição de doxiciclina no meio de cultura. N: núcleo; n: nucléolo; L: lisossomo; M: mitocôndria; V: vacúolo contendo material em degradação.

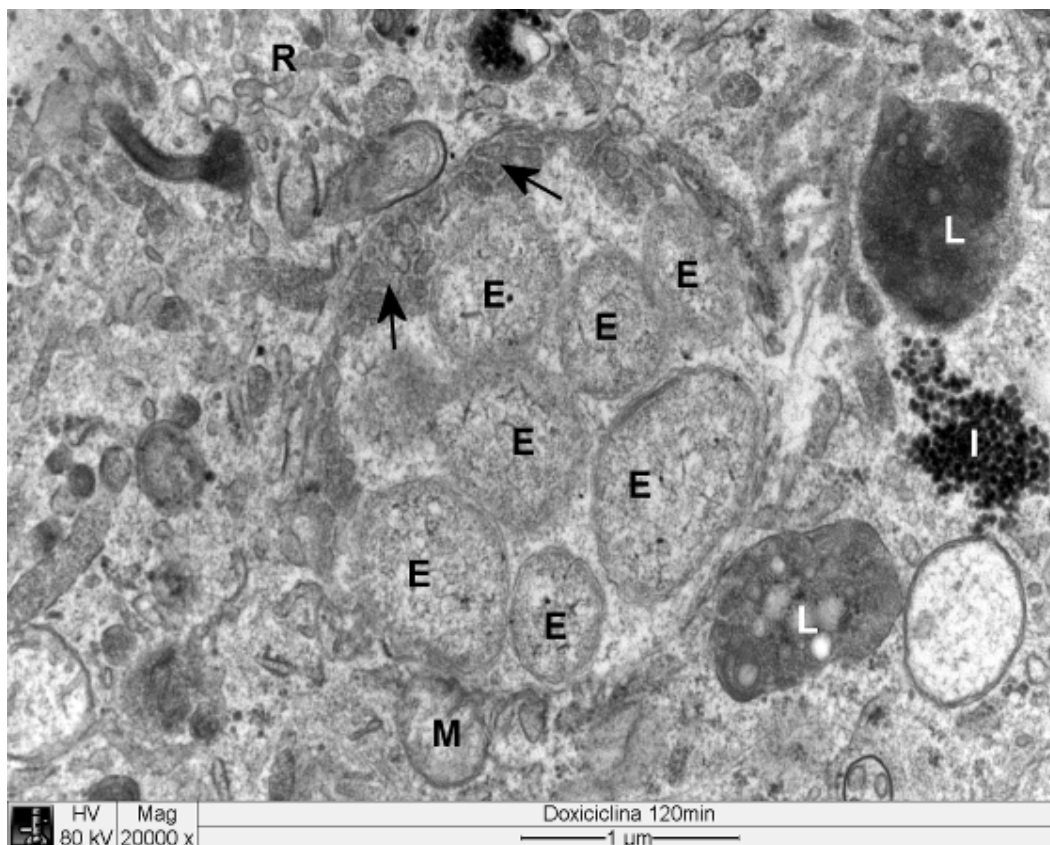


Figura 20- Eletromicrografia de cultura de células DH82 infectadas com *E. canis*, duas horas após a adição de doxiciclina no meio de cultura. L: lisossomo; R: região rica em retículo endoplasmático; E: *E. canis* clara no interior de vacúolo parasitóforo; I: inclusão citoplasmática eletrondensa granular; seta preta: fragmentação da membrana do vacúolo parasitóforo.

IV.3- Doxíciclina - 24 horas

Após 24 horas, a cultura de células DH82 infectadas por *E. canis* e tratadas com Doxíciclina apresentava a maioria das células com forma e núcleo semelhantes aos das células do controle (Fig. 21). Ainda foi possível observar estruturas que sugeriam processos de fagocitose ativa (Fig. 22). Aparentemente o número de mitocôndrias estava menor. Os retículos endoplasmáticos liso e granular estavam com forma e quantidade semelhante ao controle. Os acúmulos de substância granular eletrondensa observados nas células tratadas com doxíciclina por duas horas ainda foram observados, mas com frequência muito menor (Fig. 23). Várias células degeneradas foram observadas e com diferentes aparências. Algumas continham grande quantidade de pequenas vesículas espalhadas pelo citoplasma misturadas à cromatina, já que não possuíam envoltório nuclear íntegro (Fig. 24). Outras possuíam retículo endoplasmático e Golgi dilatados e mitocôndrias com espaço intermembranoso eletrondenso (Fig. 25). Outras ainda possuíam núcleo com cromatina condensada e formação de grande rede de túbulos que tendiam a causar fragmentação celular (Fig. 26).

Algumas mórulas com aparência normal ainda foram observadas (Fig. 27), mas a maioria das vezes apenas foram observados vacúolos com material degradado com as várias aparências descritas com duas horas de tratamento (Fig. 28 e 29). Várias células apresentavam estruturas que indicavam exocitose do material pré-degradado (Fig. 30).

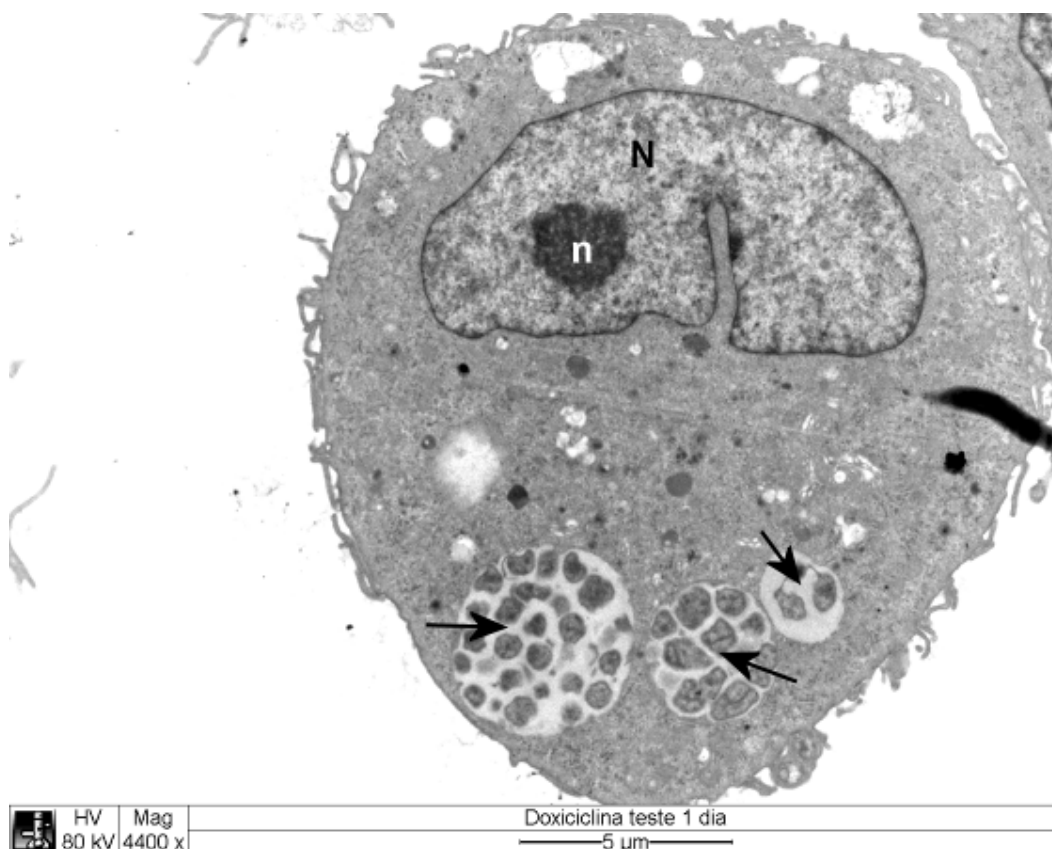


Figura 21- Eletromicrografia de cultura de células DH82 infectadas com *E. canis*, 24 horas após a adição de doxiciclina no meio de cultura. N: núcleo; n: nucléolo; seta preta: mórula composta de *E. canis* densas.

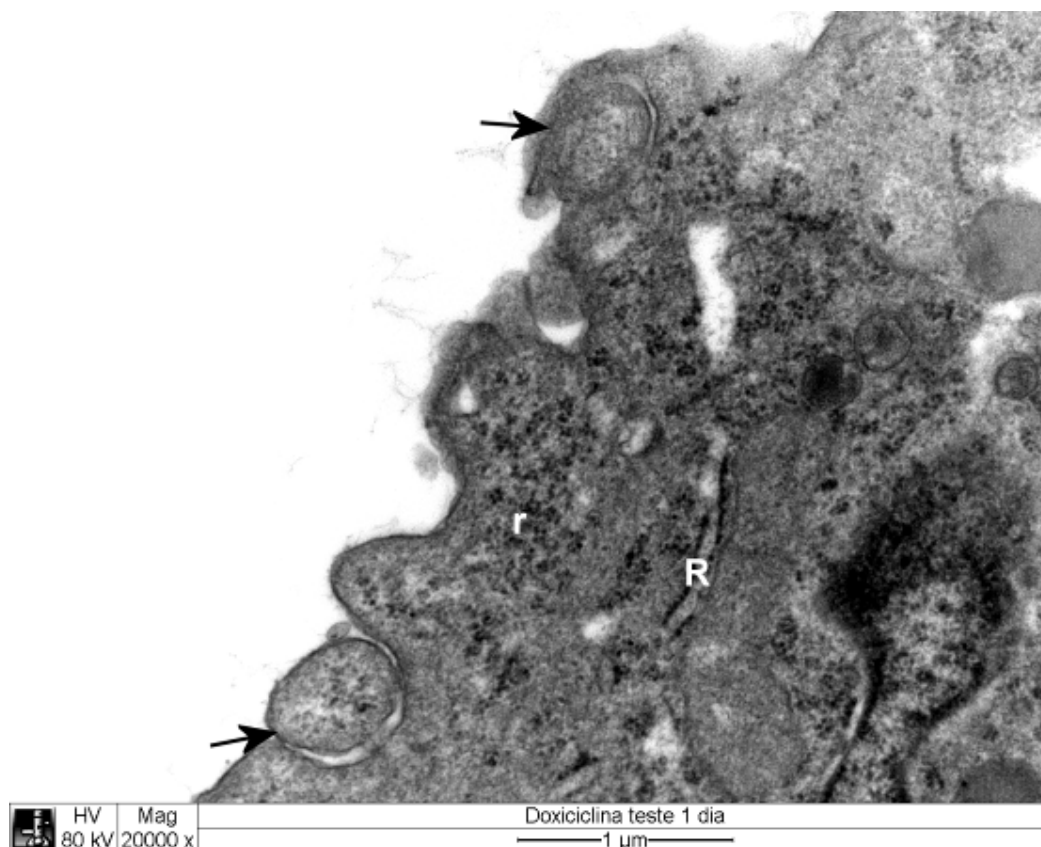


Figura 22- Eletromicrografia de cultura de células DH82 infectadas com *E. canis*, 24 horas após a adição de doxiciclina no meio de cultura. R: retículo endoplasmático granular; r: ribossomas livres; seta preta: estrutura sugestiva de fagocitose.

