

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**ISOLAMENTO, PROPAGAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E
MECANISMO DE EVASÃO DE *Ehrlichia canis* *IN VITRO***

Rosiane Nascimento Alves

Uberlândia – MG
Maio – 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**ISOLAMENTO, PROPAGAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E
MECANISMO DE EVASÃO DE *Ehrlichia canis* *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Mestranda: Rosiane Nascimento Alves

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Co-orientador: Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva

Uberlândia – MG

Maio – 2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

A474i Alves, Rosiane Nascimento, 1985-

Isolamento, propagação, caracterização genética e mecanismo de evasão de *Ehrlichia canis* in vitro [manuscrito] / Rosiane Nascimento Alves. - 2010.

83 f. : il.

Orientador: Marcelo Emílio Beletti.

Co-orientador: Claudio Vieira da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Zoonoses - Teses. 2. Erliquiose - Teses. 3. Cão - Doenças - Teses. I. Beletti, Marcelo Emílio. II. Silva, Claudio Vieira da. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU:

616.993

Dedicatória

À Deus,

por estar sempre ao meu lado em todos os momentos me dando forças para seguir em frente e não fraquejar diante dos piores obstáculos.

Aos meus pais,

Edivon e Nalva, meus exemplos de vida e perseverança, por sempre me apoiarem e incentivarem nos momentos mais difíceis, iluminando meus caminhos e esclarecendo minhas dúvidas. Serei eternamente grata ao amor incondicional e a todas as concessões que fizeram para que eu chegasse até aqui.

À minha irmã,

Daiane, minha melhor amiga e companheira, por todos os conselhos e desabafos. Sua presença é fundamental na minha vida.

Ao meu eterno amor,

Arlindo Neto, pela paciência e apoio durante todos estes anos. Pela presença em meus sonhos mesmo estando tão distante em alguns momentos.

Vocês são à base de tudo o que sou!

*"É muito melhor arriscar coisas grandiosas,
alcançar triunfo e glória, mesmo expondo-se à
derrota, do que formar fila com os pobres de
espírito, que não gozam muito e nem sofrem
muito, porque vivem na penumbra cinzenta que
não conhece nem vitória nem derrota."*

Theodore Roosevelt



Agradecimientos

Em primeiro lugar, agradeço ao meu orientador Dr. Marcelo Emilio Beletti por ter confiado em mim todo esse tempo me oferecendo a oportunidade de crescimento tanto pessoal quanto profissional. Por ter estado sempre presente me apoiando e ajudando em tudo o que precisei. Obrigada pela constante atenção, motivação, amizade, respeito e pelos inumeráveis ensinamentos.

Agradeço ao meu co-orientador Dr. Claudio Vieira da Silva, por toda ajuda e motivação. Apesar do nosso curto tempo de convivência, todos os momentos foram fundamentais ao meu crescimento.

Ao Dr. Carlos Vieira do Laboratório de Genética e Bioquímica – UFU, por sempre ter me ajudado em tudo o que precisei em um momento crítico do estudo, não medindo esforços e mantendo suas portas abertas.

Aos meus grandes amigos, Nayhanne, Loyane, Daiane, Guilherme e Nágilla por compartilharem comigo frustrações, angústias e alegrias tornando os meus dias melhores.

Aos amigos da histologia, Bellisa, Angélica, Idessânia, Belchiolina, Susana, Ester, Mariana, Paulo Vitor, Andressa, Priscila, Juliana e Lorena por todo apoio e momentos de descontração e de ótima convivência diária.

A todos os amigos e companheiros de trabalho que conquistei nos laboratórios de Genética e Bioquímica, em especial ao Renato, Cristina, Ana Carolina, Naiara e Fabiana pela ajuda incondicional. Apesar de todos os obstáculos, superamos todos e sem vocês nada disso seria possível!

A todos os funcionários da histologia pela grande ajuda e preocupação, em especial ao técnico da microscopia eletrônica Marcelo Arantes Levenhagen que não mediu esforços em me ajudar em momentos cruciais da pesquisa.

A todos os funcionários e professores que permitiram a minha utilização dos seus laboratórios em diferentes etapas do estudo.

As secretárias do programa de pós-graduação, Lucélia e Lucileide, por estarem sempre dispostas a me ajudar, esclarecendo minhas dúvidas e indicando o melhor a fazer.

Ao Dr. Marcelo Bahia Labruna por ter fornecido aliquotas de células DH82 e do isolado E. canis São Paulo.



Sumário

RESUMO	11
ABSTRACT	12
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
I. Introdução	14
I.I. Agente Etiológico	15
I.I.I. Ciclo Biológico	16
I.II. Erliquiose Monocítica Canina (EMC)	18
I.II.I. Diagnóstico	19
I.II.II. Epidemiologia	21
CAPÍTULO I	25
1. Introdução	26
2. Objetivos	28
2.1. Objetivo geral	28
2.2. Objetivos específicos	28
3. Material e Métodos	29
3.1. Origem do isolado local de <i>E. canis</i>	29
3.2. Isolamento e cultivo do isolado local de <i>E. canis</i>	29
3.3. Extração de DNA genômico	30
3.4. Reação em cadeia pela polimerase (PCR)	31
3.4.1. Amplificação do gene 16S rRNA	31
3.4.2. Amplificação do gene <i>dsb</i>	32
3.4.3. Amplificação do gene <i>p28</i>	32
3.5. Purificação dos <i>amplicons</i>	33
3.6. Clonagem dos genes <i>dsb</i> e <i>p28</i>	33
3.6.1. Reação de ligação	33
3.6.2. Transformação das bactérias <i>Escherichia coli</i> competentes	34
3.6.3. Minipreparação do DNA plasmidial	35
3.7. Sequenciamento dos genes <i>dsb</i> e <i>p28</i>	35
3.8. Análises <i>in silico</i>	36
3.9. Número de acesso às sequências de nucleotídeos	36
4. Resultados	37
4.1. Caso clínico	37
4.2. Isolamento e cultivo do isolado local de <i>E. canis</i>	37

4.3. Caracterização molecular dos isolados local e São Paulo de <i>E. canis</i>	38
5. Discussão	44
6. Conclusões	48
CAPÍTULO II	49
1. Introdução	50
2. Objetivos	53
2.1. Objetivo geral	53
2.2. Objetivo específico	53
3. Material e Métodos	54
3.1. Coleta e processamento das amostras para microscopia eletrônica	54
3.2. Análise das eletromicrografias e quantificação dos vacúolos contendo <i>E. canis</i>	55
3.3. Análise Estatística	55
4. Resultados	56
5. Discussão	61
6. Conclusão	63
BIBLIOGRAFIA	64
ANEXO	82

RESUMO

Ehrlichia canis é o principal agente etiológico da erliquiose monocítica canina (EMC), uma das mais importantes doenças infecciosas de cães no Brasil. A quantidade de informações a respeito da variabilidade genética e de mecanismos utilizados por este patógeno que garantam sua evasão imune permanece insuficiente. Assim, o presente estudo relatou o primeiro isolamento e cultivo de *E. canis* utilizando células DH82 em Uberlândia, a partir de um cão naturalmente infectado. Sequências parciais dos genes *dsb* e *p28* deste novo isolado de *E. canis* foram obtidas e alinhadas com sequências correspondentes de outras cepas acessíveis no *GenBank*. Além disso, a possível fusão de lisossomos com endossomos contendo *E. canis* foi investigada em células DH82 infectadas. Lisossomos em células com 50% de infecção foram marcados citoquimicamente com fosfatase ácida para documentar a fusão endossomo-lisossomal (E-L). A nova cepa, designada como isolado Uberlândia, apresentou 99–100% de similaridade com sequências do gene *dsb* de outros isolados de *E. canis* provenientes de diferentes áreas geográficas, incluindo: Brasil, África e América do Norte. Por outro lado, a sequência parcial do gene *p28* de *E. canis* Uberlândia diferiu em vários nucleotídeos das sequências correspondentes em *E. canis* provenientes do Brasil, Venezuela e América do Norte. Através dessas variações o índice antigênico previu determinantes antigênicos dos isolados de *E. canis*, sendo observadas similaridades e algumas diferenças nos epítomos, sugerindo que esta proteína é antígenoicamente diferente entre cepas, independentemente da origem. Estes achados sugerem que novos estudos são necessários para avaliar a utilidade deste antígeno no sorodiagnóstico da EMC. Já em relação às análises citoquímicas, a fusão E-L geralmente não foi observada em vacúolos contendo *E. canis* viáveis, sugerindo que este parasito é capaz de inibir este mecanismo de defesa da célula hospedeira.

Palavras-chave: *Ehrlichia canis*, isolamento de cepa, polimorfismo genético, evasão imune.

ABSTRACT

Ehrlichia canis is the primary etiologic agent of canine monocytic ehrlichiosis (CME), one of the most important infectious diseases of dogs in Brazil. The amount of information about the genetic variability and the mechanisms used by this pathogen to ensure their immune evasion remains insufficient. Therefore, the present study reports the first isolation and culture of *Ehrlichia canis* in Uberlândia, from a naturally infected dog using the DH82 cell line. Partial sequences of *dsb* and *p28* genes of the new *E. canis* isolate were obtained and aligned with the corresponding sequences of other *Ehrlichia* strains accessible in GenBank. Furthermore, the possible fusion of lysosomes with endosomes containing *E. canis* was investigated in infected DH82 cells. Lysosomes in cells with 50% infectivity were labeled cytochemically with acid phosphatase to document endosome-lysosome (E-L) fusion. The new strain, designated as Uberlândia isolate, showed 99–100% of similarity with the *dsb* gene sequence of *E. canis* from different geographic areas including: Brazil, Africa and North America. On the other hand, the *p28* partial sequence for *E. canis* Uberlândia isolate differed in several nucleotides from the corresponding sequences of the *E. canis* strains from Brazil, Venezuela and North America. Through these variations the antigenic index predicted potential antigenic determinants of *E. canis* strains and similarities in antigenicity were observed, however, some differences in deduced epitopes suggest that this protein is antigenically different among strains, regardless of origin. These findings suggest that new studies are necessary to evaluate the utility of this antigen for serodiagnosis of CME. In relation to cytochemical analysis, E-L fusion was generally not observed in active *E. canis* containing vacuoles, indicating that *E. canis* is able to inhibit this mechanism of host defense.

Keywords: *Ehrlichia canis*, strain isolation, genetic polymorphism, immune evasion.



Fundamentação Teórica

I. Introdução

As Erliquioses têm sido crescente objeto de estudo na clínica veterinária e na saúde pública, uma vez que causam severas doenças de importância veterinária e são responsáveis por duas zoonoses emergentes, Erliquiose Monocítica e Granulocítica Humanas (THOMAS et al., 2009; DOUDIER et al., 2010).

O gênero *Ehrlichia* atualmente compreende cinco espécies conhecidas: *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* e *E. ruminantium* (DUMLER et al., 2001; YU et al., 2007). Além de uma nova espécie identificada recentemente por Shibata e colaboradores (2000) no Japão, onde foi isolada de carrapatos *Ixodes ovatus*, sendo então designada *Ixodes ovatus ehrlichia* (IOE). Trata-se de pequenas bactérias Gram-negativas pleomórficas, que residem isoladas ou em compactas inclusões no interior de vacúolos citoplasmáticos de células hematopoiéticas maduras ou imaturas, especialmente do sistema mononuclear fagocítico, tais como monócitos e macrófagos, além de neutrófilos e plaquetas (DUMLER et al., 2001; NAKAGHI, 2008). Ao microscópio eletrônico apresentam duas formas morfológicas distintas, uma maior (0,4 – 0,6 µm X 0,7 – 1,9 µm) pleomórfica contendo nucleóide disperso (reticular) e outra menor (0,4 – 0,6 µm) com nucleóide condensado e densamente corado (YU et al., 2007).

No Brasil apenas três espécies já foram descritas; *Ehrlichia ewingii*, agente etiológico da Erliquiose Granulocítica Humana (EGH) e Canina (EGC); *Ehrlichia chaffeensis*, agente etiológico da Erliquiose Monocítica Humana (EMH) e *Ehrlichia canis*, agente etiológico da Erliquiose Monocítica Canina (EMC) (AGUIAR, 2006; MACHADO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2009).

Devido à elevada infestação do carrapato vetor e à inexistência de vacina, EMC é considerada a mais prevalente e uma das mais importantes doenças transmissíveis por carrapatos na clínica de pequenos animais no Brasil, o que faz de seu agente etiológico o mais importante patógeno carreado por carrapatos na América Latina (AGUIAR, 2006; AGUIAR, et al., 2007; SAITO et al., 2008).

Primeiramente tal agente foi descrito como *Rickettsia canis* por Donatien e Lestoquard em 1935 na Argélia, associado a casos agudos de febre e anemia em diversos cães (*Canis familiares*), sendo posteriormente reclassificado como *E. canis* em 1945 (MACHADO, 2004). No entanto, somente em 1963, a doença teve destaque mundial após surto em cães militares britânicos e americanos em Singapura e Vietnã, que resultou em aproximadamente duzentas mortes ao longo de quatro anos (MAVROMATIS et al., 2006; HARRUS; WANER, 2010).

Em 1973, foi relatada a primeira ocorrência de Rickettsiales no Brasil por Costa e colaboradores, ao encontrarem inclusões citoplasmáticas, as denominadas mórulas, em linfócitos de cães com sintomatologia de erliquiose na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais. Atualmente, a doença é relatada em todo o país e considerada endêmica em muitas regiões (SANTOS et al., 2009).

I.I. Agente etiológico

Ehrlichia canis é uma bactéria intracelular obrigatória com tropismo para monócitos e macrófagos caninos com ocorrência endêmica em várias regiões brasileiras (AGUIRRE et al., 2004; AGUIAR, 2006; GAL et al., 2008; SANTOS et al., 2009; DOUDIER et al., 2010). Exibe parede celular típica de bactérias Gram negativas; entretanto, estudos genômicos sugerem a ausência de lipopolissacarídeos e peptidoglicanos. Essa deficiência resultou no desenvolvimento de estruturas protéicas complexas na membrana externa, que possuem importante papel na evasão do sistema imune e na interação de *E. canis* com as células do hospedeiro (MAVROMATIS et al., 2006).

Em microscopia eletrônica de transmissão (MET), a mórula de *E. canis* apresenta-se delimitada por uma membrana vacuolar simples, contendo corpos elementares (células erliquiais) redondos ou ovóides envoltos por uma membrana dupla, sendo a membrana interna lisa e a externa ondulada (HILDEBRANDT et al., 1973).

A taxonomia das riquetsias tem sofrido significante reorganização na última década (PAROLA et al., 2005). Recentemente, Dumler e colaboradores (2001) propuseram uma nova taxonomia para a ordem Rickettsiales em duas famílias, Rickettsiaceae, contendo os gêneros *Rickettsia* e *Orientia*, os quais compreendem bactérias intracelulares obrigatórias que crescem livremente no citoplasma de células hospedeiras eucarióticas e Anaplasmataceae que incluem todas as espécies de α -proteobactérias contidas nos gêneros *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Cowdria*, *Wolbachia* e *Neorickettsia*, que por sua vez replicam-se em compartimentos intravacuolares no interior das células eucarióticas do hospedeiro.

Desta forma, na família Anaplasmataceae foram reconhecidas espécies do gênero *Ehrlichia* spp., denominadas *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. ruminantium* (antes chamada *Cowdria ruminantium*) e *E. muris*. No gênero *Anaplasma* spp. ocorreram maiores mudanças, devido a grande similaridade genética entre *E. equi* e *E. phagocytophila*, formou-se o *Anaplasma phagocytophilum*, o qual completa o gênero com *A. bovis* (antes chamada *Ehrlichia bovis*) e *A. platys* (antes chamada *Ehrlichia platys*). Já no gênero *Neorickettsia*, *N.*

risticii (antes chamada *Ehrlichia risticii*) e *N. sennetsu* (antes *Ehrlichia sennetsu*) foram incluídas. Assim, baseando-se em análises de biologia molecular referentes aos genes 16S rRNA e *groESL* bem como em características biológicas e antigênicas, *E. canis* pertence ao gênero *Ehrlichia*, família Anaplasmataceae e ordem Rickettsiales.

I.I.I. Ciclo Biológico

O ciclo de desenvolvimento de *E. canis* nos monócitos caninos possui três estágios que podem ser observados microscopicamente. Inicialmente, os corpos elementares são endocitados pelos monócitos. Três a cinco dias após a infecção, um pequeno número de corpos elementares em agrupamentos, denominados corpúsculos ou corpos iniciais são observados como inclusões citoplasmáticas pleomórficas. No sétimo ou até décimo segundo dia subsequentes, os corpúsculos iniciais desenvolvem-se em inclusões maduras, vistas ao microscópio de luz com aspecto de “amoras”, as denominadas mórulas, que tipificam o gênero (NYNDO et al., 1971; RISTIC; HOLAND, 1993; DAGNONE et al., 2001). As mórulas, nada mais são do que vacúolos citoplasmáticos delimitados por uma membrana simples que contém em seu interior microcolônias de pequenos corpos elementares em números e tamanhos variados (YU et al., 2007). Os corpos elementares possuem 0,5 a 0,9 µm de diâmetro, membrana dupla tri-lamelar, formas arredondadas a ovais e multiplicam-se no interior dos vacúolos por fissão binária até sua liberação através da ruptura do monócito ou exocitose, o que permite a repetição do ciclo infeccioso e consequente disseminação do microorganismo pelo corpo do animal (NYNDO et al., 1971; HILDEBRANDT et al., 1973)

No principal vetor, o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), *E. canis* tem transmissão transtadial, mas não transovariana, o que torna o cão o principal reservatório da doença (AGUIAR, 2006; DOUDIER et al., 2010; NICHOLSON et al., 2010). Os carrapatos se infectam ao ingerir leucócitos infectados de cães que estão na segunda ou terceira semana de infecção, fase aguda da doença, na qual existe maior concentração destas células na corrente sanguínea do cão (MACEDO, 2007). *E. canis* multiplica-se nas células epiteliais do intestino, hemócitos e nas glândulas salivares do carrapato e a transmissão aos cães ocorre durante o repasto sanguíneo de ninfas e adultos (SMITH et al., 1976; NICHOLSON et al., 2010). Outra forma da transmissão da doença é a transfusão sanguínea de um animal infectado para um susceptível, podendo ocorrer a partir de cães com até cinco anos de infecção crônica (SWANGO et al., 1992).

Em estudo sobre o ciclo biológico de *E. chaffeensis*, análises ultraestruturais mostraram que tal parasito apresenta duas formas morfológicas distintas nas células de mamíferos: células densamente coradas (DC – “dense-cored”) e células reticuladas (RC – “reticulate cells”) residindo no interior das mórulas nas células do hospedeiro (Figura 1). Durante o período de incubação do parasito, que pode durar de 8 a 20 dias, a bactéria se adere à membrana e é endocitada pelas células do hospedeiro, sob a forma de células densamente coradas. No fagossomo, DCs passam por uma fase intermediária (IM1) e subsequentemente transformam-se em células reticuladas, que se multiplicam por fissão binária, durante aproximadamente 48 horas. Novamente passam por uma fase intermediária (IM2) até maturarem em células densamente coradas após 72 horas de infecção para serem liberadas e, então, endocitadas por outras células (ZHANG et al., 2007). Keysary e colaboradores (1996) observaram mórulas contendo *E. canis* reticuladas e densamente compactadas, sendo apenas as reticuladas observadas em processo de divisão binária, sugerindo assim semelhante ciclo biológico deste parasito à *E. chaffeensis*.

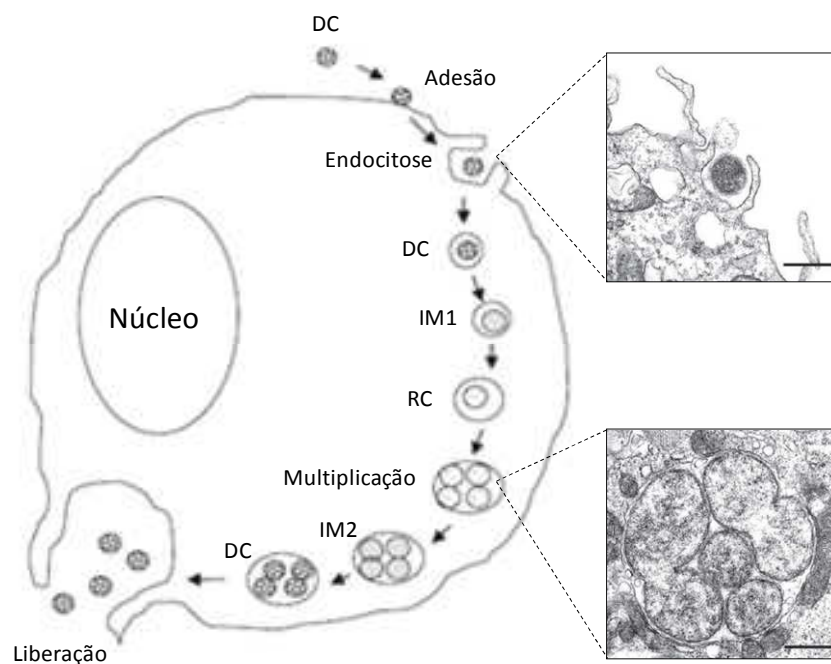


Figura 1. Ciclo de desenvolvimento de *E. chaffeensis* na célula do hospedeiro vertebrado. Barra: 0,5 µm. (Modificado de ZHANG et al., 2007).

I.II. Erliquiose Monocítica Canina (EMC)

A doença é caracterizada por ser multissistêmica e apresenta a primeira manifestação clínica após o período de incubação do microorganismo, que compreende 8 a 20 dias e pode progredir para três estágios consecutivos de infecção: agudo, assintomático e crônico (MOREIRA et al., 2003).

Apesar de os principais sinais clínicos descritos em erliquiose canina serem letargia, febre, anorexia, linfadenomegalia, fraqueza, membranas mucosas pálidas e hemorragia, cada fase da doença apresenta sintomas característicos (BANETH et al., 2009; GAUNT et al., 2010; NICHOLSON et al., 2010). Além disso, sinais clínicos e achados hematológicos podem variar de acordo com a região de estudo (OLIVEIRA et al., 2000; MENDONÇA et al., 2005; BORIN et al., 2009; UENO et al., 2009).

