

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
CAMPUS CUIABÁ
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

SAULO PEREIRA CARDOSO

**PARÂMETROS HEMORREOLÓGICOS, HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E DE
CITOCINAS SÉRICAS EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Ehrlichia*
canis TRATADOS E NÃO TRATADOS COM DOXICICLINA**

Cuiabá
2024

SAULO PEREIRA CARDOSO

**PARÂMETROS HEMORREOLÓGICOS, HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E DE
CITOCINAS SÉRICAS EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Ehrlichia*
canis TRATADOS E NÃO TRATADOS COM DOXICICLINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Mato Grosso, para obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias, área de concentração: Clínica Médica e Cirúrgica de Animais Domésticos e Silvestres.

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Régia Franco Sousa

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Luzia França

Cuiabá
2024

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

C268p Cardoso, Saulo.
PARÂMETROS HEMORREOLÓGICOS, HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E DE CITOCINAS SÉRICAS EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR Ehrlichia canis TRATADOS E NÃO TRATADOS COM DOXICICLINA [recurso eletrônico] / Saulo Cardoso. -- Dados eletrônicos (1 arquivo : 90 f., il. color., pdf). -- 2024.

Orientadora: Valéria Régia Franco Sousa.
Coorientador: Eduardo Luzia França.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Cuiabá, 2024.
Modo de acesso: World Wide Web: <https://ri.ufmt.br>.
Inclui bibliografia.

1. Erliquiose Monocítica Canina. 2. imunologia. 3. reologia. 4. albumina. 5. anemia. I. Sousa, Valéria Régia Franco, *orientador*. II. França, Eduardo Luzia, *coorientador*. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO: PARÂMETROS HEMORREOLÓGICOS, HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E DE CITOCINAS SÉRICAS EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Ehrlichia canis* TRATADOS E NÃO TRATADOS COM DOXICICLINA

AUTOR: Doutorando Saulo Pereira Cardoso

Tese defendida e aprovada em 27 de fevereiro de 2024.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Doutor Valéria Régia Franco Sousa (Presidente Banca/Orientadora)

Doutora Giane Regina Paludo (Examinadora Externa)

Doutora Marcela Corrêa Scalon (Examinadora Externa)

Doutora Adenilda Cristina Honorio França (Examinadora Interna)

Doutor Daniel Moura de Aguiar (Examinador Interno)

Doutor Richard de Campos Pacheco (Examinadora Suplente)

Cuiabá, 27 de fevereiro de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **VALERIA REGIA FRANCO SOUSA, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 04/03/2024, às 10:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcela Corrêa Scalon, Usuário Externo**, em 05/03/2024, às 16:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Giane Regina Paludo, Usuário Externo**, em 06/03/2024, às 15:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **DANIEL MOURA DE AGUIAR, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 07/03/2024, às 11:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **ADENILDA CRISTINA HONORIO FRANCA, Coordenador(a) do Prog. de Pós-Grad. em Imunologia e Parasitologia Básicas e Aplicadas do ICBS / CUA**, em 15/04/2024, às 09:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufmt.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **6655092** e o código CRC **BBB103BC**.

DEDICATÓRIA

Eu, Saulo Pereira Cardoso, dedico este trabalho de doutorado à Deus, por sua misericórdia.

Dedico também à minha esposa Alyne Farias Moreira, incrível mulher, e à minha filha Cora Linda Farias Cardoso, a alegria de todos os dias.

Dedico aos meus pais que sempre acreditaram em mim e fizeram de tudo para que chegasse onde estou hoje.

AGRADECIMENTOS

Eu agradeço a Deus por toda força que me deu nessa caminhada para superar meus medos, falhas, angústias e seguir em frente para finalizar esta jornada.

Eu agradeço a minha amada esposa, Alyne, por todas as vezes que me apoiou para trabalhar em cima desse doutoramento, até nas horas mais difíceis. Agradeço a minha filha Cora Linda, por todas as vezes que precisou me esperar terminar cada etapa, para eu lhe dar atenção só depois.

Agradeço aos meus pais, irmãos, sogros e cunhados, e demais integrantes, pelo apoio familiar que deram durante todo o processo.

Agradeço à minha orientadora, Prof^a Dr^a Valéria Régia Franco Sousa, pela dedicação a mim dada, pelo acolhimento que me ofertou na UFMT e a todos os ensinamentos transmitidos e que vou levar para sempre comigo.

Agradeço ao meu coorientador, Prof^o Dr^o Eduardo Luzia França, e também à Prof^a Dr^a Adenilda Cristina Honório-França pela paciência que tiveram perante minhas dúvidas e necessidades de um pós-graduando de doutorado. E agradeço ainda pela consideração e estima de pais mentores.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinárias por me proporcionar conhecimentos e aprendizados surpreendentes. A todos os professores do programa e todos colegas e amigos que fiz nessa jornada.

Agradeço aos amigos que me apoiavam e diziam que poderiam me ajudar se precisasse, mesmo sendo tarefas que eu mesmo precisava fazer.

Agradeço a Médica Veterinária Regiane Montechi, responsável pelo Hospital Veterinário Animais e Cia, e a toda sua equipe, em especial ao Henrique, a Isabelle e à Luana, pelo apoio e a abertura no hospital poder desenvolver a pesquisa de doutorado.

Agradeço ao Instituto Federal de Mato Grosso pelo apoio aos técnicos administrativos em educação a desenvolverem pesquisas e se qualificarem cada vez mais.

Agradeço aos animais, em especial, os cães que participaram deste trabalho, também seus tutores. Graças a eles, este trabalho ganhou vida.

RESUMO

CARDOSO, Saulo Pereira. **PARÂMETROS HEMORREOLÓGICOS, HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E DE CITOCINAS SÉRICAS EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Ehrlichia canis* TRATADOS E NÃO TRATADOS COM DOXICICLINA**. 2024. 90f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Mato Grosso, Cuiabá, 2023.

Esta tese apresenta uma avaliação da viscosidade sanguínea de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* antes e após o tratamento com doxiciclina, 10mg/kg, BID, por 28 dias, e as correlações desta viscosidade com parâmetros hematológicos, bioquímicos, hemorreológicos e citocinas. Foram obtidas amostras de sangue de 59 cães em Barra do Garças, MT. Os cães positivos na PCR para *E. canis* e negativos para *Leishmania infantum* e *Babesia* sp. foram incluídos no grupo de avaliação para EMC. Os cães negativos para *E. canis*, *L. infantum* e *Babesia* sp. foram incluídos no grupo de controle. Foram emparelhados dois grupos, um positivo e o outro, controle, cada um com 20 animais. O grupo pós-tratamento com doxiciclina foi composto por sete cães. Com base nos resultados, foram desenvolvidos dois manuscritos. O primeiro avaliou o perfil hemorreológico de dois grupos de 20 cães (positivo e controle), comparando-o com os dados hematológicos e bioquímicos de proteínas e triglicerídeos séricos. A viscosidade do sangue do Eriquiose Monocítica Canina (EMC) é inferior à do grupo de controle ($p < 0,05$). Os valores médios dos eritrócitos, hematócrito, hemoglobina, plaquetas e albumina dos cães infectados foram inferiores aos do grupo de controle ($p < 0,05$). A diminuição dos eritrócitos influenciou a diminuição da viscosidade do sangue ($r=0,84$; $p<0,05$), mas as propriedades tixotrópicas do sangue foram mantidas. A viscosidade do sangue correlacionou-se com as proteínas totais ($r=0,51$; $p<0,05$) e com a albumina ($r=0,45$; $p<0,05$) em cães com EMC. A albumina também se correlacionou com os eritrócitos ($r=0,62$; $p<0,05$), demonstrando sua influência no comportamento reológico do EMC. O segundo manuscrito, baseado em dados obtidos do grupo controle ($N=11$), e cães com EMC antes ($N=7$) e depois do tratamento com doxiciclina ($N=7$), avaliou a resposta do comportamento reológico antes e depois do tratamento com doxiciclina, comparando-a com dados hematológicos e citocinas séricas pró-inflamatórias e reguladoras. Observou-se redução de leucócitos e linfócitos totais ($p<0,05$) nos cães infectados por *E. canis*, mesmo após o tratamento. Houve um aumento de monócitos, eosinófilos e plaquetas após o tratamento com doxiciclina ($p<0,05$). Houve uma diminuição do TNF α ($p<0,05$) e um aumento da IL 11 β ($p<0,05$) no EMC. No EMC, a viscosidade do sangue correlacionou-se com IL 10 ($r= 0,797$; $p<0,05$) e IL 12 ($r=-0,838$; $p<0,05$). Esses dados sugerem que alterações nos leucócitos, viscosidade, níveis de IL 11 β e TNF α em cães infectados por *E. canis* podem ser importantes biomarcadores para o diagnóstico da doença. Assim, as alterações hematológicas, principalmente nos

eritrócitos, na albumina sérica e no perfil de citocinas, interferem nos parâmetros reológicos do sangue de cães com EMC.

Palavras-chave: Erliquiose Monocítica Canina, imunologia, reologia, albumina, anemia.

ABSTRACT

CARDOSO, Saulo Pereira. **HEMORHEOLOGICAL, HEMATOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND SERIC CYTOKINE PARAMETERS IN DOGS NATURALLY INFECTED BY *Ehrlichia canis* TREATED AND NOT TREATED WITH DOXYCYCLINE**. 2024. 90f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Mato Grosso, Cuiabá, 2023.

This thesis presents an evaluation of the blood viscosity of dogs naturally infected by *Ehrlichia canis* before and after treatment with doxycycline, 10mg/kg, BID, for 28 days, and the correlations of this viscosity with hematological, biochemical, hemorheological, and cytokine parameters. Blood samples were obtained from 59 dogs in Barra do Garças, MT. Dogs that tested positive in the PCR for *E. canis* and negative for *Leishmania infantum* and *Babesia* sp. were included in the evaluation group for CME. Dogs negative for *E. canis*, *L. infantum*, and *Babesia* sp. were included in the control group. Two groups were paired, one positive and the other control, each with 20 animals. The doxycycline post-treatment group consisted of 7 dogs. Based on the results, two manuscripts were developed. The first evaluated the hemorheological profile of two groups of 20 animals (positive and control), comparing it with the hematological and biochemical data of serum proteins and triglycerides. CME's Blood viscosity is lower than the control group ($p < 0.05$). The mean values of the infected dogs' erythrocytes, hematocrit, hemoglobin, platelets, and albumin were lower than those of the control group ($p < 0.05$). The decrease in erythrocytes influenced the decrease in blood viscosity ($r=0.84$; $p<0.05$), but the thixotropic properties of the blood were maintained. Blood viscosity correlated with total proteins ($r=0.51$; $p<0.05$) and albumin ($r=0.45$; $p<0.05$) in dogs with CME. Albumin also correlated with erythrocytes ($r=0.62$; $p<0.05$), demonstrating its influence on the rheological behavior of CME. The second manuscript, based on data obtained from a control group ($N=11$), a group before ($N=7$) and after treatment with doxycycline ($N=7$), evaluated the response of rheological behavior before and after treatment with doxycycline, comparing it with hematological data and pro-inflammatory and regulatory serum cytokines. A reduction in total leukocytes and lymphocytes ($p<0.05$) was found in dogs infected by *E. canis*, even after treatment. There was an increase in monocytes, eosinophils, and platelets after treatment with doxycycline ($p<0.05$). There was a decrease in TNF α ($p<0.05$) and an increase in IL 11 β ($p<0.05$) in CME. In CME, blood viscosity correlated with IL 10 ($r= 0.797$; $p<0.05$) and IL 12 ($r=-0.838$; $p<0.05$). These data suggest that changes in leukocytes, viscosity, IL 11 β , and TNF α levels in dogs infected with *E. canis* may be important biomarkers for diagnosing the disease. Thus, hematological changes, especially in erythrocytes, serum albumin, and the cytokine profile, interfere with the rheological parameters of the blood of dogs with CME.

