

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**RESPOSTA IMUNE EM CÃES EXPERIMENTALMENTE
INFECTADOS POR *Rangelia vitalii***

TESE DE DOUTORADO

Francine Chimelo Paim

Santa Maria, RS, Brasil

2013

**RESPOSTA IMUNE EM CÃES EXPERIMENTALMENTE
INFECTADOS POR *Rangelia vitalii***

Francine Chimelo Paim

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutora em Medicina Veterinária

Orientadora: Prof. Sonia Terezinha dos Anjos Lopes

Santa Maria, RS, Brasil

2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Chimelo Paim, Francine
Resposta imune em cães experimentalmente infectados
por *Rangelia vitalii* / Francine Chimelo Paim.-2013.
66 p.; 30cm

Orientadora: Sonia Terezinha dos Anjos Lopes
Coorientadora: Cinthia Melazzo Mazzanti
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2013

1. Rangeliose 2. Citocinas 3. Óxido nítrico 4. Proteínas
de fase aguda 5. Imunoglobulinas I. Terezinha dos Anjos
Lopes, Sonia II. Melazzo Mazzanti, Cinthia III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
Aprova a Tese de Doutorado

**RESPOSTA IMUNE EM CÃES EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS
POR *Rangelia vitalii***

elaborada por
Francine Chimelo Paim

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutora em Medicina Veterinária

Comissão Examinadora:

Cinthia Melazzo Mazzanti, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/co-orientadora)

Jessie Martins Gutierrez, Dr. (UFSM)

Marta Lizandra do Rêgo Leal, Dr^a. (UFSM)

Patricia Wolkmer, Dr^a. (UNICRUZ)

Stella de Faria Valle, Dr^a. (UFRGS)

Santa Maria, 29 de outubro de 2013

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Dr^a. Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, pela amizade e carinho durante todos esses anos que faço parte da equipe LACVET/UFSM, agradeço por acreditar em mim e sempre me incentivar.

A Dr^a. Cinthia Melazzo Mazanti e a Dr^a. Silvia Gonzalez Monteiro pela co-orientação e auxílio neste trabalho.

Ao todos os integrantes do grupo de pesquisa LACVET/UFSM, pela amizade, convivência e ajuda para realização deste trabalho. Em especial as minhas amigas Cássia e Patrícia pela amizade, parceria e auxílio fundamental em todos os experimentos e, também aos colegas Raqueli, Márcio e Aleksandro pela dedicação durante este trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação de Medicina Veterinária da UFSM que possibilitou a conclusão desta minha etapa profissional.

A CAPES, pela concessão da bolsa e suporte financeiro.

Por fim, agradeço a minha família, meus pais Breno e Cristina, pelo apoio incondicional, estímulo e paciência durante o doutorado. Também agradeço a meu noivo Felipe pela ajuda, compreensão e companheirismo. Amo muito vocês!

RESUMO

Tese de Doutorado

Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária

Universidade Federal de Santa Maria

RESPOSTA IMUNE EM CÃES EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS POR *Rangelia vitalii*

AUTORA: Francine Chimelo Paim

ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Sonia Terezinha dos Anjos Lopes

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 29 de outubro de 2013.

Rangelia vitalii é o agente etiológico da rangelirose, uma doença de curso hemorrágico que foi descrita em cães no Sul e Sudeste do Brasil, Uruguai e Argentina. Os aspectos imunológicos envolvidos nessa doença não foram totalmente elucidados. Nesse estudo objetivou-se investigar os parâmetros imunológicos na rangelirose, através da determinação sérica de citocinas, óxido nítrico, perfil eletroforético, proteínas de fase aguda e imunoglobulinas de cães experimentalmente infectados por *Rangelia vitalii*. Foram utilizados 12 cães divididos em dois grupos: Grupo A (controle) composto por animais não infectados (n=5) e Grupo B composto por animais inoculados com *R. vitalii* (n=7). Após inoculação, os animais foram monitorados por esfregaço sanguíneo. Foi coletado sangue da veia jugular nos dias 0, 10 e 20 pós-inoculação (PI) para a dosagem sérica das citocinas interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6), dosagem de produtos de oxidação do óxido nítrico (NO_x), perfil eletroforético, dosagem de proteínas de fase aguda (proteína C-reativa e alfa 1 glicoproteína ácida) e imunoglobulinas (IgG, IgM, IgA e IgE). No grupo infectado o parasita foi encontrado no interior de eritrócitos, neutrófilos e monócitos no dia 5 PI. Esse estudo demonstrou aumento (P<0,01) dos níveis de citocinas séricas no grupo infectado em relação ao grupo controle. Os níveis séricos de NO_x aumentaram nos dias 10 (P<0,01) e 20 PI (P<0,05) nos animais infectados. A proteína total reduziu nos dias 10 (P<0,01) e 20 PI (P<0,05). Ocorreu redução (P<0,01) de albumina no grupo infectado em relação ao grupo controle. As frações alfa-1 globulina e gama globulina aumentaram (P<0,01) nos animais infectados no dia 20 PI. Alfa-2 globulina (dias 10 e 20 PI) e beta-2 globulina (dia 10 PI) decresceram (P<0,05) nos animais infectados em comparação ao grupo controle. A fração beta-1 globulina não diferiu estatisticamente. As concentrações séricas de proteína C-reativa e alfa-1 glicoproteína ácida aumentaram (P<0,05) nos dias 10 e 20 PI nos animais infectados. Ocorreu aumento de IgG nos dias 10 PI (P<0,05) e 20 PI (P<0,01) no soro dos animais infectados. Foi observado aumento (P<0,01) de IgM, IgA e IgE nos animais infectados em relação ao grupo controle. A partir dos resultados pode-se concluir que a rangelirose causa alteração na concentração de citocinas séricas, nos metabólitos do óxido nítrico, nas proteínas séricas e estimula a síntese de proteínas de fase aguda e imunoglobulinas. Estas alterações podem ser associadas à resposta imune do hospedeiro contra o piroplasma.

Palavras – chave: Rangelirose. Cães. Citocinas. Óxido nítrico. Eletroforese. Proteínas de Fase Aguda. Imunoglobulinas.

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Postgraduate Program in Veterinary Medicine
Federal University of Santa Maria

IMMUNE RESPONSE IN DOGS EXPERIMENTALLY INFECTED BY *Rangelia vitalii*

AUTHOR: Francine Chimelo Paim

ADVISER: Prof^a. Dr^a. Sonia Terezinha dos Anjos Lopes

Place and Date of Defense: Santa Maria, October 29th, 2013

Rangelia vitalii is the etiologic agent of rangelirosis, a hemorrhagic disease that was described in dogs from South and Southeast Brazil, Uruguay and Argentina. The immunological aspects involved in this disease have not been fully elucidated. This study aimed to investigate the immunological parameters in rangelirosis by the determination of serum cytokines, nitric oxide, electrophoretic profile, acute phase proteins and immunoglobulins of dogs experimentally infected with *R. vitalii*. Twelve dogs were divided into two groups: Group A (control) composed by uninfected animals (n=5) and Group B consisting of animals inoculated with *R. vitalii* (n=7). After inoculation, animals were monitored by blood smear. Blood samples were collected through the jugular vein on days 0, 10 and 20 post-inoculation (PI) to determine the serum levels of interferon-gamma (IFN- γ), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin 1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6), oxidation products of nitric oxide (NO_x), electrophoretic profile, acute phase proteins (C-reactive protein and alpha 1 acid glycoprotein) and immunoglobulins (IgG, IgM, IgA and IgE). The parasite was found within erythrocytes, neutrophils and monocytes on day 5 PI in infected group. This study showed an increase ($P<0.01$) of cytokines levels in the infected group when compared to control group. Serum levels of NO_x increased on days 10 ($P<0.01$) and 20 PI ($P<0.05$) in infected animals. Total protein decrease on days 10 ($P<0.01$) and 20 ($P<0.05$) PI. There was a reduction ($P<0.01$) in albumin in infected group when compared with control group. Alpha-1 globulin and gamma globulin fractions increased ($P<0.01$) on day 20 PI in infected animals. Alpha-2 globulin (days 10 and 20 PI) and beta-2 globulin (day 10 PI) were decreased ($P<0.05$) in infected animals when compared to control group. Beta-1 globulin fraction did not differ statistically. Serum C-reactive and alpha 1 acid glycoprotein concentrations increased ($P<0.05$) on days 10 and 20 PI in infected animals. IgG was increased on days 10 ($P<0.05$) and 20 PI ($P<0.01$) in infected animals. It was observed an increase ($P<0.01$) in the levels of IgM, IgA, and IgE in infected animals compared to control group. From these results, we can conclude that rangelirosis causes alterations in serum cytokines, nitric oxide metabolites, serum proteins and stimulates the synthesis of acute phase proteins and immunoglobulins. These alterations may be associated with the host immune protection against the piroplasms, similar to what occurs in other hemoparasite infections.

Keywords: Rangelirosis. Dogs. Cytokines. Nitric oxide. Electrophoresis. Acute Phase Proteins. Immunoglobulins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Canino apresentando sangramento persistente pelas orelhas, característico de rangeliose.....	12
Figura 2 - Presença de inclusões de <i>Rangelia vitalii</i> em eritrócitos e leucócitos.....	13
Figura 3 - Eventos vasculares da inflamação: tecido normal e tecido inflamado.	16
Figura 4 - Principais funções das citocinas pró-inflamatórias.....	19
Figura 5 - Síntese de óxido nítrico a partir da L-arginina.....	20
Figura 6 - Eletroforese normal de cão (albumina, alfa 1 globulina, alfa 2 globulina, beta 1 globulina, beta 2 globulina e gamaglobulina).	22

LISTA DE ABREVIações

GPA – alfa 1 glicoproteína ácida
 α -1 globulina – Alfa 1 globulina
 α -2 globulina – Alfa 2 globulina
 β -1 globulina – Beta 1 globulina
 β -2 globulina – Beta 2 globulina
e-NOS – Óxido nítrico sintetase endotelial
 γ globulina – Gama globulina
IFN- γ – Interferon gama
IgA – Imunoglobulina A
IgE – Imunoglobulina E
IgG – Imunoglobulina G
IgM – Imunoglobulina M
IL-1 – Interleucina 1
IL-6 – Interleucina 6
i-NOS – Óxido nítrico sintetase induzível
NO – Óxido nítrico
NOS- Óxido nítrico sintetase
NO_x – Produto de degradação do óxido nítrico
NO₂⁻ - Nitrito
NO₃⁻ - Nitrato
n-NOS – Óxido nítrico sintetase neuronal
ONOO⁻ - Peroxinitrito
PCR – Proteína C reativa
PFA – Proteína de Fase Aguda
PI – Pós-infecção
R. vitalii – *Rangelia vitalii*
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS.....	26
2.1	OBJETIVO GERAL.....	26
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
3	ARTIGOS	27
3.1	ARTIGO 1:	27
3.2	ARTIGO 2	39
4	DISCUSSÃO	53
5	CONCLUSÕES	58
5.1	ARTIGO 1	58
5.2	ARTIGO 2	58
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1 INTRODUÇÃO

Rangelia vitalii é um piroplasma que infecta cães causando uma doença hemolítica extravascular de origem imunomediada e curso hemorrágico (LORETTI; BARROS, 2005; FIGHERA et al., 2010; LEMOS et al., 2012). Este protozoário pertence ao filo Apicomplexa, classe Sporozoasida e ordem Piroplasmorida, sendo o agente causador da rangeliose, doença conhecida popularmente como “peste do sangue”, “nambiuvú” ou “febre amarela dos cães” (LORETTI; BARROS, 2004; LORETTI; BARROS, 2005).

Um dos primeiros relatos dessa doença ocorreu ainda no início do século XX, em 1908, no qual foram descritos os sinais clínicos de prostração, temperatura elevada, icterícia e hemorragias da pele e narinas nos animais infectados (CARINI, 1908). Em 1910, foi realizada a taxonomia do parasita, nomeando o agente causador como *Piroplasma vitalii* (PESTANA, 1910). Quatro anos mais tarde, ocorreu nova publicação sobre a doença, propondo que o piroplasma causador da doença passasse a ser chamado de *Rangelia vitalii*, esse nome é uma homenagem ao Mestre Vital Brazil e ao seu descobridor Bruno Rangel Pestana (CARINI; MACIEL, 1914).

Durante anos, a rangeliose foi esquecida pela comunidade acadêmica e deixou de ser citada em livros e em artigos científicos (FIGHERA, 2007), além de ter sido confundida com outras doenças que apresentam sinais clínicos similares (KRAUSPENHAR et al., 2003). Toda essa confusão é fruto do desconhecimento sobre essa doença que teve suas pesquisas interrompidas após o ano de 1950 (KRAUSPENHAR et al., 2003). A rangeliose foi descrita até o momento apenas no Sul e Sudeste do Brasil (CARINI, 1908; PESTANA, 1910; KRAUSPENHAR et al., 2003; LORETTI; BARROS, 2004; FIGHERA et al., 2010; FRANÇA et al., 2010; LEMOS et al., 2012), Uruguai (SARASÚA; DONATI, 1976) e Argentina (EIRAS et al., 2012). Possivelmente, a área de distribuição desse protozoário seja mais ampla do que a atualmente conhecida (SOARES et al., 2011). Atualmente, esse parasita tem atraído grande atenção pela comunidade científica, sendo publicados casos de infecção natural (FIGHERA et al., 2010) e também de estudos experimentais (DA SILVA et al., 2011).

Os carrapatos *Amblyomma aureolatum* e *Rhipicephalus sanguineus* são os ixodídeos que têm sido encontrados em caninos acometidos por *R. vitalii* (LORETTI;

BARROS, 2004). Em um estudo realizado com os carrapatos *A. aureolatum* e *R. sanguineus* foi demonstrado que somente o *A. aureolatum* foi capaz de infectar cães com o protozoário *R. vitalii*, o mesmo não ocorreu com o *R. sanguineus* (SOARES et al., 2012). Cães jovens das áreas rurais ou periurbanas da região sul do Brasil são mais acometidos pela doença, principalmente nas épocas mais quentes do ano, em que a quantidade de carrapatos é grande no ambiente. Cães que foram infectados com *R. vitalii* podem se tornar portadores assintomáticos do patógeno, condição essa que se mantém por vários meses. Sugere-se que nas zonas rurais este protozoário seja mantido no ambiente por alguns hospedeiros desses carrapatos, como carnívoros silvestres e passeriformes (LORETTI; BARROS, 2004).

Os principais sinais clínicos da rangelirose são: anemia, icterícia, febre, esplenomegalia, linfadenopatia e hemorragias no trato gastrointestinal e sangramento pelas bordas e face externa da orelha, narinas e cavidade oral, por isso dá-se a denominação “nambiuví”, palavra indígena que significa “orelha que sangra” (Figura 1) (KRAUSPENHAR et al., 2003; LORETTI; BARROS, 2004; FIGHERA et al., 2010).



Figura 1 - Canino apresentando sangramento persistente pelas orelhas, característico de rangelirose

Fonte: Soares et al., 2011.

Essa doença pode ser dividida em três fases: aguda, subaguda e crônica. Na forma aguda o animal apresenta apatia, febre, fraqueza, mucosas pálidas que rapidamente se tornam ictéricas e óbito do animal ocorre dentro de três a cinco dias. A forma subaguda é associada a hemorragias pela boca, nariz, olhos e pele. Já na forma crônica é observado apenas picos de febre (KRAUSPENHAR et al., 2003).

No presente momento não existe conhecimento profundo sobre o ciclo de vida desse organismo. É descrito que seu ciclo de vida consiste de uma fase de desenvolvimento intraeritrocitária e outra extraeritrocitária, ocorrendo no citoplasma de células endoteliais (LORETTI; BARROS, 2005). Estudos demonstraram que apenas em 4% dos casos esse parasita pode ser encontrado na corrente sanguínea (FIGHERA, 2007). Nos últimos anos, estudo realizado por Fighera et al. (2010) demonstrou a ocorrência desse parasita livre no esfregaço sanguíneo em 11,1% dos casos estudados. No entanto, em outro estudo realizado com cães naturalmente infectados, foi possível a visualização do parasita em 71,4% dos animais que apresentavam sinais clínicos da doença (FRANÇA et al., 2010). Em cães infectados experimentalmente com *R. Vitalii*, o parasita foi observado no esfregaço de ponta de orelha no dia 5 pós-infecção, o pico da parasitemia ocorreu entre os dias 9 e 11 pós-infecção (PI), esses organismos encontravam-se livres no sangue, no interior de hemácias (Figura 2A) e leucócitos (Figura 2B) em todos os animais infectados (DA SILVA et al., 2011).