Durante a fase aguda, os organismos multiplicam-se no interior das células mononucleares, principalmente do sistema fagocítico mononuclear no baço, linfonodo e medula óssea, resultando em hiperplasia dessa linhagem celular e organomegalia (esplenomegalia e linfadenopatia) (CASTRO et al., 2004). Esta fase é caracterizada por febre, anorexia, depressão, dispnéia (CODNER et al., 1985), envolvimento ocular (TROY; FORRESTER, 1990), neurológico (MEINKOTH et al., 1989) e renal (CODNER; MASLIN, 1992). A trombocitopenia decorrente da destruição periférica das plaquetas, acompanhada ou não por leucopenia e anemia é comum durante esta fase (SWANGO et al., 1992).

Após o período agudo, a maioria dos animais imunocompetentes podem se curar, ou então entram na fase assintomática da infecção, que pode persistir por anos. Esta fase está associada com a persistência de *E. canis* no hospedeiro e com altos níveis de anticorpos no soro. Isso sugere constante estimulação do sistema imune por antígenos com duração de aproximadamente seis a nove semanas, progredindo para a fase crônica (ANDEREG; PASSOS, 1999). Particularmente em regiões enzoóticas, alguns animais apesar de não apresentarem sinais clínicos aparentes, possuem alterações laboratoriais como citopenia e hipergamaglobulinemia (CODNER et al., 1985).

A fase crônica desenvolve-se após a fase assintomática e pode variar de leve à grave. Nela, o microorganismo continua a persistir intracelularmente e os cães desenvolvem pancitopenia e outras manifestações imunológicas devido à hipoplasia da medula óssea, plasmocitose, linfocitose ocasionalmente composta de grandes linfócitos granulares, hiperglobulinemia causada por gamopatia policlonal (ou menos frequentemente monoclonal), hipoalbuminemia e proteinúria (CODNER et al., 1985; COUTO, 1998). Os sintomas clínicos

apresentados nessa fase são reflexos das alterações fisiopatológicas resultantes da grave anemia e da infiltração perivascular de muitos sistemas orgânicos com células linforreticulares e plasmócitos (SWANGO et al., 1992). A grande associação de infecções secundárias e a hemorragia sistêmica durante a fase crônica da doença podem levar ao óbito (MAVROMATIS, 2006; BOWMAN et al., 2009).

Porém, o nível exato da doença é de difícil determinação em infecções naturais, uma vez que os sinais clínicos e os achados laboratoriais são similares e a duração e gravidade dos sintomas são variáveis (GAL et al., 2008; HARRUS, WANER, 2010).

I.II.I. Diagnóstico

O diagnóstico de doenças transmitidas por carrapatos requer uma combinação de dados provenientes dos seguintes métodos: anamnese, análises clínicas e laboratoriais, visualização direta dos organismos infecciosos no sangue ou em tecidos por microscopia, isolamento em cultura celular, testes sorológicos como imunofluorescência indireta (IFI), “immunoblotting” e ensaio de imunoabsorção por ligação enzimática (ELISA) e testes moleculares como reação em cadeia pela polimerase (PCR) (SHAW et al., 2001; HARRUS et al., 2004; HARRUS; WANER, 2010).

Na erliquiose canina o diagnóstico tem aumentado em resposta ao melhor conhecimento sobre a doença, a expansão geográfica de sua ocorrência e a melhoria nos métodos de rastreamento utilizados (ANDEREG; PASSOS, 1999).

A técnica usual baseia-se na detecção de mórulas dentro de leucócitos em amostras de sangue periférico (coletadas de pequenos capilares auriculares) (CASTRO, 1997). Porém, a mórula é visualizada somente durante a fase aguda da infecção e a porcentagem de células infectadas é usualmente entre 1 – 5% (CADMAN et al., 1994; RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2005). Assim, a ausência do microorganismo no sangue não exclui a possibilidade de infecção e torna frequente o resultado falso-negativo (HOSKINS, 1991).

A identificação da bactéria na citologia por aspiração com agulha fina do baço, dos linfonodos e dos pulmões é possível, mas pouco aplicável, uma vez que se observa frequente plasmocitose (COUTO, 1998).

A utilização do isolamento do microorganismo em cultura celular para a detecção de *E. canis* em amostras sanguíneas de cães infectados é sensível e específica. Entretanto, necessita de profissional habilitado, possui alto custo e requer uma a dez semanas para a

obtenção do resultado, limitando sua eficiência como uma ferramenta de diagnóstico rápido (McBRIDE et al., 1996; HARRUS; WANER, 2010).

A imunofluorescência indireta (IFI) é o teste sorológico mundialmente mais utilizado no diagnóstico da EMC, sendo considerado o padrão ouro para a detecção e quantificação de anticorpos anti – *E. canis* (WANER et al., 2001). Porém a IFI somente pode ser feita em laboratório especializado com equipe qualificada apta a interpretar visualmente os resultados, o que prejudica sua aplicação como método para diagnóstico em clínicas veterinárias (WANER et al., 2000). Além disso, considerações e limitações da IFI incluem a reação cruzada com outros organismos relacionados, principalmente entre membros do mesmo gênero; a dificuldade em distinguir o agente etiológico específico; a baixa reprodutibilidade e a falta de um procedimento padronizado que garanta a não variabilidade dos resultados inter- e intra-laboratórios (AGUIRRE et al., 2004; CÁRDENAS et al., 2007). A presença de anticorpos anti – *E. canis* no soro de animais infectados indica prévia exposição ao agente mas não necessariamente infecção ativa (GAL et al., 2008). Cães com erliquiose clínica podem não possuir anticorpos nos primeiros dias após o início da infecção, antes do desenvolvimento de um título de anticorpos detectável (McBRIDE et al., 1996).

Outra opção diagnóstica é o “western immunoblotting” que além de possuir alta sensibilidade apresenta objetividade da leitura, pois não sofre influência da subjetividade do operador. Porém, é um método de alto custo, que consome tempo e requer tecnologia mais avançada do que a IFI (ANDEREG; PASSOS, 1999).

O teste ELISA apresenta como vantagens alta sensibilidade, custo relativamente baixo e a não necessidade de equipamentos sofisticados. Essas qualidades fazem com que este seja um método 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). Cárdenas e colaboradores (2007) determinaram um teste ELISA para *E. canis* com 100% de especificidade e sensibilidade usando polipeptídeos recombinantes gp36, gp19 e gp200. A detecção precoce da erliquiose, apenas com 14 dias de infecção, corresponde a maior vantagem deste método em relação à IFI.

Kits comerciais para o diagnóstico da erliquiose canina se baseiam no princípio do “dot-ELISA”, como o Immunocomb® (Biogal, Israel) e o Snap® 3Dx (IDEXX Laboratories Inc., USA). São práticos e detectam anticorpos IgG específicos contra o parasito, possivelmente se tornarão exames de rotina na clínica veterinária (HARRUS et al., 2002).

Métodos de diagnóstico molecular permitem a detecção direta do microorganismo e facilitam sua comparação com cepas geograficamente diferentes (WARNER; DAWSON, 1996). A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) que amplifica um fragmento do gene 16S RNA ribossomal (16S rRNA) é efetiva na detecção de *E. canis* em tecidos e em monócitos sanguíneos (IQBAL; RIKIHISA, 1994a) e tem sido aplicada com frequência no diagnóstico das erliquioses (MACHADO et al., 2006; CARVALHO et al., 2008; BANETH et al., 2009; SANTOS et al., 2009).

Muitas variações na PCR foram descritas na tentativa de melhorar a sensibilidade e a especificidade da técnica (DOYLE et al., 2005; AGUIRRE et al., 2008). Alves e colaboradores (2005) desenvolveram novos *primers* para detecção de *E. canis* a partir do alinhamento genético de cepas conhecidas de *Ehrlichia* spp. depositadas no *GenBank*. Do alinhamento selecionou-se uma região semiconservada, um iniciador específico para *E. canis*, designada EBR1 (5'- CCT CTG GCT ATA GGA AAT TG- 3') e uma região conservada, um iniciador genérico EBR5 (5'-GGA GTG CTT AAC GCG TTA G- 3'). A reação de PCR apresentou positividade para todos os isolados de *E. canis*, amplificando o fragmento esperado de 765 pares de bases (bp) do gene 16S rRNA. Resultados negativos foram verificados nas reações de PCR para amostras de DNA genômico de *Babesia canis*, *Hepatozoon canis*, *Haemobartonella* sp., *Trypanosoma evansi* e do hospedeiro (*Canis familiaris*) livre de infecção, indicando a segurança do método quanto à especificidade.

Genes *dsb* erliquiais possuem regiões de ácidos nucleicos altamente conservadas e heterólogas necessárias ao desenvolvimento de *primers* gênero-específicos e espécie-específicos, que garantem 100% de especificidade e sensibilidade às reações de PCR (DOYLE et al., 2005; LABRUNA et al., 2007).

I.II.II. Epidemiologia

Atualmente, sabe-se que a infecção possui distribuição mundial, mas é particularmente frequente em regiões tropicais e subtropicais principalmente em áreas urbanas e suburbanas, fato relacionado à maior concentração do seu principal vetor, o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (LABRUNA; PEREIRA, 2001; UNVERA et al., 2009).

Como um típico carrapato nidícola, *R. sanguineus* tem colonizado comunidades em áreas urbanas de todo Brasil, onde é ativo por todo ano. Tem o hábito de viver em ninhos, tocas ou abrigos do seu hospedeiro e quando não estão parasitando, encontram-se livres no ambiente onde vive o cão (LABRUNA; PEREIRA, 2001; LABRUNA, 2004). Embora não

frequentemente, algumas populações deste vetor se estabelecem em regiões rurais, especialmente quando cães são criados confinados a pequenas áreas, o que oferece condições adequadas ao hábito nidícola dos carrapatos (LABRUNA; PEREIRA, 2001). Porém, é importante ressaltar que os cães são considerados importantes reservatórios de *E. canis* na natureza, uma vez que o parasito causa infecções prolongadas nestes animais e não persiste nos carrapatos mais do que uma geração (SMITH et al., 1976).

Johnson e colaboradores (1998) descreveram transmissão experimental de *E. canis* pelo *Dermacentor variabilis*, relatando a primeira demonstração de outra espécie de carrapato apta em transmitir transtetadialmente este importante patógeno. Foi também demonstrado que o *Amblyoma americanum* e o *Otobius megnini* são vetores em potencial (ANDEREG; PASSOS, 1999).

A erliquiose monocítica canina já foi relatada em todos os continentes do mundo (GAUNT et al., 2010). Dados nacionais mostraram que 10 – 30% dos cães admitidos em hospitais veterinários apresentaram testes sorológicos positivos para *E. canis* e/ou reação em cadeia da polimerase (PCR) ao gene 16S rRNA de *E. canis* (DAGNONE et al., 2003; LABARTHE et al., 2003; TRAPP et al., 2006; CARVALHO et al., 2008). Semelhantemente, Morais e colaboradores (2004) relataram que aproximadamente 20% dos cães atendidos em hospitais e clínicas veterinárias dos estados do Pernambuco, Minas Gerais, Bahia, Alagoas, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio Grande do Sul, Ceará e Distrito Federal apresentaram anticorpos anti – *E. canis*.

Em estudo retrospectivo sobre a casuística clínica de erliquiose em cães atendidos entre março de 1998 e setembro de 2001 em Belo Horizonte – MG, 16% dos animais possuíam mórulas de *E. canis* no esfregaço sanguíneo (MOREIRA et al., 2003). Já em áreas rurais de Minas Gerais foram encontrados 65,6% de cães reagentes para *E. canis* na região de Nanuque; 37,8% em Belo Horizonte e 24,7% em Lavras; utilizando imunofluorescência indireta (COSTA Jr. et al., 2007).

Em áreas do município de Monte Negro – RO foram observadas mais reações positivas para *E. canis* em cães urbanos (37,9%) do que em cães rurais (24,8%) (AGUIAR, 2006).

Utilizando a “nested-PCR”, Oliveira (2008) analisou cem amostras de sangue de cães que chegaram para a realização de exames no Hospital Veterinário em Viçosa – MG. Os resultados demonstraram 32% e 5% dos animais infectados com *E. canis* e *E. ewingii*, respectivamente. Semelhantemente; 38,9% dos animais avaliados em Ribeirão Preto – SP também foram positivos para *E. canis* (SANTOS et al., 2009).

Diniz e colaboradores (2007) avaliando amostras de sangue de 198 cães com alterações clínicas e patológicas consistentes com infecções transmitidas por carrapatos em Botucatu – SP encontraram 78% delas positivas para *E. canis*. Um total de 125 cães possuía anticorpos contra *E. canis* e DNA erliquial amplificado pela PCR. Entretanto 20 cães eram soronegativos e PCR positivos. Porém utilizando apenas PCR, Ueno e colaboradores (2009) encontraram 40% de positividade em cães da mesma região.

Estudos sobre aspectos epidemiológicos da erliquiose canina em Uberlândia indicam prevalência da doença variando entre 5% (BORIN et al., 2009) e 15% (SANTOS et al., 2004). Embora a prevalência da doença não tenha apresentado associação com o sexo, a raça e a idade dos cães, a positividade dependeu significativamente da presença de carrapatos nos animais (CARVALHO et al., 2008).

Previamente, *E. canis* não era considerada um patógeno humano até Perez e colaboradores (1996) relatarem o primeiro isolamento, caracterização molecular e antigênica de uma espécie erliquial humana na América do Sul, a Erliquia Humana Venezuelense (VHE). Tais autores descreveram, com base na sequência do gene 16S rRNA de VHE, que este agente etiológico era intimamente relacionado à *E. canis* Oklahoma. Baseados nesta análise sugeriram que VHE poderia ser uma nova cepa ou subespécie de *E. canis*, que causaria infecção assintomática persistente em humanos. A partir destes resultados, o potencial zoonótico de *E. canis* tem sido analisado por vários pesquisadores (DAGNONE et al., 2001; MACHADO, 2004).

Unver e colaboradores (2001) comprovaram que a cepa de *E. canis*, também isolada de humanos na Venezuela era idêntica à cepa de *E. canis* isolada de cães e carrapatos na mesma região geográfica. Baseados no gene 16S rRNA, os autores verificaram também que estas erliquias apresentavam alta similaridade (99,9%) com o isolado de VHE e com *E. canis* Oklahoma, além de perfis antigênicos semelhantes. Estas observações sugerem que o cão serve como reservatório de *E. canis* na América do Sul e que *R. sanguineus* é o principal vetor da doença, que ocasionalmente pode picar residentes ou viajantes.

A bactéria *E. chaffeensis*, agente etiológico da erliquiose humana, apresenta 98,2% de homologia com o rRNA de *E. canis* (ANDERSON et al., 1991) e tais espécies compartilham as principais proteínas antigênicas (CHEN et al., 1994). Assim, os avanços na caracterização do agente canino contribuirão diretamente aos estudos da infecção humana. O melhor entendimento da ecologia destas bactérias é necessário ao aperfeiçoamento de estratégias de controle e prevenção.

Considerando a relevante importância de estudos sobre a EMC, o presente trabalho buscou obter informações adicionais sobre a caracterização genética de diferentes isolados, em especial do isolado local que circula em Uberlândia e sobre a estratégia de evasão de *E. canis*.

**“ISOLAMENTO, PROPAGAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO
GENÉTICA DE UM NOVO ISOLADO DE *Ehrlichia canis*
(Rickettsiales: Anaplasmataceae) *IN VITRO*”**

Capítulo I

1. Introdução

Apesar da ampla distribuição de *E. canis*, o perfil genético e antigênico deste patógeno parece ser altamente conservado entre diferentes isolados. O gene 16S rRNA por ser altamente conservado em todas as espécies de bactérias, é frequentemente utilizado no diagnóstico e caracterização de *Ehrlichia* sp. (MACHADO et al., 2006; CARVALHO et al., 2008; BANETH et al., 2009; SANTOS et al., 2009). Sequências deste gene possuem 99,9 – 100% de similaridade entre diferentes isolados de *E. canis* da América do Sul (cepas VHE e VDE), América do Norte (cepa Oklahoma), Ásia (genótipos chineses AF162860 e japoneses Kagoshima e Okinawa) e Oriente Médio (Israel e Turquia) (UNVER et al., 2001; AGUIRRE et al., 2004; YU et al., 2007).

Pouco é conhecido sobre o gene responsável por codificar proteínas formadoras das ligações dissulfeto (*dsb*) e sobre o papel de tais componentes inter e intramoleculares na estrutura do envelope celular das erliquias. Embora ácidos nucleicos codificantes de genes *dsb* apresentem significativa divergência entre diferentes gêneros de bactérias, as proteínas Dsb (thio-dissulfóxido oxidoredutases) possuem funções e domínios conservados entre estes microorganismos. Eles são, portanto, excelentes alvos para ensaios moleculares gênero-específicos (DOYLE et al., 2005).

Análises adicionais de genes que sofrem pressão do hospedeiro (ex., famílias gênicas de proteínas de membrana externa) podem elucidar a diversidade e a evolução de cepas distintas geograficamente (PINYOOWONG et al., 2008). Assim, a regulação da antigenicidade de superfície, parece ser um importante mecanismo para o estabelecimento da infecção persistente, tal como a EMC, no hospedeiro. Mesmo a patogênese da doença sendo pouco compreendida, famílias multigênicas descritas em membros de gêneros relacionados tais como: *Ehrlichia*, *Anaplasma* e *Cowdria*, podem estar envolvidas na variação da expressão antigênica de superfície, relacionada à evasão da resposta imune (McBRIDE et al., 2000).

Proteínas imunodominantes de peso molecular de 28 KDa a 32 KDa presentes na membrana externa de *E. ruminantium*, *E. chaffeensis* e *E. canis* são codificadas por famílias multigênicas homólogas do gene *p28*, também chamado *p30*. Análises comparativas deste gene entre tais patógenos revelaram a presença de quatro regiões conservadas separadas por três regiões altamente variáveis. Assim, a ocorrência de genes múltiplos contendo regiões conservadas e variáveis nas erliquias pode resultar em recombinações genéticas levando à variações nos epítomos imunogênicos de superfície (REDDY et al., 1998).

A diversidade no gene *p28* já foi relatada entre isolados de *E. chaffeensis* (YU et al., 1999). Porém, estudos têm demonstrado que o gene *p28* apresenta-se conservado entre sete isolados de *E. canis* da América do Norte, permitindo o desenvolvimento de vacinas e de antígenos para diagnóstico (McBRIDE et al., 1999).

Estudos de hibridização genômica mostraram alta variabilidade no gene *p44* entre cepas de *A. phagocytophilum*. O gene pertence à família multigênica OMP1-44 que codifica proteínas de superfície semelhantemente ao gene *p28* de *E. canis* (HOTOPP et al., 2006).

O desenvolvimento de métodos de diagnóstico sorológicos e moleculares eficientes, bem como o de vacinas efetivas para a erliquiose monocítica canina é dependente do real entendimento sobre a diversidade genética de *E. canis* (ZHANG et al., 2008). Além disso, o isolamento do patógeno em cultura celular auxiliará na melhor caracterização do agente e providenciará a área geográfica para a aplicação de antígeno específico na utilização de testes sorológicos sensíveis (UNVER et al., 2001).

Há relatos de diversos isolamentos e caracterização genética de cepas de *E. canis* em todo o mundo (KEYSARY et al., 1996; AGUIRRE et al., 2004; AGUIAR et al., 2008). Porém, até o momento, somente três isolados foram propagados em laboratórios no Brasil: um no Rio de Janeiro – RJ (TORRES et al., 2002), outro em Jaboticabal – SP (AGUIAR et al., 2007) e o terceiro em São Paulo – SP (AGUIAR et al., 2008). Sendo os dois últimos detalhados geneticamente.

No presente estudo, casos clínicos de erliquiose monocítica canina no município de Uberlândia – MG foram investigados para a confirmação da presença do patógeno, isolamento e comparação deste com isolados provenientes de diferentes regiões.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Isolar *E. canis* de cães naturalmente infectados de Uberlândia – MG e avaliar a existência de polimorfismos entre o isolado local e cepas de diferentes localidades.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar cães naturalmente infectados com EMC através da “nested-PCR” no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (HOVET - UFU).
- Isolar uma cepa local de *E. canis* *in vitro*.
- Clonar fragmentos do gene *dsb* e *p28* dos isolados local e São Paulo de *E. canis*.
- Sequenciar, analisar a identidade e a presença de polimorfismos entre os fragmentos clonados e os dados referentes à outros isolados disponíveis no *GenBank*.

3. Material e Métodos

3.1. Origem do isolado local de *E. canis*

Um cão macho de cinco anos, raça Poodle, foi atendido no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (HOVET - UFU) em junho de 2009, apresentando apatia, febre, mucosas hipocoradas e histórico recente de infestação pelo carrapato *R. sanguineus*. Amostras de sangue periférico e total para esfregaço sanguíneo, hemograma, isolamento em cultura celular e PCR foram coletadas. Posteriormente, o animal recebeu tratamento com doxiciclina e transfusão sanguínea. O protocolo experimental foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA-UFU) (ANEXO).

3.2. Isolamento e cultivo do isolado local de *E. canis*

A amostra de sangue heparinizado destinada ao isolamento foi coletada assepticamente da veia jugular do animal naturalmente infectado. A amostra foi estocada a 4°C até o momento do processamento realizado no mesmo dia da coleta. Após a centrifugação da amostra, o plasma foi descartado e as células foram processadas de acordo com Paddock e colaboradores (1997) com algumas modificações. Inicialmente, o material foi diluído em solução salina balanceada de Hanks (HBSS) estéril sem cloreto de cálcio, cloreto de magnésio, sulfato de magnésio e vermelho de fenol (Gibco Brl, Grand Island, NY, USA) na proporção 1:1. A fração leucocitária foi separada em Histopaque 1083 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), ressuspensa em 5 mL de meio *Dulbecco's Modified Eagle's* (DMEM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) com 20% de soro de bezerro (HyClone Laboratories, Logan, Utah, USA) e mantida em garrafa de cultura de 25 cm² a 37°C e 5% de CO₂ para o cultivo leucocitário primário. Após 24 horas, os leucócitos foram inoculados em garrafa de cultura de 25 cm² contendo monocamada não infectada de células DH82, linhagem celular contínua estabelecida por Wellman e colaboradores (1988) a partir de células progenitoras de um histiocitoma canino (ATCC nº: CRL-10389; gentilmente fornecidas pelo Prof. Dr. Marcelo B. Labruna, Universidade de São Paulo). Para o crescimento e manutenção celular foi utilizado o meio DMEM acrescido de 5% de soro de bezerro, renovado parcialmente a cada 2-3 dias e mantido a 37°C e 5% de CO₂ (AGUIAR, 2006).