Keywords: canine monocytic ehrlichiosis, immunology, rheology, albumin, anemia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVO GERAL	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3.1 Etiologia	17
3.2 Breve histórico.....	18
3.3 Vetor e transmissão	19
3.4 Patogenia	20
3.5 Sinais clínicos e clinico-laboratoriais	22
3.6 Interação parasito-hospedeiro.....	24
3.6.1 Resposta imunológica – imunidade inata	24
3.6.2 Resposta imunológica – imunidade adaptativa	26
3.7 Reologia	29
3.8 Métodos diagnósticos.....	31
3.8.1 Diagnóstico parasitológico	31
3.8.2 Diagnóstico sorológico (método indireto)	32
3.8.3 Cultura e isolamento	32
3.8.4 Diagnóstico molecular	32
3.9 Tratamento	33
3.10 Prognóstico	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 Comitê de ética	36
4.2 Delineamento do estudo	36
4.3 Animais	37
4.4 Real Time PCR qualitativo (qPCR)	38
4.6 Parâmetros hematológicos.....	39
4.7 Parâmetros bioquímicos.....	39
4.8 Parâmetros hemorreológicos	39
4.9 Citocinas	40
4.10 Análise estatística	40
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
6 REFERÊNCIAS.....	41
APENDICE A	52

APENDICE B74

APENDICE C89

APENDICE D90

1 INTRODUÇÃO

As bactérias da família Anaplasmataceae podem infectar células sanguíneas como leucócitos ou plaquetas, levando a distúrbios sistêmicos em animais (SAINZ et al., 2015). A Erliquiose Monocítica Canina (CME) é causada pela *Ehrlichia canis* (*E. canis*), uma bactéria dessa família, gram-negativa, intracelular-obrigatória e com tropismo por células mononucleares. Essa bactéria comumente infecta cães domésticos, seu principal reservatório, e é transmitida por meio de picadas de carrapatos, como o ixodídeo *Rhipicephalus sanguineus*.

A EMC é uma doença com distribuição cosmopolita, que acomete principalmente regiões tropicais e subtropicais (MAVROMATIS et al., 2006). O Brasil um dos país onde a doença é mais prevalente. A taxa de prevalência varia conforme cada região do país, havendo relato de taxas entre 22% e 76% nas regiões mais quentes como Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste, enquanto na região Sul essas taxas são menores com relatos que vão de 1 a 25% (VIEIRA et al., 2011; DANTAS-TORRES et al., 2020; PACHECO et al., 2021).

A EMC possui três fases, com diferentes sinais clínicos, muitos deles inespecíficos. A fase aguda pode apresentar febre, secreção oculonasal, anorexia, emagrecimento, dispneia, linfadenopatia, esplenomegalia, mucosas pálidas, hemorragias, sinais neurológicos, trombocitopenia, edema, uremia, icterícia e claudicação (RAMAKANT; VERMA; DIWAKAR, 2020; DINIZ e AGUIAR, 2022). Na fase subclínica, os cães têm melhora clínica aparente, mas pode ter alguns sinais como esplenomegalia e febre intermitente (MYLONAKIS E THEODOROU, 2017). Alguns cães desenvolvem a forma crônica que possui pior prognóstico, que pode ter sinais leves ou graves, caracterizada por hemorragias (MYLONAKIS et al., 2004), depressão, perda de peso, linfadenopatia, trombocitopenia, anemia, pancitopenia (RAMAKANT, VERMA E DIWAKAR, 2020), poliartrite, lesões oculares graves (MYLONAKIS E THEODOROU, 2017), hepatoesplenomegalia, glomerulonefrite, linfadenopatia, emaciação, entre outros, e que podem ser fatais (SAINZ et al., 2015).

Para causar infecção, a *E. canis* precisa escapar da sua eliminação pelo sistema imunológico. Para tanto, a bactéria causa distúrbios no ambiente intracelular e modula a produção de citocinas para favorecer uma infecção persistente (LINA et

al., 2016). Inclusive, *E. canis* pode inibir a apoptose celular por diferentes vias (ZHANG et al, 2004). A sobrevivência da *Ehrlichia* no hospedeiro é dependente da inibição da resposta imunológica do tipo T helper 1 (Th1). A interleucina interferon gama (IFN- γ), ligada a resposta Th1, é responsável por ativar os monócitos infectados que eliminam os microrganismos intracelulares (LINA et al., 2016).

A infecção por *E. canis* pode levar a anormalidades hematológicas significativas em cães, como anemia, trombocitopenia e a pancitopenia (PALACIOS; ARTEAGA; CALVO, 2017; BONILLA ALDANA et al., 2022). Estudos demonstraram que algumas alterações sanguíneas em cães como anemia (SILVA et al., 2018), podem causar alterações na viscosidade sanguínea. Outras alterações que afetam o sangue como modificação da pressão arterial (DHAS; BANERJEE; MISHRA, 2020), a síndrome de hiperviscosidade (MOUTZOURI et al., 2008) e a diabetes (FRANÇA et al., 2018) podem alterar a viscosidade sanguínea em humanos. Da mesma forma, cães infectados com bactérias da família Anaplasmataceae apresentaram diminuição da viscosidade (CARDOSO et al., 2020). No entanto, os efeitos da infecção por *E. canis* em parâmetros hemorreológicos de cães, como viscosidade do sangue, ainda não foram elucidados.

A hemorreometria permite a mensuração da viscosidade sanguínea com uso do reômetro, uma ferramenta que avalia a capacidade de um líquido fluir, considerando a resistência a se dissipar ao ser lida aplicada uma pressão (KALELIOGLU et al., 2019). A viscosidade do sangue é crucial na manutenção da pressão arterial sistêmica e da gasometria (CABRALES; INTAGLIETTA; TSAI, 2005), pois ajuda a manter as propriedades reológicas do sangue e restaurar as condições homeostáticas (CABRALES; TSAI; INTAGLIETTA, 2007).

Alguns trabalhos apontam perspectivas promissoras no entendimento dos mecanismos imunopatológicos e imuno-hemorreológicos em infecções por parasitos intracelulares. As infecções, como a malária, podem causar alterações na viscosidade sanguínea, e a interação com citocinas pode atuar como um agente imunomodulador durante a infecção (SCHERER et al., 2016). É possível que cães infectados por *E. canis* tenham apresentado alterações nos níveis de citocinas, o que pode estar relacionado às alterações hematológicas da doença.

A EMC é uma doença que frequentemente é alvo de discussão em pesquisas devido a alguns fatores como: elevada taxa de infecção em cães (VIEIRA et al., 2011); difícil controle de sua transmissão por ter carrapatos vetores, que se reproduzem

facilmente em países de clima quente; o tratamento da enfermidade em geral é longo, com duração de 28 dias; as tetraciclinas: doxiciclina e minociclina, e a rifampicina podem não garantir a eliminação total de *E. canis* do organismo do hospedeiro, apesar da melhora clínica (MYLONAKIS; HARRUS; BREITSCHWERDT, 2019); A EMC tem importância epidemiológica relevante e pode ser fatal (SAINZ et al., 2015); não possui uma vacina comercial disponível (RUDOLER et al., 2012); e possui casos de infecção em humanos, o que demonstra a importância para saúde pública (PEREZ et al., 2006).

Além disso, estudos indicam que a doxiciclina é relatada como uma droga eficaz no tratamento de infecções por *E. canis* (LANZA-PEREA et al., 2009; MCLURE et al., 2010; FOURIE et al., 2015; MYLONAKIS et al., 2019) devido à sua capacidade de penetrar nas células. No entanto um autor contrapõe sobre tal eficácia nos casos subagudos e crônicos de EMC, indagando sobre a não resolução da infecção perpetuando-se os sinais clínicos que podem ser fatais (FOURIE et al., 2015). Além disso, nenhuma pesquisa estabelece uma conexão entre os efeitos da doxiciclina na viscosidade e nas citocinas.

Diante do exposto, o presente trabalho objetivou avaliar os parâmetros hemorreológicos, hematológicos, bioquímicos e de citocinas séricas em cães tratados e não tratados com doxiciclina. Tal investigação nos permite entender sobre os mecanismos imunológicos, hematológicos e bioquímicos que alteram o comportamento reológico e também como o tratamento da EMC pode influenciar nesse processo. Assim buscou-se delinear um ensaio clínico, coletando amostras de sangue e/ou medula óssea de cães naturalmente infectados por *E. canis* na cidade de Barra do Garças – MT para entender um pouco mais sobre esses mecanismos.

2 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a relação de parâmetros hemorreológicos, hematológicos, bioquímicos, e de citocinas séricas em cães com Erliquiose Monocítica Canina tratados e não tratados com doxiciclina.

2.1 Objetivos específicos:

- Caracterizar o perfil hemorreológico de cães infectados com *Ehrlichia canis*.
- Correlacionar o perfil hemorreológico com parâmetros hematológicos, bioquímicos de proteínas séricas totais, albumina e triglicérides.

Artigo 1 – Caracterização da correlação hemorreológica, hematológica e de proteínas séricas de cães infectados naturalmente por *Ehrlichia canis*

Submetido em: Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

2.1 Objetivos específicos:

- Avaliar em amostras de sangue de cães com infecção por *E. canis* tratados e não tratados com doxiciclina os parâmetros hematológicos, perfil hemorreológicos e as citocinas séricas.
- Comparar mecanismos da alteração hemorreológica correlacionada com as alterações hematológicas
- Elucidar mecanismos da alteração hemorreológica correlacionada com a produção de citocinas séricas.
- Correlacionar mecanismos de alteração hematológica correlacionada com a produção de citocinas séricas.

Artigo 2 - Effects of doxycycline treatment on hematological parameters, viscosity and cytokines in canine monocytic ehrlichiosis

Publicado em: Revista Biology - EISSN 2079-773

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Etiologia

Ehrlichia canis é uma bactéria da família Anaplasmataceae, filo Proteobacteriota, ordem Alphaproteobacteria e classe Rickettsiales (SCHOCH et al., 2020). É um microrganismo gram-negativo, intracelular-obrigatório, que se replica em vacúolos intracelulares de monócitos devido a seu tropismo específico (SONGER E POST, 2005). Esses vacúolos contêm colônias com mais de 400 células bacterianas em seu interior, e este conjunto colônica-vacúolos é denominada mórula (HACKSTADT, 1998).