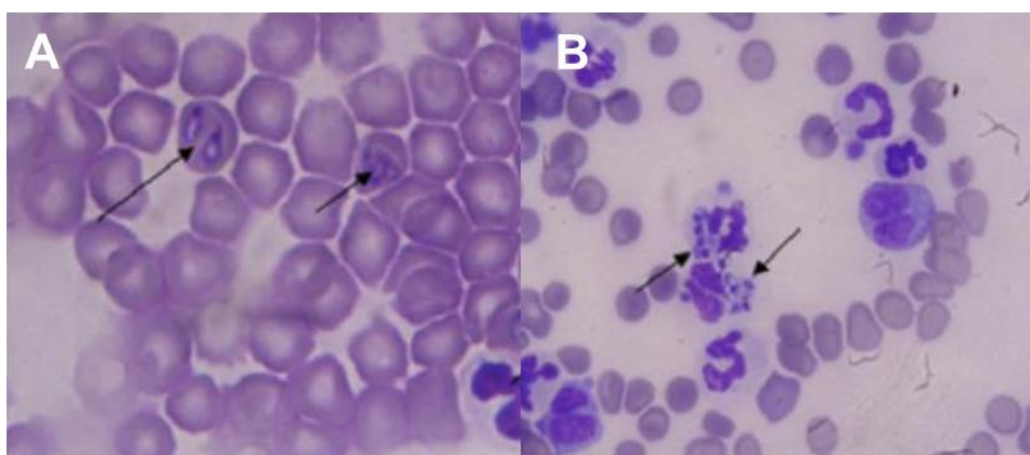


Figura 2 - Presença de inclusões de *Rangelia vitalii* em eritrócitos (setas) (A) e leucócitos (setas) (B)

Fonte: Adaptado de Da Silva et al., 2011.

O diagnóstico presuntivo de rangeliose é baseado no histórico clínico, sinais clínicos, hemograma, resposta favorável à terapia, observação de organismos em esfregaço de sangue periférico, exame histopatológico e diagnóstico molecular (KRAUSPENHAR et al., 2003; LORETTI; BARROS, 2005; FIGHERA et al., 2010; SOARES et al., 2011). Recentemente, foi realizada a primeira análise molecular desse protozoário (SOARES et al., 2011). Esse estudo foi baseado apenas em fragmentos dos genes do RNA ribossomal 18S (rRNA 18S) e da proteína de choque térmico 70 (hsp70), amplificados por PCR convencional (cPCR) a partir de amostras de sangue de cinco cães infectados com *R. vitalii* oriundos da região Sul do Brasil. A análise filogenética demonstrou uma estreita relação entre *R. vitalii* e o gênero *Babesia* (SOARES et al., 2011).

No diagnóstico diferencial de rangeliose devem ser incluídas doenças infecciosas e parasitárias que ocorrem em cães no Brasil que cursam com anemia, icterícia, febre, esplenomegalia, linfadenopatia e hemorragias (KRAUSPENHAR et al., 2003; LORETTI; BARROS, 2004). As enfermidades mais frequentemente confundidas com a rangeliose são a babesiose, ehrlichiose, leishmaniose, leptospirose e doenças que causam a perda de sangue através do tubo digestivo, como verminoses gastrintestinais e úlceras gástricas. A anemia hemolítica imunomediada, associada a diferentes etiologias e idiopática, também deve ser incluída no diagnóstico diferencial dessa enfermidade (LORETTI; BARROS, 2004). A sua forma intra-eritrocitária é semelhante morfológicamente a *Babesia spp.*. Além disso, a sua forma extraeritrocitária pode ser confundida com a *Leishmania spp.* (KRAUSPENHAR et al, 2003; LORETTI; BARROS, 2005; SOARES et al, 2011). Portanto, a fim de diagnosticar com precisão a rangeliose, são necessárias técnicas mais sensíveis e específicas, tais como métodos de diagnóstico molecular.

Os achados laboratoriais são característicos de anemia hemolítica extravascular imunomediada, sendo observada uma anemia macrocítica hipocrômica, com anisocitose, policromasia, corpúsculo de Howell-Jolly, reticulocitose e presença de precursores eritróides imaturos, além de esferocitose, plasma ictérico e bilirrubinúria. Ocasionalmente pode ocorrer anemia normocítica normocrômica (LORETTI; BARROS, 2005; FIGHERA et al., 2010). Não existe um padrão quanto ao leucograma, variando de leucopenia a leucocitose (observada na maioria dos casos) com desvio a esquerda regenerativo, linfocitose e monocitose (FRANÇA et al., 2010). Ainda, os cães infectados

podem apresentar trombocitopenia acentuada, devido à trombocitopenia autoimune ou coagulopatia de consumo desencadeada pela lesão endotelial, ocasionada pela replicação do parasito intracelular em vacúolos parasitóforos, promovendo a ruptura dos capilares sanguíneos ou pela formação de imunocomplexos que causam lesão endotelial (LORETTI; BARROS, 2004).

Um estudo realizado em cães submetidos à necropsia na região central do Estado do Rio Grande do Sul demonstrou que infecções por esse protozoário representam a principal causa de doença hemolítica (FIGHERA et al., 2010). Os achados de necropsia incluem mucosas pálidas ou ictericas, linfadenopatia, esplenomegalia e hemorragias em diferentes órgãos (LORETTI; BARROS, 2005). Na histologia, o parasita é observado em vacúolos parasitóforos intra-citoplasmáticos em células endoteliais de capilares sanguíneos de diferentes órgãos e tecidos (LORETTI; BARROS, 2004).

Os protocolos terapêuticos baseados em corticóides (prednisona), doxiciclina, dipropionato de imidocarb ou aceturato de diaminazeno costumam ser eficazes no tratamento dessa protozoose. Em alguns casos em que ocorre redução acentuada do hematócrito é aconselhável a transfusão sanguínea (LORETTI; BARROS et al., 2004; FRANÇA, et al., 2010).

A inflamação é uma resposta dos tecidos conjuntivos vascularizados às agressões de diversas naturezas (infecções microbianas, queimaduras, radiações, traumatismos mecânicos, toxinas, substâncias cáusticas, presença de tecido necrótico entre outros), visando destruir, diluir ou limitar a disseminação do agente agressor (LAMANO, 2008). Ainda, o processo inflamatório é caracterizado pela reação dos vasos sanguíneos, levando ao acúmulo de líquido e leucócitos nos tecidos extravasculares (COLLINS, 2000). É um mecanismo protetor vital, já que corresponde ao meio pelo qual as células fagocíticas e as moléculas de defesa, tais como os anticorpos e o complemento, ganham acesso aos locais de invasão microbiana ou de danos teciduais (TIZARD, 2008).

A inflamação é fundamentalmente uma resposta protetora cujo objetivo final é livrar o organismo da causa inicial da lesão celular (por exemplo, microorganismos e toxinas) e das consequências dessa lesão (células e tecidos necróticos). Ainda, a resposta inflamatória ocorre nos tecidos vascularizados, incluindo plasma, células circulantes, vasos sanguíneos e constituintes celulares e extracelulares do tecido conjuntivo (COLLINS, 2000).

Mediada por diferentes mecanismos, a resposta inflamatória pode ser dividida em duas fases distintas: a) fase aguda - evento transitório, de início rápido, com duração curta e caracterizada pela presença de exsudação de fluido e proteínas plasmáticas (edema) e a migração de leucócitos, predominantemente de neutrófilos; b) fase crônica - com duração maior e histologicamente associada com a presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, degeneração tissular e reparação fibrótica (LAWRENCE; GILROY,2007).

O processo inflamatório consiste basicamente de dois componentes principais: uma reação vascular e uma reação celular/ tecidual. A reação vascular caracteriza-se pelo aumento do suprimento sanguíneo para as áreas afetadas, além do aumento da permeabilidade capilar que permite que moléculas de grande peso molecular, tais como anticorpos, possam atravessar o endotélio. As modificações vasculares que permitem essas alterações acontecem principalmente nas arteríolas e nas vênulas. Nas arteríolas, o relaxamento da musculatura lisa promove a vasodilatação, permitindo assim um maior fluxo sanguíneo para a região lesionada. Nas vênulas, é a contração das fibras de actina e miosina presentes no endotélio que promovem espaço para a migração das células do sistema imune e das moléculas do leito vascular (Figura 3) (LAWRENCE; GILROY, 2007).

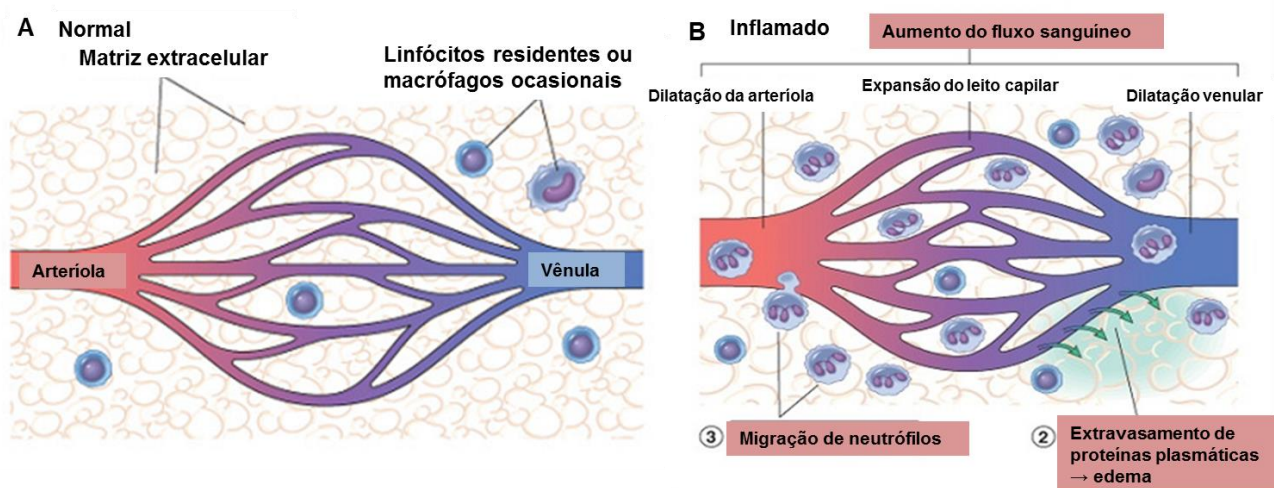


Figura 3 - Eventos vasculares da inflamação: tecido normal (A) e tecido inflamado (B).

Fonte: adaptado de Kumar et al., 2007.

O evento celular caracteriza-se pela migração de vários tipos celulares. As células circulantes incluem os neutrófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos, basófilos e plaquetas. As células do tecido conjuntivo constituem-se em mastócitos, fibroblastos, macrófagos locais e linfócitos. A matriz extracelular consiste de proteínas fibrosas estruturais (colágeno, elastina), glicoproteínas de adesão (fibronectina, laminina, colágeno não-fibrilar, tenascina e outras) e proteoglicanos (GRUYS et al., 2005).

As características fisiológicas do processo inflamatório são iniciadas e reguladas por substâncias denominadas mediadores inflamatórios. Os mediadores inflamatórios incluem proteases, constituintes do sistema complemento, sistema de cininas, sistema fibrinolítico e sistema de coagulação; mediadores liberados por fosfolípidos (prostaglandinas, leucotrienos e fator ativador de plaqueta); e outros mediadores como histamina, serotonina, substância P, neurocinina, fatores de transcrição, óxido nítrico (NO), proteína C reativa (PCR), mieloperoxidase (MPO) e citocinas (EISERICH et al., 2002; DUSSE et al., 2003; LAWRENCE; GILROY, 2007).

As citocinas são glicoproteínas que podem atuar como mediadoras intercelulares de muitos processos biológicos, como inflamação, fibrose, reparação, angiogênese, regulação da hematopoiese, controle da proliferação e diferenciação celular e ativação da resposta imune celular e humoral (FELDMANN, 2008; TIZARD, 2008). Possuem papel essencial na formação dos sinais locais ou sistêmicos da inflamação, sendo produzidas e liberadas por vários tipos de células em resposta a estímulos desencadeados por agentes infecciosos ou em resposta a outras citocinas (COTRAN, 2000; ROITT, 2003).

As citocinas apresentam as seguintes propriedades: são moléculas pleiotrópicas (podem atuar em diferentes tipos celulares), possuem efeitos redundantes (várias citocinas podem efetuar as mesmas ações) e podem influenciar na ação de outras citocinas de forma sinérgica ou antagônica. São liberadas principalmente por monócitos/macrófagos e linfócitos, mas também podem ser secretadas por células adiposas, células epiteliais, células endoteliais e células dendríticas (BENJAMINI et al., 2002; TIZARD, 2008; ABBAS et al., 2012).

As citocinas podem ser agrupadas em cinco classes, de acordo com sua função principal. As citocinas que regulam a função dos linfócitos, por exemplo, interleucina 2 (IL-2) e interleucina 15 (IL-15) que estimulam a proliferação de células natural killer (NK), linfócitos B e T. Já a interleucina 10 (IL-10) atua por mecanismo de feedback negativo,

inibindo os macrófagos ativados e a produção de citocinas pró-inflamatórias (JANEWAY et al, 2002). As citocinas envolvidas na resposta imune inata incluem as citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF), a interleucina 1 (IL-1) e a interleucina (IL-6). A IL-1 e TNF em conjunto com a IL-6 mediam os efeitos sistêmicos da inflamação, incluindo febre, perda de peso, liberação de neutrófilos na circulação e síntese de proteínas de fase aguda pelo fígado (Figura 4) (NAIRN, 2004). As citocinas que ativam células inflamatórias, por exemplo, IL-12 e IL-18 estimulam a produção de interferon-gama (IFN- γ), uma citocina ativadora de macrófagos. Essas células uma vez ativadas passam a produzir citocinas pró-inflamatórias (ABBAS et al., 2012). As quimiocinas atuam como ativadoras e quimioatraentes para tipos específicos de leucócitos. A interleucina 8 (IL-8), por exemplo, causa ativação e quimiotaxia de neutrófilo. A CCL2 (também conhecida como proteína quimiotática para monócitos/macrófagos 1 - MCP-1) está intrinsecamente associada à infiltração de macrófagos (LEVINSON; JAWETZ, 2005). A proteína induzida por interferon 10 (IP-10/CXCL10) também é uma citocina envolvida na quimiotaxia a monócitos/macrófagos. As citocinas que regulam a hematopoese, por exemplo, interleucina 7 (IL-7), secretada pelas células do estroma da medula óssea que estimula a expansão de precursores imaturos dos linfócitos T e B. O fator estimulador de colônia granulocítica monocítica (GM-CSF) é produzido por linfócitos T, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos do estroma que age na medula óssea para aumentar a produção de neutrófilos e monócitos. (ABBAS et al., 2012).

Inúmeras pesquisas sobre a resposta celular padrão Th1, caracterizada principalmente pela síntese de INF- γ e de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 e IL-6, já foram realizadas em diferentes hemoparasitoses. Na erliquiose, estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram aumento da síntese de INF- γ e TNF- α . Este aumento foi correlacionado à patogenicidade da cepa (TAJIMA; RIKIHISA, 2005). As citocinas pró-inflamatórias ativam as células endoteliais, induzindo a expressão de moléculas de adesão endotelial e mediadores químicos, como outras citocinas, fatores de crescimento, quimiocinas e óxido nítrico (COTRAN, 2000; GAO; PEREIRA, 2002; MAGEZ et al., 2007; PAIM et al., 2011).

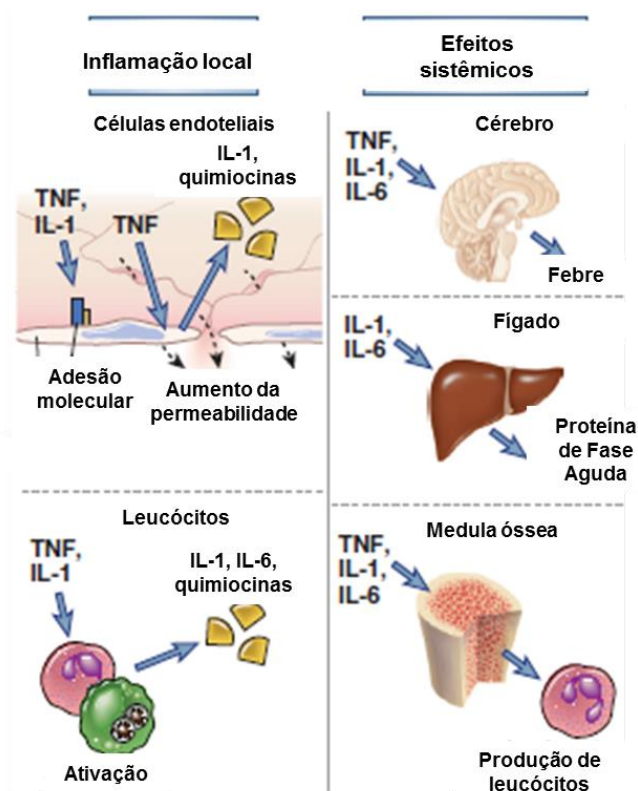


Figura 4 - Principais funções das citocinas pró-inflamatórias

Fonte: Adaptado de Abbas et al., 2012.

