

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

**MECANISMOS DE SINALIZAÇÃO CELULAR ENVOLVIDOS  
NOS PROCESSOS DE PROLIFERAÇÃO E PROPAGAÇÃO DE**  
***Ehrlichia canis IN VITRO***

**Marcelo Arantes Levenhagen**

**Uberlândia - MG**  
**Março - 2011**

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

**MECANISMOS DE SINALIZAÇÃO CELULAR ENVOLVIDOS  
NOS PROCESSOS DE PROLIFERAÇÃO E PROPAGAÇÃO 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.

**Mestrando: Marcelo Arantes Levenhagen**

**Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti**

**Uberlândia - MG**  
**Março - 2011**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

L657m Levenhagen, Marcelo Arantes, 1980-  
Mecanismos de sinalização celular envolvidos nos processos de  
proliferação e propagação de *Ehrlichia canis* in vitro [manuscrito]  
/ Marcelo Arantes Levenhagen. - 2011.  
51 f. : il.

Orientador: Marcelo Emílio Beletti.

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

Inclui bibliografia.

1. Erliquiose - Teses. 2. Zoonoses - Teses. I. Beletti, Marcelo  
Emílio. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-  
Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

---

CDU: 619:616.995.42

**Dedico esse trabalho à minha esposa Maria pela paciência,  
dedicação e presença nos momentos mais difíceis.**

**Amo você!**

## **AGRADECIMENTOS**

**Aos meus pais, Inácio e Tereza, pelos conselhos, apoio e incentivo profissional. Sem o empenho de vocês não teria chegado até aqui. Serei eternamente grato.**

**Aos meus irmãos Ivan e Ângelo pela eterna amizade. Às minhas cunhadas Lili e Dê e meus sobrinhos Lucas e Nicolas. Aprendo muito com vocês.**

**Aos meus sogros, Edson e Rosa; cunhadas, Camila e Kárita pelo convívio diário e companheirismo.**

**Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti pela confiança e possibilidade de crescimento profissional e pessoal.**

**Aos professores e colegas de trabalho da Histologia pela convivência e compreensão nos momentos de correria.**

**À todos meus colegas de pós-graduação pelo aprendizado, momentos de descontração e motivação.**

**Ao Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna por fornecer alíquotas de células DH82 e do isolado *E. canis* São Paulo.**

# SUMÁRIO

|                                                                                                                                      | Página |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| RESUMO -----                                                                                                                         | 06     |
| ABSTRACT -----                                                                                                                       | 07     |
| 1. INTRODUÇÃO -----                                                                                                                  | 08     |
| 1.1. Agente Etiológico -----                                                                                                         | 09     |
| 1.2. Ciclo Biológico -----                                                                                                           | 10     |
| 1.3. Patogenia -----                                                                                                                 | 12     |
| 1.4. Diagnóstico -----                                                                                                               | 13     |
| 1.5. Mecanismos de invasão de patógenos, Sinalização Celular e Resposta Imune -----                                                  | 16     |
| 2. OBJETIVOS -----                                                                                                                   | 22     |
| 2.1. Geral -----                                                                                                                     | 22     |
| 2.2. Específicos -----                                                                                                               | 22     |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS -----                                                                                                         | 23     |
| 3.1. Cultura de Células DH82 -----                                                                                                   | 23     |
| 3.2. Manutenção e Manipulação de <i>Ehrlichia canis</i> -----                                                                        | 23     |
| 3.3. Avaliação dos efeitos de várias drogas nos ensaios de proliferação e propagação de <i>Ehrlichia canis</i> em células DH82 ----- | 23     |
| 3.4. Avaliação da Infectividade -----                                                                                                | 24     |
| 3.5. Imunofluorescência -----                                                                                                        | 26     |
| 3.6. Análise Estatística -----                                                                                                       | 26     |

|                                                                                          |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4. RESULTADOS</b>                                                                     | <b>27</b> |
| <b>4.1. Avaliação das drogas no ensaio de proliferação de <i>E. canis</i> em células</b> |           |
| <b>DH82</b>                                                                              | <b>27</b> |
| <b>4.2. Avaliação das drogas no ensaio de propagação de <i>E. canis</i> em células</b>   |           |
| <b>DH82</b>                                                                              | <b>31</b> |
| <b>5. DISCUSSÃO</b>                                                                      | <b>34</b> |
| <b>6. CONCLUSÃO</b>                                                                      | <b>38</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                                                        | <b>39</b> |

## RESUMO

*Ehrlichia canis*, agente etiológico da Erliquiose Monocítica Canina, é uma bactéria intracelular obrigatória que se aloja em monócitos e macrófagos. Nesse estudo analisamos o papel do citoesqueleto, especificamente filamentos de actina e microtúbulos, de alguns componentes da Via de Sinalização celular IP3/DAG: fosfolipase C (PLC), proteína quinase (PTK) e canais de cálcio, além do ferro nos processos de proliferação e propagação de *E. canis* em células DH82. Para cada um desses componentes utilizamos diferentes drogas inibitórias: Citocalasina D (inibe a polimerização de filamentos de actina); Nocodazol (inibe a polimerização dos microtúbulos); Neomicina (inibidor de PLC); Genisteína (inibidor de PTK); Cloridrato de Verapamil (bloqueador de canal de cálcio) e Deferoxamina (quelante de ferro). Quanto ao Processo de Proliferação, observou-se diminuição significativa do número total de bactérias nas células tratadas. Exceto para Genisteína (29.86%) e Nocodazol (38.53%), a porcentagem de células infectadas apresentou-se significativamente menor em comparação ao controle (33.23%). Quanto ao Processo de Propagação, exceto para Nocodazol, houve uma queda do número total de bactérias após o tratamento. Quanto à porcentagem de células infectadas, não houve diferença significativa para as células tratadas com Citocalasina D (44.72%) e Deferoxamina (56.53%) em relação ao controle (51.67%). Em relação ao Nocodazol, foi evidenciado aumento significativo na porcentagem de células infectadas (64.75%). Esses resultados sugerem que os processos de proliferação e propagação de *E. canis* são sensíveis às drogas testadas, demonstrando que a polimerização dos filamentos de actina, em comparação aos microtúbulos, bem como a participação dos componentes da Via de Sinalização IP3/DAG (PLC, PTK e canais de cálcio) analisados e do ferro são essenciais à multiplicação bacteriana.

**Palavras-Chave:** Células DH82, *Ehrlichia canis*, sinalização celular.

## ABSTRACT

*Ehrlichia canis*, etiologic agent of Canine Monocytic Ehrlichiosis, is an obligatory intracellular bacteria that lodges itself in monocytes and macrophages. In this study we analyzed the role of the cytoskeleton, specifically actin and microtubules, some components of the signaling pathway IP3/DAG: phospholipase C (PLC), protein kinase (PTK) and calcium channels as well as the role of iron in the processes of proliferation and propagation of *E. canis* in DH82 cells. For each of these components different inhibitory drugs were used: Cytochalasin D (inhibits actin polymerization), Nocodazole (inhibits microtubule polymerization), Neomycin (PLC inhibitor), Genistein (PTK inhibitor), Verapamil hydrochloride (blocker calcium channel) and Deferoxamine (iron chelator). Regarding to proliferation process, we observed a significant decrease in the total number of bacteria in treated cells. Except for Genistein (29.86%) and Nocodazole (38.53%), the percentage of infected cells was significantly lower compared with the control (33.23%). As for the propagation process, except for Nocodazole, there was a decrease in the total number of bacteria after treatment. In relation to infected cells percentage, no significant difference were seen in treated cells with Cytochalasin D (44.72%) and Deferoxamine (56.53%) when compared to controls (51.67%). Regarding Nocodazole was evidenced significant increase in the percentage of infected cells (64.75%). These results suggest that *E. canis* proliferation and spread are sensitive to tested drugs, demonstrating that actin filaments polymerization, compared to microtubules, as well as the components envelopment of signaling pathway IP3/DAG (PLC, PTK and calcium channels) analyzed and iron are essential to bacterial multiplication

**Keywords:** DH82 cells, *Ehrlichia canis*, cell signaling.

## 1. INTRODUÇÃO

*Ehrlichieae* corresponde a uma família de microrganismos riquetsiais intracelulares obrigatórios de células sanguíneas da série branca, sendo responsáveis por diversas zoonoses de importância veterinária e humana (HIRSH, 2003)

A espécie *Ehrlichia canis* foi identificada pela primeira vez na Argélia (DONATIEN, LESTOQUARD, 1935) com a denominação de *Rickettsia canis*. Tal observação foi feita em monócitos de cães (*Canis familiares*), infestados pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, e que apresentavam quadros agudos de febre e anemia. Neitz e Thomas (1938) descreveram uma epidemia de *R. canis* no Parque Nacional Kruger, África, onde os esfregaços dos órgãos dos cães selvagens (*Lycaon pictus*) acometidos apresentavam uma riquetsia que correspondia à descrição de *R. canis*, feita por Donatien e Lestoquard em 1935. Entretanto, a reclassificação se deu em 1945 por Mashkovsky (MACHADO, 2004), passando a se chamar *Ehrlichia canis*.

No entanto, somente em 1963, a doença teve destaque mundial após surto em cães militares britânicos e americanos durante a Guerra do Vietnã, resultando na morte de um grande número de cães naquele período (BREITSCHWERDT, 1998). Na ocasião os animais apresentaram uma enfermidade hemorrágica fatal, chamada Pancitopenia Tropical Canina, caracterizada por debilidade, epistaxes, anemia e leucopenia (MACHADO, 2004).

A primeira ocorrência de Rickettsiales em cães no Brasil se deu em 1973 e foi relatada por Costa e colaboradores, ao encontrarem inclusões citoplasmáticas contendo as bactérias, as denominadas mórulas, em linfócitos de cães com sintomatologia de erliquiose na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais.

Atualmente, a Erliquiose Monocítica Canina (EMC), doença multissistêmica causada por *Ehrlichia canis*, uma infecção que apresenta distribuição mundial, particularmente frequente em regiões tropicais e subtropicais, principalmente em áreas urbanas e suburbanas devido à maior concentração do seu principal vetor, o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (LABRUNA; PEREIRA, 2001; UNVERA et al., 2009).

*Rhipicephalus sanguineus*, como um típico carrapato nidícola, tem colonizado comunidades em áreas urbanas de todo o Brasil, onde é ativo por todo ano. Tem o hábito de viver em ninhos, tocas ou abrigos de seu hospedeiro e quando não estão parasitando encontram-se livres no ambiente (LABRUNA; PEREIRA, 2001; LABRUNA, 2004). Embora não frequentemente, algumas populações desse 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 parasita causa infecções prolongadas nesses animais e não persiste nos carrapatos mais que uma geração (SMITH et al., 1976).

A erliquiose 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 16 rRNA de *E. canis* (DAGNONE et al., 2003; LABARTHE et al., 2003; TRAPP et al., 2006; CARVALHO et al., 2008).

Morais e colaboradores (2004) relataram que aproximadamente 20% dos cães atendidos em hospitais e clínicas veterinárias dos estados de 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*.

### 1.1) Agente etiológico

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;
- Anaplasmataceae, que incluíam todas as espécies de  $\alpha$ -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. O gênero *Ehrlichia* atualmente compreende cinco espécies conhecidas: *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* e *E. ruminantium*.