A cultura celular foi monitorada a cada 5 dias para a presença de mórulas através de esfregaços da monocamada celular corados com Kit Panótico Rápido (Laborclin, Pinhais, PR, BR) e através da “nested-PCR” do gene 16S rRNA para a confirmação da infecção. Quando a monocamada desta primeira passagem apresentou mínimo de 50% de infecção, alíquotas foram inoculadas em novas monocamadas de DH82 não infectadas, a fim de estabelecer novas passagens. Este procedimento foi realizado em passagens subsequentes, até que a monocamada apresentasse 90 a 100% de infecção após poucos dias de inoculação, caracterizando o estabelecimento do isolado local em cultivo celular.

3.3. Extração de DNA genômico

O DNA das amostras sanguíneas e do pellet de células DH82 infectadas com a cepa local foi obtido por extração manual conforme Azevedo e colaboradores (2003) com modificações.

Inicialmente, retirou-se uma alíquota de 500 µL de cada amostra e adicionou-se 1000 µL de tampão de lise celular gelado (320 mM de sacarose; 100 mM de Tris HCl; 5 mM de MgCl₂; 1% de Triton X-100; pH 7,5). Após centrifugação a 6.800 g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 400 µL de master mix (10 mM de EDTA; 10 mM de NaCl; 0,5% de SDS; 10 mM de Tris HCl; pH 7,5) para a ressuspensão do pellet. As amostras foram então incubadas durante 2 horas com a enzima proteinase K (10 mg/mL) a 65°C e centrifugadas a 17.900 g durante 5 minutos para decantar os debris celulares. O sobrenadante foi coletado, 200 µL de NaCl saturado (7M) foi adicionado e incubado em gelo durante 10 minutos. Após nova centrifugação a 17.900 g durante 15 minutos, o sobrenadante foi coletado e 1000 µL de etanol absoluto gelado foi adicionado a fim de precipitar o DNA. Após centrifugação (17.900 g durante 10 minutos) para decantar o DNA precipitado, o sobrenadante foi descartado, o pellet foi lavado com 1000 µL de etanol 70% gelado e centrifugado novamente a 17.900 g por 10 minutos. Finalmente, descartou-se o sobrenadante, o pellet foi diluído em 200 µL de água ultrapura, quantificado através do espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Montchanin, DE, USA) e estocado a -20°C até sua utilização.

Paralelamente, o DNA de células DH82 infectadas com o isolado *E. canis* São Paulo e de células não infectadas, fornecidas pelo Prof. Dr. Marcelo B. Labruna da Universidade de São Paulo, foram extraídos para utilização como controles positivo e negativo nas reações de PCR.

3.4. Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

Amostras de sangue e alíquotas de células DH82 infectadas com o isolado local foram submetidas à “nested-PCR” para amplificação do gene 16S rRNA de *Ehrlichia* spp. a fim de confirmar a infecção. Após a confirmação do isolamento, a amplificação dos genes *dsb* e *p28* dos isolados local e São Paulo foi realizada por meio de PCR convencional para a clonagem e sequenciamento dos fragmentos.

A extração de DNA, a elaboração do mix para o PCR e as reações de amplificação foram realizadas em salas diferentes com o intuito de evitar a contaminação das amostras. Os produtos amplificados foram separados por um sistema de eletroforese horizontal (Loccus Biotecnologia LCH, São Paulo, SP, BR) em gel de agarose 1,5% e visualizados com brometo de etídeo sob luz ultravioleta no transiluminador ImageMaster VDS (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). Em todas as reações foram incluídos um controle positivo (DNA de *E. canis* isolado São Paulo) e pelo menos um negativo (água ou DNA de células DH82 não infectadas) para assegurar a confiabilidade dos resultados.

3.4.1. Amplificação do gene 16S rRNA

Utilizou-se a “nested-PCR” para a amplificação do gene 16S rRNA conforme Murphy et al. (1998) com modificações. Dois pares de *primers*: ECC (5'- AGA ACG AAC GCT GGC GGC AAG C -3') combinado com o *primer* reverso ECB (5'- CGT ATT ACC GCG GCT GCT GGC A -3') e ECAN5 (5' CAA TTA TTT ATA GCC TCT GGC TAT AGG A 3') combinado com HE3 (5' TAT AGG TAC CGT CAT TAT CTT CCC TAT 3') foram utilizados para amplificar fragmentos com 478 bp e 365 bp, respectivamente. Enquanto o primeiro par de *primers* é designado para identificar um amplo espectro de *Ehrlichia* spp., o segundo é específico para *E. canis*.

A reação foi composta de 100 – 200 ng de DNA; 25 pmol de cada *primer*; 0,2 mM de cada nucleotídeo dATP, dTTP, dCTP e dGTP (Promega, Fitchburg, WI, USA); 2 mM MgCl₂; 1,25 U Platinum Taq Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); tampão da Taq contendo 50 mM KCl e 20 mM Tris-HCl e água ultrapura para completar o volume final de 50 µL.

Utilizou-se PCR com partida a quente, na qual a enzima é adicionada após a desnaturação inicial de 3 minutos a 94°C. A reação consiste em dois programas de ciclos que foram realizados no termociclador Mastercycler personal (Eppendorf, Edison, NJ, USA). No primeiro, utilizam-se os *outer primers* ECC e ECB com desnaturação inicial a 94°C por 3

minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 65°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 2 minutos. Ao final, uma extensão a 72°C por 5 minutos. Para o segundo ciclo, utiliza-se 5 µL do produto amplificado na primeira reação, em um novo mix com *inner primers* ECAN5 e HE3. Para esta reação foi utilizada uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 3 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 1,5 minuto. Em seguida, iniciam-se 37 ciclos de desnaturação a 92°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 1,5 minuto. Ao final, uma extensão a 72°C por 5 minutos.

3.4.2. Amplificação do gene *dsb*

Para a amplificação do gene *dsb*, utilizou-se o *primer dsb-330* (5' GAT GAT GTC TGA AGA TAT GAA ACA AAT 3') combinado com o *primer reverso dsb-728* (5' CTG CTC GTC TAT TTT ACT TCT TAA AGT 3') para amplificar um fragmento de 409 bp.

A reação continha 100 – 200 ng de DNA; 25 pmol de cada *primer*; 0,25 mM de uma mistura contendo cada nucleotídeo dATP, dTTP, dCTP e dGTP (Promega, Fitchburg, WI, USA); 2 mM MgCl₂; 1,25 U Platinum Taq Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); tampão da Taq contendo 50 mM KCl e 20 mM Tris-HCl e água ultrapura para completar o volume final de 50 µL conforme descrito por Doyle e colaboradores (2005) modificado.

Foi utilizada uma desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 2 minutos e uma extensão final a 72°C por 5 minutos no termociclador Mastercycler personal (Eppendorf, Edison, NJ, USA).

3.4.3. Amplificação do gene *p28*

Os *primers* 793 (5' GCA GGA GCT GTT GGT TAC TC 3') e 1330 (5' CCT TCC TCC AAG TTC TAT GCC 3') foram utilizados para amplificar um fragmento de 518 bp do gene *p28* conforme McBride e colaboradores (1999) modificado.

A reação de amplificação foi realizada com: 100 – 200 ng de DNA; 25 pmol de cada *primer*; 0,25 mM de uma mistura contendo cada nucleotídeo dATP, dTTP, dCTP e dGTP (Promega, Fitchburg, WI, USA); 2 mM MgCl₂; 1,25 U Platinum Taq Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); tampão da Taq contendo 50 mM KCl e 20 mM Tris-HCl e água ultrapura para completar o volume final de 50 µL.

Inicialmente, as amostras foram desnaturadas 95 °C por 2 minutos, seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 2 minutos e uma extensão final a 72°C por 5 minutos no termociclador Mastercycler personal (Eppendorf, Edison, NJ, USA).

3.5. Purificação dos *amplicons*

Após a visualização do gel de agarose, as bandas de amplificação dos genes *dsb* e *p28* dos isolados local e São Paulo foram cortadas e colocadas em eppendorfs contendo lâ de vidro (Synth, São Paulo, SP, BR) para a purificação do DNA amplificado. As amostras foram então centrifugadas repetidamente a 2.200 g durante 10 minutos até que acima da lâ de vidro apenas existisse agarose. Acrescentou-se acetato de amônia 7,5 M, etanol absoluto gelado e glicogênio 10 µg/mL ao volume filtrado para precipitar o DNA. O material foi deixado *overnight* a -20°C. Após tal período, efetuou-se uma centrifugação a 13.200 g durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se etanol 70% para ressuspender o pellet. O material foi novamente centrifugado como descrito anteriormente, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi seco a temperatura ambiente. O pellet foi ressuspensão em água ultrapura estéril, quantificado no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Montchanin, DE, USA), sujeito à eletroforese em gel de agarose 1% e estocado a -20°C até sua utilização nas reações de clonagem.

3.6. Clonagem dos genes *dsb* e *p28*

3.6.1. Reação de ligação

Os produtos purificados do gel de agarose foram inseridos em vetor plasmidial pGEM-T Easy (Promega, Fitchburg, WI, USA) (Figura 2), o qual provém de um sistema de clonagem de produtos da PCR preparado pela clivagem com a enzima de restrição *EcoV* e adição de timidina nas extremidades 3'. Essas timidinas localizadas na posição 3' do sítio de clonagem aumentam a eficiência da ligação do produto da PCR no plasmídeo, prevenindo a recircularização do vetor e oferecendo uma base compatível para os produtos da PCR amplificados por algumas polimerases termoestáveis. Para a seleção dos clones positivos, o vetor possui um gene de resistência à ampicilina e promotores para RNA polimerase T7 e SP6, seguido do sítio múltiplo de clonagem dentro da região codificadora α -peptídeo da

enzima β -galactosidase. A inativação do α -peptídeo pela inserção do fragmento de DNA no sítio de clonagem permite a detecção dos clones positivos pela ausência de cor, sendo que os clones negativos apresentam-se azulados (NAKAGHI, 2008).

As reações de ligação entre os produtos purificados do gel de agarose e o vetor pGEM-T Easy foram executadas conforme indicações do kit. Posteriormente, as amostras foram incubadas *overnight* a 14°C para obtenção do número máximo de clones.

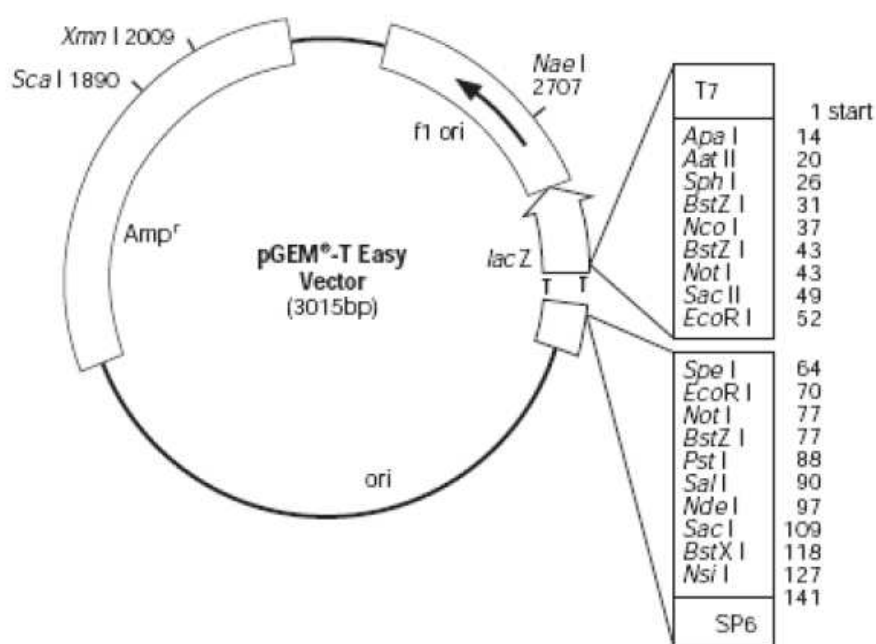


Figura 2. Mapa do vetor de clonagem pGEM-T Easy.

3.6.2. Transformação das bactérias *Escherichia coli* competentes

O processo de transformação baseia-se na introdução de um DNA exógeno (plasmídeo) em uma célula hospedeira bacteriana (*E. coli*). Uma vez dentro da bactéria, como o DNA possui origem de replicação autônoma, ou seja, capacidade de se replicar independentemente da replicação do cromossomo bacteriano, produzirá inúmeras cópias idênticas dentro da célula transformada.

O produto da reação de ligação (3µL) foi misturado levemente com 200 µL de bactérias eletrocompetentes *E. coli* XL1Blue, colocado em cuveta gelada e eletroporado em Eletroporador Bio-Rad (Bio-Rad, Berkeley, CA, USA). Após eletroporação adicionou-se, rapidamente à cuveta, 1 mL de meio SOC (triptona, extrato de levedura, NaCl, glicose e MgCl₂) lavando-a com o meio por duas vezes. O material coletado foi incubado por 1 hora a

37°C em *shaker* a 250 rpm e plaqueado em 100 µL de meio LB sólido contendo 100 µg/mL de ampicilina para crescimento das colônias bacterianas transformadas e resistentes (AZEVEDO et al., 2003).

3.6.3. Minipreparação do DNA plasmidial

Colônias bacterianas transformadas incolores (clones positivos) foram inoculadas em 5 mL de meio LB líquido contendo ampicilina (100 µg/mL) e incubadas a 37°C por 16-24 horas, sob agitação (250 rpm) para replicação. Posteriormente, realizou-se a lise bacteriana para a obtenção do DNA plasmidial conforme Azevedo e colaboradores (2003) com algumas modificações. Inicialmente as amostras foram centrifugadas a 6.000 g durante 20 minutos e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 200 µL de GET (glicose 20%; EDTA 0,5 M pH 8; Tris-HCl 1 M pH 7,4) e incubadas em gelo por 5 minutos. Em seguida foram adicionados 240 µL de solução II (NaOH 2 M, SDS 10%) recém preparada e homogeneizou-se por inversão. Após a lise celular foram adicionados 150 µL de solução III (acetato de potássio 3M) e 2 µL de RNase (10 mg/mL). As amostras foram incubadas por 10 minutos e centrifugadas (4.000 g) durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, ao qual foram adicionados 100 µL de isopropanol e centrifugou-se (4.000 g) durante 45 minutos a 20 °C. O *pellet* foi lavado com 600 µL de etanol 70% gelado e ressuspensão em 20 µL de água ultrapura estéril. O DNA plasmidial foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Montchanin, DE, USA) e visualizado em gel de agarose 0,8%.

3.7. Sequenciamento dos genes *dsb* e *p28*

No mínimo, três amostras clone de cada gene foram submetidas à reação de sequenciamento utilizando o Kit *DYEnamic ET Dye Terminator* em sequenciador automático MegaBace 1000 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA), segundo seu manual de instruções, o qual preconiza a utilização dos oligonucleotídeos iniciadores “M13 forward” (5'-GTA AAA CGA CGC CGC CCA-3') e “M13 reverse” (5'-AAC AGC TAT GAC CAT G-3') ao sequenciamento do plasmídeo pGEM-T Easy.

3.8. Análises *in silico*

Todas as sequências de nucleotídeos obtidas foram editadas utilizando o algoritmo CAP3 do Software BioEdit (HALL, 1999) e analisadas pelo programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) com a finalidade de procurar e comparar genes similares disponíveis no *GenBank*, banco de dados internacional. Já as sequências de aminoácidos foram traduzidas pelo programa Expasy Proteomics Server (<http://ca.expasy.org/tools/dna.html>). O alinhamento das sequências de nucleotídeos e aminoácidos foi realizado pelo programa ClustalW (THOMPSON et al., 1994) (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>). Os índices antigênicos das sequências protéicas foram deduzidos pelo algoritmo de antigenicidade Jameson-Wolf através do Software Lasergene (JAMESON; WOLF, 1988) (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA).

3.9. Número de acesso às sequências de nucleotídeos

As sequências de nucleotídeos do gene *dsb* utilizadas para comparação neste estudo estão disponíveis no *GenBank* com os seguintes números de acesso: *E. canis* Jaboticabal, DQ460716; *E. canis* São Paulo, DQ460715; *E. canis* Camarões, DQ124260; *E. canis* Jake, CP000107 e *E. canis* Oklahoma, AF403710. Já o produto amplificado do gene *p28* foi comparado às sequências dos isolados Jaboticabal, EF014897; São Paulo, DQ460713; VHE, AF165815; Jake, CP000107 e Oklahoma, AF078553.

4. Resultados

4.1. Caso clínico

Análise hematológica do cão aparentemente infectado com *E. canis*, revelou trombocitopenia (contagem de plaquetas: $33 \times 10^3/\mu\text{L}^{-1}$), anemia (hematócrito: 11,8%; hemoglobina: 3,7 g/dL; contagem de células vermelhas: $1,8 \times 10^6/\mu\text{L}^{-1}$) e leucocitose (contagem de células brancas: $20,6 \times 10^3/\mu\text{L}^{-1}$) com desvio à esquerda. Porém não foram observadas mórulas no esfregaço sanguíneo de capilar auricular.

4.2. Isolamento e cultivo do isolado local de *E. canis*

A “nested-PCR”, utilizando *primers* específicos para amplificação de um fragmento do gene 16S rRNA de *E. canis*, amplificou o produto esperado de 365 bp a partir do DNA extraído tanto do sangue total do cão quanto da monocamada de células DH82 infectadas após 13 dias de inoculação (Figura 3).

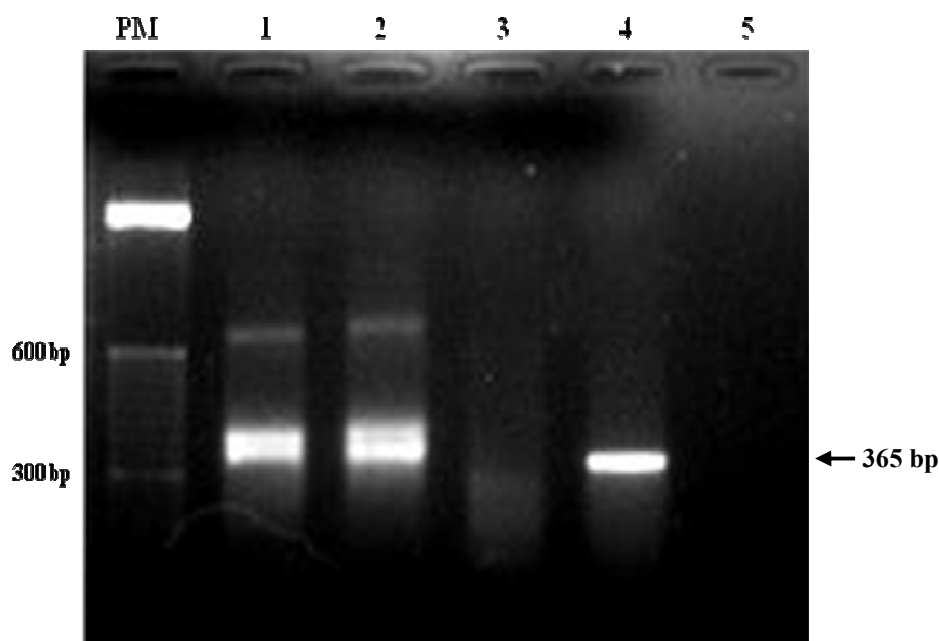


Figura 3. “Nested-PCR”, produtos da amplificação dos *primers* HE3 e ECAN5 para *E. canis*. PM: padrão de peso molecular de 100 bp. Coluna 1: amostra do cão naturalmente infectado (sangue). Coluna 2: amostra de DH82 com o isolado local aos 13 dias pós-inoculação (cultura celular). Coluna 3: amostra de DH82 (cultura celular). Coluna 4: controle positivo de *E. canis* isolado São Paulo (cultura celular). Coluna 5: controle negativo da reação (água). Os produtos foram corados com brometo de etídeo, revelados em gel de agarose 1,5% e observados sob luz ultravioleta.

Entretanto, inclusões citoplasmáticas compatíveis com *Ehrlichia* spp. foram encontradas nestas células após 26 dias de inoculação (Figura 4). O isolado replicou-se lentamente, alcançando 90 – 100% de infecção após 3 meses. Porém, após sucessivas inoculações em células DH82 não infectadas, o mesmo passou a atingir 90 – 100% de infecção em 15 dias.

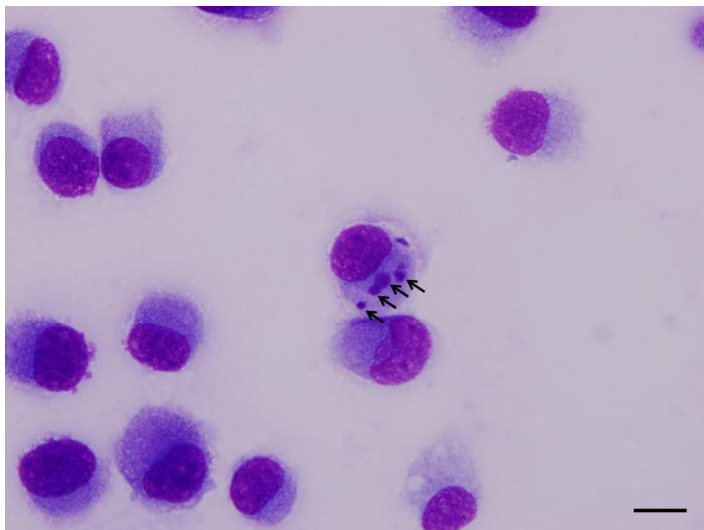


Figura 4. Fotomicrografia de células DH82 infectadas por *E. canis* isolado local sob a forma de mórulas (setas) aos 26 dias pós-inoculação. Coloração pelo Panótico Rápido. Barra: 10 μ m.

4.3. Caracterização molecular dos isolados local e São Paulo de *E. canis*

Amostras de células DH82 infectadas com os isolados local ou São Paulo de *E. canis* apresentaram-se positivas nas PCRs dos genes *dsb* e *p28*, com produtos amplificados de 409 bp e 518 bp, respectivamente (Figura 5).