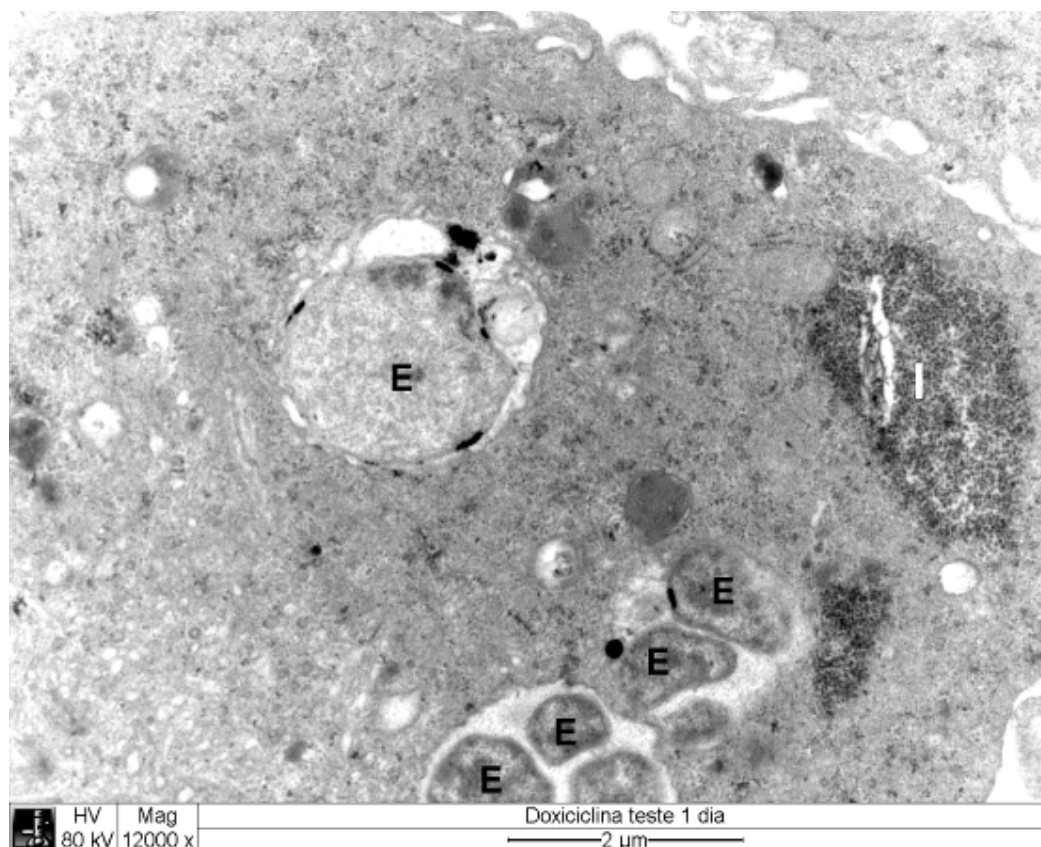


Figura 23- Eletromicrografia de cultura de células DH82 infectadas com *E. canis*, 24 horas após a adição de doxiciclina no meio de cultura. I: inclusão citoplasmática eletrondensa granular; E: *E. canis* no interior de vacúolo parasitóforo.

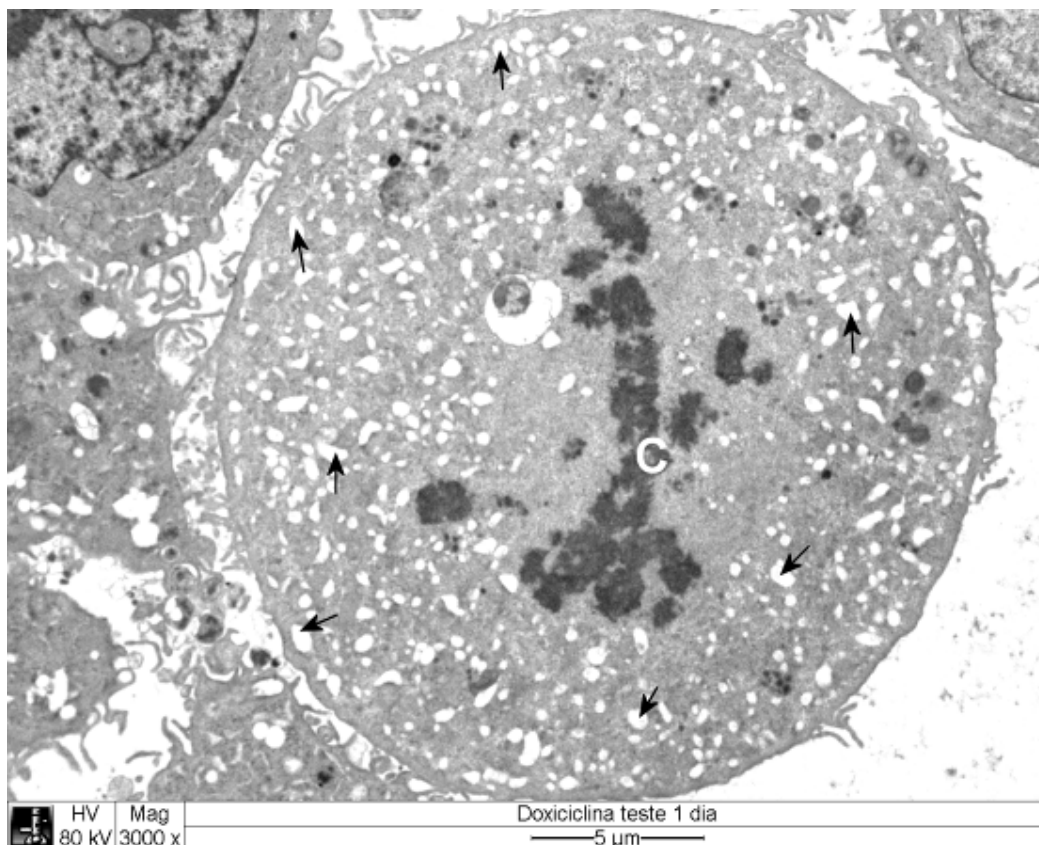


Figura 24- Eletromicrografia de cultura de células DH82 infectadas com *E. canis*, 24 horas após a adição de doxiciclina no meio de cultura. C: cromatina; seta preta: vesícula citoplasmática.

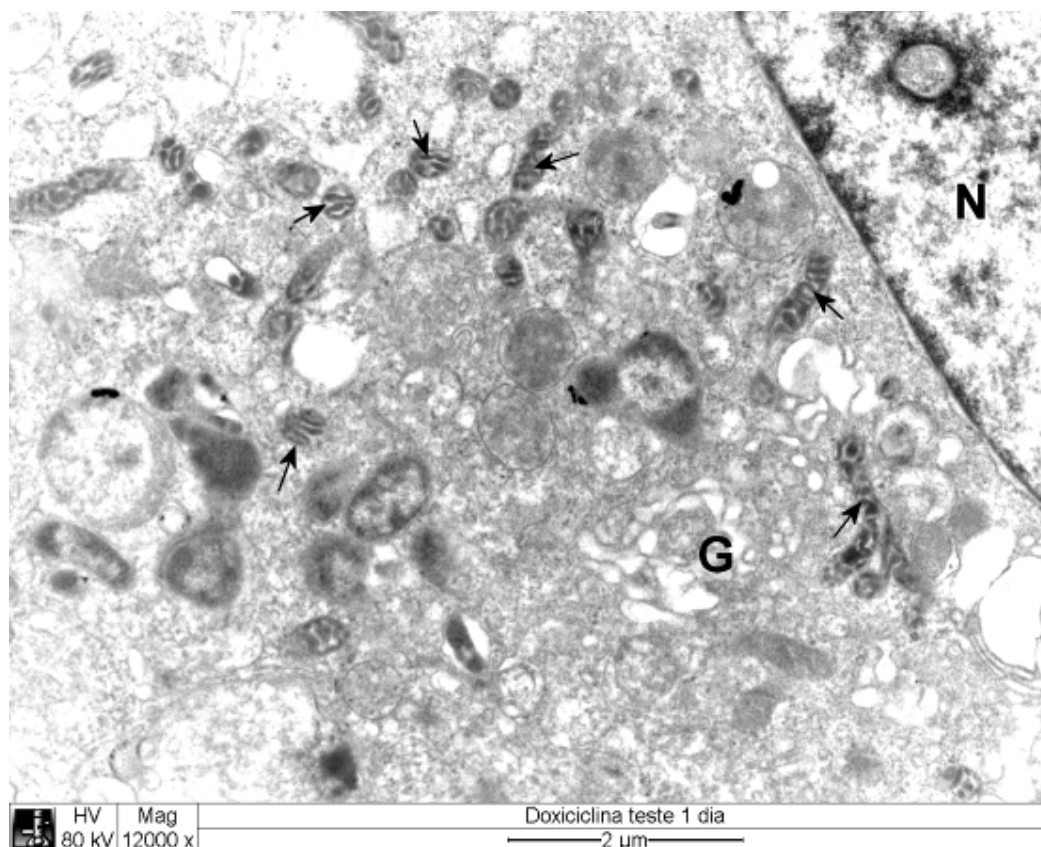


Figura 25- Eletromicrografia de cultura de células DH82 infectadas com *E. canis*, 24 horas após a adição de doxiciclina no meio de cultura. N: núcleo; G: aparelho de Golgi; seta preta: mitocôndria com espaço intermembranoso eletrondenso.

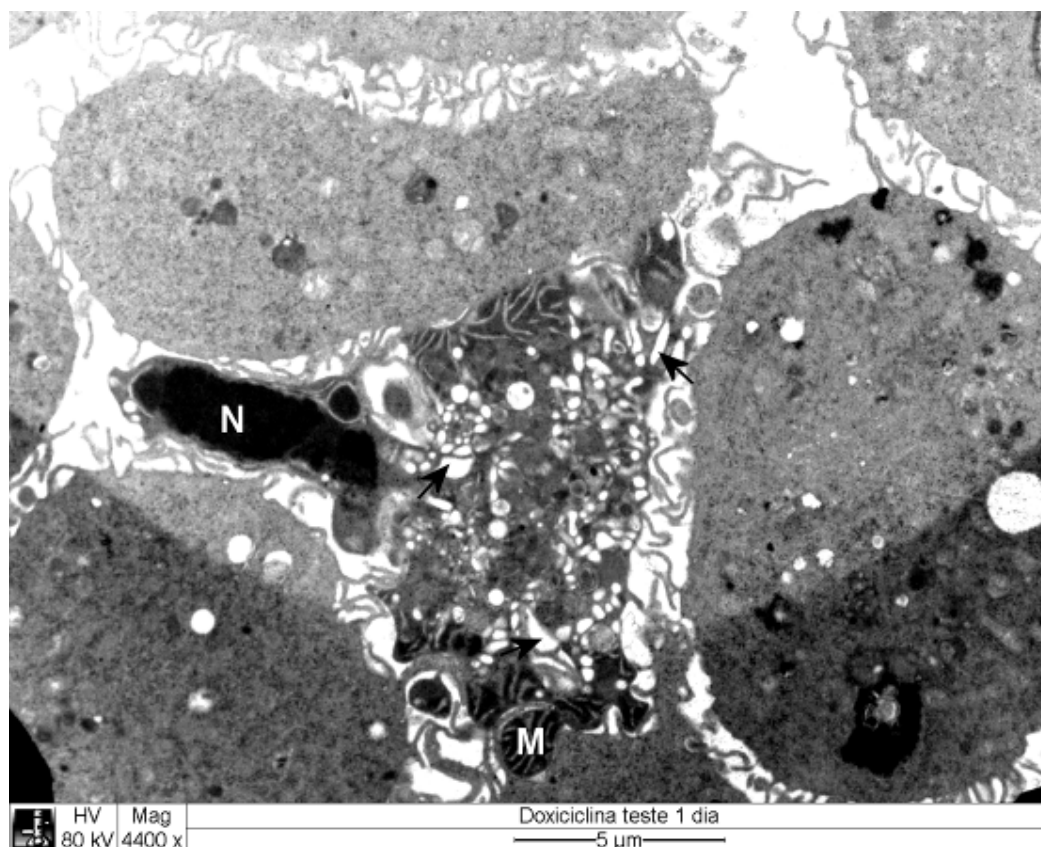


Figura 26- Eletromicrografia de cultura de células DH82 infectadas com *E. canis*, 24 horas após a adição de doxiciclina no meio de cultura. N: núcleo; M: mitocôndria com espaço intermembranoso eletrondenso; seta preta: rede de túbulos.