Além disso, vale ressaltar a identificação recente de uma nova espécie por Shibata e colaboradores (2000) no Japão, sendo isolada de carrapatos *Ixodes ovatus*, recebendo, assim, a classificação de *Ixodes ovatus ehrlichia* (IOE).

No Brasil apenas três espécies já foram descritas (AGUIAR, 2006; MACHADO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2009):

- *Ehrlichia ewingii*: agente etiológico da Erliquiose Granulocítica Humana (EGH) e canina (EGC);
- *Ehrlichia chaffensis*: agente etiológico da Erliquiose Monocítica Humana (EMH);
- *Ehrlichia canis*: agente etiológico da Erliquiose Monocíta Canina (EMC).

*Ehrlichia canis* caracteriza-se por ser uma bactéria gram-negativa pleomórfica, intracelular obrigatória, que se aloja isolada (corpúsculos elementares) ou em inclusões compactas no interior de vacúolos citoplasmáticos (mórulas) de monócios e macrófagos (DUMLER et al., 2001). Exibe parede celular típica de bactérias Gram-negativas, entretanto as camadas de peptidoglicano e lipopolissacarídeos (LPS) não estão presentes (MURRAY, 2006). 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), as mórulas de *E. canis* apresentam-se delimitadas por uma membrana vacuolar simples, contendo células erliquiais arredondadas ou ovóides envoltas por uma membrana dupla, sendo a membrana interna lisa e a externa ondulada (HILDEBRANT et al., 1973). Além disso, apresentam duas formas morfológicas distintas, uma maior (0,4 – 0,6  $\mu\text{m}$  x 0,7 – 0,9  $\mu\text{m}$ ) pleomórfica contendo nucleóide disperso (reticular) e outra menor (0,4 – 0,6  $\mu\text{m}$ ) com nucleóide condensado e densamente corado (YU et al.; 2007).

## 1.2) Ciclo biológico

O ciclo da *E. canis* se inicia com a inoculação desse agente no cão pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (POPOV et al., 1998).

Nos monócitos caninos, o ciclo se desenvolve mediante três estágios identificáveis microscopicamente (NYNDO et al., 1971; DAGNONE et al., 2001):

1º) Fagocitose dos corpos elementares pelos monócitos;

2º) Três a cinco dias pós-inoculação, um pequeno grupo de corpos elementares em agrupamentos, denominados corpúsculos ou corpos iniciais são observados como inclusões citoplasmáticas pleomórficas;

3º) No sétimo ou até o décimo segundo dia subsequentes, os corpúsculos elementares desenvolvem-se em inclusões maduras, vistas ao microscópio de luz com aspecto de “amoras”, as denominadas mórulas, que tipificam o gênero.

Os corpos elementares 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 microrganismo pelo corpo do animal (NYNDO et al., 1971; HILDEBRANDT et al., 1973).

Outra forma de transmissão da doença é a transfusão sanguínea de um animal infectado para outro susceptível, podendo ocorrer a partir de cães com até cinco anos de infecção crônica (SWANGO et al.; 1992).

No principal vetor, o carrapato *R. sanguineus* (Acari: Ixodidae), *E. canis* tem transmissão transtadial, mas não transovariana, o que torna o cão o principal reservatório da doença (AGUIAR, 2006). Os carrapatos se infectam ao ingerir leucócitos de cães contaminados que estejam na segunda ou terceira semana de infecção (fase aguda da doença) na qual existe maior concentração dessas células na corrente sanguínea do hospedeiro (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 (NICHOLSON et al., 2010).

O ciclo de desenvolvimento de *Ehrlichia chaffeensis* nas células do hospedeiro (ZANGH et al., 2007; McBRIDE; WALKER, 2011) inicia-se pela endocitose mediada por receptor de corpos erliquiais densamente corados (DC). Dentro de 1 h passam por uma fase intermediária (IM 1) e posteriormente transformam-se em células reticuladas (RC). Durante as próximas 48 h, essas células se multiplicam por divisão binária, duplicando seu número a cada 8 h. Após passarem por outra fase intermediária (IM 2), maturam em corpos erliquiais densamente corados (DC) dentro de 72 h após o contato inicial, podendo ser liberadas e, assim, endocitadas por outras células (Figura 1).

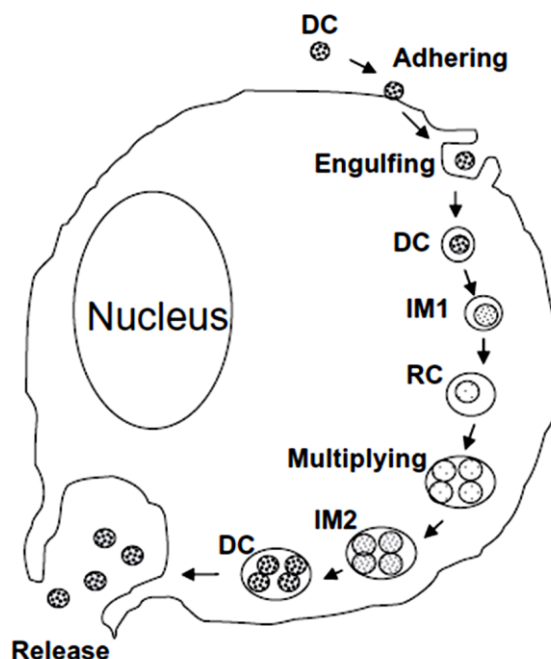


**Figura 1.** Ciclo de desenvolvimento de *E. chaffeensis* na célula do hospedeiro vertebrado. (ZANGH et al., 2007; McBRIDE; WALKER, 2011)

### 1.3) Patogenia

A Erliquiose Monocítica Canina apresenta a primeira manifestação clínica após o período de incubação do microrganismo, que compreende de uma a três semanas. De acordo com as alterações clínicas e hematológicas, a doença pode evoluir para três estágios consecutivos de infecção (MOREIRA et al., 2003):

- Fase aguda: as bactérias se multiplicam no interior de células do sistema fagocítico mononuclear em órgãos como fígado, baço e linfonodo ocasionando esplenomegalia e linfadenopatia. Além disso, multiplicam-se também em células da medula óssea, resultando em hiperplasia dessa linhagem celular (CASTRO et al., 2004). Essa fase é caracterizada por febre, anorexia, depressão e dispnéia (CODNER et al., 1985), comprometimento ocular (TROY; FORRESTER, 1990), alterações neurológicas (MEINKOTH et al., 1989) e renais (CODNER; MASLIN, 1992). A trombocitopenia decorrente da destruição periférica das plaquetas, acompanhada ou não por leucopenia e anemia é comum durante essa fase (SWANGO et al., 1992). De acordo com Meyer e colaboradores (1995), a trombocitopenia é clinicamente seguida pelo achado de hemorragias petequiais e equimóticas nas membranas, mucosas ou pele, sendo

confirmada pelo contagem de plaquetas. Essa fase pode durar de duas a quatro semanas (NEER, 1998).

- Fase assintomática ou subclínica: instala-se quando o cão sobrevive à fase aguda (MACEDO, 2007). Pode perdurar por vários anos, caracterizando-se pela persistência de *E. canis* no hospedeiro, promovendo altos títulos de anticorpos, sugerindo uma estimulação constante do sistema imune por antígenos com duração de aproximadamente seis a nove semanas (ANDEREG; PASSOS, 1999). Couto (1998) relatou que nessa fase os pacientes tornam-se assintomáticos, entretanto podem-se observar algumas alterações: orgânicas com o desenvolvimento de infecções secundárias, neurológicas como ataxia e hematológicas como trombocitopenia, leucopenia e neutropenia (WANER, 1997).
- Fase crônica: caracteriza-se pela incapacidade do sistema imune do hospedeiro em eliminar o agente. Essa fase varia de suave a severa, sendo que é dependente de fatores como idade, imunocompetência, virulência da cepa, e infecções concomitantes (QUINN, 1997). São relatadas alterações bioquímicas como hiperglobulinemia, hipoalbuminemia e proteinúria (CODNER et al., 1985; COUTO, 1998). Segundo Vignard-rosez e colaboradores (2001), a principal característica dessa fase é o desenvolvimento de uma hipoplasia medular, acarretando em uma anemia aplásica com monocitose, linfocitose e leucopenia.

#### **1.4) Diagnóstico**

A Ehrliquiose canina é considerada uma síndrome altamente variável, em suas alterações clínicas e hematológicas, mimetizando doenças metabólicas e infecciosas (KAKOMA et al., 2000), o que dificulta o seu diagnóstico diferencial (HARRUS et al., 1997).

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

O diagnóstico de doenças transmitidas por carrapatos requer uma combinação de dados provenientes da anamnese e de métodos laboratoriais. Dentre os métodos utilizados nas análises-clínicas destacam-se:

- Exames de esfregaços sanguíneos: detecção de mórulas no citoplasma de leucócitos do sangue periférico e da medula óssea (ANDEREG; PASSOS, 1999), corados pelos métodos de Wright, Giemsa ou pelo Kit Panótico rápido (Laborclin®). As inclusões aparecem vermelhas, lilás ou azul escuro, conforme o estado de desenvolvimento da bactéria e do protocolo de coloração utilizado (DAVOUST, 1993). As mórulas são de difícil visualização já que a porcentagem de células infectadas varia de 1 – 5% (CADMAN et al., 1994; RODRIGUEZ-VIAZ et al., 2005).
- Isolamento do microrganismo em cultura celular: é sensível e específica sendo utilizada para detecção de *E. canis* em amostras sanguíneas de cães infectados. Para esse fim, *E. canis* pode ser cultivada *in vitro* em células DH82 (*dog histiocytosis*), linhagem originária de monócitos caninos, que foi adaptada a partir de um caso de histiocitoma (WELMAN et al., 1998; AGUIAR, 2006). Entretanto, necessita de profissional habilitado, possui alto custo e requer uma a dez semanas para obtenção do resultado, limitando sua eficiência como uma ferramenta de diagnóstico rápido (McBRIDE et al., 1996; HARRUS; WARNER, 2010).
- Imunofluorescência indireta (IFI): o isolamento e o desenvolvimento de métodos de cultivo *in vitro* da bactéria levaram ao uso desse teste sorológico para detecção e titulação de anticorpos anti-*E. canis* em cães. Esse teste descrito por Ristic e colaboradores em 1972 tem sido considerado como o teste sorológico “Gold Standard”, indicando exposição à riquetsia *E. canis* (WARNER et al., 2001; MACEDO, 2007). Entretanto, considerações e limitações da IFI incluem: reação cruzada com outros organismos relacionados, principalmente entre membros do mesmo gênero; dificuldade em distinguir agente etiológico específico; baixa reprodutibilidade e falta de um procedimento padronizado que garanta a não variabilidade dos resultados intra e inter-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). Além disso, 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).
- Técnica de “Western immunoblotting”: apresenta objetividade da leitura, já que não sofre a influência da subjetividade do observador, como ocorre com a técnica de IFI. McBride

et al. (2001), avaliando a reatividade de diferentes proteínas de membrana (p28 e p43) de *E. canis* verificaram boa correlação com a RIFI por essa técnica. A proteína p43 apresentou 100% de sensibilidade e 85% de especificidade quando comparada à RIFI, enquanto a p28 apresentou sensibilidade de 96% e especificidade de 100%. No entanto é uma técnica cara, que consome muito tempo para sua execução, além de necessitar de uma tecnologia mais avançada (ANDEREG; PASSOS, 1999)

- Ensaio de ELISA (ENZYME LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY): Cárdenas e colaboradores (2007) relatam esse teste com 100% de especificidade e sensibilidade utilizando os peptídeos recombinantes gp36, gp19 e gp200. Harrus et al. (2001) desenvolveram um ELISA para detecção de anticorpos anti-*E.canis*, salientando que a leitura rápida e objetiva do método por eles desenvolvido apresentou uma vantagem sobre a interpretação visual e frequentemente subjetiva da IFI. A detecção precoce da erliquiose, apenas com 14 dias de infecção, corresponde a maior vantagem desse método em relação à IFI. Kits comerciais para o diagnóstico da erliquiose canina se baseiam no princípio do “dot-ELISA”, como Immunocomb® (Biogal, Israel) e o Snap® 3Dx (IDEXX Laboratories Inc., USA). São práticos e detectam anticorpos IgG específicos contra a bactéria. Possivelmente se tornarão exames de rotina na clínica veterinária. (HARRUS et al., 2002).
- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR): métodos de diagnóstico molecular permitem a detecção direta do microrganismo pela amplificação de uma sequência alvo de nucleotídeos e facilitam sua comparação com cepas geograficamente diferentes (WARNER; DAWSON, 1996). A utilização dessa técnica na amplificação de 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). 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).