Ehrlichia tem forma cocoide ou de bastonete, de tamanhos variáveis de 0,2 a 0,5 micrômetros (μm) de diâmetro e 0,8 a 2,0 μm de comprimento. Para se desenvolverem e replicarem dentro das células esses microrganismos utilizam o aminoácido para gerar energia via Adenosina Tri-Fosfato (ATP) e outros nutrientes para replicação (AZIZ et al., 2023). Cada célula bacteriana contém ácido ribonucleico (RNA), ácido desoxirribonucleico (DNA) e ribossomos (GANTA, 2013a; GANTA, 2013b). O genoma do gênero *Ehrlichia* é pequeno, possui entre 0,8 a 1,5 milhões de pares de base (ANDERSSON E KURLAND, 1998). A espécie *E. canis* possui um genoma completo de 1.315.030 pares de base que podem codificar 925 proteínas, 40 espécies de RNA estáveis, 17 pseudogenes putativos e possui uma extensa parte de sequência não codificante que representa 27% de todo seu genoma (MAVROMATIS et al., 2006).

As bactérias da família Anaplasmataceae se diferem da família Rickettsiaceae por não possuírem peptidoglicanos em suas membranas celulares (QUINN et al., 2011), e nem lipopolissacarídeos (LPS). Deste modo, a *Ehrlichia* tem apenas uma membrana de colesterol que provém da célula hospedeira que parasita (LIN E RIKIHISA, 2003). Com relação ao tropismo, as bactérias da família Anaplasmataceae infectam células de origem hematopoiética, enquanto as da família Rickettsiaceae infectam células endoteliais (QUINN et al., 2011). Durante o processo de infecção celular, as bactérias da ordem Rickettsiales possuem uma forma infectante chamada de célula de núcleo denso, que permite sua entrada na célula hospedeira, e uma forma vegetativa, chamada célula reticulada, capaz de se multiplicar por fissão

binária. Ao infectarem as novas células, as formas infectantes permanecem no interior de vacúolos, ou fagossomos, impedem a fusão com lisossomos e, depois, se tornam em formas vegetativas que se proliferam e desenvolvem a mórula. O processo inverso pode ocorrer, após a maturação das formas vegetativas, ocorre a liberação das bactérias por exocitose ou por lise das células hospedeiras, liberando-as para infectarem novas células (PRUNEAU et al., 2014).

Além de *E. canis*, há outras espécies que infectam diversos outros animais e que foram identificadas e classificadas como *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. minasensis*, *E. muris*, *E. ovina* e *E. ruminantium*. Ainda dentro do grupo de *E. canis*, há espécies que foram identificadas em mamíferos silvestres, mas ainda não cultivadas *in vitro* e, portanto, ainda não foram classificadas, são elas: *Candidatus Ehrlichia regneryi*, *Candidatus Ehrlichia shimanensis* e *Candidatus Ehrlichia zunyiensis* (SCHÖCH, et al., 2020). As espécies de *Ehrlichia* se diferenciam pela sequência de genes de RNA ribossomal 16S, que permite a divisão em três genogrupos (MAHAN et al., 1999), e pelas proteínas codificadas pelo gene *groESL* (SUMNER et al., 1997).

Dentre as espécies descritas nessa seção, apenas as espécies *E. canis*, *E. ewingii* e *E. chaffeensis* são relatadas como agentes infecciosos de cães (GANTA, 2013a; GANTA, 2013b). A infecção por *E. ewingii* em cães de Minas Gerais, em que os animais apresentaram distúrbios hematológicos, além de outros sinais de hemoparasitose (OLIVEIRA et al., 2009).

3.2 Breve histórico

No ano de 1935, na Argélia, foi observada pela primeira vez um microrganismo de características rickettsiais no interior de células mononucleares de cães. Tal microrganismos foi descrito como *Rickettsia canis* (DONATIEN E LETOSQUARD, 1935).

No ano de 1945, foi reclassificada como *E. canis* por Mashkovky (STIVAL et al., 2021). Somente na década de 70 nos Estados Unidos, a EMC foi reconhecida notoriamente como uma doença importante na medicina veterinária por causar a morte de cães pastores alemães militares que foram utilizados na guerra do Vietnã (HUXSOLL et al., 1970). Já no Brasil, foi descrito em 1973,

mórulos de *Ehrlichia* spp. infectando cães no estado de Minas Gerais, em Belo Horizonte (COSTA et al., 1973).

3.3 Vetor e transmissão

O carrapato *R. sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodida), é o principal vetor de *E. canis* que possui distribuição cosmopolita em regiões tropicais. Também é encontrado em menor escala em regiões de clima temperado, mas em condições ambientais que proporcionem seu desenvolvimento, como canis e ou áreas internas de construções (SAINZ et al., 2015). Além disso, são seres que podem sobreviver por mais de 12 meses sem alimento (BOWMAN, 2010).

Em regiões do Leste Asiático, *Haemaphysalis longicornis* é considerado o principal vetor de *E. canis*. Outros ectoparasitos também foram relatados como vetores, são eles: *Amblyomma americanum*, *Haemaphysalis yeni* e *Dermacentor variabilis* (AZIZ et al., 2022).

Uma vez infectado por *E. canis*, o vetor se torna uma fonte de infecção por toda a vida, desde a forma larval, até a adulta. Logo, mesmo após passar pelos diferentes estágios de desenvolvimento, os tecidos do carrapato se mantem, sendo classificada como uma transmissão transestadial (AZIZ et al., 2022). Em três horas após o vetor se fixar no hospedeiro, ocorre a transmissão da bactéria infectando o animal (SAINZ et al., 2015). No vetor, *E. canis* coloniza as células das glândulas salivares do aparelho bucal, os hemócitos da hemolinfa e as células intestinais (SMITH et al., 1976).

O aumento do número de casos de EMC em determinada região está correlacionado com a distribuição do vetor no ambiente, sobretudo nos períodos quentes do ano. Como o *R. sanguineus* tem predileção de repasto em canídeos, do que em outros animais, a exposição ambiental de cães em áreas endêmicas é um fator de risco considerável para infecção por *E. canis* (SAINZ et al., 2015)

A infecção ocorre no momento em que o carrapato *R. sanguineus* realiza a hematofagia em um hospedeiro suscetível. A saliva contaminada com *E. canis* presente em seu aparelho bucal é então inoculada no local de penetração no hospedeiro. As larvas, as ninfas e as formas adultas do carrapato infectadas por *E. canis* podem transmitir o patógeno. Não ocorre transmissão transovariana de *E. canis* das formas adultas de carrapatos para as formas larvais no processo de

reprodução de *R. sanguineus*. Os carrapatos apenas se infectam quando se alimentam de animais infectados que estejam em fase de bacteremia da doença, comumente na fase aguda (AZIZ et al., 2022).

Apesar da transmissão vetorial de *E. canis* é o principal modo de infecção, a transfusão sanguínea de um hospedeiro infectado para um não infectado também deve ser considerada como potencial causa de EMC em cães (SHERDING, 2006; BORIN et al., 2009).

3.4 Patogenia

A EMC é uma enfermidade com sinais clínicos inespecíficos e que podem variar de cão para cão de acordo com a fase da doença, seja ela aguda, subclínica ou crônica (AZIS et al., 2022). Estes sinais clínicos estão relacionados à patogenia da doença em que *E. canis* pode infectar diversos tecidos, causando vasculite ou perivasculite sistêmica (CASTRO et al., 2022), e ao consumo de plaquetas, de forma direta ou indiretamente (SHROPSHIRE; CHRISTINE; LAPPIN, 2018).

Além disto, a patogenia esta intimamente ligada à resposta imunológica (CASTRO et al., 2022), devido aos mecanismos de escape desenvolvidos pelo patógeno para garantir sobrevivência e multiplicação. Possui 12 diferentes proteínas de superfície que facilitam sua entrada nas células hospedeiras (MAVROMATIS et al., 2006; ROGAN et al., 2021).

O período de incubação pode durar entre 8 a 20 dias (KUMAR et al., 2023). É o período em que bacteremia e disseminação pelos tecidos levam a lesões suficientes para causar danos sistêmicos e ao aparecimento dos primeiros sinais clínicos. Os produtos da resposta inflamatória, sobretudo no fígado, desenvolvem lesões e morte celular de hepatócitos (TOMINELLO et al., 2019).

Os cães com EMC apresentam elevada produção de óxido nítrico a partir do 18º dia pós infecção, provavelmente pela resposta celular do tipo Th1 para tentar debelar o patógeno. Contudo, o óxido nítrico é um marcador de estresse oxidativo celular, que pode causar alterações em membranas celulares, ácidos nucleicos e proteínas. Este mecanismo pode estar relacionado com o agravamento de EMC em cães (DA SILVA et al., 2013).

A baixa significativa de plaquetas na EMC é o principal sinal observado nos parâmetros hematológicos dos cães (AZIS et al., 2022). Tal queda está ligada a diferentes fatores: consumo excessivo de plaquetas devido a lesões endoteliais, destruição por ação imunológica e um aumento sequestro esplênico destas plaquetas (SMITH et al, 1975; SHROPSHIRE; CHRISTINE; LAPPIN, 2018).

Foi descrito que há um fator de inibição de migração de plaquetas que favorece o sequestro esplênico (ABEYGUNAWARDENA; KAKOMA; SMITH, 1990). Assim, a trombocitopenia está ligada ao quadro de hemorragias comumente observado nos cães com EMC nas fases aguda e crônica, o que debilita bastante os cães e pode ser fatal (RAMAKANT; VERMA; DIWAKAR, 2020). Nem sempre cães com trombocitopenia grave apresentam hemorragias. Uma possível teoria seria o estado hipercoagulável e de baixa fibrinólise do sangue de cães infectados durante a fase aguda ou, ainda, um estado ativado das plaquetas durante a infecção, mesmo em contagens muito baixas de plaquetas, mas que impedem a hemorragia (SHROPSHIRE; CHRISTINE; LAPPIN, 2018).

Durante a fase aguda, a bacteremia permite a disseminação de *E. canis* e sua proliferação em tecidos linfoides. A infecção de células mononucleares do tecido linfático desenvolve uma hiperplasia celular e um aumento de órgãos linfoides e também no fígado (AZIS et al., 2022). A bacteremia durante a fase aguda é uma das prováveis causas de destruição de eritrócitos. Após a fase aguda, o hospedeiro desenvolve anticorpos para *Ehrlichia* spp., desenvolvendo uma hiperglobulinemia, fase em que animal não apresenta sinais clínicos. Então, a bactéria se aloja em tecidos do animal como o baço, um dos órgãos alvo para incubação e replicação de *E. canis*, onde persiste por anos (SAHOO et al., 2022). Um experimento utilizando técnica molecular de polimerase de reação em cadeia (PCR) em cães com suspeita de EMC, demonstrou que a *E. canis* pode não ser mais encontrada em sangue periférico durante a fase subclínica da doença. Porém a bactéria ainda ser detectada em tecidos como medula óssea, baço, fígado e linfonodos (RODRÍGUEZ-ALARCÓN et al, 2020).