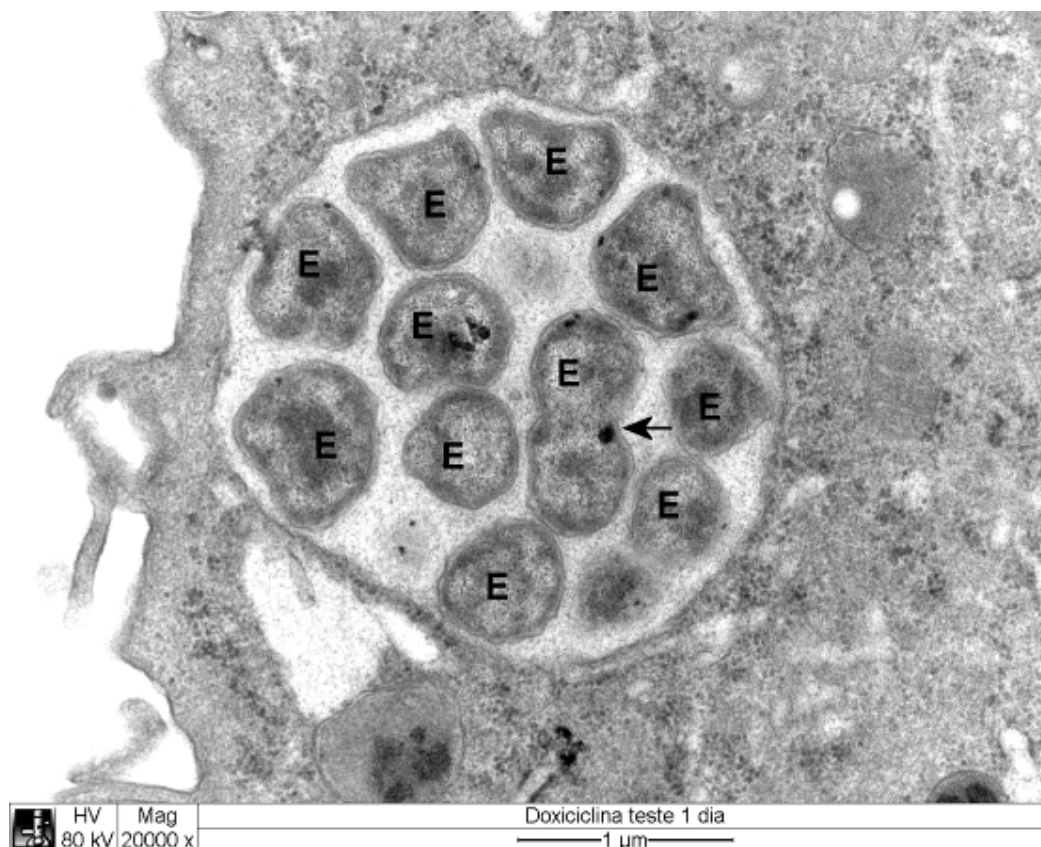


Figura 27- Eletromicrografia de cultura de células DH82 infectadas com *E. canis*, 24 horas após a adição de doxiciclina no meio de cultura. E: *E. canis* no interior de vacúolo parasitóforo; seta preta: provável início de divisão binária.



Figura 28- Eletromicrografia de cultura de células DH82 infectadas com *E. canis*, 24 horas após a adição de doxiciclina no meio de cultura. N: núcleo; E: *E. canis* com forma irregular no interior de vacúolo parasitóforo.

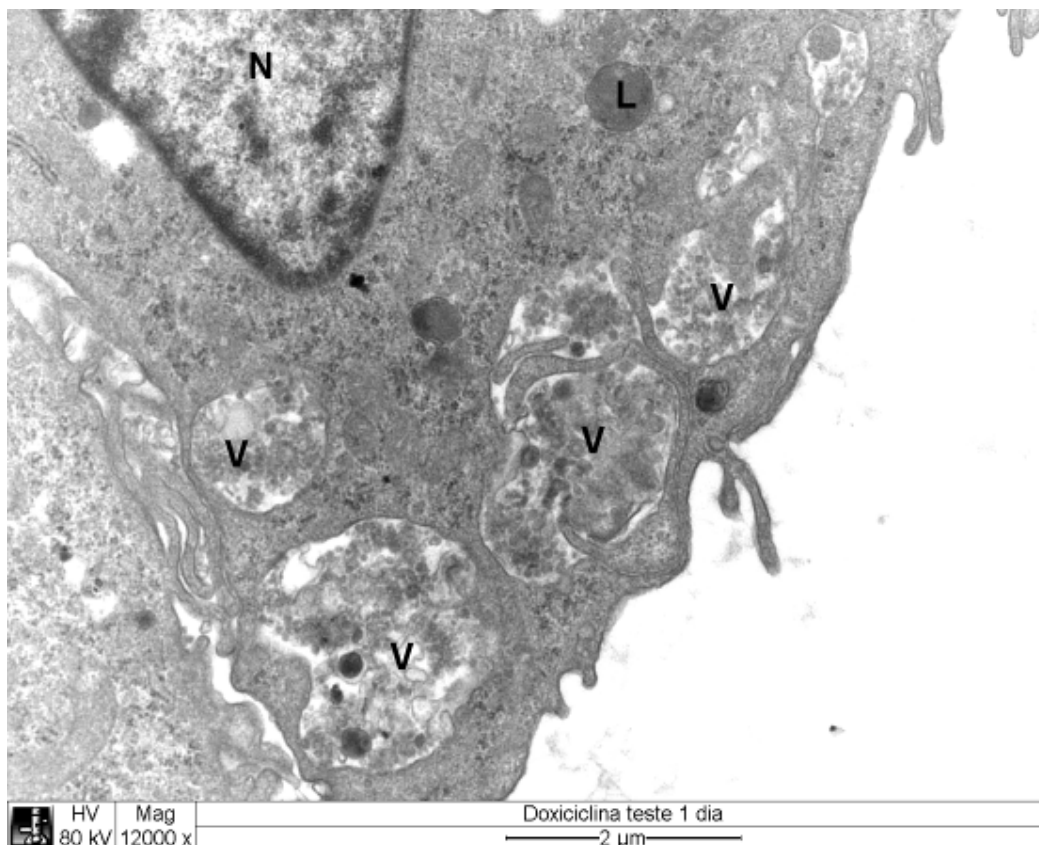


Figura 29- Eletromicrografia de cultura de células DH82 infectadas com *E. canis*, 24 horas após a adição de doxiciclina no meio de cultura. N: núcleo; V: Vacúolo com material degradado.

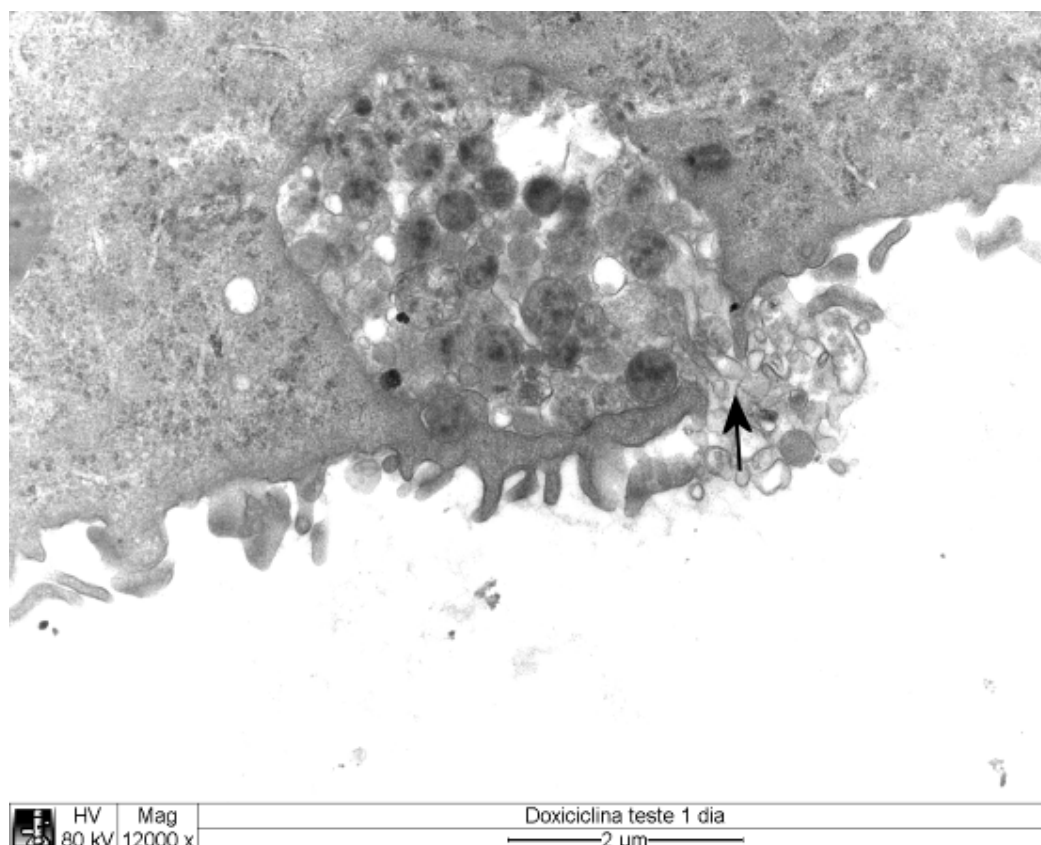


Figura 30- Eletromicrografia de cultura de células DH82 infectadas com *E. canis*, 24 horas após a adição de doxiciclina no meio de cultura. Seta preta: provável processo de exocitose.

IV.4- *Artemisia annua* L. - 2 horas

Após duas horas da adição de *Artemisia annua* L. ao meio de cultura das células DH82 infectadas por *E. canis*, as células apresentavam forma e núcleos semelhantes aos das controle (Fig. 31). Algumas poucas células apresentavam sinais de degeneração tal como dilatação das organelas membranosas (Fig. 32).

A maioria das mórulas apresentava-se na forma clara e sem sinais de alteração (Fig. 33). Foi possível observar bactéria em processo de divisão (Fig. 34). Geralmente as células que apresentavam sinais de degeneração possuíam mórulas na forma densamente compactada (Fig. 35). Raras células apresentavam vacúolos com conteúdo sugestivo de mórula degradada (Fig. 36). Outras apresentavam vacúolos parasitóforos contendo erlíquias com morfologia normal juntamente com pequenas vesículas membranosas e algumas com membrana dupla (Fig. 37).

Também foi possível observar estruturas sugerindo processo de exocitose (Fig. 38).

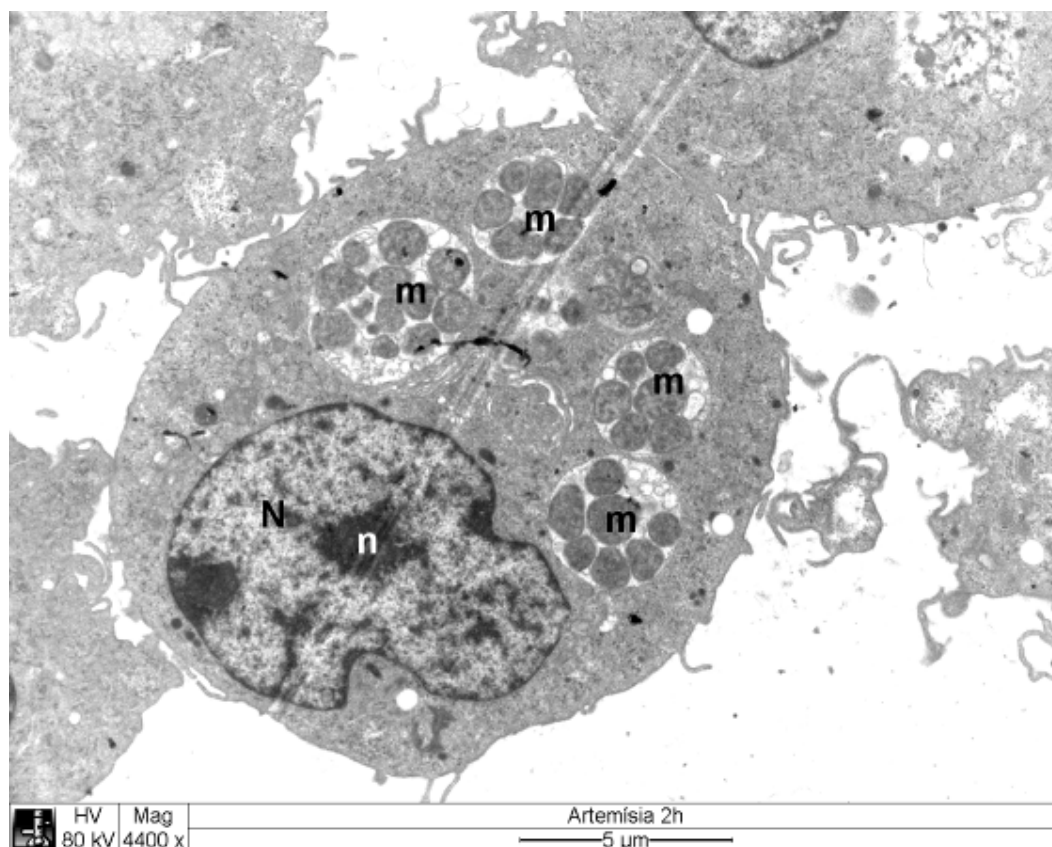


Figura 31- Eletromicrografia de cultura de células DH82 infectadas com *E. canis*, duas horas após a adição de infusão de *Artemisia annua* L. no meio de cultura. N: núcleo; n: nucléolo; m: mórula de *E. canis* clara.