### 1.5) Mecanismos de invasão de patógenos, Sinalização Celular e Resposta imune

A resposta imune inata se inicia pela fagocitose de patógenos por macrófagos, que por sua vez desencadeia a resposta imune adaptativa. O primeiro desafio do sistema imune nesse processo envolve a discriminação de agentes infecciosos em relação ao que é próprio. Para isso macrófagos possuem um número restrito de receptores de fagocitose, que reconhecem motivos conservados em patógenos, chamados de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs). Além disso, patógenos podem também ser fagocitados após seu reconhecimento por receptores do complemento e por receptores Fc após opsonização específica com imunoglobulinas (ADEREM, UNDERHILL, 1999).

A fagocitose é um processo extremamente complexo de internalização de grandes partículas ( $> 0,5 \mu\text{m}$ ), de forma que um único modelo é insuficiente para esclarecer completamente as diversas estruturas e componentes associados a ele. Essa complexidade pode ser relacionada à diversidade de receptores capazes de estimular a fagocitose, assim como a capacidade que vários patógenos possuem de influenciar seu destino uma vez internalizados. (ADEREM, UNDERHILL, 1999).

Um outro mecanismo que possibilita a captação seletiva de macromoléculas específicas e patógenos é a endocitose mediada por receptor. As macromoléculas que são internalizadas ligam-se inicialmente a receptores específicos de superfície celular. Esses receptores estão concentrados em regiões especializadas da membrana plasmática, denominadas de regiões recobertas por clatrina ou em pequenas invaginações da membrana plasmática denominadas caveolas. As vesículas cobertas por clatrina ou caveolina fusionam-se com os endossomos jovens, nos quais os seus conteúdos são transportados para lisossomos e reciclados na membrana plasmática (COOPER, 2001).

Em ambos processos, fagocitose ou endocitose mediada por receptor, a formação do fagossomo parece envolver diversos mecanismos capazes de desencadear diferentes vias de sinalização. Alguns desses mecanismos incluem: a participação do citoesqueleto, especificamente filamentos de actina e microtúbulos, GTPases, ativação de Fosfolipase C (PLC), IP3-Kinase, Proteína-quinase C (PKC), canais de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e outras proteínas. (JANMEY et al., 1994; ANDEREM; UNDERHILL, 1999)

Uma importante via de sinalização celular que pode estar envolvida com o processo de entrada de patógenos é a via IP3/DAG e elevação do cálcio citosólico. Essa via pode ser iniciada pela ligação do ligante a determinados receptores acoplados à proteína G, ou mesmo por diversos outros tipos de receptores, levando à ativação da fosfolipase C. A clivagem do

PIP<sub>2</sub> pela fosfolipase C dá origem ao IP<sub>3</sub> e ao DAG (**passo 1**). Após sua difusão através do citosol, o IP<sub>3</sub> interage com os canais de Ca<sup>2+</sup> na membrana do retículo endoplasmático, abrindo-os (**passo 2**) e provocando a liberação dos íons Ca<sup>2+</sup> estocados para o citosol (**passo 3**). Uma das várias respostas celulares induzidas por uma elevação de Ca<sup>2+</sup> citosólico é o recrutamento da proteína-quinase C (PKC) para a membrana plasmática (**passo 4**) na qual será ativada pela DAG (**passo 5**). A quinase ativada pode fosforilar diversas enzimas e receptores celulares, alterando, desse modo, suas atividades (**passo 6**). Conforme o estoque de Ca<sup>2+</sup> é depletado, os canais de cálcio controlados por IP<sub>3</sub> se ligam aos canais de Ca<sup>2+</sup> TRP, operados pelo estoque, sobre a membrana plasmática, permitindo um influxo de cálcio extracelular (**passo 7**) (LODISH et al., 2005). Esse processo é exemplificado na figura abaixo.

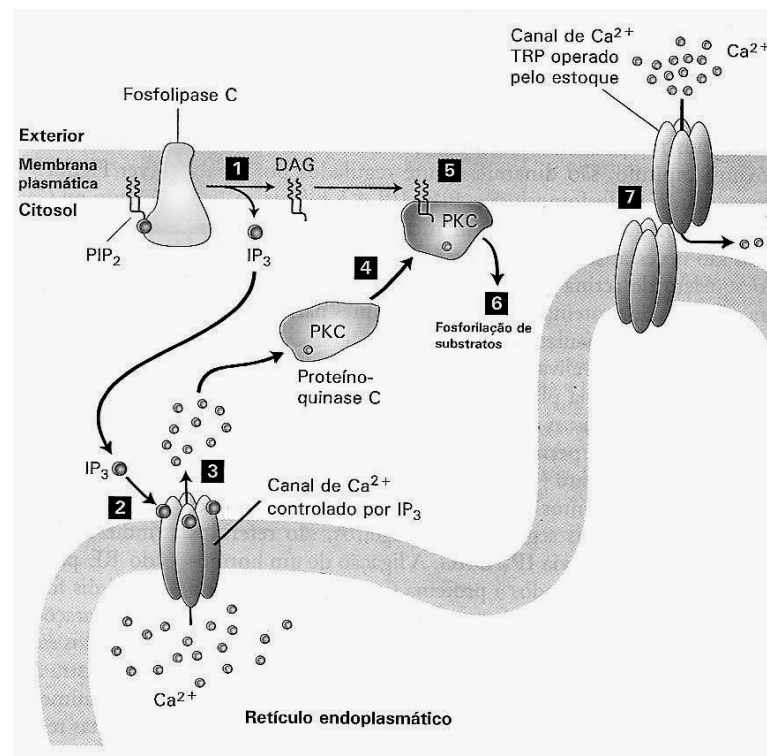


**Figura 3.** Via de Sinalização celular IP<sub>3</sub>/DAG. (LODISH et al., 2005)

Após internalizados, os patógenos devem lidar de alguma forma com o tráfego de membrana na célula hospedeira (ALBERTS et al., 2006). Durante esse processo eles encontram-se em um compartimento endossomal que normalmente se fundirá com os lisossomos. O patógeno deverá, portanto, modificar o compartimento para impedir a fusão, escapar do compartimento antes que ele seja digerido, ou desenvolver algum sistema que

permita sua sobrevivência em um ambiente hostil como o fagolisossomo (ALBERTS et al., 2006).

A estratégia mais comum utilizada por bactérias e parasitas intracelulares é a de induzir modificações no compartimento endossomal, de forma que esses organismos possam ali permanecer e se replicar. As modificações do compartimento devem ocorrer de pelo menos duas formas: primeiro, alguns patógenos utilizam mecanismos de escape da fusão lisossomal e, segundo, estabelecem uma rota de obtenção de nutrientes importantes a partir do citosol do hospedeiro (ALBERTS et al., 2006).

Diferentes patógenos utilizam estratégias distintas para esse mesmo fim. O *Toxoplasma gondii* cria o seu próprio compartimento membranar, embora estudos recentes demonstrem envolvimento do tráfego normal de membrana do hospedeiro (SILVA et al., 2009). A *Mycobacterium tuberculosis*, de alguma forma, consegue evitar que o endossomo inicial onde ela se encontra amadureça, e assim ele não acidifica ou adquire as características de um endossomo tardio (ALBERTS et al., 2006).

Outras bactérias se mantêm em compartimentos intracelulares completamente distintos da rota endocítica usual. A *Legionella pneumophila*, por exemplo, replica em compartimentos organizados em camadas do retículo endoplasmático rugoso. A *Chlamydia trachomatis*, um patógeno bacteriano transmitido por via sexual e que pode causar esterilidade e cegueira, replica em estruturas que se assemelham muito a compartimentos pertencentes à rota exocítica. Os mecanismos usados por esses organismos para alterar a membrana de seus compartimentos ainda não estão esclarecidos (ALBERTS et al., 2006).

A dinâmica de internalização celular de *Anaplasma phagocytophilum* e de *Ehrlichia chaffeensis* nas células do hospedeiro ocorre através de um processo de endocitose mediado por receptores de membrana, com participação de cavéolas (LIN; RIKIHISA, 2003a). Esse processo exibe uma grande sensibilidade a monodansylcadaverina (MDC), um inibidor de transglutaminase (TGase), que participa da endocitose mediada por receptor (LIN et al., 2002). Outros mecanismos de sinalização celular incluem: fosforilação de proteína quinase (PTK), ativação de fosfolipase C (PLC), produção de fosfatidil-inositol-trifosfato 1,4,5 (IP3) e um consequente aumento intracelular de cálcio (RIKIHISA, 2006).

Além disso, é relatado a participação do citoesqueleto durante a internalização, já que esse processo é inibido pela ação de taxol e colchicina, que são inibidores de microtúbulos, assim como também sofre ação da citocalasina D, que inibe a montagem dos filamentos de actina (LIN et al., 2002). Rikihisa e colaboradores (1994), observaram ainda que a

participação do citoesqueleto se dá também durante o tráfego celular do patógeno pela célula hospedeira, processo esses denominados de proliferação de propagação.

Inclusões contendo *E. chaffeensis* apresentam características de endossomos precoces, incluindo os marcadores Rab5, antígeno 1 de endossomo precoce (EEA1) e receptor de transferrina (TfR) necessário à evasão lisossomal e aquisição de ferro importantes para a multiplicação bacteriana (RIKIHISA, 2010).

A aquisição de ferro pelos macrófagos se dá através de receptores de transferrina (TfRs) nos quais se ligam à transferrina livre (Tf), que por sua vez possui uma alta afinidade pelo íon férrico. Após a ligação, o complexo Tf/TfR é internalizado através dessa via endocítica clássica em direção a um compartimento endossomal. O pH ácido do vacúolo facilita a liberação do íon da Tf e essa molécula livre juntamente com o TfR retornam à superfície celular em ciclo contínuo. O ferro intracelular é transportado através de um compartimento endossomal e passa a participar do conjunto de moléculas de ferro intracelular disponíveis. Em seguida, o ferro é utilizado sempre que necessário e o excedente é armazenado ligado à ferritina, que são as moléculas de armazenamento de ferro. Assim, embora o TfR não tenha um contato direto com o ferro, sua expressão controla a maior parte do ferro absorvido pelas células do hospedeiro (COLLINS, 2003).