A infecção persistente, quando não tratada, pode levar à forma crônica de EMC e causar aplasia de medula óssea, sendo considerada a forma mais grave da doença (AZIS et al., 2022). As hemorragias na fase crônica tem relação

direta com a trombocitopenia grave devido à hipoplasia ou aplasia de medula óssea (HARRUS et al., 1999). Além disto, devido a infecção pode afetar diretamente células mononucleares, assim o sistema imunológico torna-se bastante debilitado ocasionando uma pancitopenia. Esse processo facilita a entrada de outros patógenos e as infecções secundárias que pioram o quadro de EMC (SAHOO et al., 2022).

3.5 Sinais clínicos e clínico-laboratoriais

Na infecção experimental por *E. canis* se observa uma enfermidade com variados sinais clínicos caracterizada por três fases: aguda, subclínica ou crônica. Como mencionado anteriormente, os sinais clínicos estão relacionados à patogenia de EMC, que é sistêmica e afeta diversos tecidos, causando lesões vasculares (CASTRO et al., 2022).

Em infecções naturais por *E. canis* a distinção das fases não é clara (LIMA et al., 2021), pois os sinais clínicos e clínico laboratoriais são inespecíficos e comum às diferentes fases. Diferentes autores descrevem sinais clínicos diversos (RAMAKANT; VERMA; DIWAKAR, 2020).

Os sinais clínico-laboratoriais como anemia e trombocitopenia são comuns à grande maioria dos cães com EMC, principalmente na fase aguda (AZIS et al., 2022). A Tabela 1 apresenta os sinais clínicos e clínico laboratoriais em cada fase da doença para facilitar a compreensão.

Tabela 1 – Os sinais clínicos e demais características das fases aguda, subclínica e crônica de cães com EMC.

	Fase aguda	Referência	Fase subclínica	Referência	Fase crônica	Referência
Duração	3 a 5 semanas	RAMAKANT; VERMA; DIWAKAR, (2020)	Pode durar meses ou vários anos	MYLONAKIS; HARRUS; BREITSCHWERDT (2019) RAMAKANT; VERMA; DIWAKAR, (2020)	3 dias ou até 3 semanas	MYLONAKIS et al., 2004
Sinais clínicos	Perda de peso Anorexia Febre Depressão Linfadenomegalia Esplenomegalia Hemorragias Melena Hematêmese Mucosas pálidas Descarga ocular Sinais neurológicos Icterícia Claudicação Ascite	RAMAKANT; VERMA; DIWAKAR, 2020 RODRÍGUEZ-ALARCÓN et al., 2020	Assintomáticos ou Esplenomegalia e febre intermitente	MYLONAKIS E THEODOROU, 2017	Infecções secundárias Estomatite ulcerativa Letargia Perda de peso Depressão Hemorragias Mucosas pálidas Edema Linfadenomegalia Diátese hemorrágica Debilitação severa Sinais neurológicos Hepatoesplenomegalia Arritmias Poliúria e polidipsia Artrite	MARSHET E DESSI, 2020 RAMAKANT, VERMA E DIWAKAR, 2020 RODRÍGUEZ-ALARCÓN et al., 2020
Achados laboratoriais	Anemia Trombocitopenia Hipoproteinemia Hipoalbuminemia	RAMAKANT; VERMA; DIWAKAR, (2020)	Trombocitopenia moderada Hipergamaglobulinemia Hipoalbuminemia Anemia Leucopenia	KATAOKA et al. (2006) NAKAGHI et al. (2008) MARSHET E DESSI (2020)	Hipergamaglobulinemia Linfocitose Plasmocitose Hipoplasia de medula óssea Pancitopenia severa Trombocitopenia Anemia	RAMAKANT; VERMA; DIWAKAR, (2020) RODRÍGUEZ-ALARCÓN et al. (2020)
Prognóstico	Bom prognóstico	SAINZ et al., 2015	Bom prognóstico, quando tratado.	SKOTARCZAK, 2003	Reservado	RAMAKANT, VERMA E DIWAKAR, 2020 2020 AZIS et al., 2022

3.6 Interação parasito-hospedeiro

3.6.1 Resposta imunológica – imunidade inata

Os microrganismos intracelulares obrigatórios, tal como *E. canis*, ao infectarem seu hospedeiro, precisam resistir à imunidade inata para sobreviverem, isto é, precisam ser fagocitados por macrófagos e neutrófilos e, ainda, impedirem de serem eliminados (ABBAS et al., 2011).

Os fagócitos identificam os patógenos por receptores de superfície celular, como os receptores de membrana do tipo TOLL (TLR) ou do tipo Notch para então os fagocitarem. Para isto, é necessário que os receptores dos fagócitos reconheçam algum antígeno na superfície do patógeno, os chamados padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), principalmente peptidoglicanos ou lipopolissarídeos (LPS) (TIZZARD, 2014).

A *Ehrlichia spp.* não possui peptidoglicanos ou LPS, que são as estruturas de superfície de membrana mais conhecidas como ligantes de reconhecimento por TLR e presentes nas bactérias gram-negativas. Na superfície possuem 12 diferentes proteínas com repetição em tandem, que permite o aumento do repertório antigênico para evadir à resposta imunológica (MAVROMATIS et al., 2006).

A literatura apresenta muitos avanços sobre o conhecimento sobre a resposta imunológica em relação ao gênero *Ehrlichia*, porém os estudos referentes a *E. chafeensis* tem ganhado notoriedade, principalmente por ser a causadora da Erliquiose monocítica humana (EMH) (MCBRIDE E WALKER, 2011).

Um trabalho com *E. chafeensis* demonstrou que os receptores celulares de fagócitos envolvidos no processo de infecção são os WNT, que ativam vias de endocitose para permitir a entrada dessa bactéria, em sua forma infectante, em monócitos. Além disso, receptores WNT do hospedeiro se ligam à proteína com repetições tandem 120 (TRP120) durante a infecção. A TRP120 possui regiões que mimetizam as interações dos receptores WNT, as chamadas regiões repetitivas de motivo curto e repetitiva (SLiM) e são responsáveis pela entrada na célula hospedeira.

Outras proteínas como TRP32, TRP47 e TRP75 também estão associados com processo de interação parasito-hospedeiro e que se ligam a

fragmentos de DNA ou outras proteínas da célula hospedeira (ROGAN et al., 2021). A TRP120 também interage e ativa receptores do tipo Notch, levando a desregulação dos TLR2 e 4 da célula hospedeira (BIERLY et al., 2021). Durante processo de fagocitose, *E. chafeensis* altera a composição da membrana dos vacúolos e impede a fusão dos fagossomos com lisossomos, bem como altera o pH dentro dos vacúolos (YU E WALKER, 2016).

Os macrófagos que fagocitam os microrganismos invasores apresentam para os linfócitos T um antígeno ligado ao complexo maior de histocompatibilidade de classe II (MHC de classe II). Nesse momento, ocorre a ativação dos linfócitos T que liberam citocinas. As citocinas liberadas, como exemplo o Interferon gama (IFN- γ), ativam os macrófagos e estes passam sintetizar espécies reativas de oxigênio para eliminarem patógenos intracelulares (TIZZARD, 2014).

Em um ensaio *in vitro*, foi demonstrado que células infectadas por *E. canis* não expressam MHC de classe II (TAJIMA E WADA, 2013). Um outro estudo com infecção experimental de cães com *E. canis*, sustentou esta hipótese ao verificar que a expressão de MHC de classe II em macrófagos e histiócitos em baço e linfonodos, utilizando técnica de marcação imunohistoquímica, é reduzida em relação aos cães não infectados (CASTRO et al., 2022).

Um estudo demonstrou que camundongos infectados por *E. muris* sofrem lesões hepáticas graves e letais devido a resposta inflamatória causada pela doença. A ativação de células NK leva à liberação de citocinas pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e granzimas e que ativam a morte celular (TOMINELLO et al., 2019).

Durante a fase aguda de EMC, há aumento progressivo da produção de óxido nítrico (NO), ligada a uma resposta Th1. O NO é um mediador inflamatório que potencializa a resposta imunológica do hospedeiro e está associada ao aumento de proteínas de fase aguda como ceruloplasmina, transferrina, haptoglobina e glicoproteína ácida (DA SILVA et al., 2013).

O aumento de NO leva à oxidação de proteínas, peroxidação de lipídeos e, em resposta a esse aumento, ocorre uma ação anti-inflamatória pela produção de glutatona redutase (GR), buscando um equilíbrio. O desbalanço entre a produção de NO, GR e outros componentes antioxidativos favorecem a um aumento de lesões e sinais clínicos de maior gravidade (DA SILVA et al., 2013).

3.6.2 Resposta imunológica – imunidade adaptativa

A resposta imunológica para eliminação de patógenos intracelulares é dependente da resposta adaptativa, ou celular, envolvendo principalmente linfócitos T. A diferenciação dos linfócitos T *naive* em linfócitos T auxiliares com grupamento de diferenciação 4 (CD4+), é dependente da ativação por citocinas IL-12 produzidas por macrófagos apresentadores de antígenos, levando a resposta celular do tipo Th1. Para que ocorra a produção de IFN- γ , os linfócitos T CD4+ se ligam ao MHC de classe II dos macrófagos. Assim, o IFN- γ ativa os macrófagos em M1 para produzirem espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, eficazes para eliminação de microrganismos intracelulares (ABBAS et al., 2011).

Quando os organismos intracelulares estão localizados no citoplasma, e não em fagossomos, há estímulo para uma resposta mediada por células T citotóxicas. As células T citotóxicas (TCD8+) reconhecem as células infectadas por organismos intracelulares ao interagir com moléculas do complexo maior de histocompatibilidade de classe I (MHC de classe I). Essa interação faz as TCD8+ tornarem-se citotóxicas e secretarem enzimas e substâncias tóxicas que lisam as células e eliminam o agente (ABBAS et al., 2011).

A resposta imunológica adaptativa em cães com EMC está ligada tanto a resposta celular, com proliferação de linfócitos, quanto a resposta humoral com produção de anticorpos IgG, IgM e IgE (CASTRO et al. 2022). A soroconversão de cães infectados com *E. canis* ocorre a partir dos 21 dias pós infecção, com maior produção do isótipo IgG2. A produção de IgM e IgG1 costuma ser baixa em cães com EMC (MCBRIDE et al., 2003). Um trabalho relatou que cães infectados por *E. canis* de forma natural parecem não apresentar diferenças na concentração sérica das citocinas TNF- α e IL-10 em relação a cães não infectados (LIMA et al., 2015). Durante a fase aguda de EMC, um estudo experimental demonstrou que leucócitos e esplenócitos apresentam elevada produção de TNF- α e de IL-10. Com o passar do tempo, apenas os leucócitos apresentam produção de IFN- γ e ainda em baixa escala (FARIA et al., 2011). Outro trabalho também verificou elevada produção de TNF- α em infecção experimental por *E. canis* (TAJIMA E RIKIHISA, 2005).