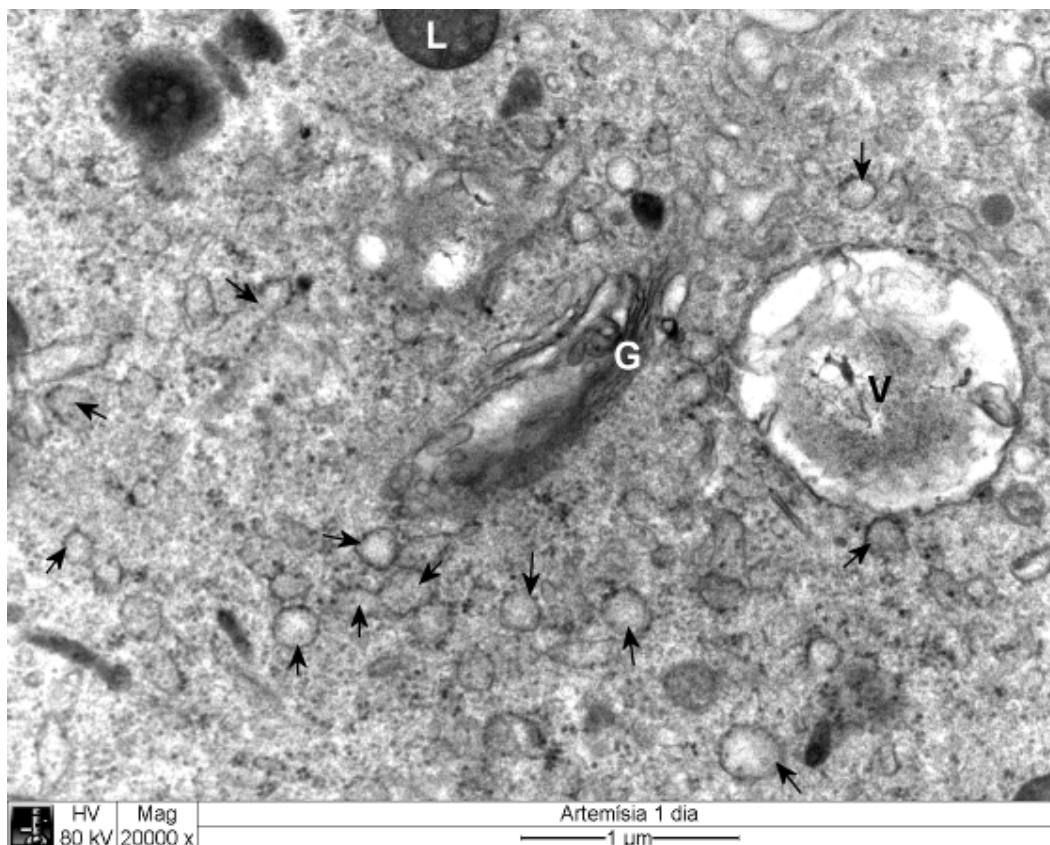


Figura 32- Eletromicrografia de cultura de células DH82 infectadas com *E. canis*, duas horas após a adição de infusão de *Artemisia annua* L. no meio de cultura. V: vacúolo com material degradado; G: aparelho de Golgi; L: lisossomo; seta preta: vesículas dilatadas do retículo endoplasmático granular.

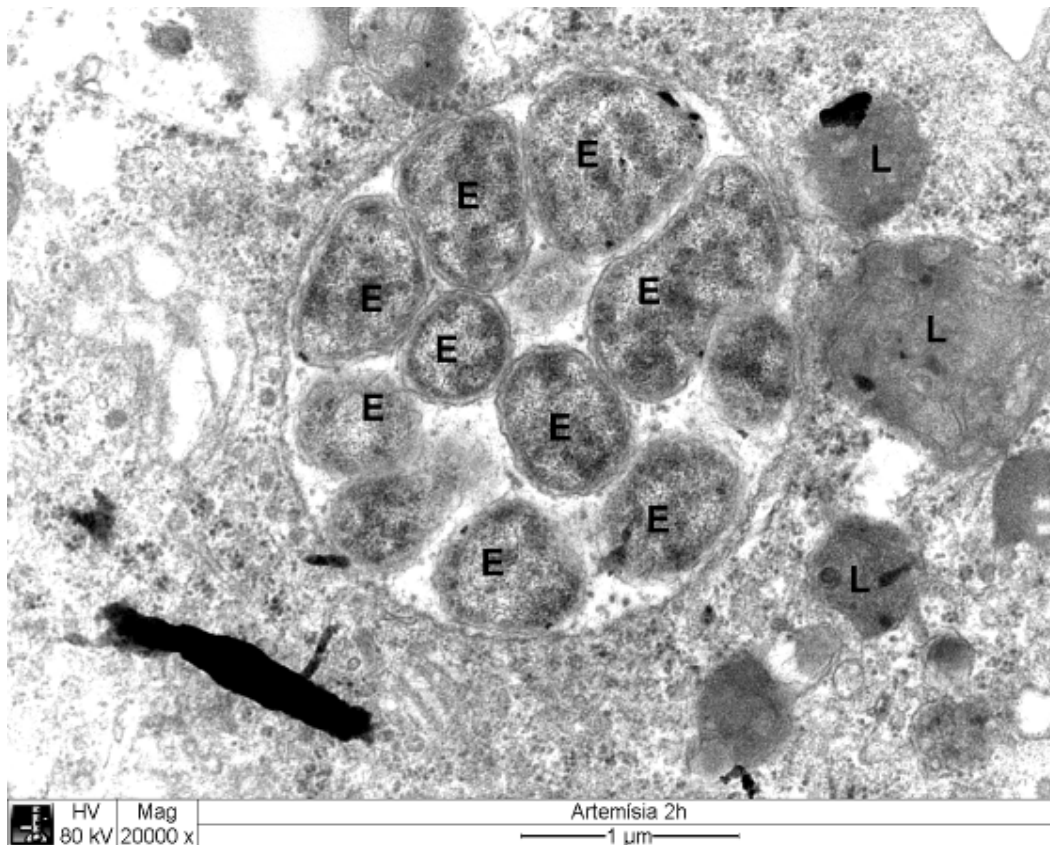


Figura 33- Eletromicrografia de cultura de células DH82 infectadas com *E. canis*, duas horas após a adição de infusão de *Artemisia annua* L. no meio de cultura. L: lisossomo; E: *E. canis* tendendo a evoluir para tipo densa.

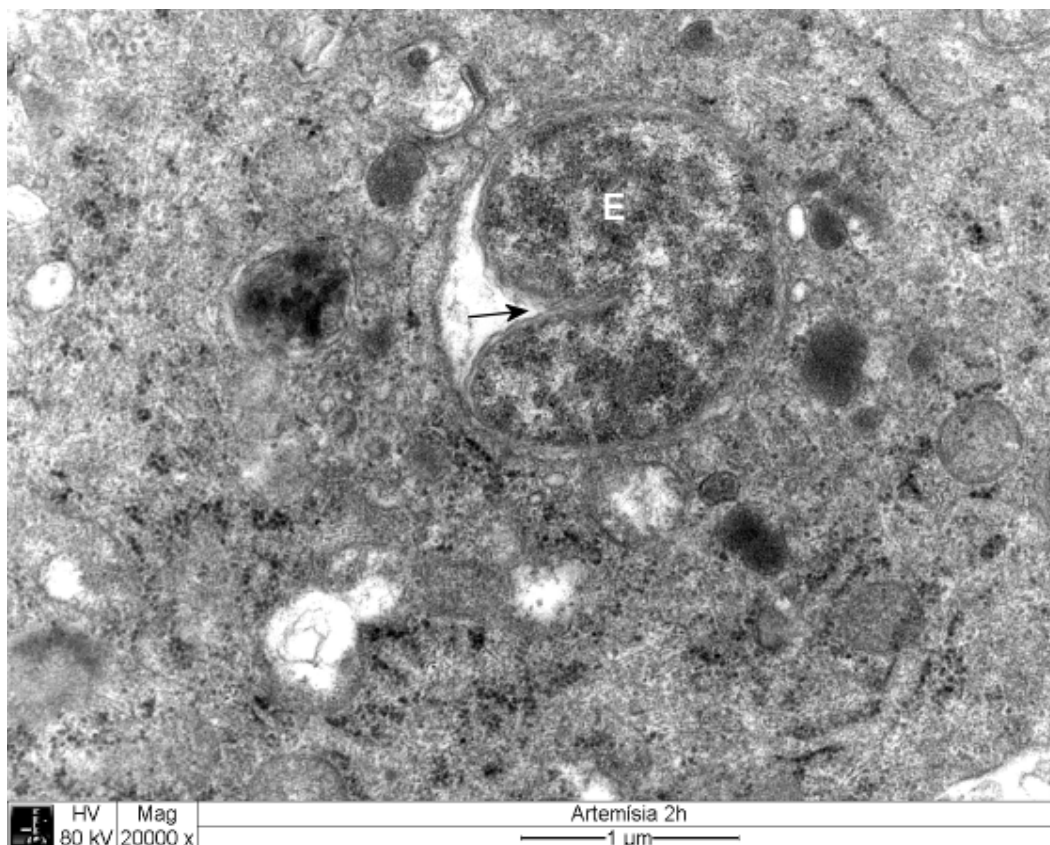


Figura 34- Eletromicrografia de cultura de células DH82 infectadas com *E. canis*, duas horas após a adição de infusão de *Artemisia annua* L. E: *E. canis* aparentemente sofrendo divisão binária.

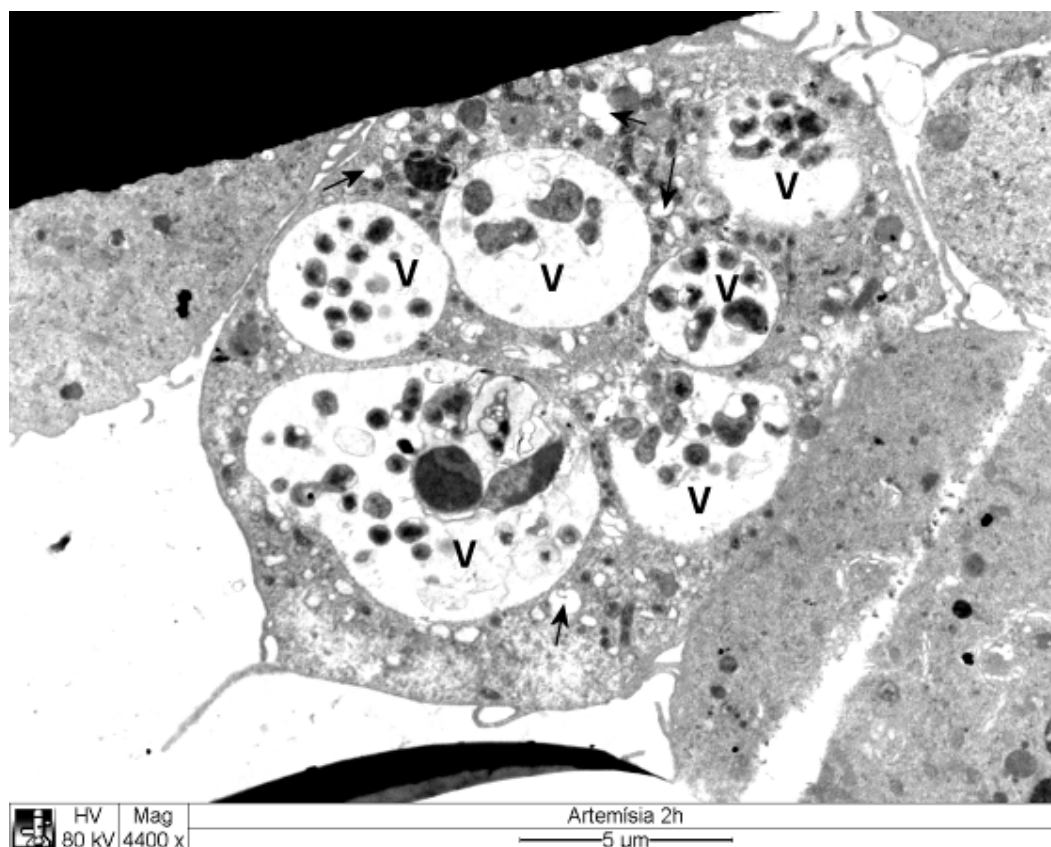


Figura 35- Eletromicrografia de célula DH82 em degeneração infectada com *E. canis*, duas horas após a adição de infusão de *Artemisia annua* L. no meio de cultura. V: vacúolo contendo *E. canis* densas em degradação; seta preta: vesículas citoplasmáticas.