Sequências parciais dos genes *dsb* (401 bp) e *p28* (526 bp) da cepa São Paulo cultivada em células DH82 na cidade de Uberlândia – MG nomeadas como *E. canis* São Paulo CC, foram obtidas após o ressequenciamento deste isolado. Também realizou-se o primeiro sequenciamento de um novo isolado, denominado *E. canis* Uberlândia, o qual resultou em sequências parciais dos genes *dsb* com 400 nucleotídeos e *p28* com 528 nucleotídeos. Tais sequências foram depositadas no *GenBank* e encontram-se disponíveis sob os números de acesso GU586135 e GU951532, respectivamente.

Após a exclusão das porções correspondentes aos *primers*, as sequências geradas foram analisadas quanto à similaridade em relação a outras cepas de *E. canis* acessíveis no *GenBank*. Assim, pode-se observar alto grau de identidade entre elas (Tabela 1).

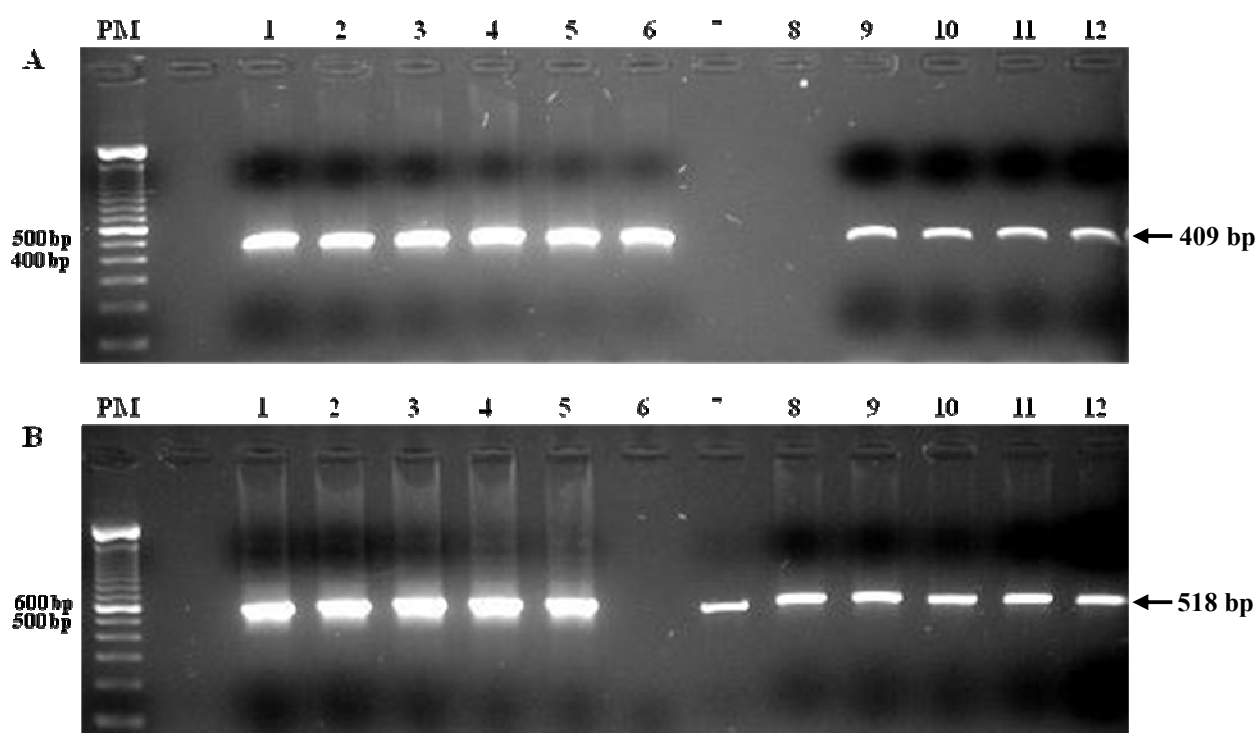


Figura 5. PCR, produtos da amplificação dos *primers* 330 e 728 para gene *dsb* (A) e dos *primers* 793 e 1330 para gene *p28* (B). PM: padrão de peso molecular de 100 bp (A e B). Colunas 1 – 6 (A): amostras positivas de *E. canis* isolado local. Colunas 7 e 8 (A): controles negativos da reação (água). Colunas 9 – 12 (A): amostras positivas de *E. canis* isolado São Paulo. Colunas 1 – 5 (B): amostras positivas de *E. canis* isolado local. Coluna 6 (B): controle negativo da reação (água). Colunas 7 – 12 (B): amostras positivas de *E. canis* isolado São Paulo. Os produtos foram corados com brometo de etídeo, revelados em gel de agarose 1,5% e observados sob luz ultravioleta.

Tabela 1. Similaridade entre as sequências parciais de nucleotídeos referentes aos genes *dsb* e *p28* do isolado *E. canis* Uberlândia e as diferentes cepas de *E. canis* disponíveis.

Isolados de <i>E. canis</i> ¹	Similaridade das sequências gênicas (%)	
	<i>dsb</i>	<i>p28</i>
<i>E. canis</i> São Paulo	100	97
<i>E. canis</i> Jaboticabal	100	98
<i>E. canis</i> Camarões	100	Na
<i>E. canis</i> Jake	99	96
<i>E. canis</i> Oklahoma	99	96
<i>E. canis</i> VHE	Na	98

¹ Números de acesso no *GenBank* estão disponíveis no Material e Métodos. Na: não avaliado.

Polimorfismos em três nucleotídeos do gene *dsb* de *E. canis* foram observados entre os isolados de Uberlândia e da América do Norte (Figura 6).

Uberlandia	-----AAGATATGAAACAAATAGTACAA	23
Jaboti cabal	-----AGTACAA	7
SaoPaulo	-----AGTACAA	7
SaoPauloCC	-----ATGATGTCTGAAGATATGAAACAAATAGTACAA	33
Oklahoma	TTTGATTACTCATGCGGCTATTGCAAAATGATGTCTGAAGATATGAAACAAATAGTACAA	360
Jake	TTTGATTACTCATGCGGCTATTGCAAAATGATGTCTGAAGATATGAAACAAATAGTACAA	360
Cameroon	-----TTGCAAAATGATGTCTGAAGATATGAAACAAATAGTACAA	40
Uberlandia	GACGGTAAAGTGCATGTTATATTCAGAGATTTCCTAATACTTGGTGAGTCTTCACTCAAA	83
Jaboti cabal	GACGGTAAAGTGCATGTTATATTCAGAGATTTCCTAATACTTGGTGAGTCTTCACTCAAA	67
SaoPaulo	GACGGTAAAGTGCATGTTATATTCAGAGATTTCCTAATACTTGGTGAGTCTTCACTCAAA	67
SaoPauloCC	GACGGTAAAGTGCATGTTATATTCAGAGATTTCCTAATACTTGGTGAGTCTTCACTCAAA	93
Oklahoma	GACGGTAAAGTGCATGTTATATTCAGAGATTTCCTAATACTTGGTGAGTCTTCACTCAAA	420
Jake	GACGGTAAAGTGCATGTTATATTCAGAGATTTCCTAATACTTGGTGAGTCTTCACTCAAA	420
Cameroon	GACGGTAAAGTGCATGTTATATTCAGAGATTTCCTAATACTTGGTGAGTCTTCACTCAAA	100
Uberlandia	GTTGCCCAAGCAGCACTAGCTGTACATATGATTAATCCAAATAAGTACATAGACTTCTAT	143
Jaboti cabal	GTTGCCCAAGCAGCACTAGCTGTACATATGATTAATCCAAATAAGTACATAGACTTCTAT	127
SaoPaulo	GTTGCCCAAGCAGCACTAGCTGTACATATGATTAATCCAAATAAGTACATAGACTTCTAT	127
SaoPauloCC	GTTGCCCAAGCAGCACTAGCTGTACATATGATTAATCCAAATAAGTACATAGACTTCTAT	153
Oklahoma	GTTGCCCAAGCAGCACTAGCTGTACATATGATTAATCCAAATAAGTACATAGACTTCTAT	480
Jake	GTTGCCCAAGCAGCACTAGCTGTACATATGATTAATCCAAATAAGTACATAGACTTCTAT	480
Cameroon	GTTGCCCAAGCAGCACTAGCTGTACATATGATTAATCCAAATAAGTACATAGACTTCTAT	160
Uberlandia	TATGCAGCAC TACATTACAAGCAACAGTTTAATGATGAGTCAATATTAAGTATCATAAAA	203
Jaboti cabal	TATGCAGCAC TACATTACAAGCAACAGTTTAATGATGAGTCAATATTAAGTATCATAAAA	187
SaoPaulo	TATGCAGCAC TACATTACAAGCAACAGTTTAATGATGAGTCAATATTAAGTATCATAAAA	187
SaoPauloCC	TATGCAGCAC TACATTACAAGCAACAGTTTAATGATGAGTCAATATTAAGTATCATAAAA	213
Oklahoma	TATGCAGCAC TACATTACAAGCAACAGTTTAATGATGAGTCAATATTAAGTATCATAAAA	540
Jake	TATGCAGCAC TACATTACAAGCAACAGTTTAATGATGAGTCAATATTAAGTATCATAAAA	540
Cameroon	TATGCAGCAC TACATTACAAGCAACAGTTTAATGATGAGTCAATATTAAGTATCATAAAA	220
Uberlandia	TCAATAGGTA TAACTGAAGAAGACTTCAAAGTATCATTAGCAAAAAATGCTGATGCTATA	263
Jaboti cabal	TCAATAGGTA TAACTGAAGAAGACTTCAAAGTATCATTAGCAAAAAATGCTGATGCTATA	247
SaoPaulo	TCAATAGGTA TAACTGAAGAAGACTTCAAAGTATCATTAGCAAAAAATGCTGATGCTATA	247
SaoPauloCC	TCAATAGGTA TAACTGAAGAAGACTTCAAAGTATCATTAGCAAAAAATGCTGATGCTATA	273
Oklahoma	TCAATAGGTA TAACTGAAGAAGACTTCAAAGTATCATTAGCAAAAAATGCTGATGCTATA	600
Jake	TCAATAGGTA TAACTGAAGAAGACTTCAAAGTATCATTAGCAAAAAATGCTGATGCTATA	600
Cameroon	TCAATAGGTA TAACTGAAGAAGACTTCAAAGTATCATTAGCAAAAAATGCTGATGCTATA	280
Uberlandia	GACAAAATGA TACAATCTAC CAGAGAAC TAGCACAGAACATTAAATATAAGGGGCACTCCT	323
Jaboti cabal	GACAAAATGA TACAATCTAC CAGAGAAC TAGCACAGAACATTAAATATAAGGGGCACTCCT	307
SaoPaulo	GACAAAATGA TACAATCTAC CAGAGAAC TAGCACAGAACATTAAATATAAGGGGCACTCCT	307
SaoPauloCC	GACAAAATGA TACAATCTAC CAGAGAAC TAGCACAGAACATTAAATATAAGGGGCACTCCT	333
Oklahoma	GACAAAATGA TACAATCTAC CAGAGAAC TAGCACAGAACATTAAATATAAGGGGCACTCCT	660
Jake	GACAAAATGA TACAATCTAC CAGAGAAC TAGCACAGAACATTAAATATAAGGGGCACTCCT	660
Cameroon	GACAAAATGA TACAATCTAC CAGAGAAC TAGCACAGAACATTAAATATAAGGGGCACTCCT	340
Uberlandia	GCTATCATAG TAGGGGATACATTTATCGGTGGTGCAGCTGATATATCAACTT TAAGAAGT	383
Jaboti cabal	GCTATCATAG TAGGGGATACATTTATCGGTGGTGCAGCTGATATATCA-----	355
SaoPaulo	GCTATCATAG TAGGGGATACATTTATCGGTGGTGCAGCTGATATATCA-----	355
SaoPauloCC	GCTATCATAG TAGGGGATACATTTATCGGTGGTGCAGCTGATATATCAACTT TAAGAAGT	393
Oklahoma	GCTATCATAG TAGGGGATACATTTATCGGTGGTGCAGCTGATATATCAACTT TAAGAAGT	720
Jake	GCTATCATAG TAGGGGATACATTTATCGGTGGTGCAGCTGATATATCAACTT TAAGAAGT	720
Cameroon	GCTATCATAG TAGGGGATACATTTATCGGTGGTGCAGC-----	378
Uberlandia	AAAATAGATCGAGCAGAA-----	400
Jaboti cabal	-----	
SaoPaulo	-----	
SaoPauloCC	AAAATAGAT-----	401
Oklahoma	AAAATAGATATGCAGAAATAA	741
Jake	AAAATAGATATGCAGAAATAA	741
Cameroon	-----	

Figura 6. Alinhamento das sequências nucleotídicas do gene *dsb* dos seguintes isolados de *E. canis*: Uberlândia, Jaboticabal, São Paulo, São Paulo CC, Oklahoma, Jake e Camarões. As bases nucleotídicas divergentes estão selecionadas. As sequências foram extraídas do *GenBank* e alinhadas pelo programa computacional ClustalW.

Consequentemente, as sequências de aminoácidos apresentaram uma única diferença representada pela substituição de uma metionina (M) nos isolados norte americanos por um glutamato (E) no isolado local (posição 244).

Já a sequência parcial do gene *p28* de *E. canis* Uberlândia apresentou dezoito polimorfismos com os isolados São Paulo CC, VHE, São Paulo, Jake, Oklahoma e Jaboticabal (Figura 7). O isolado de Oklahoma foi o que obteve a maior quantidade de variações, apresentando dezessete bases nucleotídicas diferentes.

As divergências apresentadas entre as sequências de aminoácidos dos diferentes isolados de *E. canis* considerados em comparação ao novo isolado brasileiro estão apresentadas na Tabela 2. Pode-se notar que todos os isolados apresentam aminoácidos diferentes nas posições 153, 154 e 249.

Apenas uma base nucleotídica do gene *p28* foi diferente entre a sequência previamente publicada de *E. canis* São Paulo (AGUIAR et al., 2008) e a ressequenciada neste estudo (Figura 7). Esta diferença baseou-se na substituição de uma guanina (G) por uma adenina (A) (posição 469), que resultou na troca de um aspartato (D) por uma asparagina (N) na sequência deduzida de aminoácidos (Tabela 2).

Os determinantes antigênicos foram delineados a partir do perfil linear da superfície das proteínas P28 deduzidas dos diferentes isolados de *E. canis*. Os polimorfismos entre estas sequências de aminoácidos resultaram em apenas algumas diferenças de antigenicidade entre isolados (Figura 8).

SaoPauloCC	----TTGCAGGAGCTGTTGGTTAATCAATGGGTGGCCCAAGAATAGAACTTGAAGTTCTG	56
VHE	-----AAATGGGTGGCCCAAGAATAGAACTTGAAGTTCTG	34
SaoPaulo	-----AAATGGGTGGCCCAAGAATAGAACTTGAAGTTCTG	34
Jake	GGGTTCGAGGAGCTATTTGGTTAATCAATGGGTGGCCCAAGAATAGAACTTGAAGTTCTG	360
Oklahoma	-----GCTATTGGTTAATCAATGGGTGGCCCAAGAATAGAACTTGAAGTTCTG	48
Jaboticabal	GGGTTCGAGGAGCTATTTGGTTAATCAATGGGTGGCCCAAGAATAGAACTTGAAGTTCTG	360
Uberlandia	-----GCTATTGGTTAATCAATGGGTGGCCCAAGAATAGAACTTGAAGTTCTG	48
SaoPauloCC	TACGAGACATTCGATGTGAAAAATCAGAACAAATAATATAAGAACGGCGCACACAGATAC	116
VHE	TACGAGACATTCGATGTGAAAAATCAGAACAAATAATATAAGAACGGCGCACACAGATAC	94
SaoPaulo	TACGAGACATTCGATGTGAAAAATCAGAACAAATAATATAAGAACGGCGCACACAGATAC	94
Jake	TACGAGACATTCGATGTGAAAAATCAGAACAAATAATATAAGAACGGCGCACACAGATAC	420
Oklahoma	TACGAGACATTCGATGTGAAAAATCAGAACAAATAATATAAGAACGGCGCACACAGATAC	108
Jaboticabal	TACGAGACATTCGATGTGAAAAATCAGAACAAATAATATAAGAACGGCGCACACAGATAC	420
Uberlandia	TACGAGACATTCGATGTGAAAAATCAGAACAAATAATATAAGAACGGCGCACACAGATAC	108
SaoPauloCC	TGTGCTTTATCTCATCATAGTTCAGCAACAACCATGTCCTCGCAAGTAACAAATTTGTT	176
VHE	TGTGCTTTATCTCATCATAGTTCAGCAACAACCATGTCCTCGCAAGTAACAAATTTGTT	154
SaoPaulo	TGTGCTTTATCTCATCATAGTTCAGCAACAACCATGTCCTCGCAAGTAACAAATTTGTT	154
Jake	TGTGCTTTATCTCATCATAGTTCAGCAACAACCATGTCCTCGCAAGTAACAAATTTGTT	480
Oklahoma	TGTGCTTTATCTCATCATAGTTCAGCAACAACCATGTCCTCGCAAGTAACAAATTTGTT	168
Jaboticabal	TGTGCTTTATCTCATCATAGTTCAGCAACAACCATGTCCTCGCAAGTAACAAATTTGTT	480
Uberlandia	TGTGCTTTATCTCATCATAGTTCAGCAACAACCATGTCCTCGCAAGTAACAAATTTGTT	168
SaoPauloCC	TTCTTAAAAAATGAAGGGTTAATTGACTTATCATTTATGATAAATGCATGCTATGACATA	236
VHE	TTCTTAAAAAATGAAGGGTTAATTGACTTATCATTTATGATAAATGCATGCTATGACATA	214
SaoPaulo	TTCTTAAAAAATGAAGGGTTAATTGACTTATCATTTATGATAAATGCATGCTATGACATA	214
Jake	TTCTTAAAAAATGAAGGGTTAATTGACTTATCATTTATGATAAATGCATGCTATGACATA	540
Oklahoma	TTCTTAAAAAATGAAGGGTTAATTGACTTATCATTTATGATAAATGCATGCTATGACATA	228
Jaboticabal	TTCTTAAAAAATGAAGGGTTAATTGACTTATCATTTATGATAAATGCATGCTATGACATA	540
Uberlandia	TTCTTAAAAAATGAAGGGTTAATTGACTTATCATTTATGATAAATGCATGCTATGACATA	228
SaoPauloCC	ATAATTGAAGGAATGCTTTTCACCTTATATTGTGCAGGTGTTGGTACTGATGTTGTT	296
VHE	ATAATTGAAGGAATGCTTTTCACCTTATATTGTGCAGGTGTTGGTACTGATGTTGTT	274
SaoPaulo	ATAATTGAAGGAATGCTTTTCACCTTATATTGTGCAGGTGTTGGTACTGATGTTGTT	274
Jake	ATAATTGAAGGAATGCTTTTCACCTTATATTGTGCAGGTGTTGGTACTGATGTTGTT	600
Oklahoma	ATAATTGAAGGAATGCTTTTCACCTTATATTGTGCAGGTGTTGGTACTGATGTTGTT	288
Jaboticabal	ATAATTGAAGGAATGCTTTTCACCTTATATTGTGCAGGTGTTGGTACTGATGTTGTT	600
Uberlandia	ATAATTGAAGGAATGCTTTTCACCTTATATTGTGCAGGTGTTGGTACTGATGTTGTT	288
SaoPauloCC	TCCATGTTTGAAGCTATAAATCCTAAAAATTTCTTACCAGGAAAACTAGGATTAGGTTAT	356
VHE	TCCATGTTTGAAGCTATAAATCCTAAAAATTTCTTACCAGGAAAACTAGGATTAGGTTAT	334
SaoPaulo	TCCATGTTTGAAGCTATAAATCCTAAAAATTTCTTACCAGGAAAACTAGGATTAGGTTAT	334
Jake	TCCATGTTTGAAGCTATAAATCCTAAAAATTTCTTACCAGGAAAACTAGGATTAGGTTAT	660
Oklahoma	TCCATGTTTGAAGCTATAAATCCTAAAAATTTCTTACCAGGAAAACTAGGATTAGGTTAT	348
Jaboticabal	TCCATGTTTGAAGCTATAAATCCTAAAAATTTCTTACCAGGAAAACTAGGATTAGGTTAT	660
Uberlandia	TCCATGTTTGAAGCTATAAATCCTAAAAATTTCTTACCAGGAAAACTAGGATTAGGTTAT	348
SaoPauloCC	AGTATAAGTTCAGAAGCCTCTGTTTATTCGGTGGACACTTTCACAGAGTCATAGGTAAT	416
VHE	AGTATAAGTTCAGAAGCCTCTGTTTATTCGGTGGACACTTTCACAGAGTCATAGGTAAT	394
SaoPaulo	AGTATAAGTTCAGAAGCCTCTGTTTATTCGGTGGACACTTTCACAGAGTCATAGGTAAT	394
Jake	AGTATAAGTTCAGAAGCCTCTGTTTATTCGGTGGACACTTTCACAGAGTCATAGGTAAT	720
Oklahoma	AGTATAAGTTCAGAAGCCTCTGTTTATTCGGTGGACACTTTCACAGAGTCATAGGTAAT	408
Jaboticabal	AGTATAAGTTCAGAAGCCTCTGTTTATTCGGTGGACACTTTCACAGAGTCATAGGTAAT	720
Uberlandia	AGTATAAGTTCAGAAGCCTCTGTTTATTCGGTGGACACTTTCACAGAGTCATAGGTAAT	408
SaoPauloCC	GAATTTAGAGACATCCCTGCTATGGTTCTAGTGGATCAAATCTTCCAGAAAACCAATTT	476
VHE	GAATTTAGAGACATCCCTGCTATGGTTCTAGTGGATCAAATCTTCCAGAAAACCAATTT	454
SaoPaulo	GAATTTAGAGACATCCCTGCTATGGTTCTAGTGGATCAAATCTTCCAGAAAACCAATTT	454
Jake	GAATTTAGAGACATCCCTGCTATGGTTCTAGTGGATCAAATCTTCCAGAAAACCAATTT	780
Oklahoma	GAATTTAGAGACATCCCTGCTATGGTTCTAGTGGATCAAATCTTCCAGAAAACCAATTT	468
Jaboticabal	GAATTTAGAGACATCCCTGCTATGGTTCTAGTGGATCAAATCTTCCAGAAAACCAATTT	780
Uberlandia	GAATTTAGAGACATCCCTGCTATGGTTCTAGTGGATCAAATCTTCCAGAAAACCAATTT	468
SaoPauloCC	GCAATAGTAACACATAATGTGTGTCACCTTGGCATAGAACTTGAGGAAAG-----	526
VHE	GCAATAGTAACACATAATGTGTGTCACCTTGGCATAGAACTTGAGGAAAG-----	505
SaoPaulo	GCAATAGTAACACATAATGTGTGTCACCTT-----	484
Jake	GCAATAGTAACACATAATGTGTGTCACCTTGGTTTAGAACTTGAGGAAAGATTAACTT	839
Oklahoma	GCAATAGTAACACATAATGTGTGTCACCTTGGTTTAGAACTTGAGGAAAGATTAACTT	527
Jaboticabal	GCAATAGTAACACATAATGTGTGTCACCTTGGTTTAGAACTTGAGGAAAGATTAACTT	839
Uberlandia	GCAATAGTAACACATAATGTGTGTCACCTTGGCATAGAACTTGAGGAAAGATTAACTT	528

Figura 7. Alinhamento das sequências nucleotídicas do gene *p28* dos seguintes isolados de *E. canis*: São Paulo CC, VHE, São Paulo, Jake, Oklahoma, Jaboticabal e Uberlândia. As bases nucleotídicas divergentes estão selecionadas. As sequências foram extraídas do *GenBank* e alinhadas pelo programa computacional ClustalW.