A cepa Oklahoma de *E. canis* leva a uma produção de IgG2 e a uma

persistente expressão de mRNA para TNF- α e IFN- γ (TAJIMA E RIKIHISA, 2005). Já a cepa New Mexico, foi verificada a produção persistente de IL-1 β e IL-8 (UNVER; HUANG; RIKIHISA, 2006).

Em estudo experimental de infecção por *E. canis* em cães, foi verificada uma resposta celular do tipo Th1 em tecidos linfoides e regiões perivasculares de órgãos como fígado, rim, pulmão, sistema nervoso central, coração e intestino. Também ocorreu aumento de linfócitos T CD3+ e linfócitos B ativados na fase aguda, que expressam principalmente IgG2+, IgG1+ e IgE+, tanto em órgãos linfoides, quanto em tecidos com perivascularite (CASTRO et al., 2022).

Em infecções por *Erhlichia* sp. há falta de estímulos para produção de IL-12 e inibição da produção de citocinas IL-15 e IL-18 pelas células mononucleares e, assim, impede a produção de IFN- γ por células NK e células do perfil Th1. A ausência ou baixa produção de IFN- γ impede a ativação dos macrófagos para eliminarem patógenos intracelulares. As células NK e células T citotóxicas são importantes na resposta imunológica a bactérias intracelulares, porém a ausência de IL-15 e IL-18 são importantes para ativação dessas células (ZHANG et al., 2004)

É indiscutível a importância do sistema imunológico para resposta do organismo animal à entrada de patógenos. Além da ação de leucócitos, outros tipos celulares são capazes de responder a uma infecção. Quando uma célula não leucocitária é infectada, um dos mecanismos de defesa é a morte celular. A ativação da apoptose da célula infectada constitui um mecanismo eficiente de defesa (BIERLY et al., 2022).

A ativação da apoptose pode ocorrer pelas vias extrínseca e intrínseca, ou ainda uma terceira via, mediada por células T citotóxicas ou por granzimas/perforinas. Essas três vias levam à execução da apoptose, pela clivagem das caspases 3. Isso gera a desintegração do DNA, de proteínas nucleares e do citoesqueleto. Os corpos apoptóticos formados expressam ligantes para fagócitos em sua superfície para então serem fagocitados e eliminados (OBENG, 2021; SINGH et al., 2022).

Os patógenos intracelulares obrigatórios se desenvolvem e multiplicam no interior das células infectadas, utilizando o aparelho celular do hospedeiro, bem como seus nutrientes. É essencial que esses patógenos possuam diversos mecanismos reguladores que impedem ou perturbam o ambiente celular para que

não ocorra a apoptose. Geralmente a via intrínseca, mediada por mitocôndrias, está envolvida na regulação por esses patógenos (ZHANG et al., 2009).

Um dos mecanismos de inibição da apoptose por *E. chafeensis* é a desregulação da proteína cinase ativada por estresse 2 (JNK2), que é expressa pela via de transdução de sinal das proteínas ativadas por mitógenos (MAPK). A JNK2 é uma proteína importante para controle da apoptose e sua ausência causa defeito no processo de morte celular mitocôndria. A bactéria é capaz de inibir a apoptose pela via intrínseca, ligada à mitocôndria, pela desregulação de JNK2 ou pelas vias de sinalização de MAPK. A partir das primeiras horas pós infecção, *E. chafeensis* é capaz de inibir a apoptose e favorecer o prolongamento da vida da célula infectada (ZHANG et al., 2004).

Outro mecanismo de *E. chafeensis* ligado à inibição da apoptose pela via intrínseca é a o mimetismo da proteína TRP120, em uma das suas porções Slim, que ativa a via Hedgehog (HGD), que modula a ação da proteína BCL-2 da membrana mitocondrial, que possui ação antiapoptótica. A HGD é uma importante via de inibição da apoptose em células eucarióticas, e sua inibição promove a morte celular (BYERLY et al., 2022). De modo similar, a proteína TRP120 ligante de Wnt de *E. chafeensis* promove a desativação da via de sinalização Hippo, que por sua vez ativa ação da proteína YAP para gerar uma regulação positiva da proteína GLUT1 envolvida no metabolismo de glicose mitocondrial e que permite a estabilidade da mitocôndria. Este mecanismo favorece ao prolongamento da vida células infectada (BIERLY et al., 2023). O receptor Notch intracelular também é ativado pela TRP120 de *E. chafeensis*, em uma porção Slim, o que promove uma interação com a proteína X ligada a inibição da apoptose (XIAP). XIAP é uma proteína capaz de inibir a ativação das caspases 3 e 9, o que leva a inibição da apoptose (PATTERSON et al., 2023).

Em estudo de infecção experimental por *E. canis* em cães durante a fase aguda, foi demonstrado que ocorre aumento da expressão de BCL-2 por células mononucleares no baço, linfonodos e fígado. De modo diretamente proporcional também aumento o número de células apoptóticas. Também demonstrou que as células possuíam uma baixa marcação de Bax, e que esse resultado indicaria que a ativação da apoptose ocorreria pela via extrínseca (SANCHEZ et al., 2012).

3.7 Reologia

A reologia estuda o comportamento dos fluidos em se deformarem sob pressão e a resistência periférica que sofrem ao se dissiparem. O comportamento hemorreológico pode ser influenciado pelos componentes celulares e do plasma sanguíneo, a viscosidade sanguínea, a resistência periférica sobre os vasos sanguíneos, o volume circulante do sangue e a pressão do fluxo sanguíneo intravascular (MARTINS E SILVA, 1983). A capacidade de deformação eritrocitária é influenciada pela pressão sanguínea intravascular, independente do calibre do vaso, e este fenômeno é importante para manutenção do fluxo sanguíneo tanto na macro, quanto na microcirculação (MARTINS E SILVA, 1983). Na medicina veterinária, este campo de estudo ainda possui uma gama de informações a serem investigadas, pois a maioria dos trabalhos ainda ocorre com pesquisa em humanos.

A hemorreometria permite a mensuração da viscosidade sanguínea com utilização do reômetro, uma ferramenta que mensura a capacidade de um líquido fluir com base em sua resistência a se dissipar ao ser aplicada uma pressão sobre ele (KALELIOGLU et al., 2019). A viscosidade sanguínea pode ser alterada frente à algumas enfermidades que afetam o sangue ou seus componentes, assim este parâmetro é importante ser avaliado e monitorado em pacientes com doenças que sabidamente afetam o comportamento reológico.

Um fator que altera a viscosidade do sangue de forma marcante é a concentração de eritrócitos, pois pacientes com anemia demonstram diminuição da viscosidade (MENDLOWITZ, 1948). O aumento da concentração de leucócitos e de plaquetas no sangue podem perturbar o fluxo normal da passagem de eritrócitos, principalmente na microcirculação devido ao menor calibre dos capilares. Em outras palavras, o sangue se comporta similarmente a um fluido viscoso, apresentando diferentes viscosidades dependendo da quantidade de células, plaquetas e outros solutos sanguíneos (MARTINS E SILVA, 1983; BASKURT E MEISELMAN, 2003), desta forma, se uma enfermidade altera a quantidade de células, a deformabilidade eritrocitária ou componentes séricos, a viscosidade também é alterada.

Em indivíduos com hipertensão, a pressão excessiva sobre os eritrócitos

prejudica sua deformabilidade e isso atrapalha o fluxo normal do fluido pelos vasos sanguíneos (MARTINS E SILVA, 1983). Do mesmo modo, em pacientes com síndrome da hiperviscosidade, o monitoramento do comportamento reológico do sangue é essencial para avaliação do tratamento adotado nessa condição (REINHART E BERCHTOLD, 1992). Além disto, cães infectados experimentalmente por *E. canis* demonstraram que o sangue se torna hipercoagulável em comparação aos não infectados (SHROPSHIRE; CHRISTINE; LAPPIN, 2018).

A propriedade tixotrópica do sangue, isto é, a capacidade de manutenção do fluxo sanguíneo ao alterar a viscosidade frente às diferentes taxas de cisalhamento, ou grau de deformação, ao sofrer uma força compressiva durante a passagem pelos vasos sanguíneos de diferentes calibres, é importante para manter a integridade dos eritrócitos circulantes. A capacidade de deformação eritrocitária frente à taxa de cisalhamento sob às diferentes pressões sanguíneas, é um mecanismo importante para manutenção do fluxo sanguíneo. A análise reométrica de fluidos não newtonianos, tal como o sangue, revela uma curva ascendente e outra descendente que não se sobrepõem e delimitam uma área de histerese entre elas que determina a magnitude da propriedade tixotrópica (FRANÇA et al., 2014; SCHERER et al., 2016).

Para compreensão de como ocorre a imunomodulação do comportamento reológico do sangue em resposta às alterações hematológicas causadas por doenças metabólicas ou infecciosas, a alteração da viscosidade do sangue pode ser comparada entre doentes e sadios, e esses dados correlacionados com o perfil de citocinas para investigação do processo imunofisiopatológico, como demonstrado por França et al. (2014) e Scherer et al. (2016).

Distúrbios agudos levam a alteração da deformabilidade fisiológica dos eritrócitos, provavelmente mediada por fatores plasmáticos, enquanto em distúrbios crônicos, como ocorre em diabetes mellitus crônica em humanos, observa-se alteração das características físicas dos eritrócitos (LINDERKAMP et al., 1999). A alteração da capacidade de deformabilidade dos eritrócitos, somadas a outros fatores como aumento da osmolaridade sérica (RIZVI & ZAID, 2001) e lesões endoteliais, levam à síndrome de hiperviscosidade do sangue (MOUTZOURI et al., 2008).

Tanto a viscosidade, quanto o fluxo sanguíneo se tornam comprometidos

às alterações celulares e plasmáticas que ocorrem em diversas enfermidades. Em doenças infecciosas, como as causadas por parasitos intracelulares obrigatórios, pode ocorrer a diminuição da viscosidade sanguínea, como observado em cães com Leishmaniose Visceral Canina (SILVA et al., 2018).

A hemorreologia foi utilizada em pesquisas para auxiliar no entendimento de doenças por parasitos do sangue como o *Plasmodium vivax*, agente causador da malária. Indivíduos infectados mostraram elevação da viscosidade sanguínea e elevados níveis de IFN- γ e de IL-17, além de baixa concentração de TGF- β , em comparação aos não infectados (SCHERER et al, 2016).

A reometria é considerada como uma técnica auxiliar de baixo custo e que pode servir como uma ferramenta de monitoração das condições hematológicas e do comportamento hemorreológico de animais infectados por doenças infecciosas, tal como demonstrado em um estudo que avaliou cães naturalmente infectados com *Leishmania* sp. (SILVA et al., 2018), e outro que avaliou cães infectados por bactérias da família *Anaplasmataceae* (CARDOSO et al., 2020).