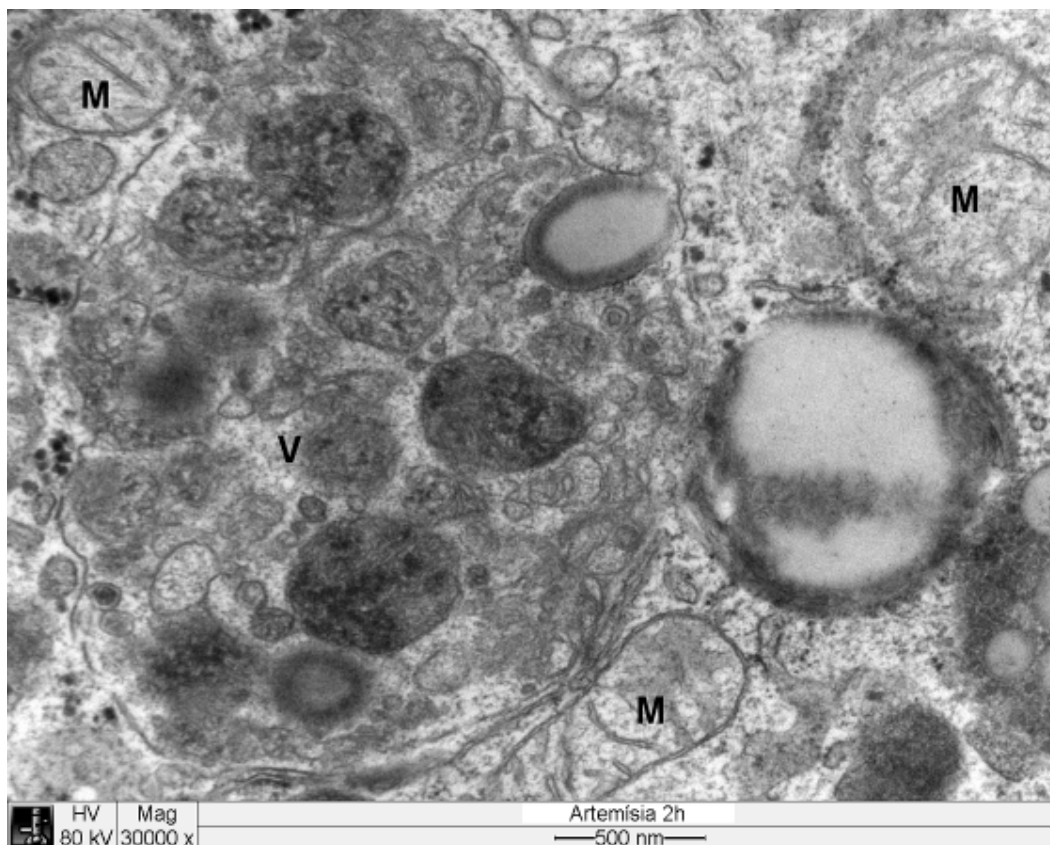


Figura 36- Eletromicrografia de cultura de células DH82 infectadas com *E. canis*, duas horas após a adição de infusão de *Artemisia annua* L. no meio de cultura. M: mitocôndria; V: vacúolo contendo *E. canis* em diversos estágios de degradação.

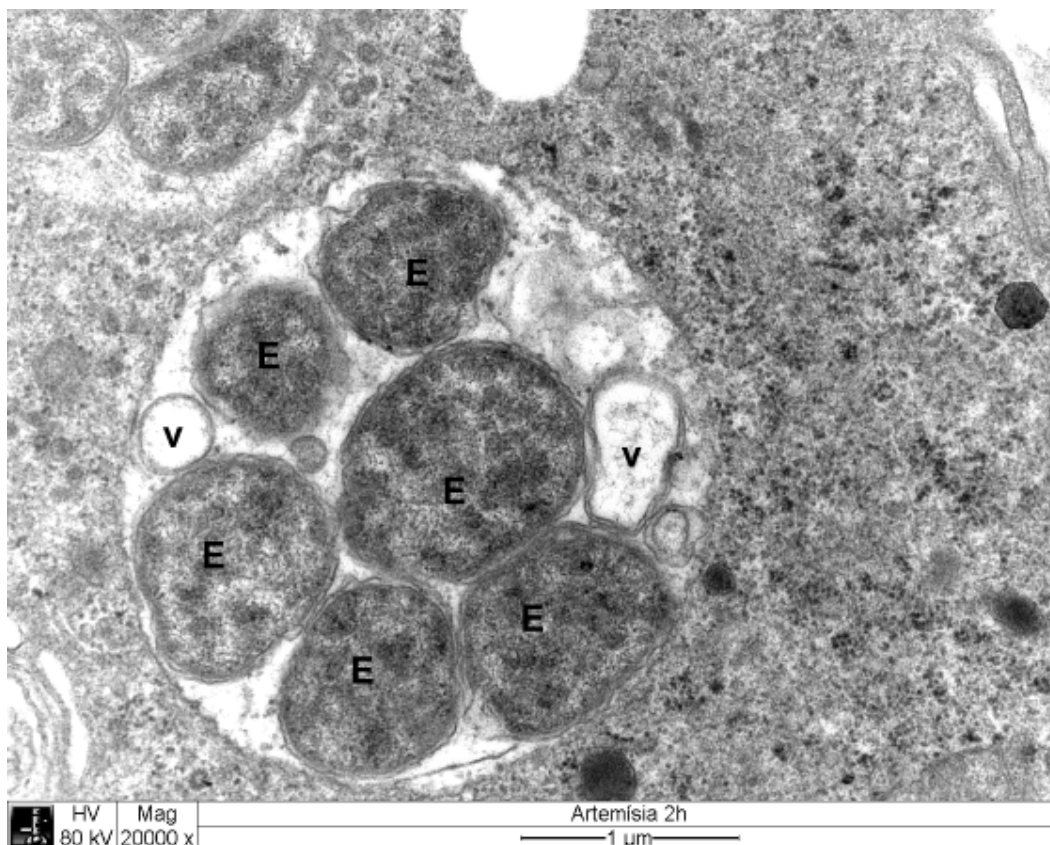


Figura 37- Eletromicrografia de cultura de células DH82 infectadas com *E. canis*, duas horas após a adição de infusão de *Artemisia annua* L. no meio de cultura. E: *E. canis* clara; v: vesícula de membrana dupla sugerindo ser *E. canis* degradada.

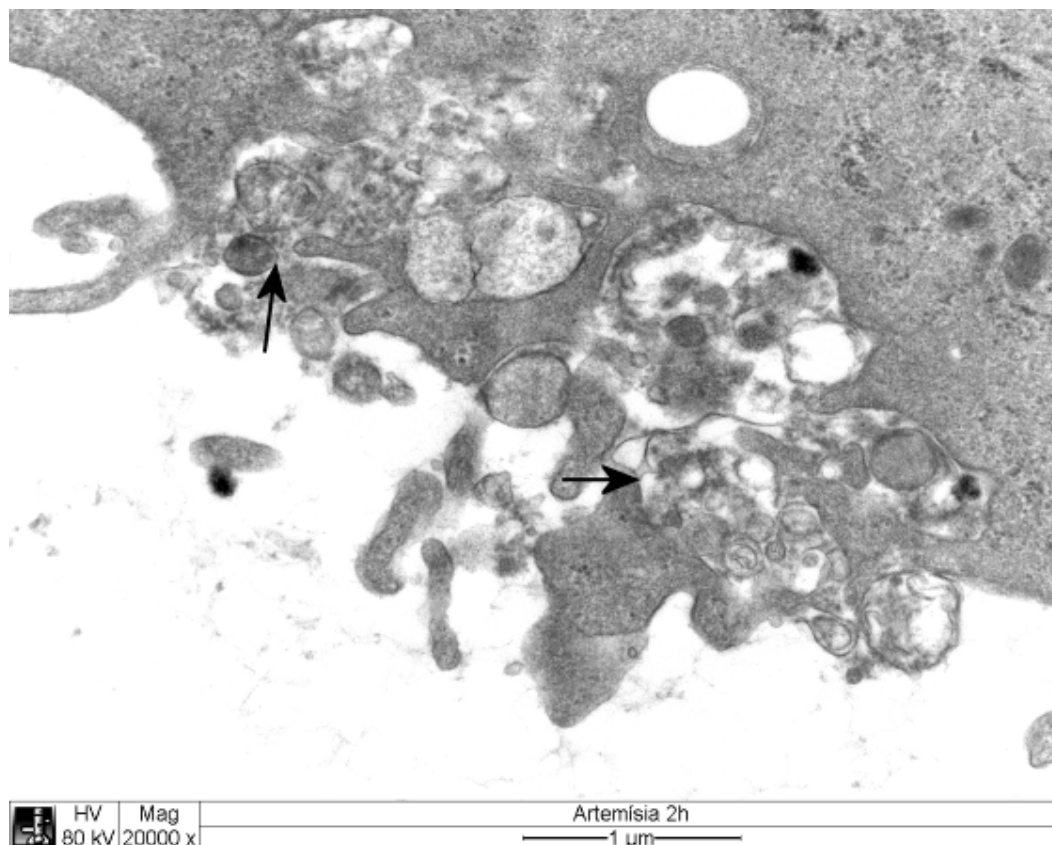


Figura 38- Eletromicrografia de cultura de células DH82 infectadas com *E. canis*, duas horas após a adição de infusão de *Artemisia annua* L. no meio de cultura. Seta preta: estrutura sugerindo processo de exocitose.

IV.5- *Artemisia annua* L. - 24 horas

Após 24 horas da adição de *Artemisia annua* L. ao meio de cultura das células DH82 infectadas por *E. canis* a maioria das células apresentava-se com forma e núcleo semelhantes aos das células do controle. Algumas vezes o núcleo da DH82 apresentava-se alongado (Fig.39). De maneira geral as mitocôndrias estavam circulares e com aparência normal. O retículo endoplasmático liso formado por pequenas vesículas e túbulos irregulares e o Golgi aparentemente estavam mais abundantes e dilatados (Fig. 40).

Algumas mórulas aparentemente normais foram observadas (Fig. 41), mas a maioria das vezes elas eram formadas por bactérias com conteúdo irregular e com material fibrilar abundante (Fig. 40 e 42), às vezes com as membranas rompidas (Fig. 42). Vacúolos contendo material em processo de degradação avançada foram raramente observados.

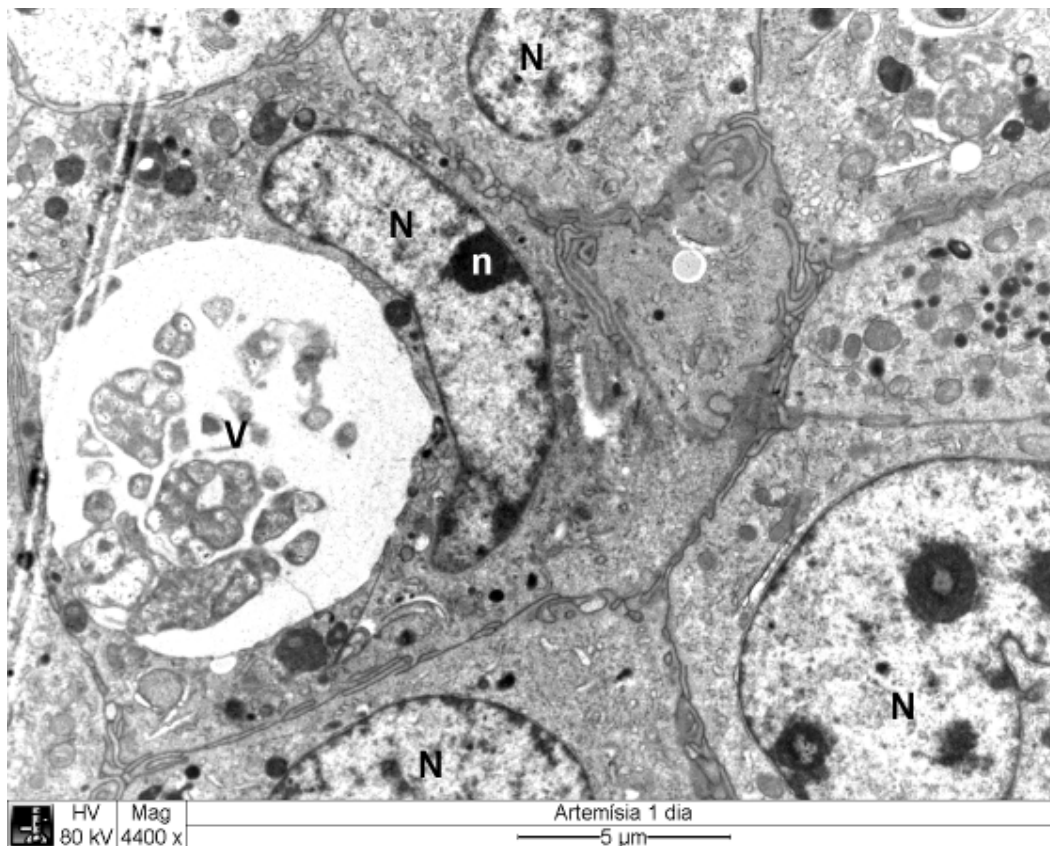


Figura 39: Eletromicrografia de cultura de células DH82 infectadas com *E. canis*, 24 horas após a adição de infusão de *Artemisia annua* L. no meio de cultura. N: núcleo; n: nucléolo; V: vacúolo contendo *E. canis* clara degradada.