O óxido nítrico (NO) é uma espécie reativa de nitrogênio, sintetizada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) a partir do aminoácido L-arginina. Esta enzima catalisa a oxidação de uma molécula de L-arginina pelo oxigênio molecular obtendo como produto final L-citrulina e uma molécula de NO (Figura 5) (FILHO; ZILBERSTEIN, 2000).

Até meados da década de 80, o NO era considerado apenas membro de uma família de poluentes ambientais indesejáveis e de carcinogênicos potenciais. O NO constitui um dos mais importantes mediadores de processos intra e extracelulares (DUSSE et al., 2003). Pesquisas vêm demonstrando que o NO está envolvido no controle da pressão sanguínea, neurotransmissão, inibição das plaquetas e aderência de neutrófilos e na habilidade de matar células tumorais e microorganismos (FILHO; ZILBERSTEIN, 2000; DUSSE et al., 2003).

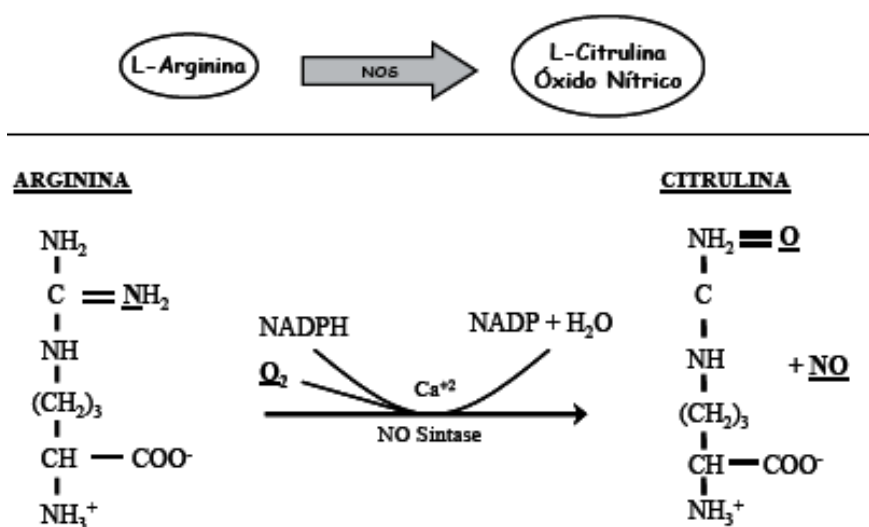


Figura 5 - Síntese de óxido nítrico a partir da L-arginina

Fonte: adaptado de Lehninger, 2002.

Existem três isoformas diferentes de NOS: sendo duas NOS constitutivas (c-NOS) e uma NOS induzível (i-NOS). As constitutivas são observadas nas células endoteliais (e-NOS) e nos neurônios (n-NOS), as quais são expressas em baixos níveis e podem ser ativadas rapidamente por um aumento dos íons cálcio citoplasmáticos na presença de calmodulina (COTRAN, 2000). A isoforma n-NOS está envolvida na regulação do fluxo sanguíneo cerebral, transmissão sináptica e no processo de memória. A e-NOS inibe a adesão e agregação plaquetária na parede vascular, regula a pressão sanguínea e a contratilidade do músculo cardíaco (DUSSE et al., 2003). A isoforma i-NOS não é dependente de cálcio e é produzida por macrófagos e outras células, quando ativadas por citocinas pró-inflamatórias, induzidas pelo estímulo imunológico ou inflamatório (FILHO; ZILBERSTEIN, 2000; DUSSE et al., 2003).

Uma vez induzida, a i-NOS é capaz de liberar grandes quantidades de NO por períodos de tempo relativamente longo, podendo gerar alguns efeitos exagerados, produzindo respostas tóxicas ao organismo. Assim, o alto nível de NO produzido por macrófagos, neutrófilos ou por outras células ativadas, que deveria ser tóxico apenas para os microorganismos ou células tumorais, pode lesar células vizinhas, sendo este mecanismo responsável pela maioria dos processos inflamatórios e autoimunes (FILHO; ZILBERSTEIN, 2000).

O NO resultante da ativação de i-NOS possui ação citotóxica e citostática, promovendo a destruição de microorganismos, parasitas e células tumorais. A citotoxicidade do NO pode ser por ação direta na inativação de enzimas do Ciclo de Krebs, para a síntese de cadeia de transporte de elétrons, para a síntese de DNA e para o mecanismo de proliferação celular (DUSSE et al., 2003). Dentro do fagolisosomo, o NO reage com o ânion superóxido (O_2^-), produzindo peroxinitrito ($ONOO^-$). O $ONOO^-$ é um radical altamente reativo que tem a capacidade de lesar o DNA e lipídios microbianos. O $ONOO^-$ promove peroxidação dos lipídios da membrana de agentes invasores, o que altera a permeabilidade das membranas celulares e leva à morte celular (COTRAN, 2000; ABBAS et al., 2012).

A determinação laboratorial de NO é complexa devido a sua meia-vida extremamente curta, cerca de 4 a 6 segundos no plasma e 10 a 60 segundos no tecido (DUSSE et al., 2003). Em função disso, a determinação indireta de NO pode ser feita através da quantificação de produtos de oxidação do NO, nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-), referida como NO_x (TASTCH et al., 2011).

As proteínas funcionam como catalisadores enzimáticos de reações bioquímicas, carreadores de constituintes do plasma e atuam na defesa do organismo na forma de anticorpos (ECKERSALL, 2008). São sintetizadas e secretadas pelos hepatócitos, exceto as imunoglobulinas, que são produzidas pelos linfócitos B. A proteína total é representada pelas frações albumina e globulinas (BUSH, 2004).

Várias são as formas de avaliar as concentrações de proteínas. Um método simples e barato é a eletroforese. A eletroforese de proteínas do soro sanguíneo é uma técnica de laboratório usada para separar proteínas séricas, permitindo a identificação e quantificação de frações de proteínas (ECKERSALL, 2008). Consiste na aplicação de uma pequena quantidade de soro na extremidade de uma fina placa de gel. Em seguida, aplica-se uma corrente elétrica nessa placa por determinado tempo. A corrente faz com que as proteínas do soro migrem pelo gel em taxas variáveis, em função da carga negativa e do tamanho da proteína. Em seguida, o gel é submetido à coloração por um corante que se adere à proteína (THRALL, 2007). Após a coloração, as frações apresentam-se na forma de bandas, com intensidade de cor variável, que podem ser escaneadas por um densitômetro para produzir um traçado eletroforético. O comprimento e a largura de cada seção da curva indica a quantidade relativa de uma proteína particular ou de um grupo de proteínas. Isto pode ser traduzido em uma leitura percentual e, combinando essa informação com a concentração de proteínas totais, os

valores absolutos da concentração de proteínas ou grupo de proteínas podem ser calculados (BUSH, 2004).

O número de frações obtidas na eletroforese varia conforme o tipo de técnica empregada e a espécie animal pesquisada. As frações quantificadas em caninos são: albumina, alfa (α)-1-globulina, alfa (α)-2-globulina, beta (β)-1-globulina, beta (β)-2-globulina, e gama (γ) globulina (ECKERSALL, 2008) (Figura 6). A separação e identificação dessas frações de proteínas facilita a compreensão de diferentes condições (ABATE et al., 2000).

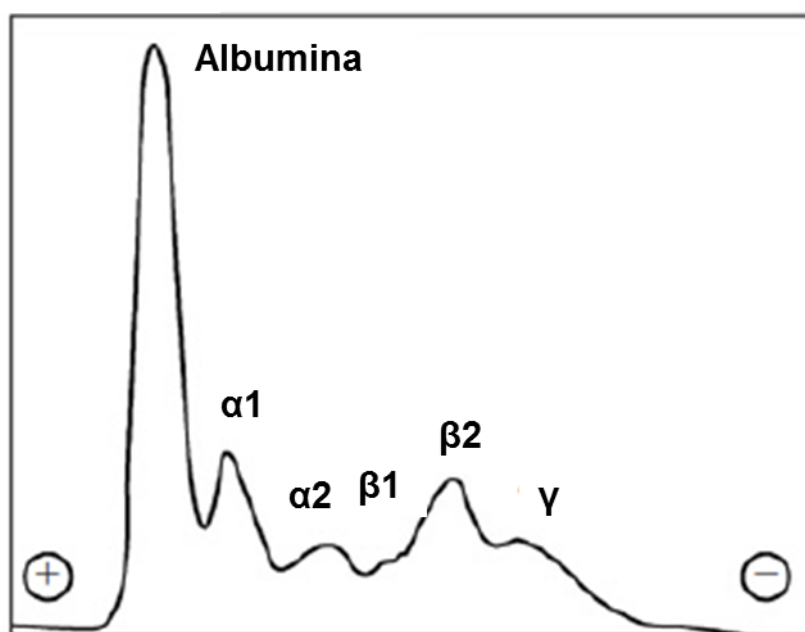


Figura 6 - Eletroforese normal de cão (albumina, alfa 1 globulina, alfa 2 globulina, beta 1 globulina, beta 2 globulina e gamaglobulina)

Fonte: adaptado de Eckersall, 2008.

A albumina é a principal proteína sérica, constituindo 35% a 50% da proteína total do soro (CÉRON et al., 2005). Essa proteína responde por cerca de 80% da pressão oncótica do sangue, que impede que a água passe do sangue para os tecidos. Além disso, a albumina é uma importante proteína transportadora, com participação no transporte de ácidos graxos livres, ácidos biliares, bilirrubina, cálcio, hormônios e

medicamentos (THRALL, 2007). A fração α -globulina aumenta imediatamente após a inflamação (STOCKHAM; SCOTT, 2008). Essa fração é composta por proteínas como α -1 glicoproteína ácida, α -2-macroglobulina, antitrombina III (inibidora da trombina), ceruloplasmina, haptoglobina, lipoproteína e transcortina. A fração β é composta pelas proteínas transferrina, ferritina, proteína C-reativa, lipoproteínas, fibrinogênio, soro amilóide A e complemento. Moléculas de imunoglobulinas dos tipos IgG e IgA podem migrar para a fração β -globulina durante o fracionamento eletroforético. A fração γ -globulina é composta por imunoglobulinas: IgM, IgG, IgA e IgE. (THRALL, 2007; ECKERSALL, 2008).

Outra característica do processo inflamatório é a produção de proteínas de fase aguda. As proteínas de fase aguda (PFA) são consideradas componentes da resposta imune inata. Essas proteínas estão envolvidas na restauração da homeostase e na restrição do crescimento microbiano antes de os animais desenvolverem imunidade adquirida. As concentrações circulantes de PFA estão relacionadas com a gravidade da desordem e extensão do dano tecidual no animal afetado e fornecem informações de diagnóstico e prognóstico de doenças, mas também de condições não inflamatórias como parto, prenhez, desordens metabólicas e estresse (MURATA et al., 2004). Perspectivas futuras da investigação das PFA em animais de companhia incluem a avaliação dos efeitos da resposta de fase aguda sobre a farmacocinética de medicamentos veterinários e a associação entre os níveis subclínicos de proteínas e doenças crônicas (ECKERSALL, 2000).

O aumento das PFAs ocorre precocemente quando comparado com a leucocitose, aumento da taxa de hemossedimentação e febre (JAIN, 1993). Entretanto, é considerada uma resposta extremamente inespecífica, pois desenvolve-se secundariamente a várias condições que produzem lesão tecidual (CERÓN et al., 2005). Esse grupo de proteínas do sangue pode ter sua concentração aumentada (PFA positivas), como proteína C-reativa, soro amilóide A, haptoglobina, alfa-1 glicoproteína ácida e ceruloplasmina; ou diminuída (PFA negativas), tais como albumina e transferrina. As proteínas de fase aguda positivas são glicoproteínas sintetizadas principalmente por hepatócitos após estimulação por citocinas pró-inflamatórias e são liberadas para a corrente sanguínea (MURATA et al., 2004; CÉRON et al., 2005).

A modulação da produção de PFA pelos hepatócitos depende da ação sinérgica de citocinas pró-inflamatórias (PETERSEN et al., 2004). O TNF- α induz a proteólise periférica, aumentando, assim, o fluxo de aminoácidos para o fígado para a produção de

novas proteínas. A IL-1 modula a síntese de proteínas no hepatócito, inibindo a síntese de PFA negativas e estimulando a síntese de PFA positivas em colaboração com os glicocorticóides, também produzidos como uma consequência da ativação da IL-1 no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Por fim, a IL-6 é responsável pela liberação dessas proteínas para a circulação sanguínea (PALTRINIERE, 2007).

As PFAs são os principais biomarcadores da inflamação e infecção em cães, dentre elas, destaca-se a proteína C-reativa (PCR) (ECKERSALL; BELL, 2010). Essa proteína é utilizada como marcador de resposta inflamatória em cães e sua elevação sérica precede qualquer alteração leucocitária, podendo aumentar de 100 a 1.000 vezes dentro de 24 a 48 horas (NAKAMURA et al., 2008). Além da PCR, a alfa-1-glicoproteína ácida (GPA) pode ser utilizada como um marcador alternativo de inflamação em caninos (YUKI et al., 2008).

A resposta imunológica contra agentes infecciosos é representada pela resposta celular e humoral, com grande produção de anticorpos. Os anticorpos ou imunoglobulinas são glicoproteínas produzidas por linfócitos B em resposta à estimulação antigênica e estão incluídas nas frações beta e gamaglobulinas (BUSH, 2004). Os anticorpos secretados realizam várias funções efetoras, como neutralização de antígenos, ativação de complemento, fagocitose e destruição de microorganismos (ABBAS et al., 2012).

A estrutura central dos anticorpos consiste em duas cadeias pesadas e duas cadeias leves, formando um complexo ligado por pontes dissulfeto. Cada cadeia consiste em uma região variável (V), que é a porção que reconhece o antígeno, uma região constante (C), que promove estabilidade estrutural e, em cadeias pesadas, que realizam as funções efetoras dos anticorpos (ABBAS et al., 2012).

As imunoglobulinas são classificadas em diferentes isotipos e subtipos de acordo com suas diferenças nas regiões C da cadeia pesada (ABBAS et al., 2012). Os cães possuem quatro subclasses de IgG1 denominadas IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, em ordem de abundância, além de IgA, IgM e IgE. Além disso, os cães são os únicos a possuírem duas subclasses de IgE: IgE1 e IgE2 (TIZARD, 2008). Cada isotipo difere nas suas propriedades físicas e biológicas e em suas funções efetoras (ABBAS et al., 2012).

O principal isotipo de imunoglobulina no sangue e nos fluidos extracelulares é a IgG, que exerce papel principal nos mecanismos de defesa mediado por anticorpos (TIZARD, 2008). A IgG também atua na neutralização de toxinas, imobilização de bactérias, sensibilização para células natural killer (NK), ativação do complemento e

opsonização. A IgM é a principal classe de Ig produzida durante uma resposta imune primária, é capaz de ativar o complemento de maneira mais eficaz, o que contribui para o controle mais eficiente de uma infecção (MOLINARO et al., 2009). A IgA é a principal Ig presente em secreções externas, tendo como função principal impedir a aderência de antígenos a superfícies corpóreas. Por fim, a classe de IgE liga-se a receptores nos mastócitos e basófilos, promovendo reação inflamatórias, através da liberação de mediadores químicos como histamina e fatores quimioatraentes. Além disso, podem estar envolvidas em processos alérgicos e na eliminação de helmintos, quando sensibilizam eosinófilos (TIZARD, 2008).

A patogênese da infecção no que se refere ao processo inflamatório e à resposta imunológica do hospedeiro na rangeliose ainda não está esclarecida. Acredita-se que a estimulação antigênica causada pelo protozoário *R. vitalii* altere a concentração de citocinas séricas, dos metabólitos do óxido nítrico, das proteínas séricas e estimule a síntese de proteínas de fase aguda e imunoglobulinas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar os parâmetros imunológicos envolvidos na infecção experimental por *Rangelia vitalii* em cães.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 ARTIGO 1:

2.2.2 – Mensurar os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α , IL-1 e IL-6).

2.2.3 - Determinar os produtos de degradação do óxido nítrico (nitrito - NO_2^- e nitrato - NO_3^-).

2.2.4 ARTIGO 2:

2.2.5 - Realizar a eletroforese das proteínas séricas.

2.2.6 - Determinar os níveis séricos de proteínas de fase aguda (proteína C-reativa e alfa-1-glicoproteína ácida).

2.2.7 - Avaliar os níveis séricos de imunoglobulinas (IgG, IgM, IgA e IgE).

3 ARTIGOS

Os resultados desta tese estão sob a forma de dois artigos científicos. Os itens materiais e métodos, resultados, discussão e referências bibliográficas encontram-se nos artigos científicos.