3.8 Métodos diagnósticos

3.8.1 Diagnóstico parasitológico

A visualização de mórulas de *Ehrlichia* em esfregaços sanguíneos é uma forma rápida de diagnóstico e de baixo custo. Contudo, o encontro de mórulas em análise de esfregaços sanguíneos de cães com infecções natural por *E. canis* pode ser comprometido devido uma baixa parasitemia durante a fase aguda (SAINZ et al, 2015). Assim, são necessários outros exames para se obter um diagnóstico mais preciso.

As amostras de sangue periférico de cães com suspeita de EMC em que não foram visualizadas mórulas, não assegura que o animal é realmente negativo (BORIN et al., 2009), devendo ser realizados outros testes para investigação diagnóstica.

Além disto, outros patógenos podem infectar células mononucleares, assim o diagnóstico diferencial precisa ser considerado, bem como evitar a classificação do cão como falso-negativo nos casos em que as mórulas não são visualizadas (MYLONAKIS et al., 2003).

3.8.2 Diagnóstico sorológico (método indireto)

Os testes comerciais disponíveis que detectam anticorpos para *Ehrlichia* são utilizados para triagem diagnóstica (NAKAGHI et al., 2008), mas não são tão sensíveis quanto os testes laboratoriais quantitativos de ensaio imunoenzimático (ELISA) ou reação de imunofluorescência indireta (RIFI), que marcam o alvo específico com anticorpos, podendo ser utilizado como diagnóstico definitivo (DAVOUST et al, 1991; SILVA et al., 2010).

Os testes sorológicos como RIFI e ELISA permitem a quantificação de anticorpos para titulação e pode ser usado em diferentes fases para analisar a variação de anticorpos ao longo do tempo. Contudo, animais que já debelaram o patógeno dos tecidos podem conter anticorpos por meses ou anos, sendo necessário realizar outro exame para detecção de material genético (AZIZ et al., 2022).

3.8.3 Cultura e isolamento

A cultura de bactérias intracelulares é importante para caracterização da cepa de *Ehrlichia canis* e mais comumente utilizado em pesquisas (AGUIAR et al., 2008).

As bactérias da ordem Rickettsiales são cultivadas em meios de cultura celulares em condições controladas, e o processo de multiplicação dessas bactérias é de longo período, o que torna o processo de diagnóstico mais lento (MCCLURE et al., 2017).

3.8.4 Diagnóstico molecular

Os exames moleculares auxiliam no diagnóstico da erliquiose e também no acompanhamento da eficácia do tratamento. Em áreas endêmicas e elevada taxa de infecção em cães, mesmo com a visualização de mórulas de *Ehrlichia* sp. em esfregaços sanguíneos, o exame molecular é importante para identificar e diferenciar as espécies de *Ehrlichia* sp. que podem ser transmitidas aos cães. A PCR convencional é uma técnica de detecção de material genético de *E. canis* e

que possui elevadas especificidade e sensibilidade, porém é apenas um exame qualitativo (NAKAGHI et al., 2010).

A técnica molecular de Real Time PCR (qPCR) quantitativa é uma técnica mais moderna e permite a contagem da carga parasitária e ainda é mais segura contra possíveis contaminações durante processamento de amplificação e leitura do resultado (DOYLE et al., 2005). Do mesmo modo, a qPCR qualitativa é uma técnica moderna para diagnóstico de qualquer hemoparasitose em cães, mas não fornece o valor da carga parasitária das amostras analisadas (Karunakaran; Sasidharan; Gopinathan, 2019).

Casos de EMC na fase subclínica, a *E. canis* pode não estar em sangue periférico e, portanto, os exames moleculares podem ter maior chance de detecção de material genético de *E. canis* a partir de aspirados de medula óssea (MYLONAKIS et al., 2003; BORIN et al., 2009).

3.9 Tratamento

A droga mais utilizada para tratamento de EMC é a doxiciclina pelo seu fácil acesso comercial, porém outras drogas do grupo das tetraciclina também podem ser utilizadas, como a minociclina. As tetraciclina possuem amplo espectro e atuam impedindo a síntese proteica ao inibir a ligação de aminoacil-tRNA ao ribossomo bacteriano. Muitos trabalhos falam sobre a duração a antibioticoterapia variando entre 1 a 8 semanas, utilizando doses 5mg/kg duas vezes ao dia (BID) ou 10 mg/kg uma vez ao dia (SID), via oral (PO) (SHROPSHIRE; OLVER; LAPPIN, 2018; MYLONAKIS et al., 2019). A dose de 10mg/kg, BID, pode ser indicada dependendo do caso (DOS ANJOS et al., 2020). As doses de 5 a 10 mg/kg, utilizando-se por período acima de 2 semanas, apresentaram eficácia na eliminação de *E. canis*, verificado por técnica de molecular de polimerase de reação em cadeia (PCR) a negatividade das amostras dos cães avaliados. Já a minociclina é recomendada no tratamento de EMC na dose de 10mg/kg, BID, por 4 semanas (JENKIS et al., 2018; MYLONAKIS et al., 2019).

Além do efeito de antibiótico, a doxiciclina tem efeito sobre plaquetas e linfócitos, capaz de melhorar a trombocitopenia causada pela infecção

(SHROPSHIRE; OLVER; LAPPIN, 2018), porém também causa uma diminuição nos linfócitos por induzir apoptose (VILLAESCUSA et al., 2015). Além disso, o tratamento com doxiciclina por 28 dias é capaz de alterar o efeito de alteração na coagulação em cães com EMC, normalizando o efeito fibrinolítico do plasma sanguíneo (SHROPSHIRE; OLVER; LAPPIN, 2018).

A minociclina é uma tetraciclina que pode ser utilizada alternativamente à doxiciclina no tratamento de EMC e com eficácia relatada em estudos. Ao comparar o tratamento de cães com EMC com doxiciclina na dose de 10mg/kg, SID, por 3 semanas, e minociclina 20mg/kg, BID, por 3 semana, demonstrou que a minociclina trouxe melhores resultados nos parâmetros hematológicos e bioquímicos (KUMAR et al., 2023). Já a oxitetraciclina de longa ação parece ter um bom efeito no tratamento de EMC, na dose de 20mg/kg, sendo aplicada uma dose a cada 72h, por 1 semana (PEÑA et al., 2018).

A rifampicina é uma droga inibidora da subunidade B de DNA -dependente da RNA polimerase e que possui eficácia para tratamento de cães com EMC (MYLONAKIS et al., 2019). O tratamento na dose de 15mg/kg, BID, via oral, por 1 semana (SCHAEFER et al., 2008) parece ter melhor resultado quando comparado com o tratamento na dose de 10mg/kg, SID, via oral por 3 semanas (THEODOROU et al., 2013).

O diprionato de imidocarb é uma droga utilizada para tratamento de babesiose em cães. Em casos de co-infecções de *Babesia* sp. e *E. canis*, pode ser feito um tratamento com esta droga (SAINZ et al., 2015). Porém, não é mais indicado seu uso para tratamento de cães apenas com EMC (MYLONAKIS et al., 2019). Outras drogas como cloranfenicol, amicarbalida (KUMAR et al., 2023), enrofloxacin (MYLONAKIS et al., 2019), já foram relatados no tratamento de cães com EMC. O tiamfenicol é menos tóxico que o cloranfenicol, e testes *in vitro* demonstraram que o tiamfenicol é mais ativo em comparação ao cloranfenicol. As bactérias *E. canis* e *E. chafeensis* possuem pouca suscetibilidade às fluoroquinolonas (BRANGER; ROLAIN; RAOULT, 2004).

A combinação de doxiciclina com associações e outras drogas, como a prednisona ou ainda com homeopatia (RISHEEN et al., 2022) são relatadas como tratamentos eficientes. A utilização de prednisona na dose de 2mg/kg, PO, SID, por 5 dias, com doxiciclina 5mg/kg, BID, por 28 dias, não apresentou resultado diferentes em comparação com uso de doxiciclina na mesma dosagem e de forma

isolada, demonstrando que ambos tratamentos foram eficazes para melhora clínica dos parâmetros hematológicos e de proteinograma. A associação de doxiciclina, 10mg/kg, SID, com substância homeopática a base de *Crotalus horridus* 200C, na dose 4 pílulas, quatro vezes ao dia (QID) demonstrou melhores resultados nos parâmetros hematológicos quando comparados na utilização isolada de doxiciclina ou de *Crotalus horridus* 200C (RISHEEN et al., 2022).

O levamisol é um anti-helmíntico que também possui ação imunomodulatória. A associação de doxiciclina, 10mg/kg, SID, por 28 dias, com o uso de levamisol na dose de 1mg/kg, via subcutânea, em dose única, é capaz de melhorar as taxas de linfócitos e monócitos, bem como o aumento da concentração total de leucócitos em cães tratados para EMC (SOUZA et al., 2013).

A escolha da antibioticoterapia para tratamentos de cães com EMC depende da avaliação clínica do paciente. Os cães com pancitopenia por aplasia medular são casos que requerem maior atenção. O tratamento clínico baseado em evidências científicas, como o uso de doxiciclina ou rifampicina nas doses recomendadas, aparecem ser as melhores opções disponíveis até o momento, com base na literatura (MYLONAKIS et al., 2019).

A utilização de citocinas para modular uma resposta imunológica em pacientes com doenças infecciosas com alterações hematológicas é alvo de discussões em pesquisas (SCHERER et al., 2016). Entender os mecanismos fisiopatológicos e imunológicos envolvidos em cães com EMC é fundamental para buscar tratamentos alternativos que favoreçam a qualidade de saúde do animal e na melhora das respostas hematológicas e bioquímicas.

3.10 Prognóstico

O prognóstico depende da fase da doença e da severidade dos sinais clínicos. Alguns cães podem sobreviver à fase aguda e eliminar o agente, porém alguns desenvolvem a forma subclínica, com nenhum ou poucos sinais clínicos e alterações clínico-laboratoriais (KATAOKA et al., 2006; NAKAGHI et al., 2008; MARSHET E DESSI, 2020). Os cães mais susceptíveis, como Pastores Alemães e Huskys Siberianos possuem maior taxa de mortalidade em relação a outros cães, devido a uma menor resposta celular ao patógeno e desenvolvem sinais

clínicos mais graves (SAINZ et al., 2015).

A fase subclínica, que geralmente apresenta apenas trombocitopenia e hiperglobulinemia (AZIS et al, 2022), possui melhor prognóstico em comparação a fase crônica, e os cães costumam responder ao tratamento.

A fase crônica de EMC possui prognóstico reservado, principalmente quando os sinais clínicos são bastante intensos e animal deixa de responder à terapia com antibióticos. A pancitopenia e as infecções secundárias também prejudicam o tratamento e, normalmente, cães neste estágio sucumbem (SAHOO et a., 2022).