Tabela 2. Diferenças entre aminoácidos traduzidos do gene *p28* do isolado *E. canis* Uberlândia e diferentes cepas de *E. canis* disponíveis.

Isolados de <i>E. canis</i> ¹	Posição do aminoácido ²												
	106	151	153	154	157	249	252	254	257	272	278	279	280
<i>E. canis</i> Uberlândia	V	S	P	G	N	G	E	S	K	I	N	Q	L
<i>E. canis</i> São Paulo CC	●	●	S	S	●	V	G	N	E	●	Na	Na	Na
<i>E. canis</i> São Paulo	Na	●	S	S	D	V	G	N	E	Na	Na	Na	Na
<i>E. canis</i> Jaboticabal	I	●	S	S	●	V	●	●	●	L	F	N	F
<i>E. canis</i> Jake	I	●	S	S	●	V	G	N	E	L	F	N	F
<i>E. canis</i> Oklahoma	I	N	S	S	●	V	G	N	E	L	F	N	Na
<i>E. canis</i> VHE	Na	N	S	S	●	V	G	N	E	●	Na	Na	Na

¹ Números de acesso no *GenBank* estão disponíveis no Material e Métodos. Na: não avaliado.

² Pontos representam aminoácidos idênticos ao isolado *E. canis* Uberlândia.

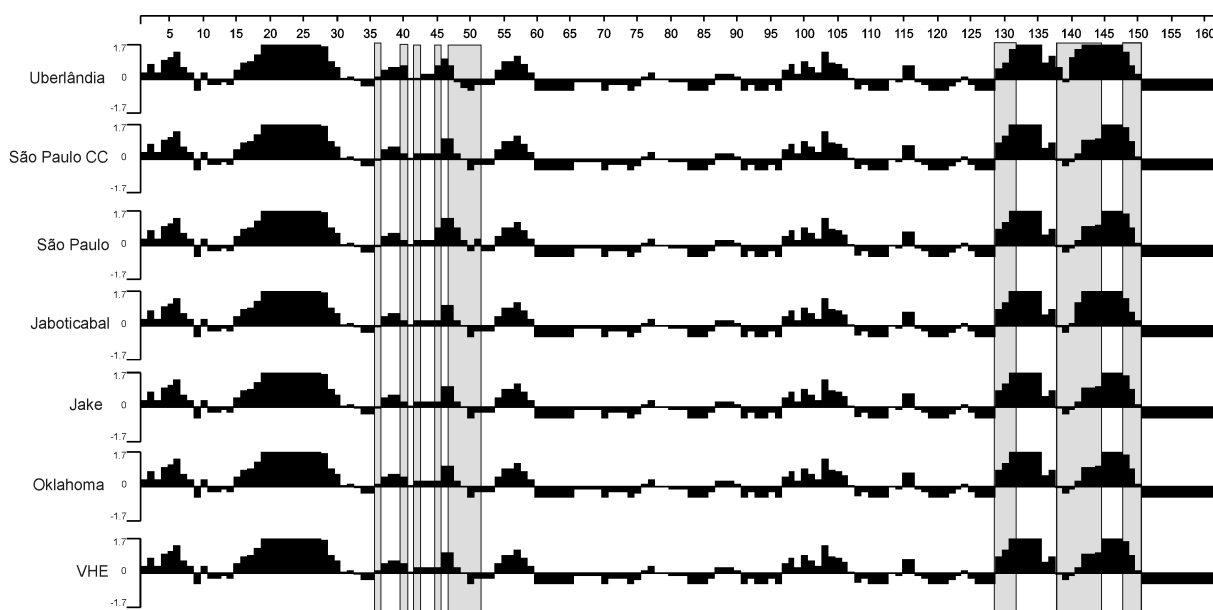


Figura 8. Comparação dos índices de antigenicidade das proteínas traduzidas a partir das sequências parciais do gene *p28* para os seguintes isolados de *E. canis*: Uberlândia, São Paulo CC, São Paulo, Jaboticabal, Jake, Oklahoma e VHE. As regiões com valores acima de zero representam determinantes antigênicos potenciais. Os epítomos divergentes entre os isolados em relação ao isolado local de *E. canis* estão selecionados. A escala indica a posição do aminoácido na sequência deduzida.

5. Discussão

Apesar da distribuição mundial de *E. canis* e de sua importância tanto na medicina veterinária quanto na saúde pública, a quantidade de informações a respeito de sua variabilidade antigênica permanece insuficiente. Assim, o isolamento de cepas em cultura celular é fundamental para a caracterização do agente e identificação de antígenos específicos presentes em determinada área geográfica para a elaboração de testes diagnósticos confiáveis e vacinas efetivas.

O presente trabalho relatou o isolamento e caracterização genética parcial de uma nova cepa de *E. canis* encontrada em cão naturalmente infectado do município de Uberlândia – MG, designada isolado *E. canis* Uberlândia. Procedimento similar foi realizado em São Paulo – SP, o qual relatou resultados semelhantes (AGUIAR, 2006).

O cão atendido apresentou sinais clínicos e hematológicos compatíveis com a EMC aguda. A trombocitopenia é o achado mais frequente em cães experimentalmente e naturalmente infectados por *E. canis* e está associada à cascata de coagulação, à resposta inflamatória e à diminuição da meia-vida das plaquetas pelo desenvolvimento de anticorpos antiplaquetários (MACHADO et al., 2004; MENDONÇA et al., 2005; GAUNT et al., 2010). Já a anemia está relacionada à supressão da eritropoiese e à destruição acelerada destas células, que ocorre progressivamente durante a fase aguda da doença (TENÓRIO et al., 2007).

O isolamento e cultivo *in vitro* de *E. canis* utilizando células DH82, provenientes de um histiocitoma canino, vêm sendo realizados em diversas partes do mundo (KEYSARY et al., 1996; UNVER et al., 2001; AGUIRRE et al., 2004; AGUIAR et al., 2008). A monocamada de células DH82 cultivadas neste estudo, apresentou inclusões citoplasmáticas características do isolado local aos trinta dias após a inoculação, período similar também descrito para as cepas espanhola (AGUIRRE et al., 2004) e brasileiras Jaboticabal (AGUIAR et al., 2007) e São Paulo (AGUIAR et al., 2008). Entretanto as mórulas da cepa VHE isolada de humano na Venezuela, puderam ser vistas precocemente, após 4 dias de inoculação em cultura celular (PEREZ et al., 1996). Estudos que utilizaram a cultura primária de monócitos caninos para o isolamento de *E. canis* relataram a visualização de mórulas após 7 a 9 dias (KEYSARY et al., 1996; GUTIÉRREZ et al., 2008). O tempo requerido para a cultura celular tornar-se positiva não é influenciado apenas pelo tipo de cepa, mas também pelo número de organismos erliquiais presentes no inóculo (IQBAL; RIKIHISA, 1994b).

A amplificação parcial do gene 16S rRNA através da “nested-PCR” mostrou-se útil à detecção molecular de *E. canis*. Embora a PCR convencional permita detectar todos os

membros de *Ehrlichia* spp. e identificar as espécies de acordo com a aplicação de *primers* espécie-específicos, sua sensibilidade é influenciada pelo tipo de amostra e pela baixa concentração do agente durante a fase crônica da doença (HARRUS et al., 1998). A “nested-PCR” mostrou-se capaz de detectar precocemente 0,2 pg de DNA purificado de *E. canis* ao contrário da PCR convencional que apenas detectou concentrações superiores a 20 pg (IQBAL et al., 1994; WEN et al., 1997). Além disso, amostras sanguíneas de cães cronicamente infectados por *E. canis* apresentaram-se positivas através da “nested-PCR” (HARRUS et al., 1998). Assim, este teste molecular tem apresentado alta sensibilidade e especificidade no diagnóstico da EMC em todas as fases da doença.

Estudos prévios têm demonstrado que alguns genes tais como: 16S rRNA, *dsb* e *p28*, exibem alto nível de conservação entre cepas de *E. canis* provenientes de diferentes regiões geográficas (PEREZ et al., 1996; AGUIRRE et al., 2004; YU et al., 2007; AGUIAR et al., 2008; PINYOOWONG et al., 2008; CARDOSO et al., 2010; HSIEH et al., 2010). No entanto, uma comparação sorológica sugeriu a existência de variabilidade antigênica entre isolados de diferentes regiões do mundo (HEGARTY et al., 1997).

O fragmento parcial do gene *dsb* analisado neste estudo demonstrou completa conservação (100%) com as sequências correspondentes dos isolados São Paulo, Jaboticabal e Camarões. Porém, polimorfismos foram encontrados entre o isolado local e as cepas norte americanas (Jake e Oklahoma), levando à substituição de um aminoácido hidrofílico (glutamato) por um apolar hidrofóbico (metionina), respectivamente. Embora as propriedades físico-químicas dos aminoácidos sejam consideradas importantes na determinação estrutural e funcional protéica, esta alteração não modificou os determinantes antigênicos potenciais das diferentes cepas de *E. canis* em questão (dados não mostrados), sugerindo que tais cepas possuem perfis similares de antigenicidade. Análises comparativas entre isolados brasileiros de *E. canis* e o isolado norte americano Jake demonstraram total similaridade em relação ao gene *dsb* (AGUIAR et al., 2007; LABRUNA et al., 2007; AGUIAR et al., 2008). Isto pode estar relacionado ao fato de que tais estudos utilizaram sequências comparativas menores, variando de 350 à 355 bp, já o presente estudo baseou-se em análises de fragmentos contendo 400 bp.

O fragmento do gene *p28* de *E. canis* Uberlândia apresentou diversos nucleotídeos diferentes quando comparado às sequências correspondentes dos isolados São Paulo, Jaboticabal, Jake, Oklahoma e Venezuela. Estes achados estão de acordo com estudos prévios que relataram um pequeno número de substituições no gene *p28* do isolado São Paulo em relação aos isolados Jake, Oklahoma e Venezuela (AGUIAR et al., 2008). Entretanto, a

completa conservação deste gene entre isolados de *E. canis* distintos geograficamente da América do Norte, sugere que este patógeno apresenta-se conservado nesta área (McBRIDE et al., 1999).

Os resultados deste estudo são consistentes aos achados que relatam a alta conservação do gene *dsb* e a variação no gene *p28*, que codifica proteínas imunodominantes de membrana sujeitas à pressão imune de diferentes hospedeiro (DOYLE et al., 2005; YU et al., 2007). Através dessas variações, o índice antigênico identificou os determinantes antigênicos potenciais presentes nas diferentes cepas de *E. canis*. Similaridades na antigenicidade foram observadas, mas alguns epítomos apresentaram diferenças, sugerindo que proteínas traduzidas pelo gene *p28* são diferentes entre isolados, independentemente da origem.

Substituições de aminoácidos em quatro regiões variáveis da proteína P28 são responsáveis por diferenças antigênicas entre *E. canis* e *E. chaffeensis*. Porém, a imunoreatividade documentada e a conservação da proteína P28 entre sete diferentes isolados de *E. canis* na América do Norte, indicam sua aplicação como antígeno para diagnóstico e produção de vacinas (McBRIDE et al., 1999). Tal conservação sugere que a expressão diferencial dos membros da família gênica *p28* pode estar envolvida nas infecções persistentes, mais do que os eventos de recombinação genética (McBRIDE et al., 2000).

Sequências gênicas que codificam a proteína imunoreativa gp36 em 34 amostras de cães naturalmente infectados por *E. canis* em *Taiwan*, apresentaram apenas 86,7 – 87,2% de identidade com outros onze isolados provenientes de diferentes localidades, indicando assim a caracterização de uma nova cepa (HSIEH et al., 2010).

A substituição de uma guanina por uma adenina no fragmento ressequenciado do gene *p28* de *E. canis* São Paulo, sugere possível mutação neste isolado durante a cultura celular. Semelhantemente, resultados prévios indicam que o isolado *E. canis* Israel pode ter sofrido atenuação após passagens múltiplas em cultura de células (OR et al., 2009). No entanto, o novo aminoácido traduzido do fragmento ressequenciado apresenta propriedades físico-químicas similares ao aminoácido substituído, provavelmente não influenciando a atividade protéica.

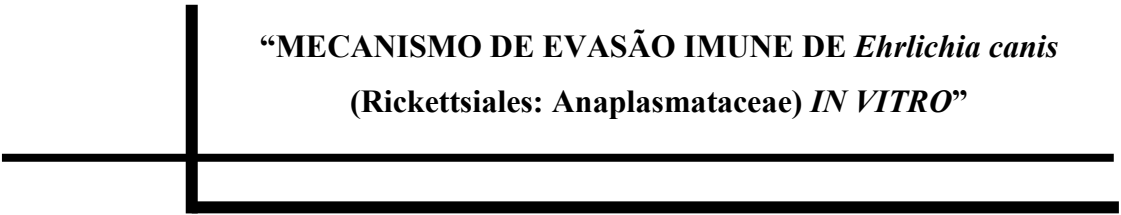
A ausência de diversidade genética entre os isolados de *E. canis* pode ser explicada pelo fato de que este parasito vem enfrentando pequena pressão durante a seleção natural, uma vez que é mantido predominantemente em uma espécie única de carrapato e de hospedeiro canino (YU et al., 2007). Alternativamente, todos os isolados de *E. canis* poderiam ter sido originados a partir de um ancestral comum introduzido recentemente no ambiente (McBRIDE et al., 2000; PARZY et al., 2009).

Com o intuito de elucidar a diversidade e a evolução das cepas, pesquisas adicionais sobre os polimorfismos genéticos presentes em isolados de *E. canis* provenientes de diferentes áreas geográficas e de diferentes hospedeiros, são fundamentais para determinar seu papel na virulência e antigenicidade. Assim, diferenças no gene *p28*, observadas neste estudo, indicam a necessidade de novos estudos com o intuito de avaliar a aplicação deste antígeno (P28) no diagnóstico e na produção de vacinas.

6. Conclusões

A partir dos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

- O gene *dsb* do isolado *E. canis* Uberlândia apresenta conservação genética e protéica com os isolados africano e brasileiros, entretanto possui alguns polimorfismos com os isolados norte americanos;
- O gene *dsb* do isolado *E. canis* Uberlândia apresenta perfil antigênico similar aos isolados da mesma bactéria depositados no *GenBank*;
- O gene *p28* do isolado *E. canis* Uberlândia possui polimorfismos quando comparado à todos os isolados da mesma bactéria depositados no *GenBank*, principalmente em relação aos isolados norte americanos;
- O gene *p28* do isolado *E. canis* Uberlândia apresenta perfil antigênico com alguns epítomos distintos dos apresentados pelos outros isolados, sugerindo a variação antigênica entre isolados, independentemente da origem;
- Não houve variação no perfil protéico do isolado *E. canis* São Paulo após sucessivas passagens em cultura celular.

A decorative graphic consisting of a horizontal line and a vertical line that meet at a right angle, forming an L-shape. The vertical line is on the left, and the horizontal line is on the bottom.

**“MECANISMO DE EVASÃO IMUNE DE *Ehrlichia canis*
(Rickettsiales: Anaplasmataceae) *IN VITRO*”**

Capítulo II

1. Introdução

Para que membros da família Anaplasmataceae, na qual *E. canis* está incluída, consigam infectar os leucócitos de mamíferos, tais microorganismos utilizam estratégias a fim de garantir tanto sua evasão à resposta imune do hospedeiro, quanto sua permanência temporária no interior das células invadidas, essenciais à sua multiplicação e consequente disseminação no organismo do hospedeiro.

Quando tais bactérias interagem com as células do hospedeiro, sinais são ativados, tanto no interior da célula quanto na bactéria. Estes sinais desarmam o sistema de alarme, bem como os mecanismos microbicidas dos leucócitos e condicionam a célula hospedeira a aceitar estes intrusos no compartilhamento de espaço e nutrientes. Sinais ativados no interior das bactérias permitem que elas regulem seu metabolismo e fisiologia no novo ambiente celular para que sua permanência temporária não prejudique a fisiologia da célula hospedeira até que tenham se multiplicado suficientemente (RIKIHISA, 2003).

Várias são as estratégias utilizadas pelas bactérias *A. phagocytophilum* e *E. chaffeensis* para que permaneçam fora do alcance de diversos mecanismos imunes do hospedeiro. Dentre elas, pode-se destacar a inibição e/ ou atraso de cascatas de sinalização cruciais à ativação dos fagócitos e às vias de diferenciação celular, além da inibição da sinalização da citocina interferon- γ (IFN- γ) e alteração no metabolismo de ferro da célula hospedeira (RIKIHISA, 2006).

A. phagocytophilum prorroga o tempo reduzido de vida dos neutrófilos infectados, atrasando a apoptose espontânea destas células para que haja tempo suficiente à sua replicação e dispersão. Tal resultado é consequência do aumento na expressão de proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2, da manutenção do potencial de membrana mitocondrial e da prevenção da ativação de caspases 3, relacionados à cascata de sinalização apoptótica (GE et al., 2005).

De acordo com o hospedeiro no qual *E. chaffeensis* se encontra, membros da família multigênica codificantes de proteínas de membrana externa com 28 KDa (*p28*) expressam-se diferentemente (SINGU et al., 2005). Esta adaptação ao ambiente do hospedeiro pode estar relacionada ao escape imune do patógeno, uma vez que a imunização em camundongos utilizando proteínas P28 recombinantes conferiu proteção aos animais (LI et al., 2002). Resultados semelhantes foram observados para *A. phagocytophilum* (RIKIHISA, 2010).

Diversas proteínas de superfície pertencentes a estas bactérias também são diferencialmente expressas durante o desenvolvimento intracelular, o que as torna marcadores

de superfície para a distinção entre células reticuladas e densamente coradas por microscopia de imunofluorescência (NIU et al., 2006; ZHANG et al., 2007). Baseando-se nesta observação, células reticuladas de *A. phagocytophilum* foram co-localizadas com uma glicoproteína de membrana 1 associada ao lisossomo (LAMP-1), sugerindo que estágios do ciclo biológico influenciam a natureza de ligação à célula hospedeira e a evasão da via lisossomo-endossomo-tardio (NIU et al., 2006).

Para criar um nicho permissivo à replicação, a bactéria intracelular deve se ligar a um receptor apropriado na célula hospedeira, que induz sua internalização sem sinalização anti-microbiana e sem a fusão de vesículas lisossomais (RIKIHIZA, 2006). Assim, a entrada de *A. phagocytophilum* e de *E. chaffeensis* na célula do hospedeiro, ocorre através de um processo de endocitose mediado por receptores de membrana, chamados cavéolas (LIN; RIKIHISA, 2003a). Os microorganismos são então direcionados a compartimentos, ou inclusões, onde não há geração de ânions superóxido (O_2^-) nem aquisição de componentes de endossomos tardios/lisossomos. A notável habilidade destas bactérias em prevenir a geração de O_2^- , principal sistema de defesa de monócitos/macrófagos e neutrófilos, está na não ativação da enzima NADPH oxidase pré-existente pela diminuição nos níveis dos seus componentes (MOTT et al., 2002). Já o mecanismo que previne a fusão destes compartimentos com os lisossomos permanece sob investigação. Porém, estudos demonstram a não co-localização entre tais microorganismos e proteínas lisossomais, tais como LAMP-1 e LAMP-3 (BARNEWALL et al., 1997; MOTT et al., 1999). Além de inclusões contendo *E. chaffeensis* apresentarem características de endossomos precoces, incluindo os marcadores Rab5, antígeno 1 de endossomo precoce (EEA1) e receptor de transferrina (TfR) (MOTT et al., 1999).

Estudos relacionados aos mecanismos de evasão de *E. canis* ainda são escassos. Entretanto, Mavromatis e colaboradores (2006) observaram a ausência de enzimas essenciais ao metabolismo de peptideoglicanos e açúcares aaminados na parede celular deste patógeno. Estes achados estão de acordo com dados experimentais que observaram a deleção dos genes requeridos na biossíntese de peptideoglicanos e lipopolissacarídeos na membrana externa de *A. phagocytophilum* e de *E. chaffeensis*, o que levaria a um baixo reconhecimento das células imunes efectoras através de seus receptores “Toll-like 2/4” e consequentemente a uma menor resposta imune inata do hospedeiro (LIN; RIKIHISA, 2003b). Tais receptores são de reconhecimento padrão expressos por monócitos/macrófagos e neutrófilos, capazes de reconhecer e se ligar a padrões moleculares associados à patógenos (PAMP) conservados,

incluindo lipopolissacarídeos (LPS) ou peptideoglicanos, presentes na parede celular bacteriana (RIKIHISA, 2006).

Com o intuito de compensar a perda na estabilidade da parede celular decorrente da deleção destas estruturas, tais patógenos adquiriram a habilidade de captar colesterol do hospedeiro. Porém, a perda de peptideoglicanos fornece flexibilidade em acomodar erliquias em um espaço intra-vacuolar limitado, melhorando ainda mais a compatibilidade com leucócitos e hospedeiros invertebrados (LIN; RIKIHISA, 2003b).

Moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) são glicoproteínas de membrana que apresentam antígenos aos linfócitos T de defesa. Em células infectadas com *E. canis* observou-se a não expressão de moléculas de MHC classe II, já em células não infectadas tal expressão variou entre 46,2% a 47,6%. Demonstrando assim, uma estratégia utilizada pelo patógeno para diminuir a apresentação de antígenos, a produção de citocinas e a resposta anti-erliquial das células de defesa do hospedeiro (HARRUS et al., 2003).