3.1 Artigo 1:

Increased cytokine and nitric oxide levels in serum of dogs experimentally infected
with *Rangelia vitalii*

Francine C. Paim^a, Aleksandro S. Da Silva^b, Carlos Breno V. Paim^a, Raqueli T. França^a, Márcio M. Costa^a, Marta M. M. F. Duarte^c, Manuela B. Sangoi^d, Rafael N. Moresco^d, Silvia G. Monteiro^b, Sonia Terezinha A. Lopes^a

(*Brief Communication* publicado no periódico **The Korean Journal of Parasitology**, v. 51, n. 1, p. 133-137, Feb. 2013)

^aLaboratory of Veterinary Clinical Analysis - LACVet, Federal University of Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^bDepartment of Microbiology and Parasitology - LAPAVET, Federal University of Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^cLutheran University of Brazil - ULBRA, BR 287, Km 252, Boca do Monte, Cx. Postal 21834, 97020-001 Santa Maria, RS, Brazil

^dDepartment of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

*Correspondence to: Francine C. Paim

Address: Laboratory of Veterinary Clinical Analysis - LACVet, Federal University of Santa Maria, Department of Small Animal Clinical Sciences, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

Phone number: +55-55-3220-8814. E-mail:franchimelo@gmail.com

Abstract

This study aimed to measure the levels of interferon-gamma (IFN- γ), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin 1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6) and nitrite/nitrate (NO_x) in serum of dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. Twelve female mongrel dogs were divided into 2 groups; group A (uninfected controls) composed by healthy dogs (n=5) and group B consisting of dogs inoculated with *R. vitalii* (n=7). Animals were monitored by blood smear examinations, which showed intraerythrocytic forms of the parasite on day 5 post-inoculation (PI). Blood samples were collected through the jugular vein at the days 0, 10 and 20 PI to determine the serum levels of IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-6 and NO_x. Cytokines were assessed by ELISA quantitative sandwich technique, and NO_x was measured by the modified Griess method. Cytokine levels (IFN- γ , TNF- α , IL-1 and IL-6) were increased ($P < 0.01$) in serum of infected animals. Serum levels of NO_x were also increased on days 10 PI ($P < 0.01$) and 20 PI ($P < 0.05$) in infected animals. Therefore, the infection with *R. vitalii* causes an increase in proinflammatory cytokines and nitric oxide content. These alterations may be associated with host immune protection against the parasite.

Key words: *Rangelia vitalii*, IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-6, nitric oxide, immunity, rangelirosis.

Canine rangelirosis is a tick-borne protozoan disease caused by *Rangelia vitalii* that primarily affects rural and periurban young dogs in southern Brazil [1,2]. Infection with *R. vitalii* causes severe anemia, jaundice, fever, splenomegaly, lymphadenopathy, hemorrhage along the gastrointestinal tract, and persistent bleeding through the tips of the pinnae, external surface of the ears, nose, and oral cavity [3-6]. The influence of this disease on immune system parameters of infected animals is unknown.

Cytokines represent the major molecules involved in the communication among T-cells, macrophages, and other immune cells in the course of an immune response to infectious agents [7]. IFN- γ is the cytokine responsible for the function of CD4⁺ Th1 cells, which is the activation of macrophages to kill intracellular microorganisms and synthesize other proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-1, and IL-6) and nitric oxide (NO) [8].

NO is an important cytotoxic mediator on immune activated cells, capable to kill pathogenic agents [9]. This reactive nitrogen species is synthesized by the isoenzymes nitric oxide synthases (NOS), which include inducible NOS (iNOS), endothelial NOS (eNOS), and neuronal NOS (nNOS) that catalyze the oxidation of L-arginine and molecular oxygen to citrulline and NO [10]. The iNOS is highly expressed in macrophages when activated by proinflammatory cytokines [11]. The half-life of NO is very short, and its indirect determination can be made by measurements of its oxidation products, nitrite (NO_2^-) and nitrate (NO_3^-), referred to as NO_x [12].

Numerous studies on the immune response of Th1 cells, characterized by the synthesis of proinflammatory cytokines and iNOS, have been performed in different hemoparasites [13-15]. However, the mechanism of host immune responses has not been explained in *R. vitalii* infection. Therefore, the aim of this study was to measure the levels of IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-6, and NO_x in serum of dogs experimentally infected with *R. vitalii*.

Twelve female mongrel dogs (6- to 12-months old) were used in this study as previously described [16]. The animals, previously determined by molecular tests to be free from *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp., and *Ehrlichia* spp. infection [16], were inoculated with *R. vitalii* (n=7) or served as uninfected controls (n=5). The *R. vitalii* strain used in this study was obtained from a naturally infected dog [17]. A fresh blood sample of this animal was inoculated (2 mL through the jugular vein) in another dog (Dog 13: male, 5-months old) for maintenance of the isolate in the laboratory. Each animal of Group B was infected through intravenous inoculation with 2 ml of fresh blood collected from Dog 13, containing an average of 6 parasites per slide, which were found inside of erythrocytes and leukocytes of blood smears [16].

The presence and degree of parasitemia were estimated for each animal every 2 days throughout the experiment. Peripheral blood smears were collected from the tip of the ear of each dog. The smears were Romanovsky stained and then examined under a microscope ($\times 1,000$ magnification), as previously described [16]. Blood collection of the jugular vein (3 ml) was performed on days 0, 10, and 20 post-infection (PI). The blood was placed in tubes without anticoagulant, centrifuged for 10 min to obtain serum and stored under freezing ($- 20^\circ\text{C}$). The serum was used for determination of proinflammatory cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-1, and IL-6) and NO_x .

The proinflammatory cytokines were quantified by ELISA, using the commercial Quantikine canine immunoassay kits (IFN- γ , TNF- α , IL-1, and IL-6), according to manufacturer's instructions (R & D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA). Briefly, 96-well microplates were sensitized with the primary antibodies at room temperature (RT) for 30 min; the sample was added and incubated for 30 min at 37°C. After washing, the secondary antibody conjugated with peroxidase was added to each well, and a period of incubation followed. The presence and concentration of the cytokines were determined by the intensity of color measured by spectrometry by a micro-ELISA reader, Sunrine-Tecan (Tecan, Sunrise, Melbourne, Australia).

Nitric oxide levels in serum of dogs infected with *R. vitalii* were analyzed indirectly, by the quantification of nitrite/nitrate (NO_x) according to the technique described in detail by Tatsch et al. [12]. Therefore, NO_x was measured by the modified Griess method using the Cobas Mira automated analyzer (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Results were expressed in $\mu\text{mol/L}$. The data were evaluated by the Student's t-test. Values with probability less than 5% were considered statistically different.

On day 5 PI, there were blood smears positive to *R. vitalii*. Parasitemia increased progressively until day 10 PI when a peak was observed. Then, the number of parasites was significantly reduced as described in detail by Da Silva et al. [16], and the parasite was found within erythrocytes, leukocytes, and the extracellular milieu. During the experimental period, clinical signs such as anorexia, apathy, weight loss, fever, anemia, and diarrhea were observed in dogs infected with *R. vitalii* [16]. The infected dogs showed no bleeding (a common finding in rangelirosis) despite severe thrombocytopenia, reduction of platelet activity, and alteration in the concentrations of nucleotides and nucleosides present in platelets, participants in the process of homeostasis [18,19]. The infection by *R. vitalii* caused in these dogs reduction in serum levels of iron, zinc, and copper [20], as well as oxidative stress with increased lipid peroxidation, protein oxidation and, consequently, increase of antioxidant status to reduce cellular injury [21].

In this study, cytokine levels increased ($P<0.01$) in infected animals compared to the control group (Fig. 1). A progressive increase in serum levels of IFN- γ (Fig. 1A), TNF- α (Fig. 1B), IL-1 (Fig. 1C), and IL-6 (Fig. 1D) was observed. An increase of nitrite/nitrate (NO_x) in serum of infected animals was observed on day 10 PI ($P<0.01$) and 20 PI ($P<0.05$) (Fig. 2).

This study is the first to demonstrate the increased serum levels of IFN- γ , TNF- α , IL-1, and IL-6 in dogs experimentally infected with *R. vitalii*. The increase of these proinflammatory cytokines can be attributed to activation of the immune response and parasitemia control, as related in other infections caused by hemoparasites, as babesiosis (22), ehrlichiosis [15], anaplasmosis [23], leishmaniasis [24], hepatozoonosis [14], and trypanosomosis [25].

On day 10 PI occurred the peak of parasitemia, when the levels of cytokines and NO increased significantly compared to the control group; thus this increase in the inflammatory mediators were able to reduce parasitemia of day 15 PI [16]. Serum levels of cytokines and NO increased during the course of infection, as detected on day 20 PI. Probably the high levels of inflammatory mediators on day 20 PI was the cause of low parasitemia observed during this period. According to the literature, these immunological parameters are responsible for controlling parasitemia in infections by other hemoparasites [14,15,22,24,25]. In trypanosomosis by *T. cruzi*, researchers concluded that NO may be directly related to parasitemia, severity of lesions, chronicity, and mortality of mice infected [26,27]. In vitro studies showed that NO has the ability to kill parasites like *Plasmodium* [28] and *T. cruzi* [26]. Therefore, this study suggests that both cytokines and NO are responsible for reduction and maintenance of low parasitemia in dogs infected with *R. vitalii*, as detailed below.

One early reaction of the host to infection with protozoan parasites is the secretion of an array of potent cytokines, including TNF, IL-1, and IL-6. These early responses contribute significantly to the outcome of infection by influencing its course directly and by regulating the specific immune responses against the parasite [29]. The overproduction of proinflammatory cytokines observed in this study contributes not only to control the infection, but also for the disease progress, similarly to which occurs in babesiosis [30]. The increased serum levels of proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-1, and IL-6) could be associated with the onset of clinical signs in the acute phase of inflammatory responses (anorexia, apathy, weight loss, and fever) [8], as observed in this study.

This study found that the increase of proinflammatory cytokines coincides with the reduction of parasites in the bloodstream. A high expression of TNF- α was found in dogs experimentally infected with *Ehrlichia canis* [31]. Furthermore, TNF- α also played a role in controlling bacterial number because TNF- α receptor-knockout mice were highly susceptible in this infection [32]. Researchers reported an association between low parasite and increased IFN- γ and TNF- α expression in dogs naturally infected with

Leishmania chagasi, indicating that these cytokines play a role in protection against infection [24]. Serum levels of TNF- α and IFN- γ increased in anaplasmosis, indicating a role of cellular immunity activation during the infection [33]. Enhanced levels of IL-1, IL-6, and TNF- α in bovine babesiosis are important for stimulating immunity against protozoan pathogens [22].

High levels of NO are mediated by upregulated expression of the iNOS gene in response to the activating signals, in particular to the secretion of proinflammatory cytokines by Th1 cells [34]. Accumulating evidence indicates that parasitic diseases are commonly associated with elevated production of NO [35]. Production of proinflammatory cytokines predisposes to the increased synthesis of NO, which mediates host protection through either direct parasite killing or by limiting parasite growth [34]. The half-life of NO is very short. Because of this, the measurement of the circulatory stable end products of NO, i.e., nitrite/nitrate (NO_x), are most often used to evaluate the NO production [12].

In this study, it was observed that an increased level of NO_x which can be related to the induction of immune responses as demonstrated in *Babesia bovis* infection, in which increased NO production reflected a complex host-parasite interaction [36]. Furthermore, researchers have demonstrated that IFN- γ is responsible by the synthesis of NO by monocytes/macrophages, which show a high babesicidal activity [37]. In dogs infected by *Hepatozoon canis*, it was demonstrated that an increased production of NO enhances the host's defense against parasitic infections and helps to eliminate it [14]. In addition, protective responses were reported through high concentrations of nitrate in equids infected with *Theileria equi* and *Babesia caballi* [38]. Increased levels of NO and IL-6 were shown in cattle with anaplasmosis and may indicate the stimulation of the host immune system [23]. However, the determination of reactive nitrogen intermediates (RNI) is unlikely to be useful indicators of severity or outcome in dogs infected with *Babesia canis* [13].

We conclude that infection with *R. vitalii* causes an increase in proinflammatory cytokines and NO metabolites. This alteration may be associated with the host immune protection against the piroplasms, similar to what occurs in other hemoparasite infections.

Acknowledgment

This study was approved by the Ethics and Animal Welfare Committee of the Federal University of Santa Maria (UFSM), Brazil, protocol number 15/2010.

References

1. Loretto AP, Barros SS. Parasitism by *Rangelia vitalii* in dogs ("nambiuuvú", "peste de sangue") - a critical review on the subject. *Arq Inst Biol* 2004; 71: 101-131.
2. França RT, Silva AS, Paim FC, Costa MM, Soares JF, Mazzanti CM, Lopes STA. *Rangelia vitalii* in dogs in southern Brazil. *Comp Clin Pathol* 2010; 19: 383-387.
3. Pestana BR. The Nambyuvú (Preliminar Note). *Rev Soc Cient São Paulo* 1910; 5: 14-17.
4. Krauspenhar C, Figuera RA, Graça DL. Protozoan-associated hemolytic disease in dogs. *Medvet - Rev Cien Med Vet Peq An Estim* 2003; 1: 273-281.
5. Loretto AP, Barros SS. Hemorrhagic disease in dogs infected with an unclassified intraendothelial piroplasm in southern Brazil. *Vet Parasitol* 2005; 134: 193-213.
6. Figuera RA, Souza TM, Kommers GG, Irogoyen LF, Barros CSC. Pathogenesis, clinical, hematological, and pathological aspects of *Rangelia vitalii* infection in 35 dogs (1985-2009). *Pesq Vet Bras* 2010; 30: 974-987.
7. Belardelli F. Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 1995; 103: 161-179.
8. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. 7 ed. Philadelphia, USA. Saunders/Elsevier. 2012, p 527.
9. Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho MD. Review on nitric oxide. *J Bras Patol Med Lab* 2003; 39: 343-349.
10. Filho RF, Zilberstein B. Nitric oxide: a simple messenger passing through the complexity. Metabolism, synthesis and functions. *Rev Assoc Med Bras* 2000; 46: 265-271.
11. Guzik TJ, Korbut R, Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol* 2003; 54: 469-487.
12. Tatsch E, Bochi GV, Pereira RD, Kober H, Agertt VA, De Campo MMA, Gomes P, Duarte MMMF, Moresco RN. A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate. *Clin Biochem* 2011; 44: 348-350.
13. Jacobson LS, Lobetti RG, Becker P, Reyers F, Vaughan-Scott T. Nitric oxide metabolites in naturally occurring canine babesiosis. *Vet Parasitol* 2002; 104: 27-41.

14. Kiral F, Karagenc T, Pasa S, Yenisey C, Seyrek K. Dogs with *Hepatozoon canis* respond to the oxidative stress by increased production of glutathione and nitric oxide. *Vet Parasitol* 2005; 131: 15-21.
15. Tajima T, Rikihisa Y. Cytokine responses in dogs infected with *Ehrlichia canis* Oklahoma strain. *Ann NY Acad Sci* 2005; 1063: 429-432.
16. Da Silva AS, França RT, Costa MM, Paim CB, Paim FC, Dornelles GL, Soares JF, Labruna MB, Mazzanti CM, Monteiro SG, Lopes STA. Experimental infection with *Rangelia vitalii* in dogs: acute phase, parasitemia, biological cycle, clinical-pathological aspects and treatment. *Exp Parasitol* 2011; 128: 347-352.
17. Soares JF, Giroto A, Brandão PE, França RT, Da Silva AS, Lopes STA, Labruna MB. Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. *Vet Parasitol* 2011; 180: 203-208.
18. Paim CB, Paim FC, Da Silva AS, Franca RT, Costa MM, Leal CA, Soares JF, Labruna MB, Schetinger MR, Mazzanti A, Mazzanti CM, Monteiro SG, Lopes ST. Thrombocytopenia and platelet activity in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. *Vet Parasitol* 2012; 185: 131-137.
19. Paim CB, Da Silva AS, Paim FC, Franca RT, Costa MM, Souza VC, Pimentel VC, Jaques JA, Mazzanti CM, Leal DB, Monteiro SG, Schetinger MR, Lopes ST. Activities of ectonucleotidases and adenosine deaminase in platelets of dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. *Exp Parasitol* 2012; 131: 252-257.
20. Da Silva A, Franca R, Costa M, Paim C, Paim F, Santos C, Flores E, Eilers T, Mazzanti C, Monteiro S, Amaral C, Lopes S. Influence of *Rangelia vitalii* (Apicomplexa: Piroplasmorida) on copper, iron and zinc bloodstream levels in experimentally infected dogs. *J Parasitol* 2012; DOI: 10.1645/GE-2985.1.
21. França RT, Da Silva AS, Costa MM, Paim FC, Paim CB, Thome GR, Wolkmer P, Pereira ME, Schetinger MR, Moresco RN, Mazzanti CM, Monteiro SG, Lopes ST. Relationship between oxidative stress and clinical-pathological aspects in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. *Res Vet Sci* 2012; DOI:10.1016/j.rvsc.2012.02.001.
22. Shoda LKM, Palmer GH, Florin-Christensen J, Florin-Christensen M, Godson DL, Brown WC. *Babesia bovis*-stimulated macrophages express interleukin-1 β , interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide and inhibit parasite replication *in vitro*. *Infect Imm* 2000; 68: 5139-5145.