Ao levar em conta um tratamento adequado da enfermidade, seja nas fases aguda e subclínica, o trabalho em conjunto entre o clínico veterinário e o tutor do animal é necessário para ter administração da dose correta de doxiciclina e também no período indicado de 4 semanas. Quando o tratamento é feito em período mais curto, os cães ainda se mantem portadores assintomáticos (Sainz et al., 2015). Assim, após final do tratamento, a realização de um exame molecular de PCR por auxiliar na verificação da negatividade do paciente (Sainz et al., 2015).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Comitê de ética

Os procedimentos experimentais desenvolvidos neste trabalho foram aprovados em 05/02/2021 pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade de Mato Grosso – Campus Universitário Araguaia (nº 23108.087992/2020-21) e a coleta de amostras e divulgação dos resultados foram autorizados pelos tutores do cão, mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

4.2 Delineamento do estudo

Em um estudo prospectivo foram avaliados clinicamente cães no Hospital Veterinário Animais e Cia da cidade de Barra do Garças, sem distinção de raça ou sexo, de diferentes idades, selecionados aleatoriamente. Os animais que apresentavam sinais clínicos sugestivos de EMC e tiveram resultados positivos

para *E. canis* em teste de PCR foram inclusos no estudo. Também foram examinados cães hígidos, para se obter o grupo controle do estudo. Os dados obtidos eram anotados em fichas individuais para cada cão.

Amostras positivas para *E. canis* em qPCR foram incluídas no estudo. Além disso, amostras que apresentaram amplificação de DNA em qPCR para *Leishmania infantum* e *Babesia* sp. seriam excluídos, portanto foram excluídos um total de 19 animais que apresentaram positividade para *Leishmania*.

Os cães foram acompanhados durante o tratamento com doxiciclina, na dose de 10mg/kg, BID por 28 dias. Após este período, foi solicitado aos tutores nova coleta para obtenção de amostras de sangue e soro.

As amostras de sangue fresco dos animais com suspeita de EMC ou positivos no teste de PCR foram submetidas à análise reológica no Laboratório Cronoimunomodulação da UFMT – campus Araguaia II. Essas amostras também foram submetidas a exame de hemograma e bioquímicos no Hospital Veterinário Animais e Cia.

Posteriormente, as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Leishmaniose da UFMT – campus Cuiabá para submetidas à exame de PCR e/ou qPCR para definição de grupos negativos, positivos antes e pós tratamento. As amostras positivas para *E. canis*, tanto antes quanto pós tratamento, foram submetidas a mensuração de citocinas séricas em citometria de fluxo para avaliação da resposta de produção de citocinas no Laboratório de Cronoimunomodulação da UFMT – campus Araguaia II.

4.3 Animais

Durante os anos 2021 a 2022 foram coletadas amostras sangue e/ou medula óssea de 59 cães, de modo aleatório, provenientes do Hospital Veterinário Animais e Cia, da cidade de Barra do Garças, Estado de Mato Grosso, Brasil (-15.8891, 15 ° 53' 24" Sul, -52.2634, 52° 15' 24" Oeste).

Os cães passaram por avaliação clínica e clínico-laboratorial. Os cães com sinais clínicos sugestivos de EMC e positivos em teste molecular de qPCR para *E. canis*, foram os critérios de inclusão neste estudo. Dentre os critérios de exclusão do estudo estão a positividade dos animais para *Leishmania* sp. (18 cães), animais menores de um ano de idade, e animais em que o tutor não

autorizou a pesquisa (1 cão), sendo excluídos ao todo 19 cães. Assim, foram obtidos 20 cães para o grupo de animais com suspeita clínica de EMC e positivos para *E. canis* e 20 cães para o grupo controle, selecionados pela ausência de sinais clínicos sugestivos de EMC e negativos para hemoparasitoses (*Leishmania infantum*, *Babesia* sp. e *Ehrlichia canis*).

Os cães positivos receberam tratamento para Erliquiose Monocítica Canina com doxiciclina na dose de 10mg/kg, a cada 12 horas por 28 dias consecutivos (Mylonakis et al., 2019). Contudo, apenas 7 tutores trouxeram seus animais para verificação do pós-tratamento.

4.4 Real Time PCR qualitativo (qPCR)

A extração de DNA de sangue total foi realizada usando o método fenol-clorofórmio (SAMBROOK E RUSSELL, 2001). O DNA foi dissolvido em 20mg/ml de água ultrapura e armazenado a -20°C. Para garantir a pureza do DNA e a ausência de inibidores, testamos as amostras usando um método de PCR para detectar o gene da β -globina canina. Este gene amplifica um fragmento de 119pb (QUARESMA et al., 2009). O processo de detecção de DNA utilizou os oligonucleotídeos E_can0503F (5'-CAG CAA ATT CCA ATC TGC ACT TC-3') e E_can0503R (5'-GAG CTT CCA ATT GAT GGGTCT G-3') nos quais o gene Ecaj_0503 codifica 147 pares de bases de uma proteína hipotética [sistema E_can0701] (SOCOLOVSKI et al., 2012).

A análise de PCR qualitativa foi realizada usando um sistema StepOne™ Real-Time PCR System Sequence Detection (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). As reações foram preparadas em um volume final de 25 μ l contendo intercaladores não específicos de DNA dupla fita (Sybr Green® Master Mix, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), 0,3 μ M de cada iniciador e 2 μ l de DNA alvo. O programa de reação consistiu nas seguintes etapas: 94°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C por 15 segundos para desnaturação e 60°C por 30 segundos para anelamento e extensão.

O controle positivo foi um animal positivo para *E. canis* na PCR com mórulas no esfregaço de sangue e o controle negativo (reação livre de DNA) foi incluído em todas as PCR. Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Todos foram corados com Gel Red e visualizados em

transiluminador (UV-300nm) Chemi-doc (Bio-Rad TM, Berkeley, Califórnia, EUA).

E a qPCR para *Leishmania infantum* utilizou os oligonucleotídeos RV1–5'-CTT TTC TGG TCC GGG TAG G-3' and RV2–5'-CCA CCT GGC TAT TTT ACA CCA-3', que amplificam 145 bp cinetoplasto de *L. infantum* (Lachaud et al., 2002).

4.5 Polimerase de Reação em cadeia (PCR) convencional

Na PCR para *Babesia* sp. foram utilizados oligonucleotídeos BAB143-167 -5'- CCG TGC TAA TTG TAG GGC TAA TAC A - 3' e BAB694-667 - 5'- GCT TGA AAC ACT CTA RTT TTC TCA AAG - 3' que amplifica uma região de aproximadamente 550pb do gene 18S rRNA (Almeida et al., 2012). Os produtos amplificados foram fracionados em eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com gel red e visualizados em transluminador (UV-300 nm).

4.6 Parâmetros hematológicos

Amostras de sangue total com EDTA dos cães foram enviadas para análise laboratorial no Hospital Veterinário Animais e Cia, Barra do Garças - MT, para obtenção de dados hematológicos como eritrograma, leucograma e contagem de plaquetas em aparelho automatizado Icounter Vet, modelo D Check D Plus [DIAGNO®, Belo Horizonte, Brasil], segundo Sirois (2020). Os valores de referência foram considerados conforme proposto por Rizzi, Meinkoth e Clinkenbeard (2010).

4.7 Parâmetros bioquímicos

Amostras de soro dos cães foram enviadas para análise laboratorial no Hospital Veterinário Animais e Cia, Barra do Garças - MT, para obtenção de dados bioquímicos como proteína total, albumina, globulinas, relação A/G e triglicérides em aparelho automatizado Smart 200+ [BioTécnica®, Varginha, Brasil], segundo Sirois (2020). Os valores de referência foram considerados conforme proposto por Rizzi, Meinkoth e Clinkenbeard (2010).

4.8 Parâmetros hemorreológicos

O sangue total com EDTA de cada cão foi submetido à análise hemorreométrica para obter dados sobre a viscosidade do sangue. Foi utilizado um reômetro modular compacto, modelo Anton-Paar® Cone-Plate – MCR 102 [Anton Paar® GmbH, Ostfildern, Alemanha], e os gráficos foram obtidos com o software Rheoplus.

Para análise hemorreométrica foram utilizados 750µL de sangue total com EDTA mantendo a temperatura de 37°C na placa com 60 pontos de medição de fluxo, conforme proposto por França et al. (2014).

4.9 Citocinas

As amostras de soro sanguíneo do cão foram submetidas ao preparo para exame de citometria de fluxo. Foram mensuradas citocinas pró-inflamatórias e reguladoras, como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α , segundo Scherer et al. (2016) e Silva et al. (2018).

Esse processo foi realizado com Citômetro de Fluxo, modelo FACScalibur BD®, com marcação específica por anticorpos. Os kits Cytometric Bead Array (CBA) (BD Biosciences, USA®) foram utilizados para essa quantificação, e o processo foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

4.10 Análise estatística

Os dados foram expressos como valores médios e estavam dentro da curva de normalidade. As diferenças estatisticamente significativas nos valores médios hematológicos, viscosidade sanguínea e citocinas séricas entre os grupos foram analisadas usando o teste paramétrico ANOVA (um critério) para análise de variância com pós-teste de Tukey. Para análise de variância comparativa dos resultados de médias dos grupos antes e pós tratamento com doxiciclina foi utilizado Teste t de Student. As correlações entre parâmetros hematológicos, viscosidade sanguínea e citocinas séricas foram analisadas pela correlação linear de Pearson. O software utilizado para análise estatística foi o Bioestat 5.0. A significância estatística foi estabelecida para valores de P menores que 0,05.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A EMC é uma enfermidade multissistêmica e complexa que acomete cães em todo o mundo. As alterações hematológicas, principalmente em eritrócitos, interferem nos parâmetros reológicos do sangue. Portanto, qualquer outro componente ou parâmetro que interaja com estes dois primeiros pode influenciar indiretamente a viscosidade sanguínea de cães com EMC.

A albumina é uma importante proteína de fase aguda negativa a ser monitorada em cães com EMC e está relacionada à alteração com a diminuição da viscosidade sanguínea nestes animais.

As alterações hematológicas e de citocinas séricas perturbam as propriedades reológicas do sangue. Os cães infectados com *E. canis* parecem se adaptar às alterações hemorreológicas e assim garantir o fluxo sanguíneo para todos os tecidos. A qPCR demonstrou ser uma técnica diagnóstica sensível e específica para detecção de *E. canis* e que pode ser utilizada com segurança para acompanhamento do tratamento de EMC.

O tratamento com doxiciclina na dose de 10mg/kg, BID, por 28 dias se mostrou eficaz na correção de parâmetros hematológicos, com exceção dos linfócitos que diminuem após o tratamento. O tratamento com doxiciclina também parece influenciar na alteração do comportamento reológico, pois o grupo de cães infectados e no pós-tratamento, apresentaram média da viscosidade sanguínea menor em relação ao grupo antes do tratamento. A busca pelo entendimento desse mecanismo com auxílio da imunologia pode evidenciar novas interações que ocorrem com os parâmetros reológicos e porque se alteram.

Mais estudos são necessários para compreender as alterações hemorreológicas em cães com EMC, envolvendo principalmente citocinas para elucidar o papel de outras proteínas séricas e do perfil lipídico no comportamento hemorreológico.