O sistema de secreção tipo IV é ancestralmente relacionado à entrega de macromoléculas efetoras produzidas pelo parasito para as células alvo eucarióticas. Genes relacionados a este sistema (VirB e VirD) foram identificados em *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis* e *E. canis*, cujas proteínas traduzidas apresentam importante função na interação parasito-hospedeiro, associada à sobrevivência e replicação intracelular do microorganismo (OHASHI et al., 2002; FELEK et al., 2003).

A compreensão adquirida através do estudo de patógenos intracelulares obrigatórios e suas estratégias de evasão permitem aumentar nosso conhecimento sobre as possíveis estratégias terapêuticas efetivas. Assim, o presente estudo buscou identificar a co-localização entre a enzima fosfatase ácida, clássico marcador lisossomal, e inclusões de *E. canis* em cultura celular.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Analisar a fusão de vacúolos contendo inclusões citoplasmáticas de *E. canis* à endossomos tardios ou lisossomos *in vitro*.

2.2. Objetivo específico

- Avaliar ultraestruturalmente a co-localização entre a enzima lisossomal fosfatase ácida e inclusões citoplasmáticas de *E. canis* em diferentes estágios biológicos.

3. Material e Métodos

3.1. Coleta e processamento das amostras para microscopia eletrônica

Células DH82 (*dog histiocyte*) infectadas com o isolado São Paulo de *E. canis* apresentando aproximadamente 50% de infecção, como demonstrado por esfregaços da monocamada celular corados pelo Kit Panótico Rápido (Laborclin, Pinhais, PR, BR), foram processadas de acordo com Worth e colaboradores (2009), com algumas modificações. Os dados experimentais foram realizados em quadruplicata para posterior quantificação.

Inicialmente, as amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (glutaraldeído 2,5%; paraformaldeído 2%; tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2) durante 1 hora, centrifugadas (2000 g) para decantar as células por 5 minutos e descartar o sobrenadante. Em seguida, foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,2M por 24 horas, novamente centrifugadas para descartar o sobrenadante e incubadas durante 1,5 hora a 37°C com agitação constante em meio Gormori modificado (13,9 mM de β -glicerofosfato; 1 mM de nitrato de chumbo; 0,05 M de tampão cacodilato de sódio pH 5; 0,08% de cloreto de cálcio; 5% de sacarose) para a marcação da enzima fosfatase ácida dos compartimentos lisossomais. Após a marcação, as células foram extensivamente lavadas em tampão cacodilato de sódio (0,2M) durante 6 horas, centrifugadas e incluídas em gelatina (0,5%).

O material foi pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio a 2% por 1 hora. Adicionou-se ferrocianeto de potássio 1,25% ao material, e aguardou 30 minutos. As amostras foram desidratadas em séries crescentes de acetona a 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 100% e 100% ficando 5 minutos nos cinco primeiros banhos e 10 minutos nos três últimos. Posteriormente, o material foi colocado em solução de resina Epon e acetona na proporção 1:1 por 12 horas. Após esse período, a solução contendo o material foi colocada na estufa a 37°C por 12-24 horas. Após a evaporação de toda acetona, os blocos foram incluídos em resina pura e mantidos durante 2 dias em estufa a 60°C. Finalmente, foram obtidos cortes ultrafinos no ultramicrotomo, os quais foram contrastados com acetato de uranila e nitrato de chumbo (BOZZOLA; RUSSELL, 1998).

O mesmo procedimento descrito acima foi aplicado na marcação de células DH82 não infectadas, que compreendem o controle negativo da reação e positivo da marcação. Para assegurar a confiabilidade da marcação de fosfatase ácida, amostras de células DH82 não infectadas também foram utilizadas como controle negativo da marcação, procedimento no

qual não foi adicionado o substrato (β -glicerofosfato) da enzima fosfatase ácida no meio Gormori modificado.

3.2. Análise das eletromicrografias e quantificação dos vacúolos contendo *E. canis*

Os cortes foram analisados e documentados fotograficamente em microscópio eletrônico Zeiss EM-109 acoplado ao sistema de captura de imagens Megaview^{G2} / Olympus Soft Imaging Solutions.

Em cada amostra processada, 100 células contendo inclusões citoplasmáticas de *E. canis* foram escolhidas aleatoriamente para a quantificação de mórulas íntegras e deterioradas co-localizadas e não co-localizadas com a marcação de fosfatase ácida.

3.2. Análise Estatística

Com o auxílio do Software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), aplicou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov para análise da distribuição dos dados. Como os dados não apresentaram distribuição normal aplicou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney para constatar a existência de possíveis variações estatisticamente significativas entre os endossomos marcados e não marcados com a fosfatase ácida. Em ambos os casos, foram utilizados nível de significância de 95% ($\alpha \leq 0,05$).

4. Resultados

As análises por microscopia eletrônica de transmissão (MET) revelaram a presença de mórulas de *E. canis* isolado São Paulo em diferentes estágios de maturação no interior dos macrófagos caninos. Para verificar se tais mórulas estavam localizadas em compartimentos endossomais tardios ou lisossomais, foi realizada a marcação da enzima fosfatase ácida presente em altas concentrações no interior destas organelas.

Observou-se marcação tanto nos compartimentos citoplasmáticos contendo mórulas íntegras (Figura 9) quanto nos endossomos com mórulas deterioradas (Figura 10). Porém a porcentagem de mórulas deterioradas apresentou maior marcação em relação às mórulas íntegras (Figura 11).

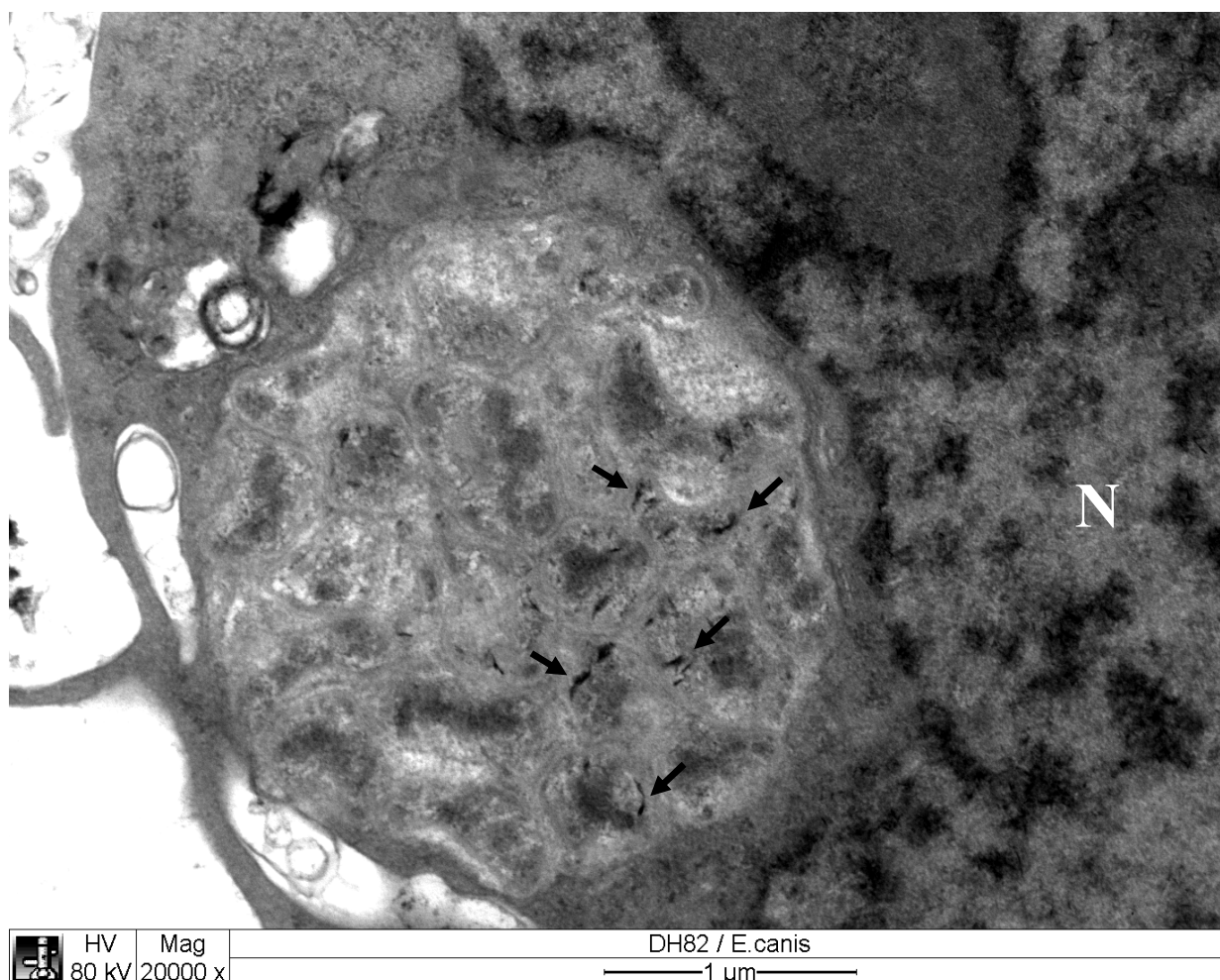


Figura 9. Eletromicrografia de célula DH82 contendo mórula íntegra de *E. canis* isolado São Paulo. Marcações de fosfatase ácida são observadas no interior da mórula (setas). Núcleo (N).

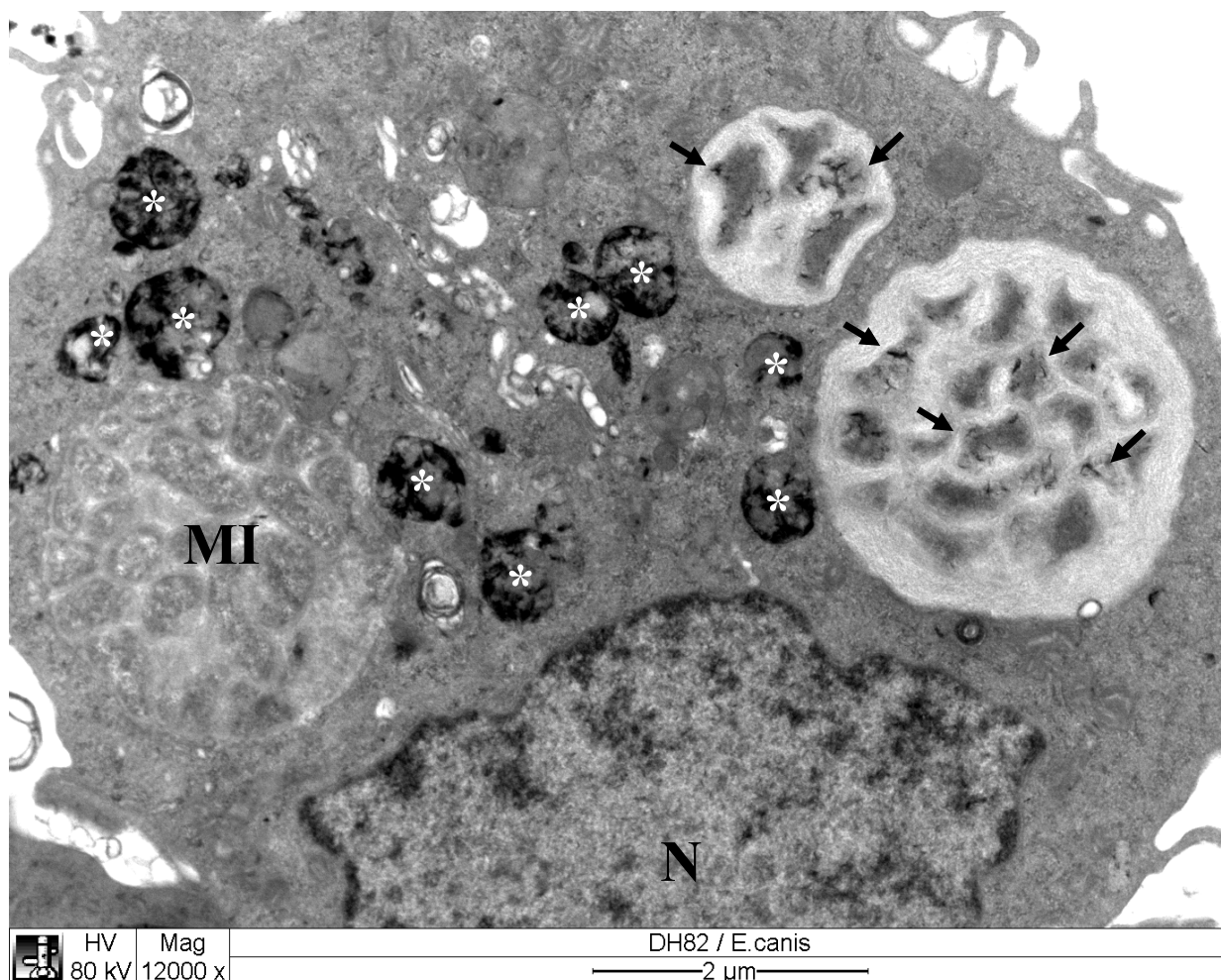


Figura 10. Eletromicrografia de células DH82 infectada por *E. canis* isolado São Paulo. Marcações de fosfatase ácida são observadas no interior das mórulas deterioradas (setas). Porém o mesmo não ocorre no interior da mórula íntegra (MI). Lisossomos marcados (*). Núcleo (N).

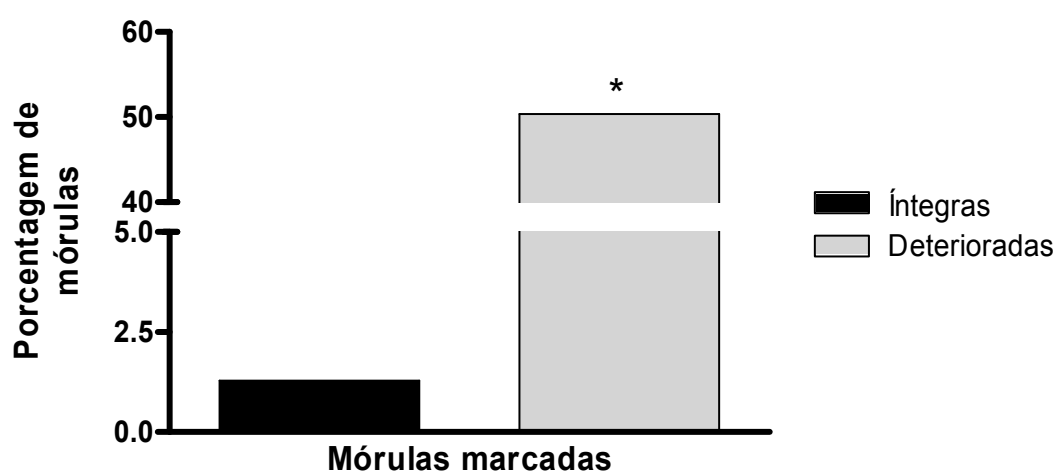


Figura 11. Comparação da porcentagem de endossomos contendo mórulas íntegras e deterioradas de *E. canis* isolado São Paulo, marcadas com a enzima fosfatase ácida. Os dados representam a mediana de quatro experimentos independentes analisados pelo teste de Mann-Whitney. *Significância estatística entre os grupos ($\alpha \leq 0,05$).

Assim, embora a ausência de marcação também tenha sido observada em endossomos contendo mórulas íntegras (Figura 12) ou deterioradas da bactéria (Figura 13), análises estatísticas revelaram que mórulas íntegras de *E. canis* praticamente não se fundem à compartimentos lisossomais (Figura 14) e que mesmo não havendo diferença significativa entre a quantidade de mórulas degradadas marcadas e não marcadas (Figura 15), as degradadas permitem maior fusão lisossomal quando comparadas às íntegras (Figura 11).

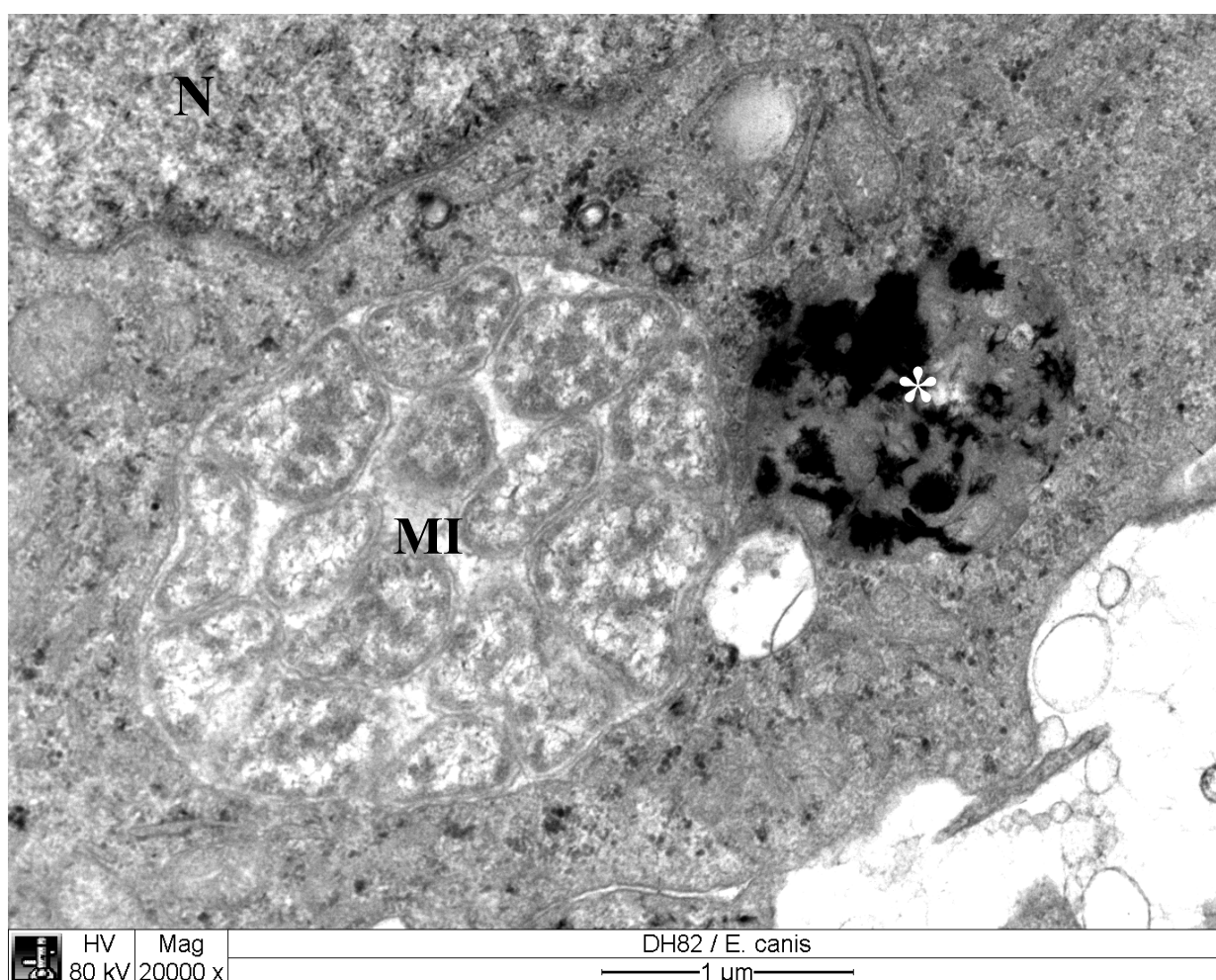


Figura 12. Eletromicrografia de célula DH82 contendo mórula íntegra de *E. canis* isolado São Paulo sem marcações de fosfatase ácida (MI). Lisossomo marcado (*). Núcleo (N).

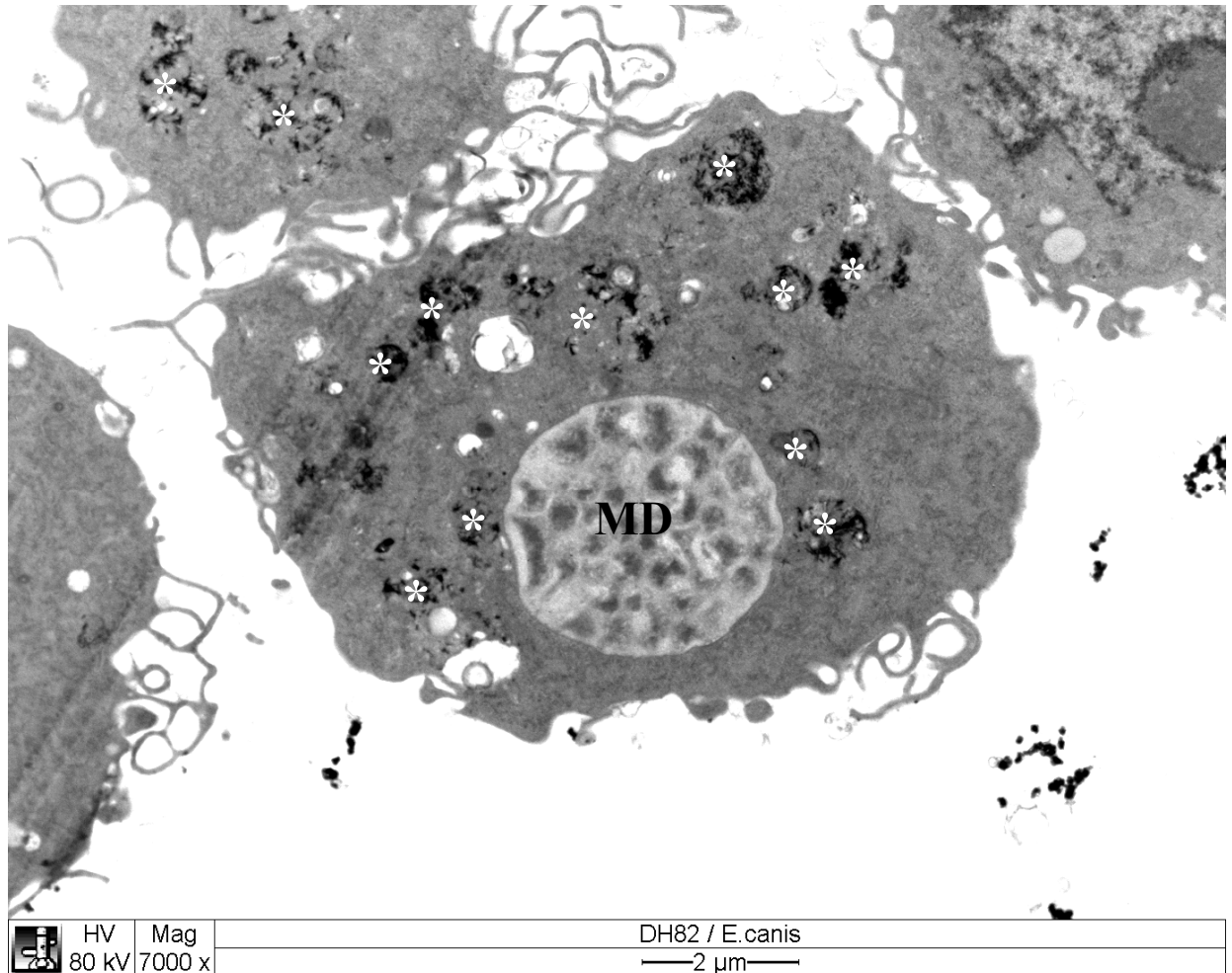


Figura 13. Eletromicrografia de célula DH82 contendo mórula deteriorada de *E. canis* isolado São Paulo sem marcações de fosfatase ácida (MD). Lisossomos marcados (*).