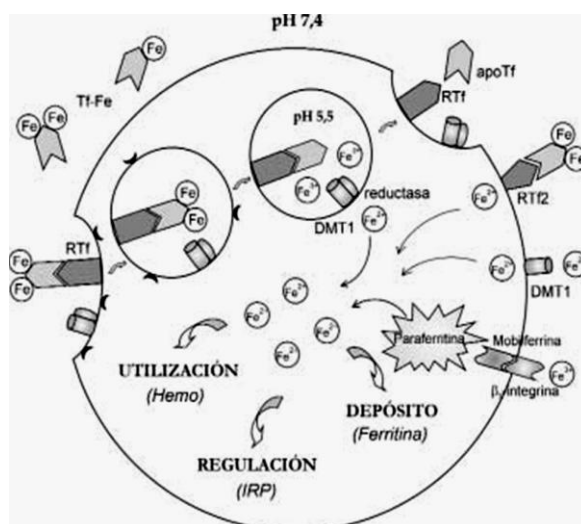


**Figura 2.** Captação e destino celular do ferro. Tf: transferrina, RTf y RTf2: receptores de transferrina, IRP (*iron regulatory protein*): proteína reguladora, DMT1 (*divalent metal transporter 1*): transportador. (PÉREZ et al., 2005)

Além disso, nesses compartimentos, ou inclusões, não há geração de ânions superóxido ( $O_2^-$ ) nem aquisição de componentes de endossomos tardios/lisossomos. A notável habilidade dessas 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 desses compartimentos com os lisossomos permanece sob investigação embora alguns estudos demonstrem a não co-localização entre tais microrganismos e proteínas lisossomais, como LAMP-1 e LAMP-3 (BARNEWALL et al., 1997; MOTT et al., 1999).

Na erliquiose canina, a persistência do agente concomitante aos altos títulos de anticorpos (HARRUS et al., 1998) evidenciam que, para a adequada eliminação intracelular do microrganismo, há necessidade da interação entre a resposta humoral e a resposta celular do hospedeiro (KAKOMA et al., 1977; WEISER et al., 1991).

A manutenção de altos títulos de anticorpos circulantes, na infecção por *E. canis*, pode indicar um estímulo antigênico persistente e/ou periódico (PERILLE; MATUS, 1991; HARRUS et al., 1998). Outra característica da resposta imune humoral nas infecções erliquiais é a plamocitose evidente na maioria dos órgãos afetados, inclusive na medula óssea (CASTRO, 2004).

Além dos mecanismos humorais, o desajuste na resposta imune mediada por células, descrito nas infecções por espécies de erliquia, tem sido amplamente estudado. Patógenos, como as erliquias, que têm como alvo o sistema imune inato, ativam a produção de IL-12 por células apresentadoras de antígenos, induzindo o desenvolvimento de resposta Th1 e secreção de IFN- $\gamma$  pelas células T CD4, o que determinaria a resistência do hospedeiro à infecção (CASTRO, 2004).

Porém, a avaliação imunohistoquímica de órgãos linfóides (baço e linfonodos) de cães experimentalmente infectados com *E. canis* revelou uma redução significativa na expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHCII) (CASTRO, 2004). A expressão dessas moléculas de MHCII é necessária à maturação de células T em linfócitos T CD4<sup>+</sup> (GRUSBY et al., 1991), que possuem um importante papel na elaboração e potencialização da resposta imune humoral e celular.

Além disso, durante a infecção, a imunossupressão induzida pela saliva do carrapato pode facilitar a instalação do agente infeccioso (WIKEL, 1999), visto que a saliva do *R. sanguineus* inibe a proliferação de células T, interfere na função de macrófagos e promove um desequilíbrio na produção de citocinas, aumentando IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ , e reduzindo IL-2,

IL-12 e IFN-  $\gamma$  (FERREIRA; SILVA, 1999), havendo assim, a inversão de uma resposta do tipo Th1 para Th2.

A secreção de TNF- $\alpha$  pelas células infectadas pode ser um dos mecanismos implicados na aparente supressão da medula óssea (HARA et al., 2004), o que justificaria as lesões hematológicas. A elevação dessa citocina também poderia justificar a alteração das enzimas hepáticas devido à hepatotoxicidade (BRADHAM et al., 1998).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

Analisar a participação do Citoesqueleto, da Via de Sinalização celular IP3/DAG e do Ferro no processo de proliferação e propagação de *Ehrlichia canis* “in vitro”.

### 2.2. Específicos

- Avaliar o papel do Citoesqueleto, especificamente filamentos de actina e microtúbulos;
- Analisar a participação de alguns componentes da Via de sinalização IP3/DAG especificamente:
  - Fosfolipase C(PLC);
  - Fosforilação da Proteína quinase (PTK);
  - Papel do íon cálcio.
- Observar a importância do elemento Ferro.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Cultura de Células DH82

As células DH82 (Histiocitoma canino: ATCC nº CRL-10389, gentilmente fornecidas pelo Prof. Marcelo B. Labruna, Universidade de São Paulo) foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's* (DMEM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), acrescido de 5% de soro fetal de bezerro (HyClone Laboratories, Logan, Utah, USA) e mantidas em garrafa de cultura de 25 cm<sup>2</sup> a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Este meio foi renovado a cada 2 dias. Não foram utilizados antibióticos neste estudo.

Os experimentos foram realizados em placas de cultura com 24 poços, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 3.2. Manutenção e manipulação de *Ehrlichia canis*

*Ehrlichia canis* foram mantidas em células DH82 em meio *Dulbecco's Modified Eagle's* (DMEM), suplementado com 5% de soro fetal de bezerro (HyClone Laboratories, Logan, Utah, USA) e 2% L-glutamina sem antibióticos em garrafa de cultura de 25 cm<sup>2</sup> a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. A porcentagem de células infectadas foi determinada por meio de esfregaços da monocamada celular corados pelo Kit Panótico Rápido (Laborclin, Pinhais, PR, BR). Quando detectado índice de infecção de 70%, as células foram ressuspensas no mesmo meio de cultura em concentração de 10<sup>6</sup> células/mL, sonicadas a 20 KHz por 20s (Sonopuls Gmmi20, Bandelin Electronic, Berlin, Germany) e centrifugado a 500 x g por 5 min. O sobrenadante contendo *E. canis* livres foram usadas para infectar as células DH82.

#### 3.3. Avaliação dos efeitos de várias drogas nos ensaios de proliferação e propagação

Para os ensaios de proliferação e propagação foram utilizadas as seguintes drogas:

- Citocalazina D 2 µM (Sigma, St. Louis, Mo): inibe a polimerização dos filamentos de actina;
- Nocodazol 10 µM (Sigma, St. Louis, Mo): inibe a polimerização de microtúbulos;
- Sulfato de Neomicina 50 µM (Sigma, St. Louis, Mo): inibidor de fosfolipase C;
- Genisteína 25 µM (Sigma, St. Louis, Mo): inibidor de proteína quinase (PTK);

- Cloridrato de Verapamil 100  $\mu\text{M}$  (Sigma, St. Louis, Mo): inibidor de canal de cálcio à nível de retículo endoplasmático e da membrana plasmática;
- Deferoxamina 15  $\mu\text{M}$  (Sigma, St. Louis, Mo): quelante de ferro;

Para se determinar o efeito dos compostos na proliferação da *E. canis* as células DH82 foram ressuspensas ( $10^5$  células/mL) no próprio meio de cultura e mantidas em placas de cultura com 24 poços, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24h para obtenção da monocamada. Após esse período, *E. canis* livres foram adicionadas aos poços e incubadas por 3h. Posteriormente, o meio foi retirado e as drogas a serem testadas foram adicionadas. Após o tempo de incubação de cada droga (24h para Deferoxamina e 3h para as demais) o meio foi retirado e as células foram mantidas por mais 4 dias em meio de cultura.

O tempo de 3h corresponde a um período em que praticamente todas as bactérias inoculadas se encontram dentro da célula, desde que tenham sido internalizadas pelo macrófago. Após 3 dias, as mórulas contendo bactérias já encontram-se em estágios mais avançados, podendo ser exocitadas pelos macrófagos e infectarem novas células.

Para se determinar o efeito dos compostos na propagação bacteriana, as células DH82 infectadas a 20%, obtidas após 3 dias de manutenção em cultura, foram ressuspensas no próprio meio de cultura ( $10^5$  células/mL) e mantidas nas mesmas condições. As drogas a serem testadas foram adicionadas e após o tempo de incubação o meio foi retirado, e as células foram mantidas por mais 4 dias em meio de cultura.

Os tempos e concentrações utilizadas são suficientes para promover uma inibição momentânea. Após esse tempo, as estruturas e/ou moléculas inibidas retomam sua atividade normal devido à reversibilidade da droga. Além disso, as concentrações e tempos das drogas utilizadas nesse trabalho são similares às utilizadas em outros experimentos (BARNEWALL; RIKIHISA, 1994; RIKIHISA, 1994; LIN et al., 2002).

A viabilidade celular foi verificada com azul de tripan 1% demonstrando que mais de 90% das células apresentavam-se viáveis após adição das drogas, mesmo quando essas drogas foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO).

### 3.4. Avaliação da Infectividade

*Ehrlichia canis* é uma bactéria que cresce e se agrupa em mórulas. Logo, é impossível determinar o número exato de bactérias por célula. Para estimar esse número, as mórulas foram classificadas em categorias de 0, 1-10, 11-50 ou 51-100 bactérias por mórula de acordo

com suas dimensões. O número total de bactérias foi obtido multiplicando a quantidade de mórulas de cada categoria com a respectiva média de bactérias em cada categoria (0, 5, 30, 75 bactérias por mórula) (BARNEWALL; RIKIHISA, 1994). Os experimentos foram realizados em triplicata de 100 células. As imagens foram capturadas utilizando o microscópio Leica EZ4 e o Software LAS EZ (Leica Application Suite).