23. Ergonul S, Askar TK. The investigation of heat shock protein (HSP 27), malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO) and interleukin (IL-6, IL-10) levels in cattle with anaplasmosis. *Vet Sci* 2009; 15: 575-579.

24. Alves CF, De Amorim IFG, Moura EP, Ribeiro RR, Alves CF, Michalick MS, Kalapothakis E, Bruna-Romero O, Tafuri WL, Teixeira MM, Melo MN. Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol* 2009; 128: 349-358.

25. Paim FC, Duarte M, Wolkmer P, Da Silva AS, Monteiro SG, Mazzantti CM, Lopes STA. Cytokines in rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. *Exp Parasitol* 2011; 128: 365-370.

26. Vespa GNR, Cunha FQ, Silva JS. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite *in vitro*. *Infect Imm* 1994; 62: 5177-5182.

27. Naviliat M, Gualco G, Cayota A, Radi R. Protein 3-nitrotyrosine formation during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Braz J Med Biol Res* 2005; 18: 1825-1834.

28. Boutlis CS, Weinberg JB, Baker J, Bockarie MJ, Mgone CS, Cheng Q, Anstey NM. Nitric oxide production and nitric oxide synthase activity in malaria-exposed Papua New Guinean children and adults show longitudinal stability and no association with parasitemia. *Infect Imm* 2004; 72: 6932-6938.

29. Titus RG, Sherry B, Cerami A. The involvement of TNF, IL-1 and IL-6 in the immune response to protozoan parasites. *Trends Immunol* 1991; 12: A13-A16.

30. Ahmed JS. The role of cytokines in immunity and immunopathogenesis of piroplasmoses. *Parasitol Res* 2002; 88: S48-S50.

31. Faria JLM, Munhoz TD, João CF, Vargas-Hernández G, André MR, Pereira WAB, Machado RZ, Tinucci-Costa M. *Ehrlichia canis* (Jaboticabal strain) induces the expression of TNF- α in leukocytes and splenocytes of experimentally infected dogs. *Rev Bras Parasitol Vet* 2011; 20: 71-74.

32. Bitsaktis C, Huntington J, Winslow G. Production of IFN- γ by CD4 T cells is essential for resolving *Ehrlichia* infection. *J Immunol* 2004; 172: 6894-6901.

33. Nazifi S, Razavi SM, Kaviani F, Rakhshandehroo E. Acute phase response in cattle infected with *Anaplasma marginale*. *Vet Microbiol* 2011; 155: 267-271.

34. Wandurska-Nowak E. The role of nitric oxide (NO) in parasitic infections. *Wiad Parazytol* 2004; 50: 665-678.

35. Nahrevanian H. Involvement of nitric oxide and its up/down stream molecules in the immunity against parasitic infections. *Braz J Infect Dis* 2009; 13: 440-448.
36. Stich RW, Shoda LKM, Dreewes M, Adler B, Jungi TW, Brown WC. Stimulation of nitric oxide production in macrophages by *Babesia bovis*. *Infect Imm* 1998; 66: 4130-4136.
37. Brown WC, Norimine J, Knowles DP, Goff WL. Immune control of *Babesia bovis* infection. *Vet Parasitol* 2006; 138: 75-87.
38. Deger S, Deger Y, Bicek K, Ozdal N, Abdurrahman G. Status of lipid peroxidation, antioxidants, and oxidation products of nitric oxide in equine babesiosis: status of antioxidant and oxidant in equine babesiosis. *J Eq Vet Sci* 2009; 29: 743-747, 2009.

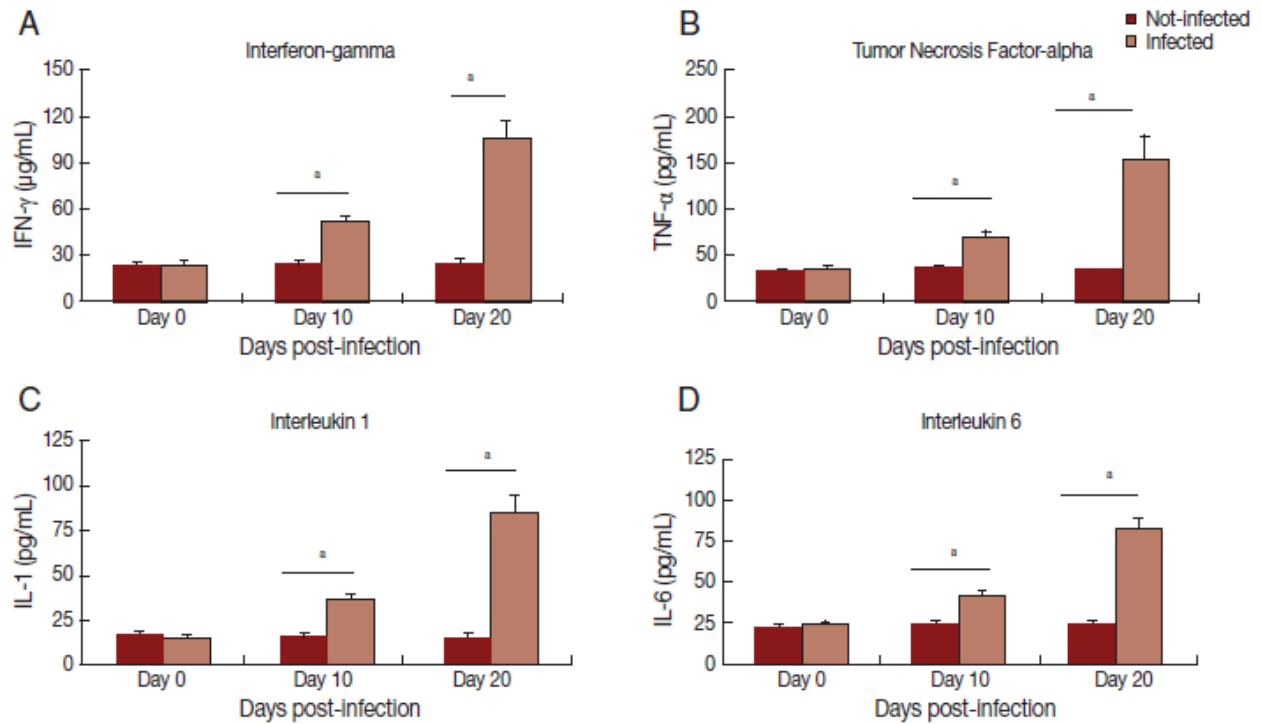


Fig. 1. Levels of proinflammatory cytokines in serum of *Rangelia vitalii*-infected dogs on days 0, 10, and 20 post-infection compared with uninfected controls. (A) IFN- γ , (B) TNF- α , (C) IL-1, (D) IL-6. ^aRepresents statistical difference between infected and control group ($P < 0.001$).

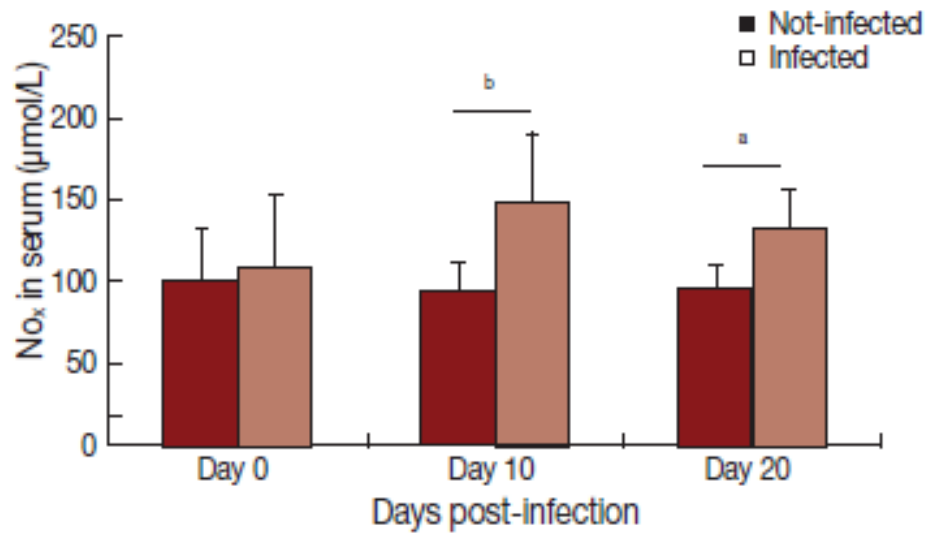


Fig. 2. Levels of nitrite/nitrate (NO_x) in serum of *Rangelia vitalii*-infected dogs on days 0, 10, and 20 post-infection compared with uninfected controls (^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$).

3.2 Artigo 2

Serum proteinogram, acute phase proteins and immunoglobulins in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*

Francine C. Paim^a, Aleksandro S. Da Silva^b, Carlos Breno V. Paim^a, Raqueli T. França^a, Márcio M. Costa^a, Marta M. M. F. Duarte^c, Cássia Bagolin Da Silva^a, Cinthia M. A. Mazzanti^a, Silvia G. Monteiro^b, Sonia Terezinha A. Lopes^a

(Artigo publicado no periódico ***Veterinary Parasitology***, v. 192, p. 137-142, Feb. 2013)

^aLaboratory of Veterinary Clinical Analysis - LACVet, Federal University of Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^bDepartment of Microbiology and Parasitology - LAPAVET, Federal University of Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^cLutheran University of Brazil - ULBRA, BR 287, Km 252, Boca do Monte, Cx. Postal 21834, 97020-001 Santa Maria, RS, Brazil

*Correspondence to: Francine C. Paim

Address: Laboratory of Veterinary Clinical Analysis - LACVet, Federal University of Santa Maria, Department of Small Animal Clinical Sciences, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

Phone number: +55-55-3220-8814

E-mail: franchimelo@gmail.com

Abstract

The present study aimed to evaluate the serum proteinogram, acute phase proteins (APPs) and immunoglobulins (Igs) of dogs experimentally infected by *Rangelia vitalii* in the acute phases of the disease. Banked serum samples collected on days 0, 10 and 20 during a previously reported *R. vitalii* experimental infection were used to analyze the serum proteinogram, APPs (C-reactive protein – CRP and alpha-1-acid glycoprotein – AGP) and Igs (IgM, IgG, IgA and IgE) in the current study. Total protein and albumin level were significantly ($P < 0.05$) decreased at day 10 PI and 20 PI in infected sera compared to the control sera. Alpha-1 globulin (day 10 PI) and gamma globulin (day 20 PI) were increased ($P < 0.01$) in infected sera. Alpha-2 globulin (days 10 and 20 PI) and beta-2 globulin (day 10 PI) were decreased ($P < 0.05$) in infected sera compared to control sera. Beta-1 globulin fraction did not differ statistically between sera. Serum CRP and AGP concentrations were significantly increased ($P < 0.05$) at days 10 and 20 PI in infected sera. IgG was increased at days 10 ($P < 0.05$) and 20 PI ($P < 0.01$) in infected sera. Furthermore, it was also observed an increase ($P < 0.01$) in the levels of IgM, IgA, and IgE in infected sera than control sera. We conclude that *R. vitalii* infection causes alterations in the proteinogram, and increases in the levels of APPs and Igs. Further studies are essentials to define the causes of these pathological changes in this disease.

Keywords: Electrophoresis, C-reactive protein, Alpha-1-acid glycoprotein, Rangeliosis.

1. Introduction

Rangelia vitalii is the etiological agent of “nambiuuvú” (=blood dribbling down from the ears’ margins) or “peste de sangue” (bleeding plague) (Loretti and Barros, 2004). This protozoan was described originally in 1910 as a distinct piroplasm capable of infecting dogs in southern Brazil (Pestana, 1910; Loretti and Barros, 2005; França et al., 2010). Recently, a phylogenetic analysis showed a close relationship between *R. vitalii* and the genus *Babesia* (Soares et al., 2011).

Rangeliosis is characterized mainly by anemia, jaundice and splenomegaly (Krauspenhar et al., 2003; Loretti and Barros, 2005; Figuera et al., 2010). The diagnosis

is based on clinical history, clinical signs, hemogram, favorable response to therapy (Loretti and Barros, 2004), observation of parasites in peripheral blood smear (França et al., 2010), post-mortem histopathology (Figuera et al., 2010) and molecular diagnosis (Soares et al., 2011).

In veterinary medicine, serum protein electrophoresis has been increasingly used as an aid in the diagnosis of canine diseases such as ehrlichiosis (Harrus et al., 1999; Abate et al., 2000). Serum protein electrophoresis (SPE) is a laboratory technique used to separate serum proteins, allowing the identification and quantification of protein fractions (Kaneco, 1997). The fractions quantified in canines are: albumin, alpha (α)-1-globulin, alpha(α)-2-globulin, beta(β)-1-globulin, beta(β)-2-globulin and gamma(γ) globulin (Kaneco, 1997). The separation and identification of different protein fractions facilitates the understanding of the pathological changes associated with different conditions (Abate et al., 2000).

Proteins function as enzymatic catalysts in biochemical reactions, carriers of plasma constituents and as antibodies. Albumin is the major single protein found in serum and constitutes 35–50% of the total serum protein. Most serum proteins are synthesized and secreted from hepatocytes, except immunoglobulins that are produced by B-lymphocytes (Kaneco, 1997). Immunoglobulins (Igs) are glycoproteins that function as antibodies; therefore are produced as a response to the detection of foreign molecules in our body. These foreign substances that trigger the production of antibodies are called antigens. There are different types of Igs: IgG, IgM, IgA, IgD and IgE, which play different roles in pathological conditions (Pier et al., 2004).

Acute phase proteins (APPs) are a group of blood proteins that their concentration can increase (positive APPs) such as C-reactive protein (CRP), serum amyloid A, haptoglobin, alpha-1-acid glycoprotein (AGP) and ceruloplasmin; and decrease (negative APPs) such as albumin or transferrin. Positive APPs are glycoproteins synthesized mainly by hepatocytes upon stimulation by proinflammatory cytokines and released into the bloodstream (Murata et al., 2004; Céron et al., 2005). APPs have been used as biomarkers of inflammation, infection and trauma (Eckersall and Bell, 2010). In dogs, CRP is the most important positive APP. Furthermore, the serum AGP concentration may be an alternative clinical marker for inflammation in canine (Yuki et al., 2008). However, there is no information about the diagnostic or prognostic value of APPs in dogs infected with *R. vitalii*.

Rangeliosis is a poorly studied disease, probably because it is regional, which occurrence is only described in Brazil. The influence of this disease on parameters of the immune system of infected animals is unknown. Thus, the present study aimed to evaluate the serum proteinogram, APPs and Igs of dogs experimentally infected by *R. vitalii* in the acute phases of the disease.

2. Material and Methods

2.1. Serum samples

Banked serum samples from a previous study (Da Silva et al., 2011) were used in the current study. The canine serum samples used in this study were collected on days 0, 10 and 20 during a previously reported *R. vitalii* experimental infection and stored frozen at -20°C (Da Silva et al., 2011). The stored sera from seven infected dogs and five matched normal controls were used to evaluate serum proteinogram, APPs and Igs.

2.2. Serum proteinogram

Total protein was determined spectrophotometrically by the biuret method (Gornall et al., 1949) using commercial reagents (Labtest[®]). The protein fractionation was determined by electrophoresis on cellulose acetate strips in a horizontal cube (Labex[®]) with Tris–glycine buffer (pH 8.6) (Naoum, 1999). The test samples were applied by semi micro applicator for 4 specimens on the strips ($0.9\ \mu\text{L}/10\ \text{mm}$) and then ran using a constant voltage of 150 V for 35 min. Strips were stained with Ponceau for 15 min, according to the technique described by Naoum (1999), adapted to canine species. The excess of stain was removed by washing the strips in 5% acetic acid until background was completely clear. Then strips were fixed in methanol for 30 s and washed for one min with a destain solution, dried at 60°C for 15 min (Naoum, 1999) and read by the Denscan system, a system that uses computer graphics capabilities to read the electrophoretic migration (Maciel et al., 2012). The fractions analyzed were the albumin, α -1-globulin, α -2-globulin, β -1-globulin, β -2-globulin and γ globulins (Kaneco, 1997).