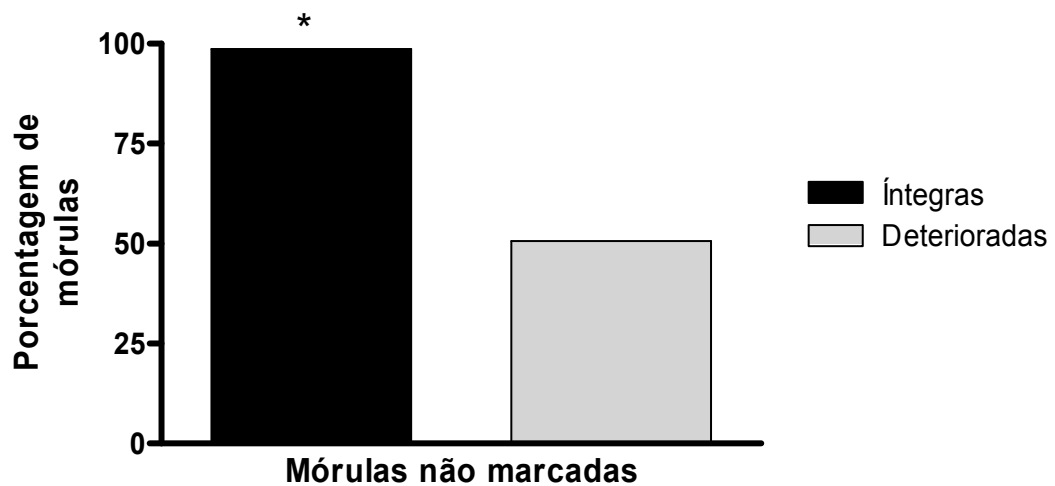


Figura 14. Comparação da porcentagem de endossomos contendo mórulas íntegras e deterioradas de *E. canis* isolado São Paulo, não marcadas com a enzima fosfatase ácida. Os dados representam a mediana de quatro experimentos independentes analisados pelo teste de Mann-Whitney. *Significância estatística entre os grupos ($\alpha \leq 0,05$).

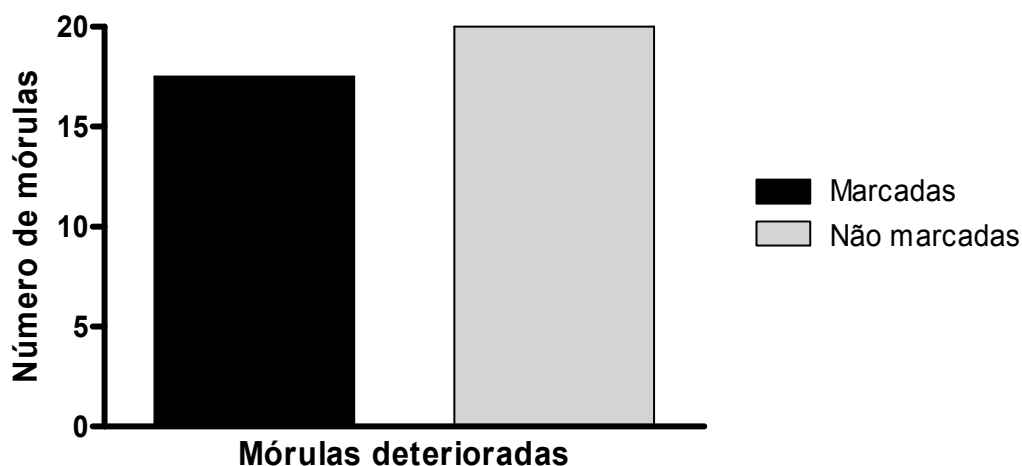


Figura 15. Comparação de número de endossomos contendo mórulas deterioradas de *E. canis* isolado São Paulo, marcadas e não marcadas com a enzima fosfatase ácida. Os dados representam a mediana de quatro experimentos independentes analisados pelo teste de Mann-Whitney. Não houve significância estatística entre os grupos ($\alpha > 0,05$).

Não houve co-localização entre os corpos elementares endocitados e a marcação de fosfatase ácida no interior dos macrófagos caninos (Figura 16).

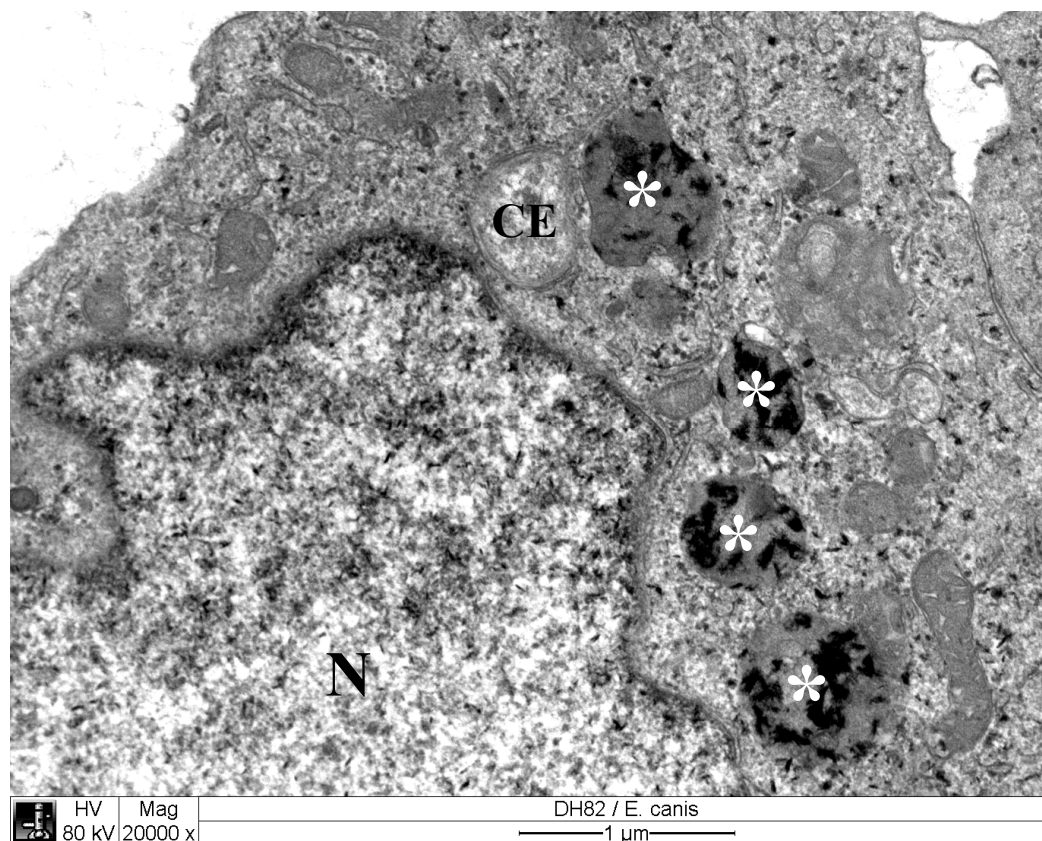


Figura 16. Eletromicrografia de célula DH82 contendo corpo elementar de *E. canis* isolado São Paulo sem marcação de fosfatase ácida (CE). Lisossomos marcados (*). Núcleo (N).

5. Discussão

Microorganismos não adaptados à sobrevivência intracelular são geralmente destruídos pela interação com macrófagos e células polimorfonucleares fagocíticas. A principal função efetora destas células é matar bactérias fagocitadas através da fusão dos lisossomos aos fagossomos, possibilitando assim o contato de enzimas proteolíticas lisossomais ao microorganismo (ABBAS, 2009). Assim, bactérias intracelulares obrigatórias desenvolveram diversos mecanismos para evadir desta resposta imune do hospedeiro, os quais envolvem adaptações que garantem a sobrevivência e replicação do parasito no interior de diferentes compartimentos intracelulares nas células eucarióticas do hospedeiro. Algumas estratégias baseiam-se no bloqueio da fusão lisossomal às inclusões bacterianas como ocorre com a *Mycobacterium tuberculosis*, no escape de vesículas fagocíticas para a replicação no citoplasma da célula como a *Listeria monocytogenes* e na adaptação a compartimentos ácidos como a *Coxiella burnetii* (HACKSTADT, 1998).

Ehrlichia spp. sobrevive e replica-se exclusivamente dentro de inclusões no interior de leucócitos, tais como, monócitos e macrófagos que são células efetoras da imunidade inata para a defesa antimicrobiana. Portanto, as erliquias precisam converter o ambiente hostil do hospedeiro em um ambiente propício ao seu desenvolvimento (BARNEWALL et al., 1997).

A citoquímica para fosfatase ácida marca endossomos tardios e lisossomos, bem como vacúolos que se fundem a estas organelas (HACKSTADT, 1998). Assim, os resultados aqui apresentados demonstraram que inclusões citoplasmáticas íntegras de *E. canis* praticamente não se fundem a compartimentos lisossomais. Semelhantemente, estudos prévios não indicaram nenhum vacúolo contendo *N. risticii* ou *A. phagocytophilum* com marcação de fosfatase ácida em células não tratadas com o antibiótico oxitetraciclina. Uma vez tratadas, as células apresentaram aumento significativo na co-localização de marcadores lisossomais e vacúolos contendo o parasito, sugerindo que este fármaco prejudica a estratégia destas bactérias em inibir a fusão lisossomal. A inibição desta fusão é específica aos vacúolos parasitóforos, pois os parasitos intracelulares não inibem a fusão lisossomal com fagossomos contendo partículas de látex fagocitadas pela mesma célula (WELL; RIKIHISA, 1988; GOKCE et al., 1999). Além disso, estudos prévios sugerem que *E. chaffeensis* localiza-se em endossomos precoces, já que não houve a co-localização entre este parasito e marcadores lisossomais LAMP-1 e LAMP-3, mas houve co-localização com os marcadores Rab5, EEA1 e TfR, característicos destes endossomos (BARNEWALL et al., 1997; MOTT et al., 1999). A não co-localização entre inclusões de *A. phagocytophilum* e estes marcadores lisossomais

também foi observada, no entanto, nenhuma co-localização com marcadores de endossomos precoces foi visualizada, sugerindo o isolamento deste parasito do tráfico vesicular endocítico (MOTT et al., 1999).

A evasão da fusão lisossomal pelas inclusões erliquiais é fundamental à sobrevivência e replicação deste patógeno, apesar de se basear em diferentes estratégias de acordo com a espécie de *Ehrlichia* spp. (RIKIHISA, 2003).

Interessantemente, no presente trabalho algumas inclusões citoplasmáticas íntegras de *E. canis* apresentaram marcação fosfatase ácida positiva, assim como outras inclusões degradadas. Segundo Niu e colaboradores (2006), células HL-60 (*human promyelocytic leukemia*) possuem receptores para internalização de *A. phagocytophilum* em replicação, ou seja, conseguem internalizar bactérias em estágios precoces de infecção. A co-localização entre estas bactérias e LAMP-1, sugere que a internalização de bactérias no estágio de desenvolvimento inicial não conduz à infecção, uma vez que direciona os endossomos à fusão lisossomal.

Células contendo inclusões citoplasmáticas de *E. canis* deterioradas apresentaram marcação para a enzima fosfatase ácida ($\geq 50\%$). Este resultado está de acordo com estudos que demonstraram a alta fusão fagossomo-lisossomal em células contendo *Salmonella typhimurium*, *M. tuberculosis* ou *T. gondii* inativados em relação aos viáveis (JOINER et al., 1990; BUCHMEIER; HEFFRON, 1991; CLEMENS; HORWITZ, 1995). Assim, microorganismos intracelulares inativos ou mortos perdem a habilidade de inibir a fusão fagossomo-lisossomal. Contudo, não se pode descartar a possibilidade do processo inibidor da fusão fagossomo-lisossomal eventualmente falhar (NIU et al., 2006), o que permitiria a fusão e conseqüentemente a degradação das bactérias, ou seja, a degradação poderia ser efeito e não causa da fusão. Assim as poucas inclusões marcadas contendo bactérias aparentemente íntegras ($< 2,5\%$) teriam sofrido fusão recente e as bactérias ainda não teriam sofrido deterioração. As inclusões contendo bactérias deterioradas e não marcadas ($\leq 50\%$), também corrobora com esta possibilidade, pois mesmo contendo bactérias deterioradas o processo de fusão não ocorreu.

Análises adicionais sobre a presença e a ausência de diferentes marcadores de compartimentos relacionados à via fagossomo-lisossomal em endossomos contendo *E. canis* podem elucidar os possíveis mecanismos que impedem a fusão fagossomo-lisossomal na célula hospedeira, permitindo a elaboração de novas estratégias terapêuticas.

6. Conclusão

A partir dos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

- O isolado *E. canis* São Paulo inibe a fusão de endossomos aos lisossomos, como mecanismo de evasão ao sistema imune do hospedeiro.



Bibliografia

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Cellular and molecular immunology**. 6^a ed. San Francisco: Elsevier Saunders, 2009. 576 p.

AGUIAR, D. M.; HAGIWARA, M. K.; LABRUNA, M. B. In vitro isolation and molecular characterization of an *Ehrlichia canis* strain from São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 3, p. 489 – 93, 2008.

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

AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, G.T.; PINTER, A.; GENNARI, S.M.; CAMARGO, L.M. A.; LABRUNA, M.B. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 44, n. 1, p. 126 – 32, 2007.

AGUIRRE, E.; SAINZ, A.; DUNNER, S.; AMUSATEGUI, I.; LÓPEZ, L.; RODRÍGUEZ-FRANCO, F.; LUACES, I.; CORTÉS, O.; TESOURO, M. A. First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Spain. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 125, n. 3 – 4, p. 365 – 72, 2004.

AGUIRRE, E.; TESOURO, M.A.; AMUSATEGUI, I.; RODRÍGUEZ-FRANCO, F.; SAINZ, A. Comparison between different polymerase chain reaction methods for the diagnosis of *Ehrlichia canis* infection. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1149, p. 118 – 20, 2008.

ALVES, L.M.; LINHARES, G.F.C.; CHAVES, N S.T.; MONTEIRO, L.C.; LINHARES, D.C.L. Avaliação de iniciadores e protocolo para o diagnóstico da Pancitopenia Tropical Canina por PCR. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 6, n. 1, p. 49 – 54, 2005.

ANDEREG, P.I.; PASSOS, L.M.F. Erliquiose Canina: revisão. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 19, p. 31 – 8, 1999.

ANDERSON, B. E.; DAWSON, J. E.; JONES, D. C.; WILSON, K. H. *Ehrlichia chaffeensis* a new species associated with human ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 29, n. 12, p. 2838 – 42, 1991.

AZEVEDO, M.A; FELIPE, M.S.S.; MARANHÃO, A.Q.; DE SOUZA, M.T. **Técnicas Básicas em Biologia Molecular**. 1ª ed. Brasília: Editora UnB, 2003. 211 p.

BANETH, G.; HARRUS, S.; OHNONA, F. S., SCHLESINGER, Y. Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 136, n. 3 – 4, p. 321 – 25, 2009.

BARNEWALL, R.E.; RIKIHISA, Y.; LEE, E.H. *Ehrlichia chaffeensis* inclusions are early endosomes which selectively accumulate transferrin receptor. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 65, n. 4, p. 1455 – 61, 1997.

BORIN, S.; CRIVELENTI, L.Z.; FERREIRA, F.A. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de *Ehrlichia* spp. naturalmente infectados. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 3, p. 566 – 71, 2009.

BOWMAN, D.; LITTLE, S.E.; LORENTZEN, L.; SHIELDS, J.; SULLIVAN, M.P.; CARLIN, E.P. Prevalence and geographic distribution of *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in the United States: Results of a national clinic-based serologic survey. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 160, n. 1 – 2, p. 138 – 48, 2009.

BOZZOLA, J.J.; RUSSELL, L.D. **Electron microscopy: principles and techniques for biologists**. 2ª ed. Sudbury: Jones and Bartlett Publishers, 1998. 670p.

BUCHMEIER, N.A.; HEFFRON, F. Inhibition of macrophage phagosome-lysosome fusion by *Salmonella typhimurium*. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 59, n. 7, p. 2232 – 38, 1991.

CADMAN, H. F.; KELLY, P. J.; MATTHEWMAN, L. A.; ZHOU, R.; MASON, P. R. Comparison of the dot-blot- enzyme linked-immunoassay with immunofluorescence for detecting antibodies to *Ehrlichia canis*. **The Veterinary Record**, London, v. 135, n. 15, p. 362, 1994.

CÁRDENAS, A. M.; DOYLE, C. K.; ZHANG, X.; NETHERY, K.; CORSTVET, R. E.; WALKER, D. H.; McBRIDE, J. W. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with conserved immunoreactive glycoproteins gp36 and gp19 has enhanced sensitivity and provides species-specific immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* infection. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 14, n. 2, p. 123 – 8, 2007.

CARDOSO, L.; TUNA, J.; VIEIRA, L.; YASASCHAR-MEKUZAS, Y.; BANETH, G. Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from the North of Portugal. **The Veterinary Journal**, London, v. 183, n. 2, p. 232 – 3, 2010.

CARVALHO, E.S.; WENCESLAU, A.A.; CARLOS, R.S.A.; ALBUQUERQUE, G. R. Epidemiological and molecular study of *Ehrlichia canis* in dogs in Bahia, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 7, n. 3, p. 657 – 62, 2008.

CASTRO, M. B. **Alterações clínicas, anatomopatológicas e imunopatológicas na erliquiose aguda experimental em cães**. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias e Veterinárias) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, São Paulo, 1997.

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

CHEN, S. M.; DUMLER, J. S.; BACKKEN, J. S.; WALKER, D. H. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, n. 3, p. 589 – 95, 1994.

CLEMENS, D.L.; HORWITZ, M.A. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 181, n. 1, p. 257 – 70, 1995.

CODNER, E. C.; ROBERTS, R. E.; AINSWORTH, A. G. Atypical findings in 16 cases of canine ehrlichiosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 186, n. 2, p. 166 – 69, 1985.

CODNER, E.C.; MASLIN, W.R. Investigation of renal protein loss with acute experimental induced *Ehrlichia canis* infection. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 53, n. 3, p. 294 – 99, 1992.

COSTA Jr., L.M.; REMBECK, K.; ROBEIRO, M.F.B.; BEELITZ, P.; PFISTER, K.; PASSOS, L.M.F. Sero-prevalence and risk for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil. **The Veterinary Journal**, London, v. 174, n. 3, p. 673 – 6, 2007.

COSTA, J.O.; BATISTA, Jr.; SILVA, M.; GUIMARÃES, M.P. *Ehrlichia canis* infection in dog in Belo Horizonte, Brazil. **Arquivos da Escola de Veterinária**, Belo Horizonte, v. 25, n. 2, p. 199 – 200, 1973.

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

DAGNONE, A. S.; DE MORAIS, H. S. A.; VIDOTTO, M. C.; JOJIMA, F. S.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in south Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 117, n. 4, p. 285 – 90, 2003.

DAGNONE, A. S.; MORAIS, H. S. A.; VIDOTTO, O. Erliquiose nos animais e no homem. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 22, n. 2, p. 191 – 201, 2001.

DINIZ, P.P.V.P.; SCHWARTZ, D.S.; DE MORAIS, H.S.A.; BREITSCHWERDT, E.B. Surveillance for Zoonotic Vector-Borne Infections Using Sick Dogs from Southeastern Brazil. **Vector-borne and Zoonotic Disease**, Larchmont, v. 7, n. 4, p. 689 – 97, 2007.

DONATIEN, A.; LESTOQUARD, F. Existence en Algerie d'une Rickettsia du chien. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, Paris, v.28, p.418 – 9, 1935.

DOUDIER, B.; OLANO, J.; PAROLA, P.; BROUQUI, P. Factors contributing to emergence of *Ehrlichia* and *Anaplasma* spp. as human pathogens. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 167, n. 2 – 4, p. 149 – 54, 2010.

DOYLE, C. K.; LABRUNA, M. B.; BREITSCHWERDT, E. B.; TANG, Y.W. CORSTVET, R. E. ; HEGARTY, B. C., BLOCH K. C., LI, P.; WALKER, D. H.; McBRIDE, J.W. Detection of Medically Important Ehrlichia by Quantitative Multicolor TaqMan Real-Time Polymerase Chain Reaction of the *dsb* Gene. **Journal of Molecular Diagnostics**, Bethesda, v. 7, n. 4, p. 504 – 10, 2005.

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 – 65, 2001.

FELEK, S.; HUANG, H.; RIKIHISA, Y. Sequence and expression analysis of *virB9* of the Type IV Secretion System of *Ehrlichia canis* strains in ticks, dogs and cultured cells. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 71, n. 10, p. 6063 – 67, 2003.

GAL, A.; LOEB, E.; YISASCHAR-MEKUZAS, Y.; BANETH, G. Detection of *Ehrlichia canis* by PCR in different tissues obtained during necropsy from dogs surveyed for naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis. **The Veterinary Journal**, London, v. 175, n. 2, p. 212 – 17, 2008.