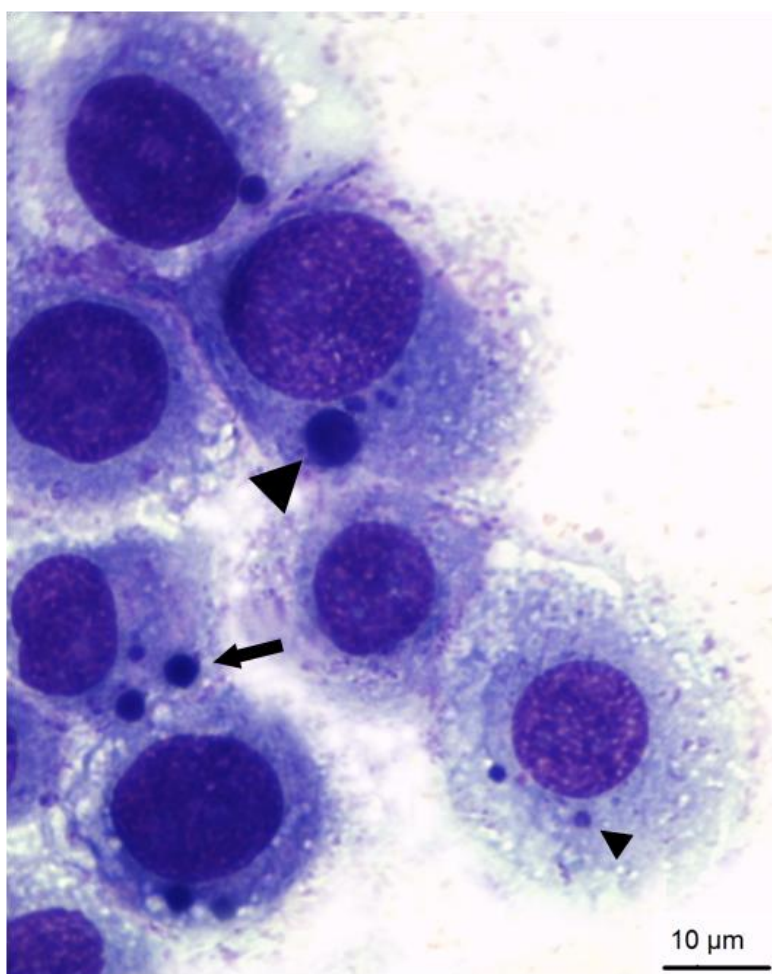


**Figura 4.** Fotomicrografia de células DH82 infectadas por *E. canis* sob a forma de mórulas. A figura evidencia mórulas contendo aproximadamente 5 (cabeça de seta pequena); 30 (seta) e 75 (cabeça de seta grande) bactérias por mórula. Coloração pelo Panótico Rápido.

### 3.5. Imunofluorescência

As lâminulas com as células infectadas em cultura foram fixadas em paraformaldeído 1% tamponado com PBS 0,1M, pH 7,2 por 10 min. Após três lavagens em PBS 0,1M, as lamínulas foram permeabilizadas com TRITON X-100 0,1% acrescido de citrato de sódio 0,1% por 1h à temperatura ambiente e posteriormente tratadas com BSA 5% por 15 min. Após três lavagens em PBS 0,1M, as lamínulas foram incubadas com anticorpo primário 1:250 (anti-*E. canis*) por 6 h à temperatura ambiente e posteriormente incubadas por 45 min em câmara úmida com anticorpo secundário anti-cão FITC (1:400), diluído em azul de evans 1%.. As lamínulas foram montadas em lâmina com Glicerina/PBS 9/1 e suas bordas foram vedadas. As imagens foram analisadas em Microscópio Confocal de Varredura a Lazer (LSM 510 Meta-Zeiss) equipado com Microscópio Invertido (Zeiss) e analisadas através do Software LSM 3.2.

### 3.6. Análise estatística

Com o auxílio do Software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) as análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste *unpaired 2-tailed Student's t*-teste para constatar a existência de possíveis variações estatisticamente significantes do número e porcentagem de células infectadas em comparação ao controle. Em ambos os casos, considerou-se significativo  $p < 0.05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Avaliação das drogas no ensaio de proliferação de *E. canis* em células DH82

Quanto ao ensaio de proliferação, as drogas foram adicionadas à cultura 3h pós-infecção, e mantidas por mais 4 dias. Os resultados obtidos demonstram uma diminuição do número total de bactérias nas células tratadas com todas as drogas. Observa-se que houve uma maior diminuição do número de bactérias quando as células foram tratadas com Citocalasina D em comparação ao Nocodazol. Verifica-se ainda um maior efeito na inibição da proliferação bacteriana promovida por Verapamil em comparação à Neomicina e Genisteína, componentes da via de sinalização IP3/DAG (Figura 5).

Exceto para Genisteína e Nocodazol, onde a porcentagem de células infectadas foi semelhante e maior que o controle respectivamente, esse valor apresentou-se menor após adição das drogas (Figura 6).

O Verapamil acarretou uma maior diferença significativa no número de bactérias assim como na porcentagem de células infectadas (Figura 7).

Além disso, observamos a formação de filopódios nas células infectadas 24 h pós-inoculação (Figura 8).

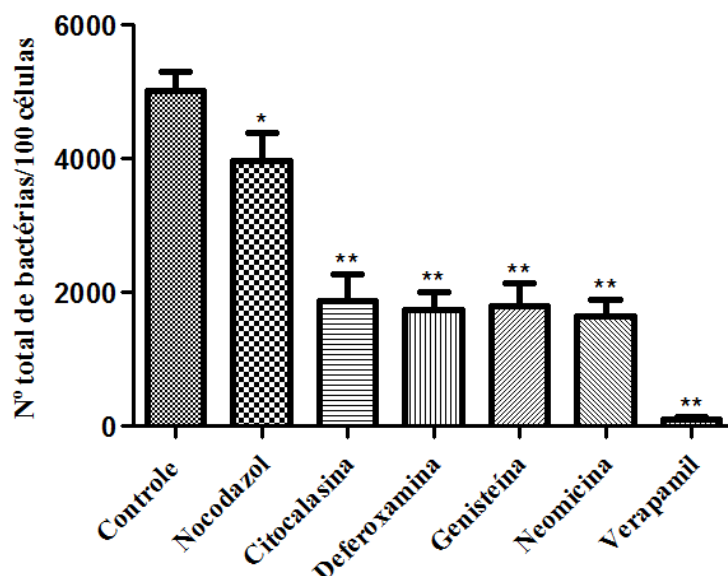


**Figura 5.** Efeito das drogas no processo de proliferação de *E. canis* em células DH82. Após 3h de infecção, as células foram tratadas com as drogas em seus respectivos tempos e concentrações. O número total de bactérias em 100 células evidenciado na figura acima é relativo a um período adicional de 4 dias de infecção. Os dados são expressados em médias  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ) e são representativos de pelo menos 2 experimentos independentes com resultados similares. \*,  $p<0.05$  (unpaired two-tailed  $t$  test); \*\*,  $p<0.01$  (unpaired two-tailed  $t$  test).

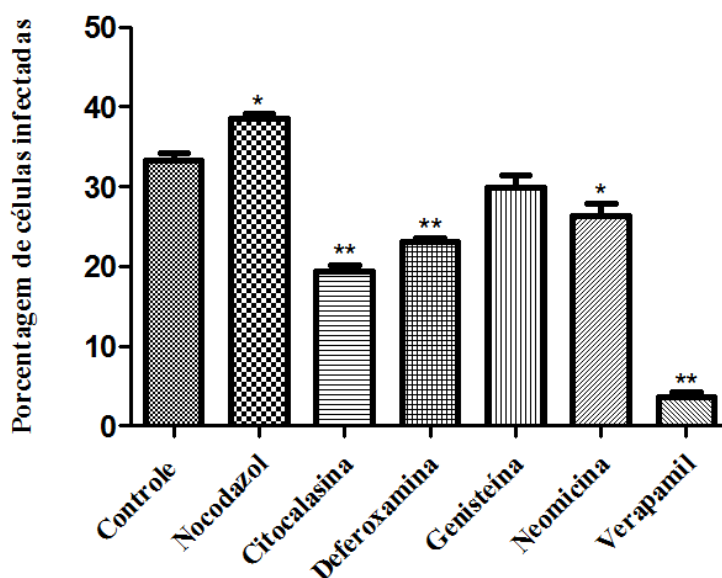


**Figura 6.** Efeito das drogas no processo de proliferação de *E. canis* em células DH82. Após 3h de infecção, as células foram tratadas com as drogas em seus respectivos tempos e concentrações. A porcentagem de células infectadas evidenciadas na figura acima é relativa a um período adicional de 4 dias de infecção. Os dados são expressados em médias  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ) e são representativos de pelo menos 2 experimentos independentes com resultados similares. \*,  $p<0.05$  (unpaired two-tailed  $t$  test); \*\*,  $p<0.01$  (unpaired two-tailed  $t$  test).

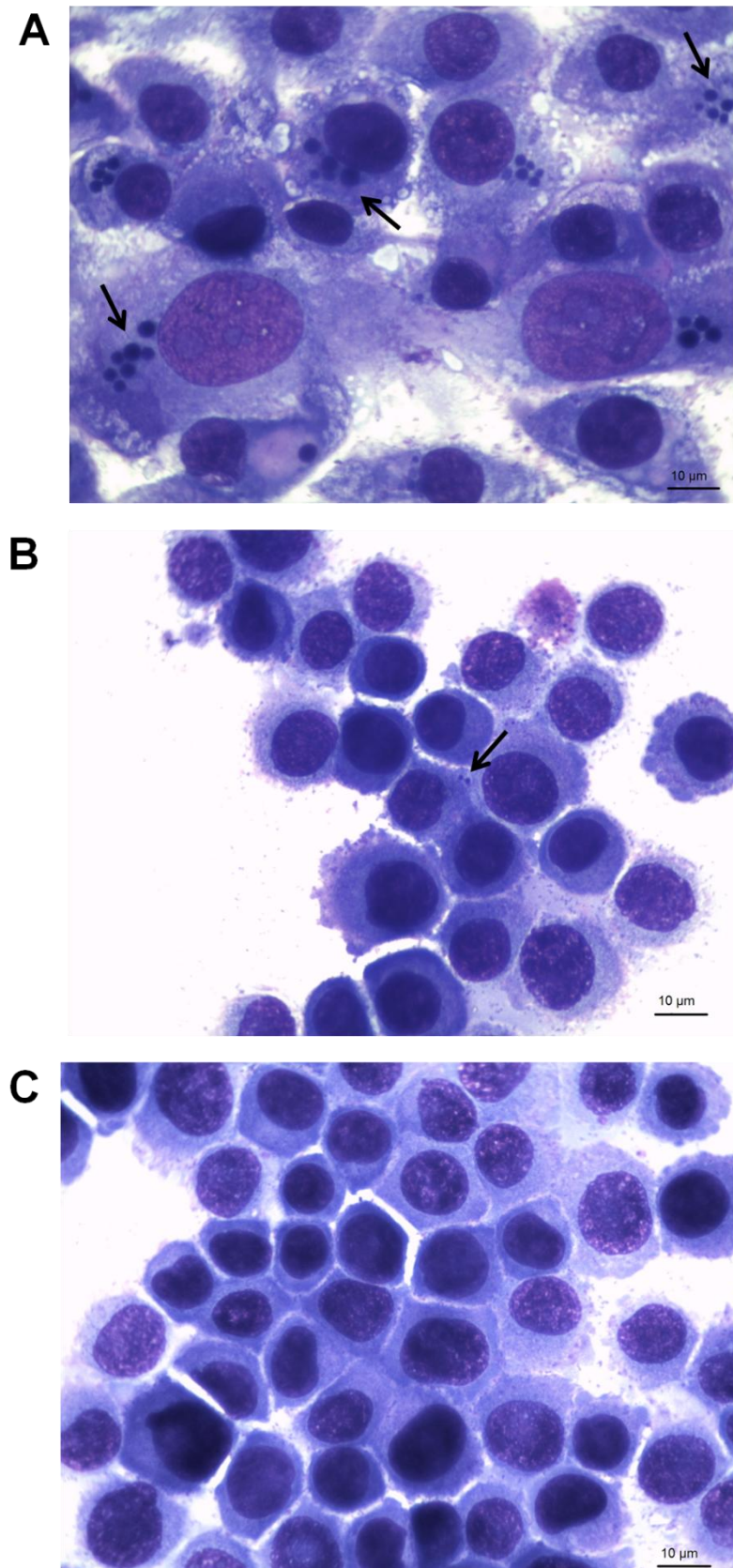


**Figura 7:** Ensaio de Proliferação de *Ehrlichia canis* em células DH82. **A:** Grupo Controle evidenciando mórulas de *E. canis* em células DH82 (setas). **B:** Grupo tratado com Verapamil demonstrando reduzido número de mórulas por célula e menor porcentagem de células DH82 infectadas em comparação ao grupo controle. **C:** Grupo tratado com Verapamil demonstrando ausência de mórulas em células DH82. Coloração pelo Panótico Rápido.