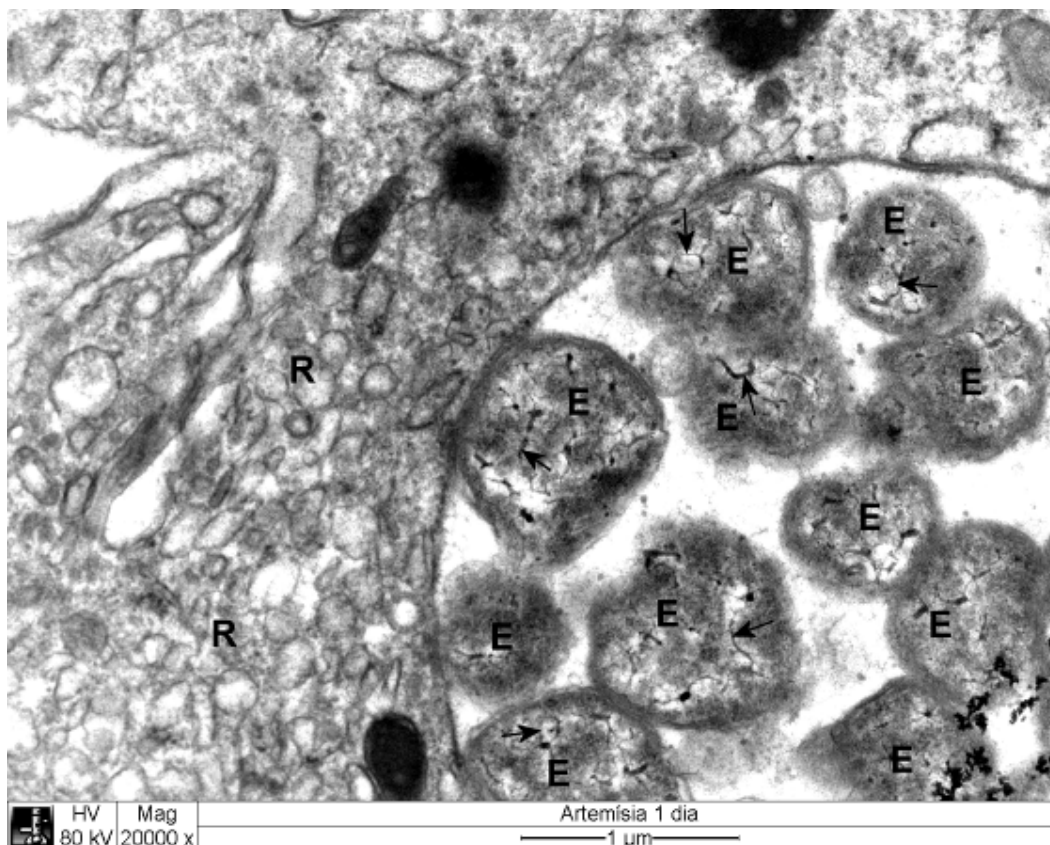


Figura 40: Eletromicrografia de cultura de células DH82 infectadas com *E. canis*, 24 horas após a adição de infusão de *Artemisia annua* L. no meio de cultura. R: região rica em retículo endoplasmático; E: *E. canis* clara; seta preta: material fibrilar no protoplasma da *E. canis*.

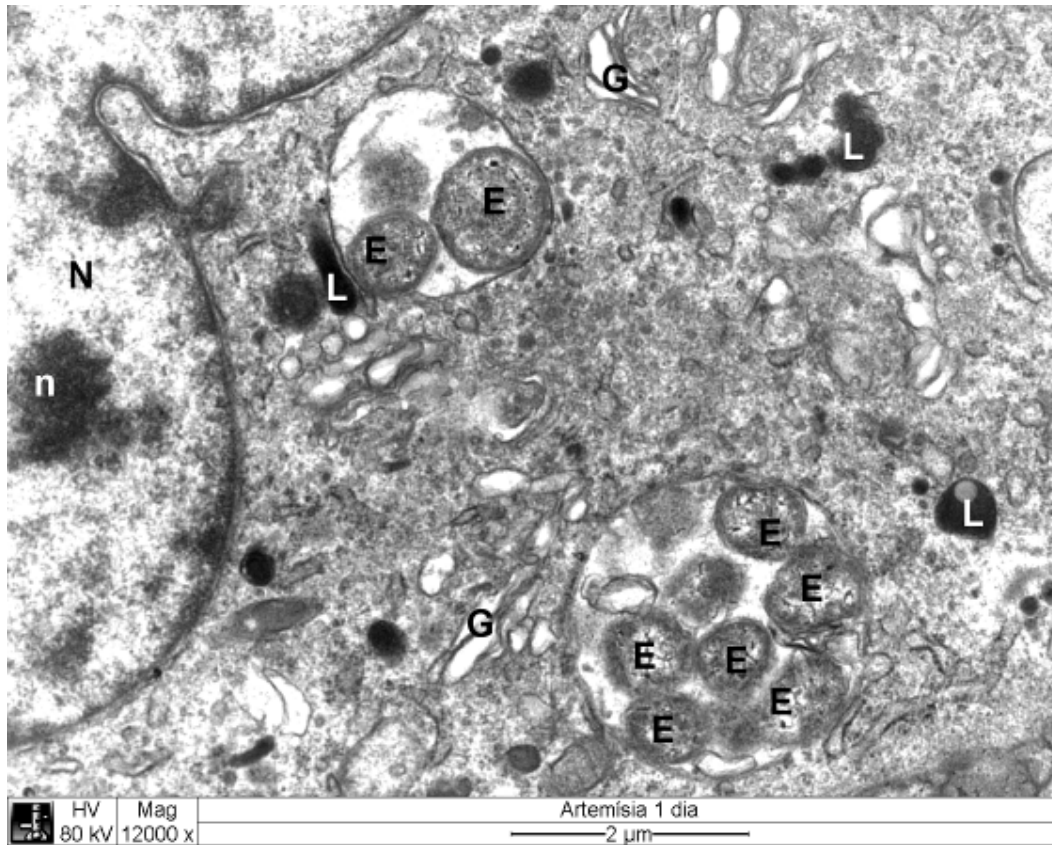


Figura 41- Eletromicrografia de cultura de células DH82 infectadas com *E. canis*, 24 horas após a adição de infusão de *Artemisia annua* L. no meio de cultura. N: núcleo; n: nucléolo; G: aparelho de Golgi; L: lisossomo; E: *E. canis* clara.

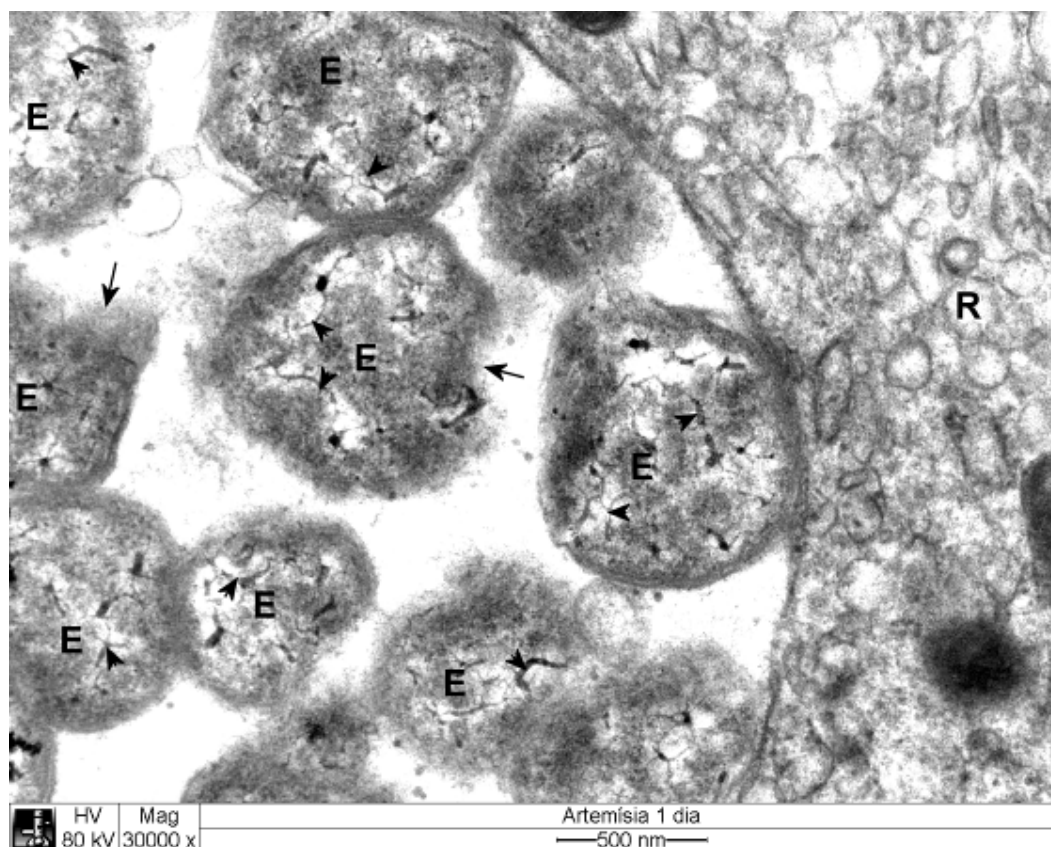


Figura 42: Eletromicrografia de cultura de células DH82 infectadas com *E. canis*, 24 horas após a adição de infusão de *Artemisia annua* L. no meio de cultura. E: *E. canis* clara; seta preta: região de ruptura das membranas da *E. canis*; cabeça de seta: material fibrilar no interior do protoplasma da *E. canis*.

V- DISCUSSÃO

V.1- Controle

A ultra-estrutura das células DH82 infectadas com *E. canis* observada no presente trabalho é muito semelhante ao descrito por Rikihisa (1991), Davoust (1993), Keysary et al. (1996), Perez et al. (1996) e Popov et al. (1998).

A tendência do retículo endoplasmático e das mitocôndrias estarem próximos aos vacúolos parasitóforos também foi descrito por Popov et al. (1998). Como as mitocôndrias localizam-se naturalmente em regiões citoplasmáticas com maior gasto de ATP (ALBERTS et al., 2007), isto demonstra que provavelmente as bactérias no interior destes vacúolos estejam utilizando o maquinário citoplasmático para suprir parte de suas exigências metabólicas.

A observação eventual de lisossomos contendo material reticulado geometricamente simétrico geralmente caracteriza lisossomos primários (ALBERTS et al., 2007). Já aqueles com predomínio de material eletrondenso, porém com regiões eletronlúcidas, provavelmente sejam lisossomos que já tenham fundido com vacúolos endocíticos (ALBERTS et al., 2007).

A observação de vacúolos contendo grande quantidade de material diferente de mórulas demonstra a capacidade natural de macrófagos em cultura celular de fagocitar debris celulares e assemelhados (BELOSEVIC et. al., 2006).