GAUNT, S.D.; BEALL, M.J.; STILLMAN, B.A.; LORENTZEN, L.; DINIZ, P.P.V. P.; CHANDRASHEKAR, R.; BREITSCHWERDT, E.B. Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. **Parasites & Vectors**, London, v. 3, n.1, p. 1 – 10, 2010.

GE, Y.; YOSHIE, K.; KURIBAYASHI, F.; LIN, MINGQUN, L.; RIKIHISA, Y. *Anaplasma phagocytophilum* inhibits human neutrophil apoptosis via upregulation of bfl-1, maintenance of mitochondrial membrane potential and prevention of caspase 3 activation. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 7, n. 1, p. 29 – 38, 2005.

GOKCE, H.I.; ROSS, G.; WOLDEHIWET, Z. Inhibition of phagosome-lysosome fusion in ovine polymorphonuclear leucocytes by *Ehrlichia (Cytoecetes) phagocytophila*. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 120, n. 4, p. 369 – 81, 1999.

GUTIÉRREZ, C.N.; MARTÍNEZ, M.; SÁNCHEZ, E.; DE VERA, M.; ROJAS, M.; RUIZ, J.; TRIANA-ALONSO, F.J. Cultivation and molecular identification of *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia chaffeensis* from a naturally co-infected dog in Venezuela. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v. 37, n. 3, p. 258 – 65, 2008.

HACKSTADT, T. The diverse habitats of obligate intracellular parasites. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 1, n. 1, p. 82 – 7, 1998.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic acids symposium series**, London, v. 41, p. 95 – 8, 1999.

HARRUS, S.; ALLEMAN, A.R.; BARK, H.; MAHAN, S.M.; WANER, T. Comparison of three enzyme-linked immunosorbent assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 86, n. 4, p. 361 – 8, 2002.

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 – 90, 2004.

HARRUS, S.; WANER, T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. **The Veterinary Journal**, London, “in press”, doi: doi:10.1016/j.tvjl.2010.02.001. 2010

HARRUS, S.; WANER, T.; AIZENBERG, I.; FOLEY, J.E.; POLAND, A.M.; BARK, H. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after the infection with *Ehrlichia canis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 1, p. 73 – 6, 1998.

HARRUS, S.; WANER, T.; FRIEDMANN-MORVINSKI, D.; FISHMAN, Z.; BARK, H.; HARMELIN, A. Down-regulation of MHC class II receptor of DH82 cells, following infection with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Netherlands, v. 96, n. 3 – 4, p. 239 – 43, 2003.

HEGARTY, B.C.; LEVY, M.G.; GAGER, R.F.; BREITSCHWERDT, E.B. Immunoblot analysis of the immunoglobulin G response to *Ehrlichia canis* in dogs: an international survey. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, Columbia, v. 9, n. 1, p. 32 – 8, 1997.

HILDEBRANDT, P.K.; CONROY, J.D.; McKEE, A.E.; NYINDO, M.B.A.; HUXSOLL, D.L. Ultrastructure of *Ehrlichia canis*. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 7, n. 2, p. 265 – 71, 1973.

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

HOTOPP, J.C.D.; LIN, M.; MADUPU, R.; CRABTREE, J.; ANGIUOLI, S.V.; EISEN, J.; SESHADRI, R.; REN, Q.; WU, M.; UTTERBACK, T.R.; SMITH, S.; LEWIS, M.; KHOURI, H.; ZHANG, C.; NIU, H.; LIN, Q.; OHASHI, N.; ZHI, N.; NELSON, W.; BRINKAC, L.M.; DODSON, R.J.; ROSOVITZ, M.J.; SUNDARAM, J.; DAUGHERTY, S.C.; DAVIDSEN, T.; DURKIN, A.S.; GWINN, M.; HAFT, D.H.; SELENGUT, J.D.; SULLIVAN, S.A.; ZAFAR, N.; ZHOU, L.; BENAHMED, F.; FORBERGER, H.; HALPIN, R.; MILLIGAN, S.; ROBINSON, J.; WHITE, O.; RIKIHISA, Y.; TETTELIN, H. Comparative genomics of emerging human ehrlichiosis agents. **PLOS Genetics**, San Francisco, v. 2, n.2, p. 208 – 23, 2006.

HSIEH, Y.C.; LEE, C.C.; TASNG, C.L.; CHUNG, Y.T. Detection and characterization of four novel genotypes of *Ehrlichia canis* from dogs. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, “in press”, doi: 10.1016/j.vetmic.2010.04.013. 2010.

IQBAL, Z.; CHAICHANASIRIWITHAYA, W.; RIKIHISA, Y. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, n. 7, p. 1658 – 62, 1994.

IQBAL, Z.; RIKIHISA, Y. Application of the polymerase chain reaction for the detection of *Ehrlichia canis* in tissue of dogs. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 42, n. 4, p.281 – 7, 1994a.

IQBAL, Z.; RIKIHISA, Y. Reisolation of *Ehrlichia canis* from blood and tissues of dogs after doxycycline treatment. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, n. 7, p. 1644 – 49, 1994b.

JAMESON, B.A.; WOLF, H. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. **Bioinformatics**, Oxford, v. 4, n. 1, p. 181 – 6, 1988.

JOHNSON, E.M.; EWING, S.A.; BARKER, R.W.; CROW, D.W.; KOCAN, K.M. Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Ehrlichia) by *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 74, n. 2 – 4, p. 277 – 88, 1998.

JOINER, K.A.; FUHRMAN, S.A.; MIETTINEN, H.M.; KASPER, L.H.; MELLMAN, I. *Toxoplasma gondii*: fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts. **Science**, Washington, v. 249, n. 4969, p. 641 – 6, 1990.

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. 3 – 4, p. 331 – 40. 1996.

LABARTHE, N.; PEREIRA, M. C.; BALBARINI, O.; McKEE, W.; COIMBRA, C. A.; HOSKINS, J. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis* and *Borrelia burgdorferi* infection in Brazil. **Veterinary Therapeutics**, Trenton, v. 4, n. 1, p. 67 – 75, 2003.

LABRUNA, M. B. Biologia-Ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 13, n. 0, Suplemento 1, p. 123 – 4, 2004.

LABRUNA, M. B.; McBRIDE, J. W.; CAMARGO, L. M. A.; AGUIAR, D. M.; YABSLEY, M. J.; DAVIDSON, W. R.; STROMDAHL, E. Y.; WILLIAMSON, P. C.; STICH, R. W.; LONG, S. W.; CAMARGO, E. P.; WALKER, D. H. A preliminary investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs and capybaras from Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 143, n. 2, p. 189 – 95, 2007.

LABRUNA, M.B.; PEREIRA, M.C. Carrapato em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 30, p. 24 – 32, 2001.

LI, J.S.; CHU, F.; REILY, A.; WINSLOW, G.M. Antibodies highly effective in SCID mice during infection by the intracellular bacterium *Ehrlichia chaffeensis* are of picomolar affinity and exhibit preferential epitope and isotype utilization. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v. 169, n. 3, p. 1419 – 25, 2002.

LIN, M.; RIKIHISA, Y. Obligatory intracellular parasitism by *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* involves caveolae and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 5, n. 11, p. 809 – 20, 2003a.

LIN, M.; RIKIHISA, Y. *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* lack genes for lipid A biosynthesis and incorporate cholesterol for their survival. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 71, n. 9, p. 5324 – 31, 2003b.

MACEDO, E. A. **Ultraestrutura de células parasitadas por *Ehrlichia* spp., métodos diagnósticos e histopatologia em órgãos de cães com erliquiose da micro-região de Uberlândia-MG.** 125 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, 2007.

MACHADO, R. Z. Erliquiose canina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.13, suplemento 1, p. 53 – 7, 2004.

MACHADO, R.Z.; DUARTE, J.M.B.; DAGNONE, A.S.; SZABÓ, M.P.J. Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 139, n. 1-3, p. 262 – 6, 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, 2001. p. 297 – 300.

MAVROMATIS, K.; DOYLE, C. K.; LYKIDIS, A.; IVANOVA, N.; FRANCINO, M.; P.; CHAIN, SHIN, M.; Malfatti, S.; LARIMER, F.; COPLELAND, A.; DETTER, J. C.; LAND, M.; RICHARDSON, P. M.; YU, X. J.; WALKER, D. H.; MCBRIDE, J. W.; KYRPIDES, N. C. The Genome of the Obligately Intracellular Bacterium *Ehrlichia canis* Reveals Themes of Complex Membrane Structure and Immune Evasion Strategist. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 188, n.11, p. 4015 – 23, 2006.

McBRIDE, J.M.; CORSTVET, R.E.; GAUNT, S.D.; CHINSANGARAM, J.; AKITA, G.Y.; OSBURN, B.I. PCR detection of acute *Ehrlichia canis* infection in dogs. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, Columbia, v. 8, n., p. 441 – 7, 1996.

McBRIDE, J.W., YU, X.J.; WALKER, D.H. Molecular Cloning of the Gene for a Conserved Major Immunoreactive 28-Kilodalton Protein of *Ehrlichia canis*: a Potential Serodiagnostic Antigen. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, New York, v. 6, n. 3, p. 392 – 99, 1999.

McBRIDE, J.W.; YU, X.J., WALKER, D.H. A conserved, transcriptionally active *p28* multigene locus of *Ehrlichia canis*. **Gene**, Amsterdam, v. 254, n. 1 – 2, p. 245-52, 2000.

MEINKOTH, J.H.; HOOVER, J.P.; COWELL, R.L.; TYLER, R.D.; LINK, J. Ehrlichiosis in a dog with seizures and non-regenerative anemia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 195, n. 12, p. 1754 – 55, 1989.

MENDONÇA, C.S.; MUNDIM, A.V.; COSTA, A.S.; MORO, T.V. Erliquiose canina: Alterações hematológicas em cães domésticos naturalmente infectados. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 21, n. 1, p. 167 – 74, 2005.

MORAIS, H. A.; 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.

MOREIRA, S. M.; BASTOS, C. V.; ARAÚJO, R. B.; SANTOS, M.; PASSOS, L. M. F. Retrospective study (1998-2001) on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, MG, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 2, p. 141 – 7, 2003.

MOTT, J.; BARNEWALL, R.E.; RIKIHISA, Y. Human granulocytic ehrlichiosis agent and *Ehrlichia chaffeensis* reside in different cytoplasmic compartments in HL-60 cells. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 67, n. 3, p. 1368 – 78, 1999.

MOTT, J.; RIKIHISA, Y.; TSUNAWAKI, S. Effects of *Anaplasma phagocytophila* on NADPH oxidase components in human neutrophils and HL-60 cells. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 70, n. 3, p. 1359 – 66, 2002.

MURPHY, G. E. EWING, S. A., WHITWORTH, L. C., FOX, J. C., KOCAN, A. A. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs from Oklahoma. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 79, n. 4, p. 325 – 39, 1998.

NAKAGHI, A.C.H. **Clonagem do gene *p28* e análise da expressão da proteína recombinante a partir da amostra Jaboticabal de *Ehrlichia canis* e sua aplicação no diagnóstico da erliquiose canina**. 84 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, São Paulo, 2008.

NICHOLSON, W.L.; ALLEN, K.E.; McQUISTON, J.H.; BREITSCHWERDT, E. B.; LITTLE, S.E. The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 26, n. 4, p. 205 – 12, 2010.

NIU, H.; RIKIHISA, Y.; YAMAGUCHI, M.; OHASHI, N. Differential expression of VirB9 and VirB6 during the life cycle of *Anaplasma phagocytophilum* in human leucocytes is

associated with differential binding and avoidance of lysosome pathway. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 523 – 34, 2006.

NYINDO, M.B.; RISTIC, M.; HUXSOLL, D.L.A.; SMITH, A.R. Tropical canine pancytopenia: In vitro cultivation of the causative agent-*Ehrlichia canis*. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 32, n. 11, p. 1651 – 58, 1971.

OHASHI, N.; ZHI, N.; LIN, Q.; RIKIHISA, Y. Characterization and transcriptional analysis clusters for a Type IV Secretion Machinery in human granulocytic and monocytic ehrlichiosis agents. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 70, n. 4, p. 2128 – 38, 2002.

OLIVEIRA, D.; TIE NISHIMORI, C.; COSTA, M.T.; MACHADO, R.Z.; CASTRO, M.B. Anti *Ehrlichia canis* antibodies detection by “dot-elisa” in naturally infected dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 9, n. 1, p. 1 – 5, 2000.

OLIVEIRA, L.S. **Investigação molecular de Ehrlichia em uma população de cães e gatos em Viçosa – MG**. 63 f. Dissertação (*Magister Scientiae* em Bioquímica Agrícola) – Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2008.

OLIVEIRA, L.S.; OLIVEIRA, K.A.; MOURÃO, L.C.; PESCATORE, A.M.; ALMEIDA, M.R.; CONCEIÇÃO, L.G.; GALVÃO, M.A.M.; MAFRA, C. First report of *Ehrlichia ewingii* detected by molecular investigation in dogs from Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 15, suplemento 2, p. 55 – 6, 2009.

OR, M.; SAMISH, M.; WANER, T.; HARRUS, S. Attenuation of *Ehrlichia canis* by multiple passages in two different cultures. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 15, n. 2, p. 74 – 5, 2009.

PADDOCK, C.D.; SUMMER, J.W.; SHORE, G.M.; BARTLEY, D.C.; ELIE, R.; McQUADE, J.G.; MARTIN, C.R.; GOLDSMITH, C.S.; CHILDS, J.E. Isolation and characterization of *Ehrlichia chaffeensis* strains from patients with fatal ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 10, p. 2496 – 502, 1997.

PAROLA, P.; DAVOUST, B.; RAOULT, D. Tick- and Flea-borne rickettsial emerging zoonoses. **Veterinary Research**, Paris, v. 36, n. 3, p. 469 – 92, 2005.

PARZY, D.; BAUDU, P.; NORMAND, T.; AUDONNET, J.C.; DAVOUST, B. *Ehrlichia canis* phylogenetic analysis of the Borgo (Corsica) strain. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 15, n. 2, p. 76 – 8, 2009.

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 – 39, 1996.

PINYWOONG, D.; JITTAPALAPONG, S.; SUKASAWAT, F.; STICH, R.W.; THAMCHAIPENET, A. Molecular characterization of Thai *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* strains detected in dogs. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 8, n. 4, p. 433 – 8, 2008.

REDDY, G.R.; SULSONA, C.R.; GARBET, A.F.; MAHAN, S.M.; BURRIDGE, M.J.; ALLEMAN, A.R. Molecular characterization of a 28 KDa surface antigen gene family of the tribe Ehrlichiae. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 247, n. 3, p. 636 – 43, 1998.

RIKIHISA, Y. *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis*: subversive manipulators of host cells. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 8, p. 328 – 39, 2010.

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

RIKIHISA, Y. Mechanisms to create a safe haven by members of the family Anaplasmataceae. **Annals New York Academy of Science**, New York, v. 990, n. 1, p. 548 – 55, 2003.

RISTIC, M.; HOLLAND, C.J. Canine ehrlichiosis. IN: WOLDEHIWT, Z.; RISTIC, M. **Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals**. Oxford: Pergamon Press. 1993.

RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; ALBORNOZ, R. E. F.; BOLIO, G. 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.

SAITO, T.B.; CUNHA-FILHO, N.A.; PACHECO, R.C.; FERREIRA, F.; PAPPEN, F.G.; FARIAS, N.A.R.; LARSSON, C.E.; LABRUNA, M.B. Canine infection by Rickettsiae and Ehrlichiae in Southern Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 79, n.1, p. 102 – 8, 2008.

SANTOS, F.; COPPEDE, J.S.; PEREIRA, A.L.A.; OLIVEIRA, L.P.; ROBERTO, P.G.; BENEDETTI, R.B.R.; ZUCOLOTO, L.B.; LUCAS, F.; SOBREIRA, L.; MARINS, M. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **The Veterinary Journal**, London, v. 179, n. 1, p. 145 – 8, 2009.

SANTOS, J.P.; SANTOS, M.P.; SILVA, T.K.; MUNDIM, E.D.; CABRAL, A.D.; CABRAL, D.D. Frequência de hemoparasitoses em cães (*Canis familiaris*) no município de Uberlândia, MG, Brasil: Avaliação por esfregaço sanguíneo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 13, 2004.

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

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

SINGU, V.; LIU, H.; CHENG, C.; GANTA, R.R. *Ehrlichia chaffeensis* expresses macrophage- and tick cell-specific 28-Kilodalton outer membrane proteins. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 71, n. 1, p. 79 – 87, 2005.

SMITH, R.D.; SELLS, D.M.; STEPHENSON, E.H.; RISTIC, M.; HUXSOLL, D.L. Development of *Ehrlichia canis*, causative agent of canine ehrlichiosis, in the tick

Rhipicephalus sanguineus and its differentiation from a symbiotic rickettsia. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 37, n. 2, p. 119 – 26, 1976.

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, 1992.

TENÓRIO, A.P.M.; ALMEIDA, E.L.; ALVES, L.C.; BRITO, F.L.C.; SANTOS, J.P.; COELHO, M.C.O.C. *Ehrlichia* sp. em mielóctios de cão. **Medicina Veterinária**, Recife, v. 1, n. 1, p. 62 – 5, 2007.

THOMAS, R.J.; DUMLER, J.S.; CARYLON, J.A. Current management of human granulocytic anaplasmosis, human monocytic ehrlichiosis and *Ehrlichia ewingii* ehrlichiosis. **Expert review of anti-infective therapy**, London, v. 7, n. 6, p. 709 – 22, 2009.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, London, v. 22, n., p. 4673 – 80, 1994.

TORRES, H.M.; MASSARD, C.L.; FIGUEIREDO, M.J.; FERREIRA, T.; ALMOSNY, 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.; MORAIS, H. S. A. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 140, n. 3 – 4, p. 223 – 30, 2006.

TROY, G.C.; FORRESTER, S.D. Canine ehrlichiosis. IN: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1990.

UENO, T.E.H.; AGUIAR, D.M.; PACHECO, R.C.; RICHTZENHAIN, L.J.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C.; MEGID, J.; LABRUNA, M.B. *Ehrlichia canis* em cães atendidos em

hospital veterinário de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.18, n. 3, p. 57 – 61, 2009.

UNVER, A.; PEREZ, M.; ORELLANA, N.; HUANG, H.; RIKIHISA, Y. Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 8, p. 2788 – 93, 2001.

UNVER, A.; RIKIHISA, Y.; KARAMAN, M.; OZEN, H. An acute severe ehrlichiosis in a dog experimentally infected with a new virulent strain of *Ehrlichia canis*. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 15, n. 2, p. 59 – 61, 2009.

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

WANER, T.; STRENGER, C.; KEYSARY, A. Comparison of a clinic-based ELISA test kit with the immunofluorescence test for the assay of *Ehrlichia canis* antibodies in dogs. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, Columbia, v. 12, n. 3, p. 240 – 44, 2000.

WARNER, C.K.; DAWSON, J.E. Genus and species level identification of *Ehrlichia* species by PCR and sequencing. IN: PERSING, D.H. **PCR protocols for emerging infectious diseases**. Washington: ASM Press. 1996.

WELLMAN, M.L.; KRAKOWKA, S.; JACOBS, R.M.; KOCIBA, G.R. A macrophage-monocyte cell line from a dog with malignant histiocytosis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, Heidelberg, v. 24, n. 3, p. 223 – 9, 1988.

WELLS, M.Y.; RIKIHISA, Y. Lack of lysosomal fusion with phagosomes containing *Ehrlichia risticii* in P388D1 cells: abrogation of inhibition with oxytetracycline. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 56, n. 12, p. 3209 – 15, 1988.

WEN, B.; RIKIHISA, Y.; MOTT, J.M.; GREENE, R.; KIM, H.Y.; ZHI, N.; COUTO, G.C.; UNVER, A.; BARTSCH, R. Comparison of Nested PCR with Immunofluorescent-Antibody

Assay for Detection of *Ehrlichia canis* Infection in Dogs Treated with Doxycycline. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 7, p. 1852 – 5, 1997.

WORTH, R.G.; MAYO-BOND, L.; KIM, M.; WINKEL, J.G.J.V.; TODD III, R.F.; PETTY, H.R.; SCHREIBER, A.D. The cytoplasmic domain of Fc γ RIIA (CD32) participates in phagolysosome formation. **Blood**, New York, v. 98, n. 12, p. 3429 – 34, 2009.

YU, X.; McBRIDE, J.W.; WALKER, D.H. Restriction and expansion of *Ehrlichia* strain diversity. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 143, n. 3 – 4, p. 337 – 46, 2007.

YU, X.J.; McBRIDE, J.W.; WALKER, D.H. Genetic diversity of the 28-Kilodalton outer membrane protein gene in human isolates of *Ehrlichia chaffeensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n.4, p. 1137 – 43, 1999.

ZHANG, J. Z.; POPOV, V. L.; GAO, S.; WALKER, D. H.; YU, X. J. The developmental cycle of *Ehrlichia chaffeensis* in vertebrate cells. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 9, n. 3, p. 610 – 18, 2007.

ZHANG, X.; LUO, T.; KEYSARY, A.; BANETH, G.; MIYASHIRO, S.; STRENGER, C.; WANER, T.; McBRIDE, J.W. Genetic and antigenic diversities of major immunoreactive proteins in globally distributed *Ehrlichia canis* strains. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 15, n. 7, p. 1080 – 8, 2008.



Anexo



Universidade Federal de Uberlândia
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
 Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
 Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –
 CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4531/4173; e-mail: ceua@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 017/09 DO COMITÊ DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O
 PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 043/08



Projeto Pesquisa: " Universidade Federal de Uberlândia
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
 Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
 Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –
 CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4531/4173; e-mail: ceua@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 017/09 DO COMITÊ DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O
 PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 043/08

Projeto Pesquisa: "MECANISMOS DE INVASÃO/ INTERNALIZAÇÃO DE *Ehrlichia canis* EM
 CÉLULAS DA LINHAGEM DH82"

Pesquisador Responsável: Marcelo Emilio Beletti

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO COM RECOMENDAÇÕES.

- PEDE-SE ATENÇÃO E ESFORÇO EXTRA PARA EVITAR DANOS E RISCOS NA COLETA DE SANGUE, ESPECIALMENTE EM ANIMAIS QUE ESTEJAM MUITO VULNERÁVEIS, NESTE ÚLTIMO CASO SÓ COLETAR COM A AUTORIZAÇÃO DO DANO E SE NÃO HOUVER DANO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 21 de janeiro de 2009.

Prof. Dr. Alcino Eduardo Bonella
 Coordenadora do CEUA/UFU