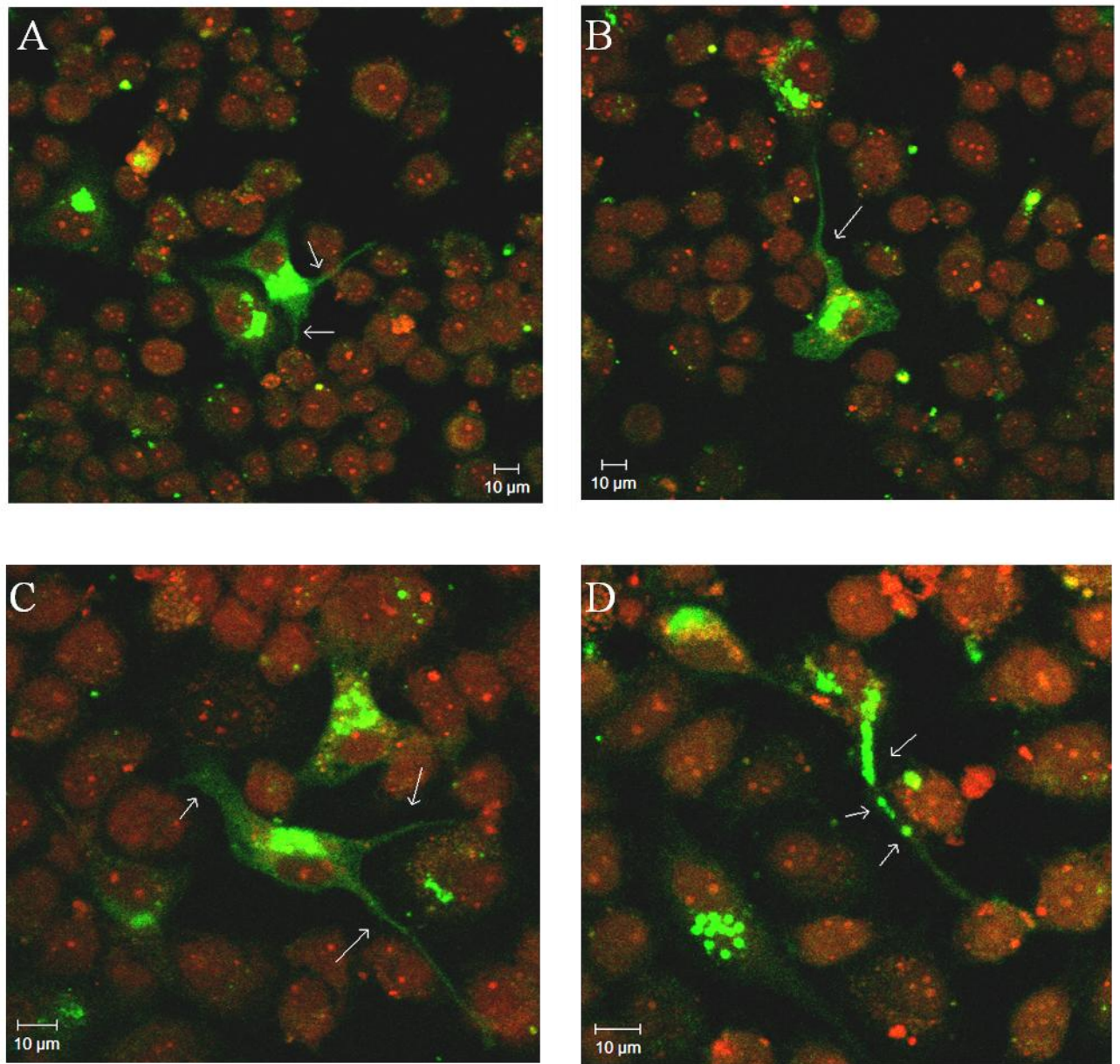


**Figura 8:** Imunofluorescência de células DH82 infectadas com mórulas de *Ehrlichia canis* 24h pós-inoculação. Notar formação de filopódios de células DH82 infectadas em direção às células DH82 não-infectadas (seta), e passagem de mórulas de uma célula à outra (D). Marcação com Anticorpo primário (anti-*E. canis*) 1:250 e Anticorpo secundário (anti-cão) FITC/Azul de Evans 1% 1:400.

#### 4.2. Avaliação das drogas no ensaio de propagação de *E. canis* em células DH82

Para avaliar os efeitos das drogas no ensaio de propagação, essas foram adicionadas às células DH82 infectadas a uma taxa de 20%. Após 4 dias as análises demonstraram que, exceto para Nocodazol, evidenciou-se uma diminuição do número total de bactérias após o tratamento (Figura 9).

Observamos ainda que não houve diferença significativa na porcentagem de células infectadas quando tratadas com Citocalasina D e Deferoxamina. Verapamil acarretou uma diminuição desse valor e Neomicina levou a uma diminuição quase significativa ( $p = 0,053$ ). Quanto ao Nocodazol, assim como Genisteína, foi evidenciado aumento significativo na porcentagem de células infectadas (Figura 10).

Nesse ensaio observa-se também um efeito significativo da droga verapamil em relação ao controle (Figura 11).

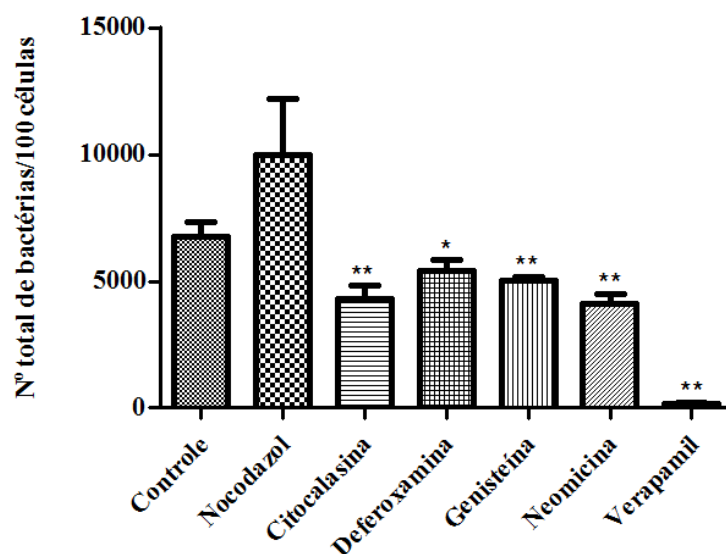


**Figura 9.** Efeito das drogas no processo de propagação de *E. canis* em células DH82, com taxa inicial de infecção de 20%. Após 4 dias o número total de bactérias em 100 células é evidenciado na figura acima. Os dados são expressados em médias  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ) e são representativos de pelo menos 2 experimentos independentes com resultados similares. \*,  $p<0.05$  (unpaired two-tailed *t* test); \*\*,  $p<0.01$  (unpaired two-tailed *t* test).

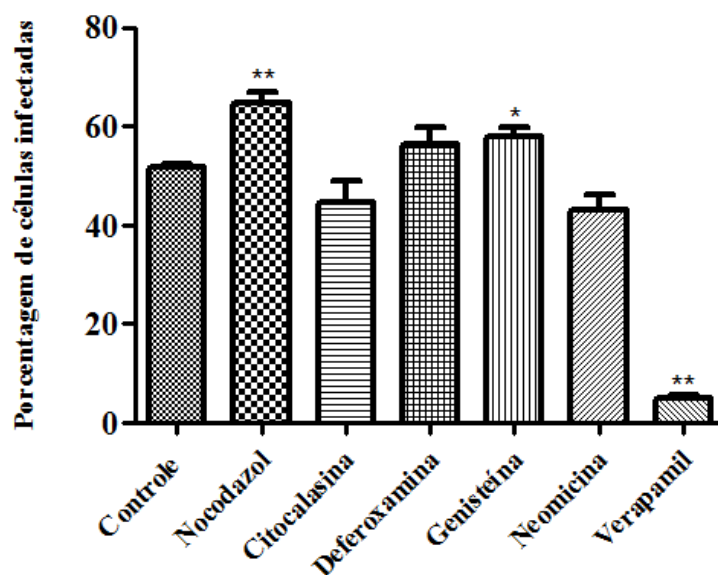


**Figura 10.** Efeito das drogas no processo de propagação de *E. canis* em células DH82, com taxa inicial de infecção de 20%. Após 4 dias a porcentagem de células infectadas é evidenciada na figura acima. Os dados são expressados em médias  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ) e são representativos de pelo menos 2 experimentos independentes com resultados similares. \*,  $p<0.05$  (unpaired two-tailed *t* test); \*\*,  $p<0.01$  (unpaired two-tailed *t* test).