2.3. Acute phase proteins and immunoglobulins

The quantification of serum CRP was performed using commercial kits of ultrasensitive CRP (BioTécnica, Minas Gerais, Brazil), following the manufacturer protocol at semiautomatic analyzer Bio-2000 (Bioplus Ltda, São Paulo, Brazil). The test samples

were treated with a specific antibody to human CRP in a suitable buffer. The turbidity induced by the formation of immune complexes was measured at 540 nm, and the values were then calculated automatically from a known standard. All the assay steps were performed automatically by spectrometry (BioTécnica, Minas Gerais, Brazil). AGP and serum IgG, IgM, IgA, and IgE concentrations were determined using immunonephelometry on a Behring Nephelometer BN II (Dade Behring – USA) using reagents from Dade Behring. Samples were diluted with a specific diluent and measured after 10 min. Polystyrene particles were coated with a specific monoclonal antibody for each human protein forming an agglutinate that disperses the light irradiated in the presence of the protein analysed. The intensity of scattered light depends of protein concentration in the sample. This evaluation was performed by comparison with standards of known concentration (Dati et al., 1996).

2.4. Statistical analysis

The result analysis was performed using the Student t-test. Values with probability less than 5% were considered statistically different. The results were presented as mean \pm standard deviation.

3. Results

3.1 Serum proteinogram

Variations in SPE were observed during the experimental period (Table 1). Total protein levels decreased at day 10 PI ($P < 0.01$) and 20 PI ($P < 0.05$) in infected sera compared to the control sera. A decrease ($P < 0.01$) in albumin levels was observed in the infected sera at days 10 and 20 PI, α -1-globulin increased ($P < 0.01$) in the infected sera at day 20 PI and α -2-globulin decreased ($P < 0.05$) at days 10 and 20 PI in infected sera. No significant alteration was observed in the β -1-globulin. A decrease ($P < 0.05$) of β -2 globulin was observed at day 10 PI in infected sera and γ -globulin increased ($P < 0.01$) at day 20 PI in infected sera to control sera.

3.2. Acute phase protein

Concentrations of APPs increased in infected sera during the current study (Fig. 1). Serum CRP (Fig. 1A) and AGP (Fig. 1B) concentrations were significantly increased ($P < 0.05$) at days 10 and 20 PI in infected sera compared to the control sera.

3.3. Immunoglobulins

IgG increased in infected sera compared with control sera (Fig. 2). IgG increased at days 10 ($P < 0.05$) and 20 PI ($P < 0.01$) in infected sera (Fig. 2A). Additionally, it was also observed an increase ($P < 0.01$) in the levels of IgM (Fig. 2B), IgA (Fig. 2C) and IgE (Fig. 2D) in infected sera compared to the control sera.

4. Discussion

This study showed the occurrence of alterations in the SPE in dogs infected with *R. vitalii*. Significant hypoproteinemia was observed in these animals. One hypothesis is that hypoproteinemia may be associated to the decrease in albumin levels. Albumin is the most abundant protein in the serum (Kaneco, 1997) and any reduction in this protein will result in a reduction of total protein levels. In addition, hypoproteinemia can be related to the anorexia (Stockham and Scott, 2002) observed in infected dogs, similarly to what occurs in the acute phase of equine babesiosis (Barrera et al., 2010).

Hypoalbuminemia was found in dogs with *R. vitalii*, in accordance to studies with *Ehrlichia canis* (Mylonakis et al., 2004) and *Babesia canis* (Gallego et al., 2008). The cause of hypoalbuminemia is often multifactorial and can be associated to compensatory mechanism for hypergammaglobulinemia to maintain the plasma osmolarity as described in Ehrlichia infection in dogs (Harrus et al., 1999). Inflammation is a well-known cause of hypoalbuminemia. Thus, the synthesis of albumin can be reduced because of its function as negative APPs (Céron et al., 2005). Others causes of hypoalbuminemia include hepatic failure, inflammation, chronic malnutrition, loss through hemorrhage, vasculitis, protein losing enteropathy or nephropathy and dilution of plasma proteins (Stockham and Scott, 2002). In the case of rangelirosis, vasculitis is a common pathological finding, because the piroplasm has predilection for endothelial cells. Therefore, this may contribute to reduce the circulating albumin.

APPs are blood proteins that can be used to assess the innate immune system's response to infection, inflammation or trauma (Murata et al., 2004). The present study reports for the first time the APP response observed in experimental canine rangelirosis, by increasing of positive APPs: CRP and AGP. Researchers observed elevations in the levels of CRP and AGP in canine ehrlichiosis, indicating that these proteins can be correlated with the severity of inflammatory damage in dogs with *E. canis* (Rikihisa et al., 1994). Moreover, an increase in CRP and AGP was observed in dogs with acute inflammation (Yamashita et al., 1994). Serum CRP was also increased in dogs with

babesiosis (Matijatko et al., 2007). Therefore, our results suggest that the measurement of these APPs may be useful in monitoring immune response to rangelioidosis.

Alpha globulin fraction is known as acute stage proteins because their concentration increases immediately after an inflammation (Stockham and Scott, 2002). These globulins are a common finding in acute inflammatory diseases and represent an acute phase response. Alpha globulin fraction is composed of APPs such as AGP, α -2-macroglobulin, lipoproteins, ceruloplasmin and haptoglobin (Kaneco, 1997). In this study, it was observed an increase of α -1 globulin fraction in infected animals, in agreement with the results showed by Camacho et al. (2005) in canine babesiosis. The increase of this protein fraction may be correlated to the raise of AGP as observed in this study. AGP is a positive APP which increases its production in response to the inflammation process. Elevated serum AGP levels are observed in dogs with ehrlichiosis during the acute stage of infection (Rikihisa et al., 1994). However, α -2-globulin fraction decreased in the infected animals during the current study. The possible causes for this decrease are unknown.

Infection is generally associated with an increase in the concentration of β -globulins. The β globulins fraction includes transferrin (a negative APP), ferritin, CRP, lipoproteins, fibrinogen, serum amyloid and complement (Kaneco, 1997). In this study, the serum CRP was significantly higher in dogs with rangelioidosis, similarly the other studies with dogs infected with *B. canis* (Ulutas et al., 2005) and *E. canis* (Shimada et al., 2002). However, our results showed that β -1 globulin did not differ significantly and β -2 globulin decreased in dogs with rangelioidosis. One of the reasons for this decrease may be the transferrin. This protein is a negative acute phase reactant, with levels decreasing during acute inflammatory processes which can contribute to decrease β -globulin level.

Gamma globulin level was increased in our study, and these results are similar to those observed in babesiosis (Barrera et al., 2010), ehrlichiosis (Harrus et al., 1999) and trypanosomiasis (Costa et al., 2010). In canines, γ -globulin fraction is composed by IgM, IgG, IgA and IgE (Tizard, 2008). Igs are proteins that act as antibodies and are produced by B-lymphocytes in the spleen, lymph nodes and bone marrow in response to antigens (Kaneco, 1997). In this study, we showed an increase in all classes of Igs in dogs infected with *R. vitalii*, indicating a polyclonal gammopathy (Stockham and Scott, 2002). Moreover, increase in Igs levels is related to the humoral immunity activated by the parasite. Therefore, hypergammaglobulinaemia in this study can be associated to the increase in Igs levels.

As previously mentioned, dogs with experimental rangelioidosis have increased levels of Igs, unlike what occurred in the experimental infection with *E. canis* (Hess et al., 2006). In this study the significantly increase in IgG and IgM in the infected animals occurred simultaneously, however 10 days PI the level of IgM was more than 19-fold increased, unlike the level of IgG which was only 1.18-fold increased. At days 20 PI, both Igs were very high. A typical antibody response consisting primarily of IgM at first and subsequently of IgG was observed in dogs infected by *Leishmania infantum* (Martinez-Subiela et al., 2011). IgM increases primarily in order to directly combat the agent, as reported in infections by *Babesia bovis* (Gonçalves et al., 1999), and probably in dogs parasitized by *R. vitalii*. The later increase of IgG, may be is related to the reduction of parasitemia demonstrated to Da Silva et al. (2011), since this Ig has great importance in combating hemoparasites (Cunha et al., 2006).

IgE is associated with allergic cases (Tizard, 2008); and/or parasitized cases, where this class of Ig plays an important role in the expulsion of parasites and the subsequent recovery of the host (Bloch and Malveaux, 1985). Recently, researchers found high values of specific IgE in symptomatic dogs with canine leishmaniasis (Iniesta et al., 2005), similar finding of this study. The dogs in this study had diarrhea (Da Silva et al., 2011), a typical clinical sign in cases of rangelioidosis. The parasite leaves the blood and invades endothelial cells and organs including gastrointestinal tract (Figuera et al., 2010), might allowing the migration of the parasite to the mucous membranes, justifying the increase in IgA.

Based on the results we conclude that *R. vitalii* infection causes alterations in the proteinogram, and increases in the levels of APPs and Igs. Further studies are essential to define the causes of these pathological changes in this disease. Probably, the increase in these parameters is intended to combat the parasite indirectly (by activating other cells) and/or direct (attacking the parasite, in the case of immunoglobulins), similar to what occurs in other parasitic diseases.

References:

- Abate, O., Zanatta, R., Malisano, T., Dotta, U., 2000. Canine serum protein patterns using high-resolution electrophoresis (HRE). *Vet. J.* 159, 154–160.
- Barrera, R., Carapeto, M.V., Habela, M.A., Zaragoza, C., 2010. Electrophoretic pattern of serum proteins in horses with babesiosis. *Arch. Med. Vet.* 42, 173–178.

Bloch, E.F., Malveaux, F.J., 1985. The significance of immunoglobulin E in resistance to parasitic infections. *Ann. Allergy* 54, 83–93.

Camacho, A.T., Guitian, F.J., Pallas, E., Gestal, J.J., Olmeda, S., Goethert, H., Telford, S., Spielman, A., 2005. Serum protein response and renal failure in canine *Babesia annae* infection. *Vet. Res.* 36, 713–722.

Céron, J.J., Eckersall, P.D., Martínez-Subiela, S., 2005. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet. Clin. Pathol.* 34, 85–99.

Costa, M.M., Da Silva, A.S., Wolkmer, P., Zanette, R.A., França, R.T., Monteiro, S.G., Lopes, S.T.A., 2010. Serum proteinogram of cats experimentally infected by *Trypanosoma evansi*. *Prev. Vet. Med.* 95, 301–304.

Cunha, C.W., McGuire, T.C., Kappmeyer, L.S., Hines, S.A., Lopez, M., Dellagostin, O.A., Kowles, D.P., 2006. Development of specific Immunoglobulin G_a (IgG_a) and (IgG_b) antibodies correlates with control of parasitemia in *Babesia equi* infection. *Clin. Vaccine Immunol.* 13, 297–300.

Da Silva, A.S., França, R.T., Costa, M.M., Paim, C.B., Paim, F.C., Dornelles, G.L., Soares, J.F., Labruna, M.B., Mazzanti, C.M., Monteiro, S.G., Lopes, S.T.A., 2011. Experimental infection with *Rangelia vitalii* in dogs: acute phase, parasitemia, biological cycle, clinical-pathological aspects and treatment. *Exp. Parasitol.* 128, 347–352.

Dati, F., Schumann, G., Thomas, L., Aguzzi, F., Baudner, S., Bienvenu, J., 1996. Consensus of group of professional society and diagnostic companies on guidelines for interim reference ranges for 14 proteins in serum based on standardization against the IFCC/BRC/CAP Reference Material (CRM). *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 34, 517–520.

Eckersall, P.D., Bell, R., 2010. Acute phase proteins: biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Vet. J.* 185, 23–27.

Figuera, R.A., Souza, T.M., Kommers, G.G., Irogoyen, L.F., Barros, C.S.C., 2010. Patogênese e achados clínicos, hematológicos e anatomopatológicos da infecção por *Rangelia vitalii* em 35 cães (1985–2009). *Pesq. Vet. Bras.* 30, 974–987.

França, R.T., Silva, A.S., Paim, F.C., Costa, M.M., Soares, J.F., Mazzanti, C.M., Lopes, S.T.A., 2010. *Rangelia vitalii* in dog in southern Brazil. *Comp. Clin. Pathol.* 19, 383–387.

Gallego, S.L., Trotta, M., Carli, E., Carcy, B., Caldin, M., Furlanello, T., 2008. *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* clinicopathological findings and DNA

detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease. *Vet. Parasitol.* 157, 211–221.

Gonçalves, P.M., Passos, L.M.F., Ribeiro, M.F.B., 1999. Detection of IgM antibodies against *Babesia bovis* in cattle. *Vet. Parasitol.* 82, 11–17.

Gornall, A.G., Bardawill, C.S., David, M.N., 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177, 751–766.

Harrus, S., Waner, T., Bark, H., Jongejan, F., 1999. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2745–2749.

Hess, P.R., English, R.V., Hegarty, B.C., Brown, G.D., Breitschwerdt, E.B., 2006. Experimental *Ehrlichia canis* infection in the dog does not cause immunosuppression. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 109, 117–125.

Iniesta, L., Gallego, M., Portús, M., 2005. Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 103, 77–81.

Kaneco, J.J., 1997. Serum proteins and the dysproteinemias. In: Kaneco, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L. (Eds.), *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, vol. 5. Academic Press, San Diego, pp. 117–138.

Krauspenhar, C., Figuera, R.A., Graça, D.L., 2003. Anemia hemolítica em cães associada a protozoários. *Medvep – Rev. Cien. Med. Vet. Peq. An. Estim.* 1, 273–281.

Loretti, A.P., Barros, S.S., 2004. Parasitismo por *Rangelia vitalli* em cães (“nambiuví” “peste de sangue”) – uma revisão crítica sobre o assunto. *Arq. Inst. Biol.* 71, 101–131.

Loretti, A.P., Barros, S.S., 2005. Hemorrhagic disease in dogs infected with an unclassified intraendothelial piroplasm in southern Brazil. *Vet. Parasitol.* 134, 193–213.

Maciel, R.M., Lopes, S.T.A., Mazzanti, C.M., Costa, M.M., Salbego, F.Z., Martins, D.B., França, R.T., Teixeira, L.V., Zanette, R.A., 2012. A hematologic and electrophoretic study in puppies vaccinated against canine distemper virus and canine parvovirus. 40, 1011–1012.

Martinez-Subiela, S., Ayali, D.S., Céron, J.J., Baneth, G., 2011. Acute phase protein response in experimental canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* 180, 197–202.

Matijatko, V., Mrljak, V., Kis, I., Kucer, N., Forsek, J., Zivicnjak, T., Romić, Z., Simec, Z., Ceron, J.J., 2007. Evidence of an acute phase response in dogs naturally infected with *Babesia canis*. *Vet. Parasitol.* 144 (242), 250.

Murata, H., Shimada, N., Yoshioka, M., 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet. J.* 168, 28–40.

Mylonakis, M.E., Koutinas, A.F., Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C., Billinis, C.D., Leontides, L.S., Kontos, V.S., 2004. Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 19 natural causes. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 40, 174–184.

Naoum, P.C., 1999. Proteínas plasmáticas. In: Naoum, P.C. (Ed.), *Eletroforese-Técnicas e Diagnóstico*, vol. 2. Santos, São Paulo, pp. 13–38.

Pestana, B.R., 1910. O Nambyuvú (nota preliminar). *Rev. Soc. Cient. São Paulo* 5, 14–17.

Pier, G.B., Lyczak, J.B., Wetzler, L.M., 2004. *Immunology, Infection and Immunity*. ASM Press, Washington, 718pp.

Rikihisa, Y., Yamamoto, S., Kwak, I., Iqbal, Z., Kociba, G., Mott, J., Chichanasiriwithava, W., 1994. C-reactive protein and alpha 1-acid glycoprotein levels in dogs infected with *Ehrlichia canis*. *J. Clin. Microbiol.* 32, 912–917.

Shimada, T., Ishida, Y., Shimizu, M., Nomura, M., Kawato, K., Iguchi, K., Jinbo, T., 2002. Monitoring C-reactive protein in beagle dogs experimentally inoculated with *Ehrlichia canis*. *Vet. Res. Commun.* 26, 171–177.

Soares, J.F., Giroto, A., Brandão, P.E., França, R.T., Da Silva, A.S., Lopes, S.T.A., Labruna, M.B., 2011. Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. *Vet. Parasitol.* 180, 203–208.

Stockham, S.L., Scott, M.A., 2002. Proteins. In: Stockham, S.L., Scott, M.A. (Eds.), *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*. Iowa State Press, Iowa, USA, pp. 251–276.

Tizard, I.R., 2008. *Veterinary Immunology: An Introduction*, 8th ed. Elsevier (Saunders), Philadelphia, p. 147.

Ulutas, B., Bayramli, G., Ulutas, P.A., Karagenc, T., 2005. Serum concentration of some acute phase proteins in naturally occurring canine babesiosis: a preliminary study. *Vet. Clin. Pathol.* 34, 144–147.