Os dois tipos de mórula observados no presente trabalho também foram claramente descritos por Keysary et al. (1996), e Popov et al. (1998) e Walker (2006). Popov e colaboradores (1998) avaliando as linhagens Oklahoma e o Isolado Venezuelano Humano (VHE) de *E. canis*, constataram que em *E. canis* existia grandes mórulas com muitas erliquias densamente compactadas. No entanto, na infecção natural por *E. muris* e *E. equi* não observaram células densamente compactadas. Na época sugeriram quatro possíveis explicações para este achado: erliquias densamente compactadas não existiriam em infecção aguda animal ou humana; elas seriam formadas raramente e a pequena quantidade de mórulas examinadas, comparada ao modelo em cultura de células, não permitiu sua

detecção; elas se formariam quando a carga parasitária de erliquia fosse alta, como por exemplo, em infecção experimental em cultura celular e esta situação ocorreria somente tardiamente em infecções naturais; alguns fatores específicos ou sinais da célula hospedeira causariam sua formação. Já para Walker (2006) a aparência dimórfica das erlíquias reflete o ciclo de desenvolvimento. Desse modo, erlíquias densamente compactadas seriam formas infecciosas, mas não se replicam; já as formas reticuladas, por nós denominadas de claras, se replicam, mas não seriam infecciosas. A observação no presente trabalho somente de bactérias clara, corrobora a proposta de Walker (2006), no entanto também foram observadas algumas bactérias claras livres no meio de cultura e sendo fagocitadas pelas células DH82, bem como, vacúolos parasitóforos com uma única célula clara morfolologicamente perfeita. Isso demonstra que pelo menos *in vitro* a forma clara também é infecciosa. A observação de maior número de mórulas compostas por erlíquias densas no controle 24 horas comparada a 2 horas corrobora com a idéia de que elas se formariam quando a carga parasitária de erliquia fosse alta, como por exemplo, em infecção experimental em cultura celular e esta situação ocorreria somente tardiamente em infecções naturais, pois a parasitemia após 24 horas seria maior do que no início do experimento.

V.2- Doxíciclina 2 horas

A presença de material eletrondenso granular nas células DH82 após 2 horas da adição de doxíciclina sugere que o antibiótico absorvido constituiria estas inclusões citoplasmáticas ou levaria à formação precoce das mesmas. Além da presença destas inclusões, as células apresentaram outras alterações nas organelas, mas sem que estas perdessem suas funções, pois claramente as células continuavam a fazer fagocitose e fusão de vacúolos endocíticos com lisossomos.

O principal mecanismo de ação da doxíciclina é a inibição da síntese protéica, assim como de outras tetraciclina. Ela exerce atividade bacteriostática por inibir a síntese protéica ao impedir a ligação do t-RNA à subunidade menor do ribossomo bacteriano - 30S, causando a ruptura das interações códon-anticódon entre RNA transportador e RNA mensageiro e conseqüente do vínculo entre o aminoacil-RNA-transportador e seu sítio de ligação do ribossoma. A

farmacocinética e biodisponibilidade de tetraciclina são afetadas pelo cátion a que está ligada. No plasma sanguíneo, a droga é transportada como complexos de cálcio. No meio intracelular, complexos de magnésio parecem ser mais importantes, já que provavelmente desempenham um papel na ligação aos ribossomos (JOSHI; MILLER, 1997; GUERRA et al., 2006). Além disso, a Doxiciclina induz danos na membrana citoplasmática, promovendo assim, a perda de nucleotídeos e outros componentes celulares (JOSHI; MILLER, 1997). Apesar de atuar na subunidade 30S do ribossomo de procariontes, unidade essa substituída pela 40S em eucariontes, as tetraciclina possuem efeitos colaterais aqui demonstrados por essas alterações celulares (ALBERTS et al., 2007). É oportuno salientar que as mitocôndrias possuem maquinário de síntese protéica próprio muito semelhante à de bactérias e poderia ser influenciado pela doxiciclina;

Apesar da doxiciclina ser considerada bacteriostática (JOSHI; MILLER, 1997; GUERRA et al., 2006), apenas duas horas de tratamento provocavam a degradação da maioria das mórulas. Segundo Joshi e Miller (1997) além de bloquear a síntese protéica das bactérias, as tetraciclina também induzem danos à membrana citoplasmática, o que no presente trabalho levou à destruição da maioria das bactérias, caracterizando este antibiótico também como bactericida nessas condições experimentais.

V.3- Doxiciclina - 24 horas

Após 24 horas da adição de doxiciclina, o material eletrondenso granular foi raramente observado. É importante salientar que não foi acrescentado ou trocado meio de cultura após a adição de doxiciclina. Assim, o antibiótico pode ter sido metabolizado pelas células.

A maioria das células DH82 apresentava vacúolos com debris celulares e mórulas em estado avançado de degradação. No entanto, ainda foi possível observar mórulas morfolologicamente normais. Provavelmente, as bactérias que foram afetadas precocemente evoluíram para a degradação total. No entanto, algumas não chegaram a ser afetadas gravemente antes da diminuição da concentração de antibiótico ativo no meio de cultura, permanecendo viáveis para provavelmente continuar a infecção de outras células.

De forma semelhante, as células DH82 que foram afetadas mais intensamente antes da diminuição da concentração do antibiótico, evoluíram para a necrose. A observação de diversas formas de células em degeneração poderia significar estágios diferentes desse processo.

Frequentemente foram observadas células viáveis com estruturas em sua superfície que sugeriam processo de exocitose, demonstrando que a célula continua com suas atividades funcionais. Apesar de serem mais indicativas de exocitose, estas observações poderiam ser de processos de fagocitose, mas igualmente demonstrariam a atividade celular.

V.4- *Artemisia annua* L. - 2 horas

A *Artemisia annua* L. é utilizada principalmente no tratamento de malária, sendo que atualmente já são utilizadas formas sintéticas do princípio artemisinina (BALINT, 2001) e alguns derivados, como artesunato de sódio, arteméter, arteéter, ácido artelínico e dihidroartemisinina (BORSTNIK et al., 2002; CHEN et al., 2003). A ação da artemisinina descrita na malária é muito específica, atuando em duas etapas: quebra da ponte endoperóxido gerando radicais livres instáveis e espécies eletrofílicas; e formação de aductos covalentes entre a artemisinina e proteínas do parasito (BALINT, 2001). No presente trabalho, após duas horas da adição de infusão de *Artemisia annua* L., foram observadas mórulas com estruturas sugestivas de bactérias degradadas juntamente com outras aparentemente normais. Isso sugere uma ação do fármaco na *E. canis*, porém não necessariamente semelhante ao descrito para malária.

Apesar da existência de células DH82 com sinais de degeneração, também foram observadas situações que sugeriram atividade celular normal. A artemisinina e alguns de seus derivados semi-sintéticos também apresentaram atividade antitumoral (CHEN et al., 2003). Levando em consideração que as células DH82 são oriundas de histiocitoma canino, a presença de células degeneradas pode ser por ação semelhante.

V.5- *Artemisia annua* L. - 24 horas

Nessa etapa foram observadas muitas células com retículo endoplasmático e Golgi dilatados. A infusão adicionada ao meio não teve sua osmolaridade testada e corrigida, estando provavelmente hipotônica, o que poderia justificar a dilatação

dessas organelas. Não se pode descartar uma possível ação tóxica da *Artemisia annua* L.

As mórulas eram compostas principalmente de bactérias com sinais de degeneração, porém várias ainda possuíam bactérias aparentemente normais. Comparativamente ao tratamento com doxiciclina, além de existirem mais mórulas aparentemente normais, as em degeneração estavam menos degradadas. Isso sugere uma ação mais bacteriostática do que bactericida.

Apesar da *Artemisia annua* L. ser menos ativa contra *E. canis* em cultura de células DH82, fica clara sua atividade anti-erlíquia, podendo tornar-se um tratamento alternativo após estudos *in vivo*.

VI- CONCLUSÕES

- Doxiciclina e *Artemisia annua* L são levemente tóxicas para células DH82
- *Artemisia annua* L possui atividade anti-erlíquia em cultura de células DH82
- A doxiciclina é mais eficiente do que *Artemisia annua* L. contra *E. canis* em cultura de células DH82

VII- REFERÊNCIAS

ADEYANJU, B.L.; ALIU, Y.O. Chemotherapy of canine ehrlichiosis and babesiosis with imidocarb dipropionate. **Journal of the American Animal Hospital Association**, Denver, v.18, p.827-830, 1982.

AGUIAR, D. M. **Aspectos epidemiológicos da erliquiose canina no Brasil**. São Paulo, SP. 2006. 95f. Tese (Doutorado em Epidemiologia) Universidade de São Paulo, São Paulo.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A., RAFF, M. ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. 5ed. New York, Garland Science, 2007, 1392p.

ANDEREG, P. I.; PASSOS, L.M.F. Erliquiose Canina: revisão. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v.4, n.18, p. 31-38, 1999.

ANDRADE, S.F.; SANTARÉM, V.A. Endoparasitídeos e ectoparasitídeos. In: ANDRADE, S.F. **Manual de terapêutica veterinária**. 2 ed.: Roca: São Paulo, cap. 18, p.437-476, 2002.

AUTRAN de MORAIS, H.; HOSKINS, J.; ALMOSNY, N.R.P.; LABARTHE, N. Diretrizes gerais para o diagnóstico e manejo de cães infectados por *Ehrlichia* spp **Clínica Veterinária**, São Paulo, n.48, p. 28-30, 2004.

BALINT, G.A. Artemisinin and its derivatives: an important new class of antimalarial agents. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 90, n.2, p. 261-265, 2001.

BARR,S.C. Ehrlichiosis. In: TILLEY, L.P.; SMITH JR.; F.W.K. **The 5 minute veterinary consult**. Baltimore: Williams & Wilkins. p.538-539, 1997.

BARROS-BATTESTI, D.M.B.; ARZUA, M.; BECHARA, G.H. Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. Vox/ICTTD-3/Butantan, São Paulo/BR, p.223, 2006.

BELOSEVIC, M.; HANINGTON, P.C.; BARREDA, D.R. Development of goldfish macrophages in vitro. **Fish & Shellfish Immunology**, New York, v.20, n.2, p.152-171, 2006.

BILIA, A.R.; MELILLO, M.P.; BERGONZI, M.C.; VINCIERI, F.F. Simultaneous analysis of artemisinin and flavonoids of several extracts of *Artemisia annua* L. obtained from a commercial sample and a selected cultivar. **Phytomedicine**, Amsterdam, v.13, n.7, p.487-493, 2006.

BORSTNIK, K.; PAIK, I.; SHAPIRO, T.A.; POSNER, G.H. Antimalarial chemotherapeutic peroxides: artemisinin, yingzhaosu A and related compounds. **International Journal for Parasitology**, Tolland, v. 32, n.13, p. 1661-1667, 2002.

BOUNOUS, D.I.; HOSKINS, J.D.; BOUDREAUX, M.K. O sistema hematopoiético. In: **Pediatria Veterinária: cães e gatos até 6 meses de idade**. São Paulo: Manole. Cap. 11 p. 317-351, 1992.

BRANGER, S.; ROLAIN, J.M.; RAOULT, D. Evaluation of antibiotic susceptibilities of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Anaplasma phagocytophilum* by real-time PCR. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 48, n. 12, p.4822-4828, 2004.

CHEN, H.H.; ZHOU, H.J.; FANG, X. Inhibition of human cancer cell line growth and human umbilical vein endothelial cell angiogenesis by artemisinin derivatives in vitro. **Pharmacological Research**, London, v. 48, n.2, p. 231-236, 2003.

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

COSTA-JUNIOR, L. M.; REMBECK, K.; RIBEIRO, M. F. B.; BEELITZ, P.; PFISTER, K.; PASSOS, L. M. F. Epidemiological study on canine ehrlichiosis in rural areas of state of Minas Gerais, Brazil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 14, SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RIQUETSIOSES, 2, Ribeirão Preto. **Anais...** p. 373, 2006.

COUTO, C.G. Doenças Rickettsiais. In: BICHARD, S.; E. SHERDING. **Manual Saunders**, São Paulo: Roca, 2.ed., 1998.

CUPP, E.W. Biology of ticks. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Filadélfia, v.21, n.1, p. 1-25, 1991.

D'ANGELO, J.G., BORDÓN, C., POSNER, G.H., YOLKEN, R., JONES-BRANDO, L. Artemisinin derivatives inhibit *Toxoplasma gondii* in vitro at multiple steps in the lytic cycle. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Birmingham, v.63, n.1, p.146–150, 2009.

DAGNONE, A. S. Caracterização molecular de espécies da Família Anaplasmataceae em leucócitos e plaquetas de cães de Jaboticabal-SP e de Campo Grande – MS. 2006. 118p. (Doutorado em Patologia Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, UNESP, Jaboticabal, SP, 2006.

DAVOUST, B. L'ehrlichiose canine. **Le Point Veterinaire**, Rueil Malmaison, v.25, n. 151, p. 43-51, 1993.