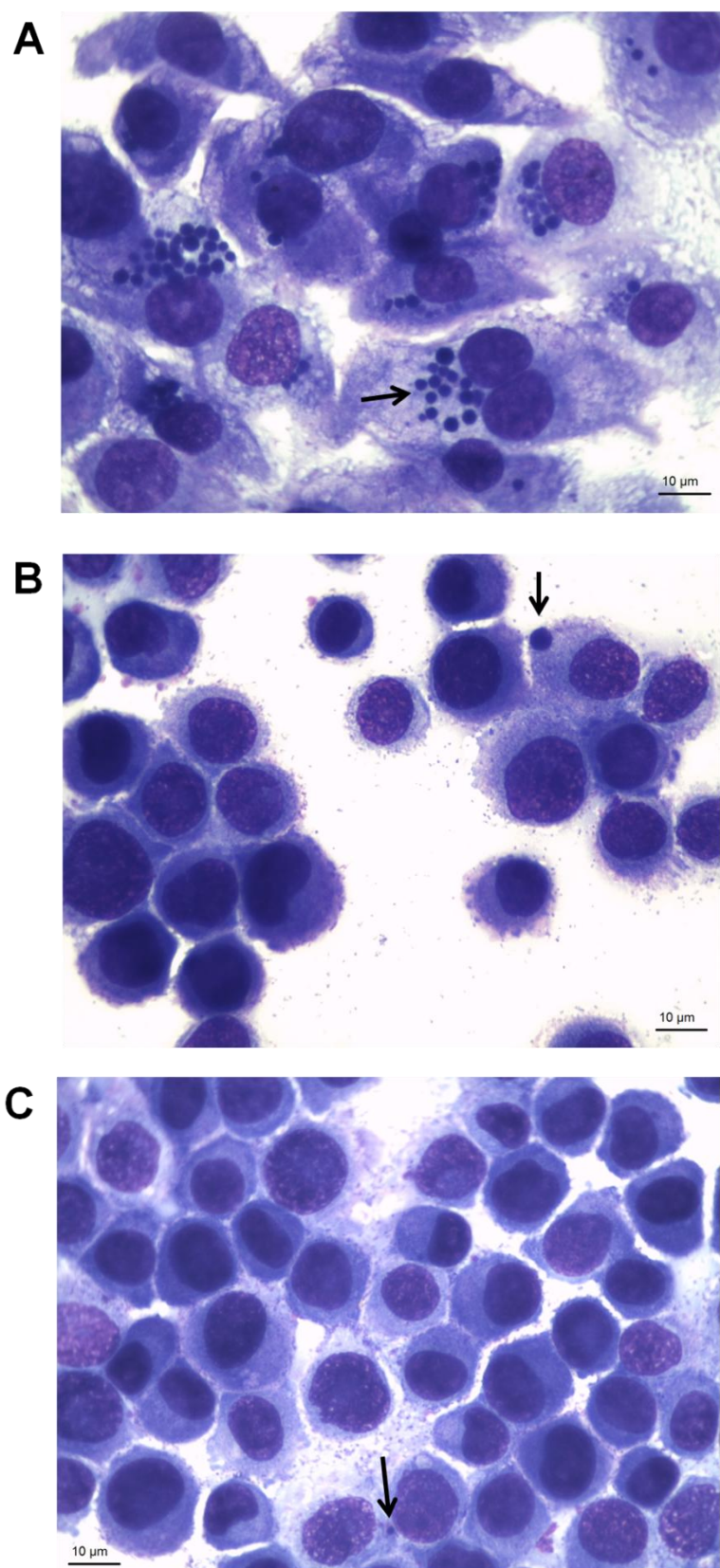


**Figura 11:** Ensaio de Propagação de *Ehrlichia canis* em células DH82. **A:** Grupo Controle evidenciando mórulas de *E. canis* em células DH82 (seta). **B e C:** Grupo tratado com Verapamil demonstrando reduzido número de mórulas (seta) por célula e menor porcentagem de células DH82 infectadas em comparação ao grupo controle. Coloração pelo Panótico Rápido.

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que o processo de proliferação e propagação de *E. canis* pode estar relacionado com a participação do citoesqueleto uma vez que houve uma diminuição do número total de bactérias quando as células foram tratadas com Citocalasina D, inibidor de filamentos de actina. Podemos propor que essa droga foi capaz de inibir eficientemente a multiplicação intracelular da bactéria.

No entanto, não observou-se uma diminuição significativa na porcentagem de infecção no experimento de propagação quando as células foram tratadas com Citocalasina D, indicando que mesmo com um menor número de bactérias, essas foram suficientes para infectar outras células após o período de inibição da exocitose e fagocitose estimulada por essa droga.

Muitos patógenos exploraram ativamente o citoesqueleto de actina durante a infecção. Este fenômeno pode ocorrer durante a entrada em células de mamíferos após a ligação a um receptor e/ou relacionar-se a uma série de eventos de sinalização que culminam com a internalização do microrganismo. Embora os rearranjos de actina sejam uma característica comum à maioria dos eventos de internalização de algumas bactérias (*Listeria*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Neisseria*, e *Bartonella*), outros fatores celulares envolvidos são característicos de cada espécie. Um outro momento durante o qual patógenos utilizam o citoesqueleto de actina ocorre no citosol, no qual algumas bactérias (*Listeria*, *Shigella*, *Rickettsia*) ou vírus são capazes de se mover. O movimento é acoplado a um processo de polimerização de actina, com a formação de caudas de actina (DRAMSI; COSSART, 1998).

Thomas e colaboradores (2010) demonstraram que a formação de filopódio é essencial para o transporte intercelular de *Ehrlichia muris* e *Ehrlichia chaffeensis*. Filopódios são prolongamentos celulares finos de superfície contendo feixes de filamentos de actina paralelos, podendo ser utilizados como mecanismos de entrada e saída de patógenos. De acordo com o mesmo autor uma vantagem desse transporte de *Ehrlichia* através de filopódio é que possibilita a evasão do sistema imune ao mesmo tempo que possibilita a passagem de uma célula a outra.

Em nossos estudos também observamos a formação desses filopódios provenientes das células infectadas em direção às não-infectadas. Esse fato pode sugerir que esses filopódios formam-se devido a um estímulo bacteriano, caracterizando-se como um importante mecanismo de evasão lisossomal e fundamental nos processos de proliferação e propagação bacterianas.

Quanto à atuação do Nocodazol, inibidor de microtúbulos, evidenciou-se uma divergência do número de bactérias nas análises de proliferação e propagação. Os dados demonstram que a interferência dessa droga provavelmente se dá nos momentos iniciais de infecção, onde houve uma diminuição no número total de bactérias. Claramente observou-se que no ensaio de propagação o número total de bactérias não diminuiu.

Entretanto, assim como no ensaio de proliferação, houve um aumento na porcentagem de células infectadas. Esse fato pode ser explicado porque essa droga inviabiliza a realização de mitose (LODISH et al., 2005). Assim, no final do processo de incubação (4 dias), haverá uma maior quantidade de células infectadas em relação às não-infectadas.

A polimerização dos microtúbulos caracteriza-se por ser processo essencial no transporte vesicular intracelular, especialmente de endossomos e lisossomos (MATTEONI; KREIS, 1987). Rikihisa e colaboradores (1994) demonstram que os processos de proliferação e propagação de *Ehrlichia risticii* em macrófago parece requerer clatrina, microfilamentos e microtúbulos. Os autores observaram ainda que houve uma prevenção da proliferação após utilização de taxol e colchicina, drogas que inibem a polimerização dos microtúbulos e, consequentemente, o transporte vesicular.

Sabe-se que a participação do citoesqueleto se dá tanto no processo de internalização de diferentes patógenos durante a fagocitose (MATTEONI; KREIS, 1987) bem como em outros mecanismos celulares, como nos de transporte vesicular. Um dos processos de transporte no qual o citoesqueleto participa é utilizado por bactérias do gênero *Ehrlichia sp.* e envolve a endocitose mediada por receptor de transferrina (TfRs), responsável por um transporte contínuo de ferro para dentro da célula, elemento essencial para a sobrevivência dessas bactérias.

Inclusões de proliferação e propagação de *Ehrlichia chaffensis* e *Neorickettsia risticii* acumulam esses receptores de transferrina em sua membrana favorecendo tanto a evasão do sistema imune como a obtenção de uma fonte contínua de nutriente (BARNEWALL et al., 1997; RIKIHISA, 2010;). A aquisição de ferro por essas bactérias é dependente de moléculas de ferro disponíveis no citoplasma, uma vez que esses patógenos não podem estabelecer infecção quando os macrófagos são tratados com o quelante de ferro deferroxamina antes da infecção ou nos seus estágios iniciais. Ao contrário dessas bactérias, *Anaplasma phagcytophilum* é resistente à deferroxamina sugerindo que a sobrevivência dessa bactéria é independente da moléculas de ferro disponíveis bem como do sistema de aquisição de ferro via TfR na célula hospedeira (RIKIHISA, 2003).

Nesse estudo observamos uma efetiva inibição da proliferação de *E. canis* quando as células infectadas foram expostas ao quelante de ferro Deferoxamina. Efeito semelhante foi observado no ensaio de propagação em relação ao número total de bactérias por célula. Entretanto a porcentagem de células infectadas permaneceu inalteradas quando comparadas ao controle. Isso pode ter ocorrido pelo fato de que como nesse experimento as células já estavam infectadas, o tempo de ação e a concentração da droga podem não ter sido suficientes para levar a uma carência de ferro tal que promovesse a diminuição efetiva da porcentagem de células infectadas. Apesar de se esperar um resultado mais eficiente dessa droga, é importante ressaltar que ela atua no ferro solúvel ou disponível, não afetando o ferro ligado à ferritina (RIKIHISA, 2003). Logo, esse elemento estará disponível após o efeito inibitório.

Avaliando a ação da Neomicina (inibidor de PLC), Genisteína (inibidor de PTK) e Verapamil (bloqueador de canal de cálcio), observamos diminuição da proliferação e propagação bacterianas. A semelhança entre os resultados obtidos pelo tratamento com essas drogas se deve ao fato de que todas atuam em uma mesma via de sinalização celular que culmina no transporte intra e extra-celular de cálcio.

A Proteína quinase C (PKC) também parece desempenhar um papel na fagocitose já que seu principal substrato, MARCKs, é conhecido como um dos reguladores na estrutura de actina em membranas, tornando-se assim, um ideal candidato na estruturação da actina em fagossomos em resposta a sinais de PKC e cálcio/calmodulina (ALLEN; ANDEREM, 1995).

Recentes evidências sugerem que PI3-Kinase, um componente intermediário da via, participa na cascata de sinalização de receptores de fagócitos. PI3-Kinase catalisa a fosforilação na posição D3 do anel inositol do fosfatidilinositol (PI), PI(4)P e PI(4,5)P<sub>2</sub>, e é ativada por muitos receptores de tirosina quinase que desencadeiam a polimerização da actina (TOKER; CANTLEY, 1997). Além disso há evidências que a IP3-Kinase participa do tráfego de membrana (De CAMILLI et al., 1996), sendo um possível candidato ao estudo de sua participação nos processos de infecção por *Ehrlichia canis*.

O cálcio é um elemento essencial para a fisiologia celular e participa de diversos processos relacionados à internalização, proliferação e propagação de patógenos tais como: montagem dos filamentos de actina para fagocitose (DeVINNEY et al., 1999), endocitose mediada por receptor (RIKIHISA, 2003) e ativação da própria PTK (LIN et al., 2002), uma proteína quinase responsável pela ativação e fosforilação de diferentes substratos (ALBERTS et al., 2006). Lin et al (2002) afirma que a propagação de *E. chaffensis* requer a exocitose ou a lise das células do hospedeiro e subsequente endocitose por outra célula e que esse processo também requer mobilização de cálcio intracelular e fosforilação da tirosina quinase.

As propriedades físicas das redes de actina depende da duração e concentração dos filamentos e do número e geometria das ligações entre elas. Proteínas de ligação de actina que regulam cada uma dessas propriedades e que promovem ou impedem a formação de filamentos foram identificadas e, em muitos casos, suas interações com actina são alteradas por moléculas relacionadas à sinalização celular, que incluem  $\text{Ca}^{2+}$  e PPIs. A crucial importância do  $\text{Ca}^{2+}$  para a estrutura do citoesqueleto é indicada pelo número de proteínas ligantes de actina cuja função é regulada por esse íon *in vitro* (JANMEY, 1994).