Yamashita, K., Fujinaga, T., Miyamoto, T., Mitsujoshi, G., Izumisawa, Y., 1994. Canine acute phase response: relationship serum cytokine activity and acute phase protein in dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 56, 487–492.

Yuki, M., Itho, H., Tamura, K., Nishii, N., Takase, K., 2008. Isolation, characterization and quantitation of canine alpha-1-acid glycoprotein. *Vet. Res. Commun.* 32., 533–542.

Table 1

Proteinograms of canine sera obtained on days 0, 10 and 20 of a *Rangelia vitalii* experimental infection. Means and standard deviations of total proteins, albumin, alpha-1 globulin, alpha-2 globulin, beta-1 globulin, beta-2 globulin and gamma globulin in infected sera (n = 7) and normal control sera (n = 5).

Parameters	Days	Control sera	Infected sera
Total proteins (mg/mL)	0	6.05 ^a (±0.80)	5.88 ^a (±0.40)
	10	5.83 ^a (±0.50)	4.61 ^b (±0.25)
	20	5.75 ^a (±0.40)	5.21 ^b (±0.13)
Albumin (mg/mL)	0	3.58 ^a (±0.50)	3.49 ^a (±0.30)
	10	3.31 ^a (±0.36)	2.35 ^b (±0.22)
	20	3.42 ^a (±0.28)	2.50 ^b (±0.40)
Alpha-1 globulin (mg/mL)	0	0.30 ^a (±0.08)	0.29 ^a (±0.11)
	10	0.32 ^a (±0.10)	0.31 ^a (±0.07)
	20	0.28 ^a (±0.05)	0.46 ^b (±0.12)
Alpha-2 globulin (mg/mL)	0	0.33 ^a (±0.07)	0.34 ^a (±0.04)
	10	0.36 ^a (±0.05)	0.28 ^b (±0.04)
	20	0.32 ^a (±0.04)	0.24 ^b (±0.05)
Beta-1 globulin (mg/mL)	0	0.31 ^a (±0.04)	0.30 ^a (±0.06)
	10	0.34 ^a (±0.08)	0.29 ^a (±0.08)
	20	0.30 ^a (±0.16)	0.29 ^a (±0.11)
Beta-2 globulin (mg/mL)	0	0.43 ^a (±0.07)	0.41 ^a (±0.06)
	10	0.44 ^a (±0.04)	0.34 ^b (±0.05)
	20	0.42 ^a (±0.11)	0.33 ^a (±0.05)
Gamma globulin (mg/mL)	0	1.10 ^a (±0.11)	1.05 ^a (±0.13)
	10	1.06 ^a (±0.12)	1.04 ^a (±0.11)
	20	1.01 ^a (±0.10)	1.39 ^b (±0.20)

P.s.: Means followed by the same letter in the line do not differ among themselves by the Tukey test at 5% of probability.

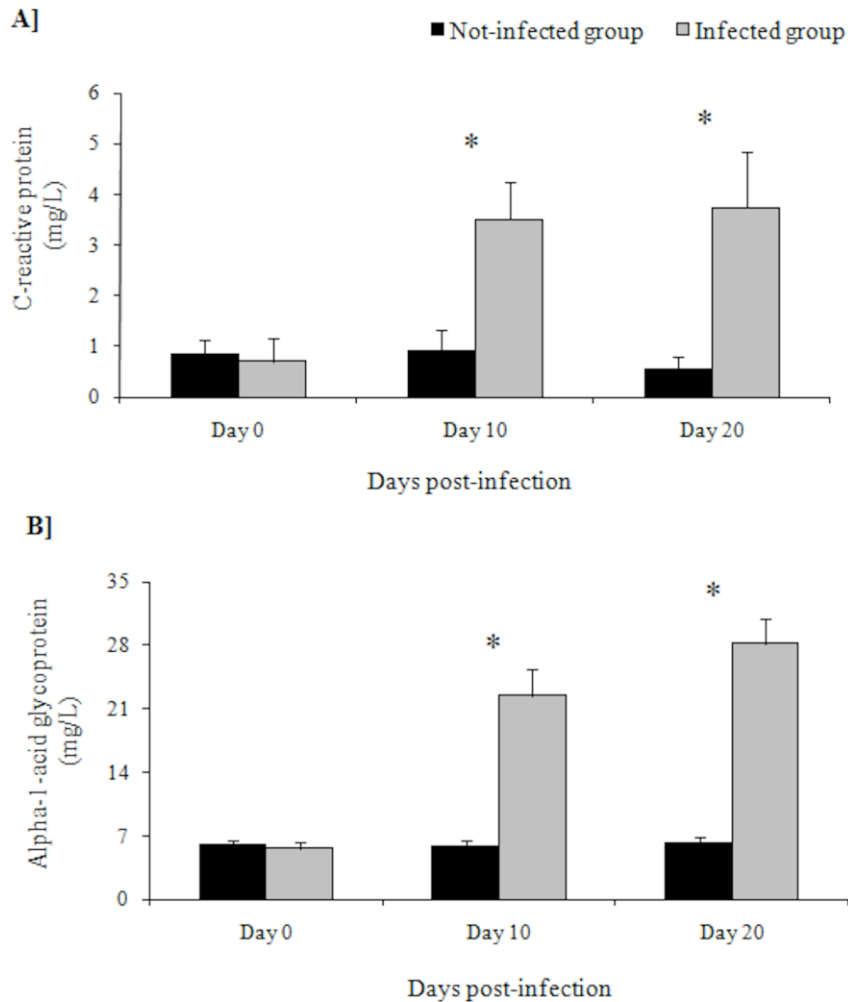


Fig. 1. Levels of acute phase proteins in canine sera obtained on days 0, 10 and 20 of a *Rangelia vitalii* experimental infection. C-reactive protein [A] and alpha-1-acid glycoprotein [B] (* $P < 0.05$, $n = 7$ infected sera and $n = 5$ normal control sera).

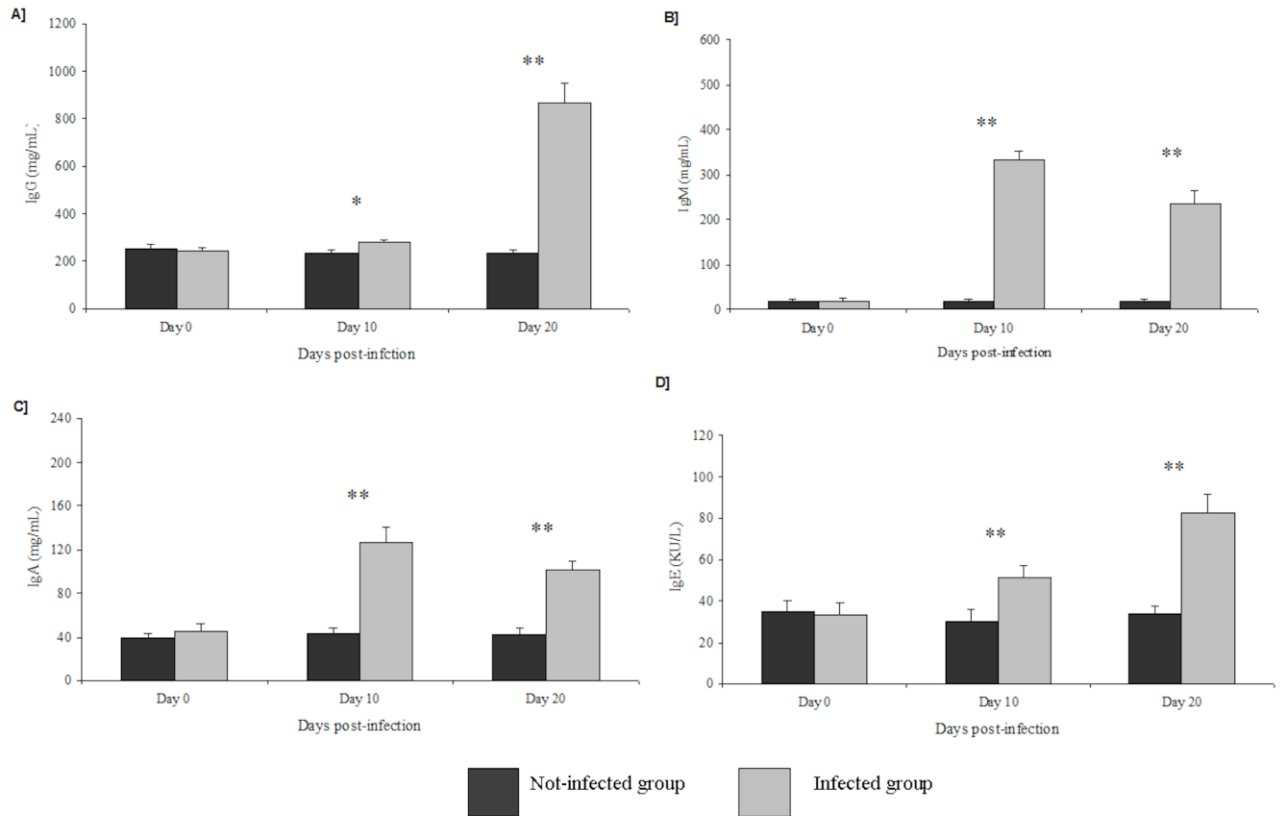


Fig. 2. Levels of immunoglobulins in canine sera obtained on days 0, 10 and 20 of an experimental *Rangelia vitalii* infection. IgG [A], IgM [B], IgA [C] and IgE [D] (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, $n = 7$ infected sera and $n = 5$ normal control sera).

4 DISCUSSÃO

A rangeliose é uma doença pouco descrita na literatura e isso pode ser devido ao fato dessa enfermidade ser muitas vezes confundida com outras doenças infecciosas de cães (KRAUSPENHAR et al., 2003). Atualmente, esse parasita tem atraído grande atenção pela comunidade científica, sendo realizadas pesquisas com ênfase nos aspectos clínicos e achados patológicos dessa enfermidade (DA SILVA et al., 2011; FRANÇA et al., 2013). Entretanto, a patogênese da infecção no que se refere ao processo inflamatório e à resposta imunológica do hospedeiro ainda não está esclarecida.

A seguir serão realizadas considerações a respeito dos resultados dos dois artigos apresentados nessa tese de doutorado. O objetivo do primeiro artigo foi mensurar a concentração sérica de citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-1 e IL-6) e produtos de degradação do óxido nítrico (nitrito - NO₂⁻ e nitrato - NO₃⁻). Enquanto que, no segundo artigo objetivou-se avaliar o perfil eletroforético, proteínas de fase aguda (proteína C-reativa e alfa 1 glicoproteína ácida) e imunoglobulinas (IgG, IgM, IgA e IgE) em cães experimentalmente infectados com *R. vitalii*.

No primeiro artigo foi observado aumento (P<0,01) dos níveis das citocinas séricas IFN- γ , TNF- α , IL-1 e IL-6 nos animais infectados durante todo o experimento. Esse aumento das citocinas pode contribuir para a ativação da resposta imune e controle da parasitemia, semelhante ao que ocorre em outras hemoparasitoses como babesiose (SHODA et al., 2000), ehrlichiose (TAJIMA & RIKIHISA, 2005), anaplasmosse (ERGONUL & ASKAR, 2009), leishmaniose (ALVES et al., 2009), hepatozoonose (KIRAL et al., 2005) e tripanossomose (PAIM et al., 2011).

Importante ressaltar que a reação inicial do hospedeiro à infecção por protozoário é a secreção de uma variedade de citocinas, incluindo TNF, IL-1 e IL-6 (TITUS et al., 1991). Nas tripanossomoses, os antígenos do parasita promovem a produção de IFN- γ , essa citocina ativa os macrófagos e aumenta sua capacidade de destruir os microorganismos ingeridos. São os macrófagos ativados que induzem a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 e IL-6 (PAIM et al., 2011). Essas respostas iniciais observadas nos animais infectados por *R. vitalii* contribuem significativamente

para a evolução da infecção por influenciar diretamente no curso da infecção e por regulação da resposta imune específica contra o parasita (TITUS et al., 1991).

O excesso de produção de citocinas pró-inflamatórias observado nesse estudo não só contribui para o controle da infecção, mas também para o progresso da doença, de forma semelhante ao que ocorre na babesiose (AHMED, 2002). Ainda, o aumento dos níveis séricos de TNF- α , IL-1 e IL-6 podem estar associados com o aparecimento dos sinais clínicos durante a fase aguda da resposta inflamatória (anorexia, apatia, perda de peso e febre (ABBAS et al., 2012), como foi observado nesse estudo.

Nesse estudo foi demonstrado que o aumento das citocinas pró-inflamatórias coincide com a redução da parasitemia no esfregaço sanguíneo. Os resultados encontrados nesse artigo corroboram com os achados de Alves et al. (2009) que demonstraram associação entre a redução de parasitemia e o aumento da expressão das citocinas IFN- γ e TNF- α em cães experimentalmente infectados com *Leishmania chagasi*. O TNF também desempenha papel no controle da bacteremia na ehrlichiose, pois camundongos *knockout* para receptores de TNF foram susceptíveis a infecção por *Ehrlichia canis* (BITSAKTIS et al., 2004).

É relevante ressaltar que, nos resultados apresentados no primeiro artigo, ocorreu aumento dos níveis séricos de NO_x nos dias 10 (P<0,01) e 20 PI (P<0,05) nos animais infectados por *R. vitalii*. O NO é um importante mediador citotóxico de células imunes ativadas, capaz de destruir os agentes patogênicos (DUSSE et al., 2003). Esta espécie reativa de nitrogênio é sintetizada pelas isoenzimas óxido nítrico sintase (NOS), que incluem NOS induzível (iNOS), NOS endotelial (eNOS) e NOS neuronal (nNOS), que catalisam a oxidação de oxigênio e L-arginina em citrulina e NO molecular (FILHO & ZILBERSTEIN, 2000). A iNOS é altamente expressa em macrófagos quando ativados por citocinas pró-inflamatórias (GUZIK et al., 2003). A meia-vida de NO é muito curta, e a sua determinação indireta pode ser feita por meio da mensuração de seus produtos de oxidação, nitrito (NO₂⁻) e nitrato (NO₃⁻), referido como NO_x (TATSCH et al., 2011).

O aumento de NO é mediado pela regulação de expressão de iNOS em resposta a secreção de citocinas pró-inflamatórias pelas células Th1 (WANDURSKA-NOWAK, 2004). Sabe-se que nas doenças parasitárias é frequentemente relatada a elevação da produção de NO (NAHREVANIAN, 2009), semelhante ao que ocorre na rangeliose. Foi observado maior aumento de NO e também das citocinas no dia 20 PI, coincidindo com a diminuição da parasitemia, provavelmente o aumento desses mediadores inflamatórios é responsável pelo controle da parasitemia. Portanto, esse primeiro artigo atribui as

citocinas e NO funções fundamentais na redução e manutenção da baixa parasitemia em cães infectados com *R. vitalii*.

No segundo artigo foi realizado proteinograma, dosagem de proteínas de fase aguda e imunoglobulinas com o intuito de esmiuçar ainda mais o mecanismo de resposta imune na rangelirose. Nesse segundo artigo foram observadas alterações no perfil eletroforético das proteínas séricas de cães experimentalmente infectados com *R. vitalii*.

Os níveis séricos de proteína total reduziram nos dias 10 ($P < 0,01$) e 20 PI ($P < 0,05$) nos animais infectados em decorrência da redução ($P < 0,01$) nos níveis de albumina no grupo infectado. A hipoproteinemia observada nesse estudo pode ser atribuída à diminuição da albumina. Visto que a albumina é a proteína mais abundante no soro, constituindo 35% a 50% da proteína total (CÉRON et al., 2005). Semelhante ao ocorrido no primeiro artigo, no qual os sinais clínicos foram associados ao aumento das citocinas pró-inflamatórias, nessa segunda pesquisa a anorexia observada nos animais infectados foi relacionada à hipoproteinemia (STOCKHAM & SCOTT, 2008). Esses resultados são semelhantes aos observados em outras doenças infecciosas como *Ehrlichia canis* (MYLONAKIS et al., 2004) e *Babesia canis* (GALLEGO et al., 2008). A albumina é considerada uma PFA negativa, sendo assim, diminui sua concentração durante o processo inflamatório e infeccioso (CÉRON et al., 2005). Portanto, a hipoalbuminemia evidenciada nos animais infectados pode ser atribuída ao processo inflamatório desencadeado por esse protozoário.