DUMLER, J. S.; ANTHONY, F. B.; CORNELIS, P. J.; BEKKER, G. A.; DASCH, G.H.; PALMER, S. C.; RAY, Y. R.; 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 'HE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.51, n.6, p. 2145-2165, 2001.

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**, Lakewood, v.21, n.6, p.1237-1242, 2007.

ESTRADA-PEÑA, A.; JONGEJAN, F. Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v.23, n.9, p. 685-715, 1999.

FARAH, S.B.; IN: DNA: Segredos & Mistérios. São Paulo: Savier, 2000.

GALVÃO, M.A.M., Erliquiose humana no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA,14, SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 2, p. 162, 2006.

GUERRA, W.; SILVA, I.R.; AZEVEDO, E.A. MONTEIRO, A.R.S.; BUCCIARELLI-RODRIGUEZ, M.; CHARTONE-SOUZA, E.; SILVEIRA, J.N.; FONTESD, A.P.S.; PEREIRA-MAIA, E.C. Three new complexes of platinum(ii) with doxycycline, oxytetracycline and chlortetracycline and their antimicrobial activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 17, n. 8, p. 1627-1633, 2006.

HARRUS, S.; AROCH, I.; LAVY, E.; BARK.; H. Clinical manifestation of infectious canine cyclic thrombocytopenia. **The Veterinary Record**, Londres, v.141, n.10, p. 247-250, 1997.

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

HARRUS, S.; MICHAEL, D.; TREVOR, W.; HYLTON, B.; Presence of immune-complexes, and absence of antinuclear antibodies in sera of dogs naturally and experimentally infected with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Microbiology**, Chicago, v.83, n.4, p.343-349, 2001.

IQBAL, Z.; RIKIHISA, Y. Application of the polymerase Chain reaction for the detection of *Ehrlichia canis* in tissue of dogs. **Veterinary Microbiology**, Chicago, v.42, n.4, p.281-287, 1994.

JONES-BRANDO, L., D'ANGELO, J., POSNER, G.H., YOLKEN, R. In vitro inhibition of *Toxoplasma gondii* by four new derivatives of artemisinin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.50, n.12, p.4206–4208, 2006.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, Londres, v.129, n.1, p.3-14, 2004.

JOSHI, N.; MILLER, D.Q. Doxycycline Revisited. **Archives of Internal Medicine**, Chicago, v. 157, n.13, p. 1421-1428, 1997.

KEYSARY, A., WANER, T., ROSNER, M., WARNER, C.K., DAWSON, J.E., ZASS, R., BIGGIE, K.L., HARRUS, S. The first isolation, in vitro propagation, and genetic characterization of *Ehrlichia canis* in Israel. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 62, n. 314, p. 331-340, 1996.

KLEIN, M.; NELSON, C.; GOODMAN, J. Antibiotic susceptibility of the newly cultivated agent of human granulocytic ehrlichiosis: promising activity of quinolones and rifamycins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.41, n.1, p.76-79, 1997.

LABARTHE, N., PEREIRA, M. D. C., BARBARINI, O., McKEE, W., COIMBRA, C. A., HOSKINS, J. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* infections in Brazil. **Veterinary Therapeutics**, Yardley, v. 4, n. 1, p. 67, (abstract), 2003.

LABRUNA, M.B. Carta Acarológica. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.13 (Supl.1), p. 199-202, 2004.

LABRUNA, M.B.; SOUZA, S.L.P.; GUIMARÃES, JÚNIOR.; PACHECO, R.C.; PINTER, A.; GENNARI, S.M. Prevalência de carrapatos em cães de áreas rurais da região norte do Estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.53, n. 5, p. 553-556, 2001.

LABUDA, M.; NUTTALL, P.A. Tick-borne viruses. **Parasitology**, Londres, v. 129, sule.51, S221-S245, 2004.

LANS, C., TURNER, N., KHAN, T., BRAUER, G. Ethnoveterinary medicines used to treat endoparasites and stomach problems in pigs and pets in British Columbia. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 148, n.314, p.325–340, 2007.

LEGATZKI, K.; JORGE, P.S. Erliquiose canina. Uma doença emergente? **Nosso Clínico**, São Paulo, n.26, p.12-20, 2002.

MACIEIRA, D. B. Avaliação da ocorrência de *Ehrlichia canis* (Donatien & Lestoquard, 1935) em cães (*Canis familiaris*, LINNAEUS, 1758) com trombocitopenia na região metropolitana do Rio de Janeiro. 2003. 89 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária (Clínica e Reprodução Animal) – Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2003.

MACIEIRA, D. D.; MESSICK, J. B.; CERQUEIRA, A. D., FREIRE, I. M. A.; LINHARES, G. F. C.; ALMEIDA, N. K. D.; ALMOSNY, N. R. P. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Clinical Pathology**, Filadélfia, v. 34, n. 1, p. 44-48, 2005.

MACHADO, R.Z. Erliquiose nos animais domésticos e silvestres do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 14, e SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 2, p. 163-166. 2006.

MADRUGA, C. R., de ARAÚJO, F. R., SOARES, C. O. DOT-ELISA para detecção de anticorpos contra *Ehrlichia canis*. In **Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, p. 297-300, 2001.

MANNA, L.; ALBERTI, A.; PAVONE, L.M.; SCIBELLI, N.S.; GRAVINO, A.E. First molecular characterization of a granulocytic *Ehrlichia* strain isolated from a dog in South Italy. **The Veterinary Journal**, Londres, v. 167, n.3, p. 224-227, 2004.

MAURIN, M.; BAKKEN, J.S.; DUMLER, J.S. Antibiotic susceptibilities of *Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophilum* strain from various geographic areas in the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.47, n.1, p. 413-415, 2003.

MOREIRA, S.M.; BASTOS, C.V.; ARAÚJO, R.B.; SANTOS, M.; PASSOS, L.M.F.; Retrospective study (1998-20010) on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, M.G., Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.55, n.2, p.141-147, 2003.

NEER, T.M.; BREITSCHWERDT, E.B.; GREENE, R.T.; LAPPIN, M.R. Consensus statement on Ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. American College of Veterinary Internal Medicine. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lakewood, v.16, n.3, p. 309-315, 2002.

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

NOVAK, I.; KOVAC, B. Photoelectron spectra of important drug molecules: zidovudine and artemisinin. **The Journal of Organic Chemistry**, Salt Lake City, v.68, n.14, p. 5777-5779, 2003.

NYINDO, M. B. A.; M, RISTIC, D. L.; HUXSOLL, A.; SMITH, R. Tropical canine pancytopenia: In vitro cultivation of the causative agent-*Ehrlichia canis*. **American Journal Veterinary Research**, Gloucestershire, v.32, n.32, p.1651-1658, 1971.

OLIVEIRA, L. S.; OLIVEIRA, K. A.; ALMEIDA, M. R.; CONCEIÇÃO, I. G.; GALVÃO, M. A. M.; BOUYER, D.; WALKER, D. H.; MAFRA, C. L. Identificação molecular de *Ehrlichia canis* em uma população de cães em Viçosa/ MG e a relação da trombocitopenia e anemia com a ehrlichiose na população em estudo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 14, , Ribeirão Preto, **Anais...** p. 383, 2006.

ORIA, A.P.; PEREIRA, P.M.; LAUS, J.L. Uveíte em cães infectados com *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.4, p.1289-1295, 2004.

PAIVA, J.; BENDAS, A.J.; ROSSI, M.I.D.; BRANCO, A.S.; VALLE, L.G.; BELMONTE, D.; MENDES-DE-ALMEIDA, F.; GUERRERO, J.; LABARTHE, N. Uso de doxiciclina (Doxifin®) em cães mantidos sob condições adversas, em foco de transmissão ativa de *Ehrlichia canis* (Donatein & Lestoquard, 1935) e de *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856). **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v.27, n.157, p.17-18, 2007.

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

POPOV, L. V.; HAN, V. C.; CHEN, S. M.; DUMLER, J. S.; FENG, H. M.; ANDREADIS, T. G.; TESH, R. B.; WALKER, D. H. 1998. Ultraestrutural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v.47, n.3, p. 235-251, 1998.

RATH, K., TAXIS, K., WALZ, G., GLEITER, C.H., LI, S.-M., HEID, L. Pharmacokinetic study of artemisinin after oral intake of a traditional preparation of *Artemisia annua* L. (Annuam wormwood). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Illinois, v.70, n.2, p.128–132, 2004.

RIKIHISA, Y. The tribe *Ehrlichiae* and ehrlichial diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington , v.4, n.3, p. 286-308, 1991.

RISTIC, M.; HOLLAND, C.J. Canine ehrlichiosis. In: WOLDEHIWET, Z.; RISTIC, M. **Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals**. Pergamon Press, Oxford, United Kingdom, cap. 8, p. 169-186, 1993.

RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; ALBORNOZ, R. E. F.; BOLIO, M. E. *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatan, Mexico: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 127, n.1, p. 75–79, 2005.

SÁINZ, A.; DELGADO, S.; AMUSATEGUI, I.; TESOURO, M. A.; CÁRMENES, P. Seroprevalence of canine ehrlichiosis in Castilla-Léon (north-west Spain). **Preventive Veterinary Medicine**, Londres, v. 29, n.1, p. 1-7, 1996.

SCHAEFER, J.J.; KAHN, J.; NEEDHAM, G.R.; RIKIHISA, Y.; EWING, S.A.; STICH, R. W. Antibiotic clearance of *Ehrlichia canis* from dogs infected by intravenous inoculation of carrier blood. **Animal Biodiversity and Emerging Diseases**, New York, **Anais...**New York Academy of Sciences, p. 263-269, 2008.

SCHAEFER, J.J.; NEEDHAM, G.R.; BREMER, W.G.; RIKIHISA, Y.; EWING, S.A.; STICH, R. W. Tick Acquisition of *Ehrlichia canis* from dogs treated with doxycycline hyclate. **Antimicrobial Agentes and Chemotherapy**, Washington, v.51, n.9, p. 3394-3396, 2007.

SOUZA, E. S.; GAZETA, G. S.; BARBOSA, P. R. A.; GONÇALVES, P. C. Detecção de riquetsias e erliquias através de PCR em animais domésticos do Município de Valença/RJ. In: XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia, Porto Alegre, 2005.

SWANGO, L. J.; BANKENIPER, K. W.; KONG, L. I. Infecções Bacterianas, Riquetsiais, Protozoais e outras IN: ETTINGER, S.J. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. São Paulo: Manole, cap.46, p.276-311, 1992.

TELFORD III, S. R.; GOETHERT, H. K. Emerging tick-borne infections: rediscovered and better characterized, or truly “new”? **Parasitology**, Londres, v.129, s.1, S301-S327, 2004.

TORRES, H. M.; MASSARD, C. L.; FIGUEIREDO, M. J.; FERREIRA, T.; ALMASNY, N.R.P. Isolamento e propagação da *Ehrlichia canis* em células DH82 e obtenção de antígeno para a reação de imunofluorescência indireta. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, Rio de Janeiro, v.9, n.2, p.77-82, 2002.

TRAPP, S. M.; DAGNONE, A. S.; VIDOTTO, O., FREIRE, R. L.; AMUDE, A. M., de MORAIS, H. S. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 140, n.314, p. 223–230, 2003.

TROY, G.C.; FORRESTER, S.D. Canine ehrlichiosis. In: GREENE, C.E. Infectious diseases of the dog and cat. Philadelphia: Saunders, p.404-414, 1990.

UNVER, A.; PEREZ, M.; ORELLANA, N.; HUANG, H.; RIKIHISA, Y. Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolated from dogs, ticks, and a human in Venezuela. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.39, n.8, p. 2788-2793, 2001.

WALDEMARIN, K. C. A.; MUNDIM, A. V.; BASTOS, J. E. D.; CUNHA, G. N. Alterações hematológicas em cães (*Canis familiaris*) naturalmente infectados por *Ehrlichia* spp. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v.9, n.2, p. 23-29, 2003.

WALKER, D. H. Molecular phylogeny of *Ehrlichia* and clinical, epidemiologic, and immunopathologic aspects of human ehrlichioses. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 14, Ribeirão Preto. **Anais....** p. 161, 2006.

WANER, T.; HARRUS, S.; WEISS, D.J.; BARK, H.; KEYSARY, A. Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.48, n.1, p. 177-182, 1995.

WELLMAN, M.L.; KRAKOWKA, S.; JACOBS, R. M.; KOCIBA, G.J. A macrophage-monocyte cell line from a dog with malignant histiocytosis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, Nova Iorque, v.24,n.3, p.223-229, 1988.