Esse grupo de proteínas se ligam aos filamentos de actina atuando no controle do comprimento dos filamentos quebrando-os em fragmentos menores e formando novas extremidades de filamentos para a polimerização. Esse processo de formação é favorecido pela concentração de actina na célula, tornando necessária a existência de proteínas cortadoras que atuam na quebra de filamentos, como gelsolina e cofilina (LODISH et al., 2005)

As proteínas cortadoras são reguladas por várias rotas de sinalização. Tanto cofilina como gelsolina se ligam a PIP<sub>2</sub>, inibindo a ligação dessas proteínas aos filamentos de actina, impossibilitando assim sua atividade cortadora. A hidrólise de PIP<sub>2</sub> libera essas proteínas induzindo rápida fragmentação dos filamentos. A fosforilação reversível e a defosforilação da cofilina também regulam a sua atividade e atividade cortadora da gelsolina é ativada por um aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. A influência neutralizadora de diferentes moléculas de sinalização,  $\text{Ca}^{2+}$  e PIP<sub>2</sub>, permite a regulação recíproca dessas proteínas (LODISH et al., 2005)

Um outro aspecto importante a ser analisado é o fato de que neste estudo observou-se que o bloqueador de canal de cálcio foi mais efetivo em comparação às outras drogas que atuam na mesma via de sinalização. Segundo Alberts e colaboradores (2006), uma alteração na concentração citosólica de cálcio livre pode ser desencadeada por muitos sinais diferentes não somente por aqueles que agem por meio de receptores acoplados à proteína G. Isso demonstra a importância do íon  $\text{Ca}^{2+}$  em todo processo de sinalização já que representa o último componente da via e que é responsável pelo estímulo a diferentes outros processos envolvidos na internalização, proliferação e propagação de patógenos, desde o estímulo à polimerização dos filamentos de actina bem como à endocitose mediada por receptor de transferrina. Esse fato sugere que desde os contatos iniciais da bactéria à célula assim como sua multiplicação e posterior infecção à outras células envolve um constante estímulo ao influxo desse íon.

## 6. CONCLUSÃO

No presente estudo analisamos o papel do citoesqueleto, especificamente microtúbulos e filamentos de actina, alguns componentes da Via de sinalização IP3/DAG: fosfolipase C (PLC), proteína quinase (PTK) e canais de cálcio além da participação ferro nos processos de proliferação e propagação bacterianas utilizando drogas inibitórias. De acordo com os resultados obtidos, concluímos que:

- A participação dos filamentos de actina parece ser necessária à movimentação e multiplicação bacteriana;
- O elemento ferro parece ser essencial à multiplicação bacteriana;
- Existe envolvimento dos componentes da Via de Sinalização IP3/DAG, principalmente do influxo de cálcio. Esse íon parece ser fundamental à ativação dos outros processos necessários à proliferação e propagação bacteriana, desde estímulo à polimerização dos filamentos de actina até à endocitose mediada por receptor de transferrina. Esse fato sugere que desde os contatos iniciais da bactéria à célula assim como sua multiplicação e posterior infecção à outras células envolve um constante estímulo ao influxo desse íon.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEREM, A.; UNDERHILL, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 17, p. 593-623, 1999.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and molecular immunology**, 6<sup>a</sup> 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.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. 2006. **Essential Cell Biology**, 5a ed. London: Garland Science, 2006. p

ALLEN, L. H.; ADEREM, A. A role for MARCKS, the alpha isozyme of protein kinase C and myosin I in zymosan phagocytosis by macrophages. **J. Exp. Med.**, vol. 182, p. 829-840, 1995.

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

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.

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

BRADHAM, C. A.; PLUMPE, J.; MANNS, M. P.; BRENNER, D. A.; TRAUTWEIN, C. Mechanisms of hepatic toxicity of TNF-induced liver injury. **American Journal of Physiology**, v. 275, n. 3, p. 387-92, 1998.

BREITSCHWERDT, E. B. As riquetsioses. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. São Paulo: Manole, 1998, p. 543-553.

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.

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

CASTRO, M. B. **Alterações clínicas, anatomopatológicas e imunopatológicas na ehrliquiose 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 monocyte ehrliquiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 119, n. 1, p. 73-86, 2004.

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

COHN, L. A. Ehrlichiosis and related infections. **Veterinary Clinic of Small Animal**, v. 33, p. 863-84, 2003.

COLLINS, H. L. The role of iron in infections with intracellular bacteria. **Immunology letters**, v. 85, p. 193-195, 2003.

CONOVER, W. J. **Practical Nonparametric Statistics**. 3 ed. New York: John Wiley & Sons; 1998.

COOPER, G. M. **A célula, uma abordagem molecular**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2001, 712 p.

COSTA, J. O.; BATISTA, J. 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<sup>a</sup> 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.

De CAMILLI, P; EMR, S. D.; McPHERSON, P. S.; NOVICK, P. Phosphoinositides as regulators in membrane traffic. **Science**, vol. 271, p. 1533-1539, 1996.

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.

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 Diagnosis**, Bethesda, v. 7, n. 4, p. 504-10, 2005.

DRAMSI, S.; COSSART, P. Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.**, vol. 14, p. 137-166, 1998.

DUMLER, J. S.; ANTHONY, F. B.; CORBELIS, 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.

FERREIRA, B. R.; SILVA, J. S.; Successive tick infestations selectively promote a T-helper 2 cytokine profile in mice. **Immunology**, v. 96, n. 3, p. 434-39, 1999.

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, M.; 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.

GRUSBY, M. J.; JOHNSON, R. S.; PAPAIOANNOU, V. E.; GLIMCHER, L. H. Depletion of CD4<sup>+</sup> T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice. **Science**, v. 253, n. 5026, p. 1417-20, 1991.

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

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

HARRUS, S.; ALLEMAN, A. R.; BARK, H.; MAHAN, S. M.; WARNER, 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.; WANER, T.; AYALI, D. S.; BARK, H.; JONGEJAN, F.; HECHT, G.; BANETH, G. Dynamics of IgG1 and IgG2 subclasses response in dogs naturally and experimentally infected with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**, v. 99, p. 63-71, 2001.

HARRUS, S.; KENNY, M.; MIARA, L.; AIZENBERG, L.; WARNER, 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.; WARNER, T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. **The Veterinary Journal**, London, “in press”, doi: 10.1016/j.tvjl.2010.02.001.2010.

HILDEBRANDT, P. K.; CONROY, J. D.; MCKEE, A. E.; NYNDO, M. B. A.; HUXSOLL, D. L. Ultrastructure of *Ehrlichia canis*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 7, n. 2, 265-71, 1973.

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**, 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 446 p.

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

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.

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

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

JANMEY, P. A. Phosphoinositides and calcium as regulators of cellular actin assembly and disassembly. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 56, p. 164-191, 1994.

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

LABARTHE, N.; PEREIRA, M. C.; BALBARINI, O.; McKEE, W.; COIMBRA, C. A.; HOSKINS, J. Serologic prevalence of *Dirofililaria 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.; WINSLOW, G. M. Survival, replication, and antibody susceptibility of *Ehrlichia chaffeensis* outside of host cells. **Infection and immunity**, v. 71, n. 8, p. 4229-37, 2003.

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.; RIHIHISA, 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.; RIHIHISA, 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.

LIU, P. T.; MODLIN, R. L. Human macrophage host defense against *Mycobacterium tuberculosis*. **Current opinion in Immunology**, v. 20, p. 371-76, 2008.

LODISH, H.; BERK, A.; MATSUDAIRA, P.; KAISER, C. A.; KRIEGER, M.; SCOTT, M. P. **Molecular Cell Biology**. 5<sup>a</sup> ed. New York: W.H.Freeman and Co., 2005 , p-814-848.

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. 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.

MAVROMATIS, K.; DOYLE, C. K.; LYKIDS, A.; IVANOVA, N.; FRANCINO, M. P.; CHAIN, S. M.; Malfatti, S.; LARIMER, F.; COPLELAND, A.; DETTER, J. C.; LAND, M.; RICHARDSON, P. M.; YU, X. J.; WALKER, D. H.; McBRIDE, J. M.; KYRPIDES, N.

C.; The Genome of the Obligatory Intracellular Bacterium *Ehrlichia canis* Revelas 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, p. 441-7, 1996.

McBRIDE, J. W.; WALKER, D. H. Molecular and cellular pathobiology of *Ehrlichia chaffeensis* infection: targets for new therapeutics and immunomodulation strategies. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 13, 2011.

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.

MEYER, D.; COLES, H. E.; RICH, L. J. **Medicina de Laboratório Veterinária: interpretação e diagnóstico**. São Paulo: Roca, 1995. 308p.

MORAIS, H. A.; HOSKINS, J.; ALMOSNY, N. R. P.; LABARTHE, N. Diretrizes gerais para o diagnostic 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.; BARNWALL, R. E.; RIKIHISA, Y.; Human granulocyte 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.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microniologia médica**, 6<sup>a</sup> ed. San Francisco: Elsevier Saunders, 2006. 979 p.

NEER, T. M. Ehrlichiosis: Canine Monocytic and granulocytic ehrlichiosis. IN: GREENE, C. E. (Org.). **Infectious diseases of the dog and cat**. 2.ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1998, p. 139-54.

NEITZ, W. O.; THOMAS, A. D. Rickettsiosis in the dog. **Journal of South African Veterinary Research**, Gloucestershire, v. 32, p. 1651-58, 1971.

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.

NYNDO, 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.

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.

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

PÉREZ, G.; VITTORI, D.; PREGI, N.; GARBOSSA, G.; NESSE, A. Homeostasis del hierro. Mecanismos de absorción, captación celular y regulación. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, v. 39, p. 301-314, 2005.

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

PIMENTEL, G. F. **Curso de Estatística Experimental**. São Paulo, Nobel, 1985. 467 p.

POPOV, V. L.; HAN, V. C.; CHEN, M.; DUMLER, J. S.; FENG, H. M.; ANDREADIS, T. G.; TESH, R. B.; WALKER, D. H. Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 47, p. 2235-51, 1998.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; MARKEY, B. K.; TORGERSON, P. R. Bacterial diseases. **Microbial and parasitic diseases of the dog and cat**. London: Saunders, 1997, p. 229-33.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. **The Journal of the cell biology**, New York, v. 18, p. 208-13, 1963.

RIKIHISA, Y. *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis*: subversive manipulators of the 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.

RODRIGUEZ-VIAZ, R. I.; ALBORNOZ, R. E. F.; BOLIO, G. M. *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.

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.

SHIBATA, S. I.; KAWAHARA, M.; RIKIHISA, Y.; FUJITA, H.; WTANABE, 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.

SILVA, C. V.; SILVA, E.; CRUZ, M.; CHAVRIER, P.; MORTARA, R. ARF6, PI3-Kinase and host cell actin cytoskeleton in *Toxoplasma gondii* cell invasion. **BBRC**, v. 378, p. 656-661, 2009.

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.

THOMAS, S.; POPOV, V. L.; WALKER, D. H. Exit Mechanisms of the Intracellular Bacterium *Ehrlichia*. **Plos one**, v. 5, 2010.

TOKER, A.; CANTLEY, L. C. Signaling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. **Nature**, vol. 387, p. 673-676, 1997.

TRAPP, S. M.; DAGNONE, A. S.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R. L.; AMUDE, A. M.; MOREIS, 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.

UNVERA, A.; RIKIHISA, Y.; KARAMAN, M.; OZEN, H. Na 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.

VIGNARD-ROSEZ, K.; ALVES, F. R.; MAES, L. Erliquiose canina. **Cães e gatos**, n. 96, p. 25-28, 2001.

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.

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.

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

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. 223-15, 1988.

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

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.

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