PFA é um grupo de proteínas do sangue que pode ter sua concentração aumentada (PFA positivas), como proteína C-reativa (PCR), soro amilóide A, haptoglobina, alfa-1 glicoproteína ácida (GPA) e ceruloplasmina; ou diminuída (PFA negativas), tais como albumina e transferrina. As PFA positivas são glicoproteínas sintetizadas principalmente por hepatócitos após estimulação por citocinas pró-inflamatórias e são liberadas para a corrente sanguínea (MURATA et al., 2004; CÉRON et al., 2005). Essas proteínas são usadas como biomarcadores da inflamação, infecção e trauma (ECKERSALL & BELL, 2010). A PCR é a principal PFA positiva de cães e, a concentração de GPA pode ser um marcador alternativo de inflamação em caninos (YUKI et al., 2008). Esse estudo demonstrou aumento ($P < 0,05$) das concentrações séricas de PCR e GPA nos animais infectados nos dias 10 e 20 PI. As elevações dessas PFA positivas podem estar correlacionadas ao grau de severidade da inflamação, conforme relatado em cães infectados com *E. canis* (RIKIHISA et al., 1994). Nossos

resultados sugerem que essas PFA podem ser úteis para monitoramento da resposta imune na rangeliose. Ainda, no primeiro artigo foi demonstrado aumento de citocinas pró-inflamatórias na infecção por *R. vitalii* em cães. Sabe-se que essas citocinas são responsáveis pela síntese de PFA no fígado, portanto, o aumento de PFA positiva evidenciado nessa segunda pesquisa corrobora com os resultados obtidos de elevação das citocinas séricas no primeiro estudo.

A fração α -1 globulina aumentou ($P < 0,01$) nos animais infectados no dia 20 PI, semelhante aos resultados obtidos por Camacho et al. (2005) na babesiose canina. Essa fração é composta por PFA positivas como GPA, α -2 macroglobulina, lipoproteínas, ceruloplasmina e haptoglobulina (KANECO, 1997). O aumento dessa fração proteica pode ser relacionado ao acréscimo da GPA observada nesse estudo. GPA é uma PFA positiva que aumenta em resposta ao processo inflamatório. A elevação dessa PFA foi observada em cães com ehrlichiose durante a fase aguda da infecção (RIKIHISA et al., 1994). Em contrapartida, a fração α -2 globulina decresceu ($P < 0,05$) nos animais infectados em relação ao controle no dia 10 PI. As causas desse decréscimo não estão esclarecidas.

A infecção é geralmente associada ao aumento na concentração das frações β -globulinas. A fração β globulina é composta pelas proteínas transferrina (PFA negativa), ferritina, PCR, lipoproteínas, fibrinogênio, soro amiloide e complemento (KANECO, 1997). Nesse experimento ocorreu aumento de PCR, similarmente a babesiose (ULUTAS et al., 2005) e ehrlichiose canina (SHIMADA et al., 2002). Entretanto, nesse estudo a fração β -1 globulina não diferiu estatisticamente, enquanto que, a fração β -2 globulina diminuiu ($P < 0,05$) nos cães com rangeliose no dia 10 PI. Uma das razões para esta redução pode ser a transferrina, esta proteína é uma PFA negativa, no qual seus níveis diminuem durante os processos inflamatórios agudos, podendo contribuir para a diminuição da fração β -2 globulina.

A fração γ -globulina aumentou ($P < 0,01$) nos animais infectados no dia 20 PI. O aumento dessa fração está relacionado ao aumento das Igs (IgM, IgG, IgA e IgE) nos animais infectados durante esse segundo experimento. Ocorreu aumento de IgG nos dias 10 PI ($P < 0,05$) e 20 PI ($P < 0,01$) no soro dos animais infectados. Foi observado aumento ($P < 0,01$) nos níveis séricos de IgM, IgA e IgE nos animais infectados nos dias 10 e 20 PI. ($P < 0,01$). IgM aumenta primeiramente a fim de combater diretamente o agente, como relatado na infecção por *Babesia bovis* (GONÇALVES et al., 1999) e, provavelmente nos cães parasitados por *R. vitalii*. O aumento de IgG pode ser

relacionado a redução da parasitemia, uma vez que essa Ig possui grande importância no combate a hemoparasitas (CUNHA et al., 2006). IgE está associada a casos alérgicos (TIZARD, 2008) e resposta parasitária, na qual esta classe de IgG desempenha papel importante na expulsão de parasitas (BLOCH & MALVEAUX, 1985). Foi observado aumento de IgE em cães com leishmaniose canina (INIESTA et al, 2005), corroborando com os achados desse estudo. Os cães nesse estudo apresentaram diarreia (DA SILVA et al., 2011), um sinal clínico típico de rangeliose. O parasita pode invadir as células endoteliais e os órgãos, incluindo trato gastrintestinal (FIGHERA et al., 2010), isso pode permitir a migração do parasita às membranas mucosas, justificando o aumento de IgA.

No artigo 1 ocorreu acréscimo nos níveis de citocinas séricas e produção de metabólitos do óxido nítrico. Da mesma forma que, no segundo artigo foi evidenciado alteração na concentração das proteínas séricas e estimulação da síntese de proteínas de fase aguda e imunoglobulinas. Essas alterações podem contribuir com a resposta imune do hospedeiro contra o piroplasma, semelhante ao que ocorre em outras hemoparasitoses.

5 CONCLUSÕES

5.1 Artigo 1

- A infecção por *R. vitalii* em cães causa aumento na síntese de citocinas pró-inflamatórias e metabólitos do NO.
- Estas alterações podem contribuir para a ativação da resposta imune do hospedeiro contra o parasita.

5.2 Artigo 2

- A infecção por *R. vitalii* causa alterações no perfil eletroforético das proteínas séricas, aumento nos níveis séricos de PFA e Igs.
- O aumento desses parâmetros imunológicos destina-se a combater indiretamente o parasita (por meio de ativação de outras células) e/ou diretamente (combate o parasita, no caso das Igs), semelhante ao que ocorre em outras doenças parasitárias.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATE, O. et al. Canine serum protein patterns using high-resolution electrophoresis (HRE). **Veterinary Journal**, v. 159, n. 2, p.154–160, mar. 2000.

ABBAS, A.K; LICHTMAN, A.H; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**, 7 ed. Philadelphia: Elsevier, 2012. 545p.

AHMED, J.S. The role of cytokines in immunity and immunopathogenesis of piroplasmoses. **Parasitology Research**; v 88, p. S48-S50, 2002.

ALVES, C. F et al. Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and immunopathology**, v. 128, p. 349-358, 2009.

BENJAMINI, E.; COICO, R.; SUNSHINE, G. **Imunologia**. 4. ed. Porto Alegre : ARTMED, 2002. 472 p.

BITSAKTIS, C.; HUNTINGTON, J.; WINSLOW, G. Production of IFN- γ by CD4 T cells is essential for resolving *Ehrlichia* infection. **The Journal of Immunology**, v. 172, p. 6894-6901, 2004.

BLOCH, E.F.; MALVEAUX, F. J. The significance of immunoglobulin E in resistance to parasitic infections. **Annals of Allergy**, v. 54, p. 83–93, 1985.

BUSH, B. M. Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais, 1 ed. São Paulo: Roca, 2004. 384 p.

CAMACHO, A. T. et al. Serum protein response and renal failure in canine *Babesia annae* infection. **Veterinary Research**, v. 36,p. 713–722, 2005.

CARINI, A. Notícias sobre zoonoses observadas no Brasil. **Revista Médica de São Paulo**, v. 22, p. 459-462, 1908.

CARINI, A.; MACIEL, J. J. Contribuição ao tratamento do nanbyuvú pelo trypanblau. **Revista de Veterinária e Zootecnia**, p. 63-64, 1914.

CÉRON, J. J.; ECKERSALL, P. D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, v.34, n. 2, p. 85-99, jun. 2005.

COLLINS, T. Inflamação aguda e crônica. In: Robbins. **Patologia estrutural e funcional**. 6 ed. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan, p. 45-78, 2000.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1251p.

CUNHA, C. W. et al. Development of specific Immunoglobulin G_a (IgG_a) and (IgG_b) antibodies correlates with control of parasitemia in *Babesia equi* infection. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, p. 297–300, 2006.

DA SILVA, A. S. et al. Experimental infection with *Rangelia vitalii* in dogs: acute phase, parasitemia, biological cycle, clinical- pathological aspects and treatment. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 4, p. 347 – 352, ago. 2011.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

ECKERSALL, P. D. Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 157, n. 7, p. 577-584, 2000.

ECKERSALL, P. D. Proteins, proteomics and dysproteinemias. In: KANECO, J. J.; HAVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 6 ed. San Diego: Academic Press, 2008. cap. 5, p. 117–148.

ECKERSALL, P. D.; BELL, R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. **The Veterinary Journal**, v.185, n. 1, p. 23–27, jul. 2010.

EIRAS, D.F.et al. Primer descripción de *Rangelia vitalii* (Protozoa, Piroplasmida) en la especie canina en Argentina. **XIX Reunión Científico Técnica Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico**. Buenos aires, Argentina. Proceedings, p. 338, 2012.

EISERICH, J.P. et al. Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular no oxidase, **Science**. v. 296, p.2391-2394, 2002.

ERGONUL, S.; ASKAR, T. K. The investigation of heat shock protein (HSP 27), malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO) and interleukin (IL-6, IL-10) levels in cattle with anaplasmosis. **Journal of Faculty of Veterinay Medicine**, v. 15, p. 575-579, 2009.

FELDMANN, M. Many cytokines are very useful therapeutical targets in disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 11, p. 3533-3536, nov. 2008.

FIGHERA, R. A. Rangeliose. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, n. 2, p.261-263, 2007.

FIGHERA, R. A. et al. Patogênese e achados clínicos, hematológicos e anatomopatológicos da infecção por *rangelia vitalii* em 35 cães (1985-2009). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 11, p. 974-987, nov. 2010.

FILHO, F. R ; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação de Medicina Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 265-271, 2000.

FRANÇA, R. T. et al. *Rangelia vitalii*, in dog in southern Brazil. **Comparative Clinical Pathology**, v. 19, n. 4, p. 383-387, jun. 2010.

FRANÇA, R. T. et al. Hematologic and boné marrow changes in dogs experimentally infected with *Rangelia vitalii*. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 42, p. 31-39, 2013.

GALLEGO, S. L. et al. Babesia canis canis and Babesia canis vogeli clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease. **Veterinary Parasitology**, v. 157, p. 211–221, 2008.

GAO, W.; PEREIRA, M. A. Interleukin-6 is required for parasite specific for parasite response and host resistance to Trypanosoma cruzi. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 2, p. 167-170, fev. 2002.

GONÇALVES, P. M.; PASSOS, L. M. F.; RIBEIRO, M. F. B. Detection of IgM antibodies against *Babesia bovis* in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 82, p. 11–17, 1999.

GRUYS, E. et al. Acute phase reaction and acute phase proteins. **Journal of Zhejiang University**. v.6, p.1045-1056, 2005.

GUZIK, T.J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 54, p. 469-487, 2003.

INIESTA, L.; GALLEGU, M.; PORTÚS, M. Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 103, p. 77–81, 2005.

JAIN, N. C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417p.

JANEWAY, C. A. et al. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. tradução BONORINO, C. et al. 5.ed. Porto Alegre : ARTMED, 2002. 767p

KANECO, J.J. Serum proteins and the dysproteinemias. In: Kaneco, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L. (Eds.), **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, v 5. San Diego: Academic Press, p. 117–138, 1997.

KIRAL, F. et al. Dogs with *Hepatozoon canis* respond to the oxidative stress by increased production of glutathione and nitric oxide. **Veterinary Parasitology**, v 131, p. 15-21, 2005.

KRAUSPENHAR, C.; FIGHERA, R. A.; GRAÇA, D. L. Anemia hemolítica em cães associada a protozoários. **MEDVEP – Revista Científica de Medicina Veterinária de Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v. 1, n. 4, p. 273-281, out./dez., 2003.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins Basic Pathology** 7ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier, p. 185-208, 2007.

LAMANO, T.L.C. **Inflamação**. Patologia Geral. 2008, 36 p. Disponível em: www.forp.usp.br/mef/digipato/Microsoft Word - INFLA.2008.pdf. Acesso em: 9 de setembro de 2013.

LAWRENCE, T.; GILROY, D.W. Chronic inflammation: a failure of resolution? **International Journal of Experimental Pathology**. v.88, p.85-94, 2007.

LEHNINGER. **Princípios de Bioquímica**. 3.ed. São Paulo: Sarvier, 2002, 976 p.

LEMOS, T. D. et al. Detection and molecular characterization of piroplasms species from naturally infected dogs in southeast Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.21, n.2, p.137-142, 2012.

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. **Microbiologia médica e imunologia**. 7 ed. Porto Alegre : ARTMED, 2005. 632 p.

LORETTI, A. P., BARROS, S. S. Parasitismo por *Rangelia vitalii* em cães (“Nambiuvú”, “Peste de Sangue”) – uma revisão crítica sobre o assunto. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v. 71, n.1, p. 101-131, jan./mar. 2004.

LORETTI, A. P., BARROS, S. S. Hemorrhagic disease in dogs infected with an unclassified intraendothelial piroplasm in southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 134, n. 3-4, p. 193-213, jul. 2005.

MAGEZ, S. et al. Tumor necrosis factor (TNF) receptor-1 (TNFp55) signal transduction and macrophage-derived soluble TNF are crucial for nitric oxide-mediated *Trypanosoma congolense* parasite killing. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 196, n. 6, p. 954-962, set. 2007.

MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, v 4, 2009, 496 p.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **The Veterinary Journal**, v. 168, n. 1, p. 28–40, jul. 2004.

MYLONAKIS, M. E. et al. Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 19 natural causes. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.40, p.174–184, 2004.

NAIRN, R. **Imunologia: para estudantes de medicina**. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2004. 326 p.

NAHREVANIAN, H. Involvement of nitric oxide and its up/down stream molecules in the immunity against parasitic infections. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, p. 440-448, 2009.

NAKAMURA, M. et al. C-reactive protein concentration in dogs with various diseases. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.70, n. 2, p. 127-131, fev. 2008.

PAIM, F. C. et al. Cytokines in rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Experimental Parasitology**, v. 128, n. 4, p. 365-370, ago. 2011.

PALTRINIERI, S. Early biomarkers of inflammation in dogs and cats: the acute phase proteins. **Veterinary Research Communications**, v. 31, n. 1, p. 125-129, 2007.

PETERSEN, H. H.; NIELSEN, J. P.; HEEGAARD, P. M. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary Research**, v.35, n. 2, p. 163-187, mar./abr. 2004.

PESTANA, B. R. O nambyuvú (nota preliminar). **Revista da Sociedade Científica de São Paulo**, v. 5, p. 14 – 17, 1910.

RIKIHISA, Y. et al. C-reactive protein and alpha 1-acid glycoprotein levels in dogs infected with *Ehrlichia canis*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 32, p. 912–917, 1994.

ROITT, I. M.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 6. ed. Barueri : Manole, 2003. 481 p.

SARASÚA, L. M.; DONATI, N. R. Constatación de babesiosis canina en el Departamento de Artigas (Uruguay). **Veterinaria**, v. 12, p. 137-139, 1976.

SHIMADA, T. et al. Monitoring C-reactive protein in beagle dogs experimentally inoculated with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Research Communications**, v. 26, p. 171–177, 2002.

SHODA, L. K. M. *Babesia bovis*-stimulated macrophages express interleukin-1 β , interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide and inhibit parasite replication *in vitro*. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 5139-5145, 2000.

SOARES, J. et al. Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 3, p. 153-167, jul. 2011.

SOARES, J. F. et al. Caracterização morfológica, molecular e estudos dos ixodídeos vetores de *Rangelia vitalii*. **XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária**,

2012, São Luis-MA. Anais do XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, p. 132, 2012.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. **Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology**, Iowa: Iowa State Press, 2008, 610p.

TATSCH, E. et al. A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate. **Clinical Biochemistry**. v.44,n. 4, p. 348– 350, mar. 2011.

TAJIMA, T.; RIKIHISA, Y. Cytokine Responses in Dogs Infected with *Ehrlichia canis* Oklahoma Strain. **Annals of The New York Academy of Sciences**, v. 1063, p. 429-432, dez. 2005.

THRALL, M. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 1 ed. São Paulo: Roca, 2007, p. 181.

TITUS, R. G.; SHERRY, B.; CERAMI, A. The involvement of TNF, IL-1 and IL-6 in the immune response to protozoan parasites. **Immunology Today**, v. 12, p. A13-A16, 1991.

TIZARD, I. R. **Veterinary Immunology: An Introduction**. 8a ed. Philadelphia: Elsevier (Saunders), 2008. 147p.

ULUTAS, B. et al. Serum concentration of some acute phase proteins in naturally occurring canine babesiosis: a preliminary study. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, p. 144–147, 2005.

WANDURSKA-NOWAK, E. The role of nitric oxide (NO) in parasitic infections. *Wiadomosci Parazytologiczne*, v. 50: p. 665-678, 2004.

YUKI, M. et al. Isolation, characterization and quantitation of canine alpha-1-acid glycoprotein. **Veterinary Research Communications**, v.32, n. 7, p. 533–542, 2008.