6 REFERÊNCIAS

ABBAS AK, LICHTMAN AH, PILAI S. Imunidade contra microrganismos. In: _____ **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011:345-364

ABEYGUNAWARDENA, I.; KAKOMA, I.; SMITH, R. D. Pathophysiology of canine ehrlichiosis. In: WILLIAMS, J. C.; KAKOMA, I., **Ehrlichiosis. A Vector-Borne**

Disease of Animals and Humans. Washington: Kluwer Academic Press, 1990, p. 78-92.

AGUIAR, D. M.; HAGIWARA, M. K.; LABRUMA, M. B. In vitro isolation and molecular characterization of an *Ehrlichia canis* strain from São Paulo, Brazil, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 489-493, 2008.

ANDERSSON, S. G.; KURLAND, C. G. Reductive evolution of resident genomes. **Trends in Microbiology**, v. 6, p. 263-268, 1998

AZIZ, M. U.; HUSSAIN, S.; SONG, B.; GHOURI, H. N.; ZEB, J., SPARAGANO, O. A. Ehrlichiosis in Dogs: A Comprehensive Review about the Pathogen and Its Vectors with Emphasis on South and East Asian Countries. **Archives of Veterinary Sciences**, v. 10, n. 1: p. 21, 2022.

BASKURT, O. K.; MEISELMAN, H. J. Blood rheology and hemodynamics. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 29, n. 5, p. 435-450, 2003.

BONILLA-ALDANA, D. K.; GUTIÉRREZ-GRAJALES, E. J.; OSORIO-NAVIA, D.; CHACÓN-PEÑA, M.; TREJOS-MENDOZA, A. E.; PÉREZ-VARGAS, S.; VALENCIA-MEJÍA, L.; MARÍNARBOLEDA, L. F.; MARTÍNEZ-HIDALGO, J. P.; REINA-MORA, M. A.; et al. Hematological Alterations Associated with Selected Vector-Borne Infections and Exposure in Dogs from Pereira, Risaralda, Colombia. **Animals**, v. 12, n. 24, p. 3460, 2022.

BORIN, S.; CRIVELANTI, L. Z.; FERREIRA, F. A. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de *Ehrlichia* spp. naturalmente infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 566-571, 2009.

BOWMAN DD. Artrópodes. In: _____ Georgis – Parasitologia Veterinária. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010, p. 4-70.

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

BYERLY, C. D.; MITRA, S.; PATTERSON, L. L.; PITTMER, N. A.; VELAYUTHAM, T. S.; PAESSLER, S.; VELJKOVIC, V.; MCBRIDE, J. W. *Ehrlichia* SLiM ligand mimetic activates Hedgehog signaling to engage a BCL-2 anti-apoptotic cellular program. **PLoS Pathogens**, 2022 v. 18, n. 5, e1010345, 2022.

BYERLY, C. D.; PATTERSON, L. L.; MCBRIDE, J. W. *Ehrlichia* TRP effectors: moonlighting, mimicry and infection. **Pathogens and Disease**, v. 79, n. 5, 2021.

BYERLY, C. D.; PATTERSON, L. L.; PITTMER, N. A.; SOLOMON, R. N.; PATEL, J. G.; ROGAN, M. R.; MCBRIDE, J. W. *Ehrlichia* Wnt short linear motif ligand mimetic deactivates the Hippo pathway to engage the anti-apoptotic Yap-GLUT1-BCL-xL axis. **bioRxiv**, 2023.

BYERLY, C. D.; MITRA, S.; PATTERSON, L. L.; PITTNER, N. A.; VELAYUTHAM, T. S.; PAESSLER, S.; VELJKOVIC, V.; MCBRIDE, J. W. *Ehrlichia* Slim ligand mimetic activates Hedgehog signaling to engage a BCL-2 anti-apoptotic cellular program. **PLOS Pathogens**, v. 18, n. 5, e1010345, 2022.

CABRALES, P.; INTAGLIETTA, M.; TSAI, A. G. Increased plasma viscosity sustains microcirculation after resuscitation from hemorrhagic shock and continuous bleeding. **Shock**, v. 23, p. 549–555, 2005.

CABRALES, P.; TSAI, A. G.; INTAGLIETTA, M., Is resuscitation from hemorrhagic shock limited by blood oxygen-carrying capacity or blood viscosity? **Shock**, v. 27, p. 380–389, 2007

CASTRO, M. B. DE .; SZABÓ, M. P. J.; AQUINO, L. P. C. T. DE .; DAGNONI, A. S.; ALESSI, A. C.; COSTA, M. T.; NAKAGHI, A. C. H.; SANTI, M. D.; CALCHI, A. C.; ANDRÉ, M. R.; MACHADO, R. Z. Immunophenotypical and pathological changes in dogs experimentally infected with *Ehrlichia canis*. **Revista Brasileira De Parasitologia Veterinária**, v. 31, n. 2, e021621, 2022.

CARDOSO, S. P.; PALUDO, G. R.; SILVA, J. N.; HONÓRIO-FRANÇA, A. C.; FRANÇA, E. L. Hemorheological Evaluation and Cytokine Production in Dogs Naturally Infected with Anaplasmatidae. In PACHECO, G. A. B. **Parasitology and Microbiology Research**, 1st ed., London, UK: IntechOpen, 2020; pp. 1-25.

COSTA, J. O.; SILVA, M.; BATISTA JÚNIOR, J. A.; GUIMARÃES MP. *Ehrlichia canis* infection in dog in Belo Horizonte – Brazil. **Arquivo da Escola Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, v. 25, p. 199-200, 1973.

DA SILVA, A. S.; MUNHOZ, T. D.; FARIA, J. L.; VARGAS-HÉRNANDEZ, G.; MACHADO, R. Z.; ALMEIDA, T. C.; MORESCO, R. N.; STEFANI, L. M.; TINUCCI-COSTA, M. Increase nitric oxide and oxidative stress in dogs experimentally infected by *Ehrlichia canis*: Effect on the pathogenesis of the disease. **Veterinary Microbiology**, v. 164, n. 3-4, p. 366–369, 2013.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A.; SALES, K. G. D.; MIRANDA, D. E O.; ALEXANDRE, J. L. A.; SILVA, Y. Y.; SILVA, L. G.; VALLE, G. R.; RIBEIRO, V. M.; OTRANTO, D.; DEUSTER, K.; POLLMEIER, M.; ALTREUTHER, G. Prevalence and incidence of vector-borne pathogens in unprotected dogs in two Brazilian regions. **Parasites and Vectors**, v. 13, n. 195, 2020.

DAVOUST, B.; PARZY, D.; VIDOR, E.; HASSELOT, N.; MARTET, G. Ehrlichiose canine expérimentale: étude clinique et thérapeutique. **Revue Médecine Vétérinaire**, v. 167, p. 33-40, 1991.

DINIZ, P. P. V. P.; DE AGUIAR, D. M. Ehrlichiosis and anaplasmosis: An update. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 52, n. 6, p. 1225-1266, 2022.

DOS ANJOS, D. A.; ASSIS, M. F. DE; MARTINS, R. R.; TOMACHEUSKI, R. M.; TAFFAREL, M. O. Evaluation Of Hemoacupuncture In The Treatment Of Dogs

With Thrombocytopenia. **Revista De Ciência Veterinária E Saúde Pública**, v. 7, n. 2, p. 112-118, 2020.

DOYLE, C. K.; LABRUNA, M. B.; BREITSCHWERDT, E. B.; TANG, Y. W.; CORSTVET, R. E.; HEGARTY, B. C.; BLOCH, K. C.; LI, P.; WALKER, D. H.; MCBRIDE, J. W. Detection of medically important *Ehrlichia* by quantitative multicolor TaqMan real-time polymerase chain reaction of the *dsb* gene. **The Journal of molecular diagnostics**, v. 7, n. 4, p. 504-510, 2005.

DHAS, Y.; BANERJEE, J.; MISHRA, N. Blood Viscosity, Glycemic Markers and Blood Pressure: A Study in Middle-Aged Normo-tensive and Hypertensive Type 2 Diabetics. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 35, p. 102-108, 2020.

DONATIEN, A.; LESTOQUARD, F. Existence en Algérie d'une Rickettsia du chien. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v. 28, p. 418-419, 1935.

FONSECA, J. P., HIRSCH, C., GUIMARÃES, A. M. Erliquiose monocítica canina: epidemiologia, imunopatogênese e diagnóstico. **PUBVET**, v. 7, n. 8, ed. 231, 2013.

FOURIE, J. J.; HORAK, I.; CRAFFORD, D.; ERASMUS, H. L.; BOTHA, O. J. The Efficacy of a generic doxycycline tablet in the treatment of canine monocytic ehrlichiosis. **The Journal of the South African Veterinary Association**, v. 86, n. 1, p. 1193, 2015.

FRANÇA, E. L.; RIBEIRO, E. B.; SCHERER, E. F.; CANTARINI, D. G.; PESSÔA, R. S.; FRANÇA, F. L.; HONÓRIO-FRANÇA, A. C. Effects of *Momordica charantia* L. on the blood rheological properties in diabetic patients. **BioMed Research International**, 1-8, 2014.

GANTA, R. R. Anaplasmataceae: *Anaplasma*. In: MCVEY, D. S.; MELISSA, K.; CHENGAPPA, M. M. **Veterinary Microbiology**. Chichester: John Wiley & Sons, Inc, 2013a: p. 302-305.

GANTA RR. Anaplasmataceae: *Ehrlichia* and *Neorickettsia*. In: MCVEY, D. S.; MELISSA, K.; CHENGAPPA, M. M. **Veterinary Microbiology**. Chichester: John Wiley & Sons, Inc, 2013b: p. 302-305.

HACKSTADT, T. The diverse habitats of obligate intracellular parasites. **Current Opinion in Microbiology**, v.1, n. 1, p. 82-87, 1998.

HARRUS, S.; WANER, T.; BARK, H.; JONGEJAN, F.; CORNELISSEN, A. W. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 9, p. 2745-2749, 1999.

HUXSOLL, D. L.; HILDEBRANDT, P. K.; NIMS, R. M.; WALKER, J. S. Tropical canine pancytopenia. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 157, n. 11, p. 1627-1632, 1970.

JENKINS, S.; KETZIS, J. K.; DUNDAS, J.; SCORPIO, D. Efficacy of Minocycline in Naturally Occurring Nonacute *Ehrlichia canis* Infection in Dogs. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 32, n. 1, p. 217–221, 2018.

KALELIOGLU, T.; KARAMUSTAFALIOGLU, N.; CELIKEL, G.; GENÇ, A.; EMUL, M. Serum osmolarity and blood viscosity as a potential explanation for the pathophysiology of neuroleptic malignant syndrome. **International Journal of Psychiatry in Clinical Practice**, v. 23, n. 4, p. 307-310, 2019.

KARUNAKARAN, S.; SASIDHARAN, H.; GOPINATHAN, G. T. Taqman based real time polymerase chain reaction (qPCR) for detection of granulocytic anaplasmosis in dogs in Thrissur district, Kerala state. **The Pharma Innovation Journal**, v. 8, n. 4, p. 1118-1124, 2019.

KATAOKA, A.; SANTANA, A. E.; SEKI, M. C. Alterações do proteinograma sérico de cães naturalmente infectados por *E. canis*. **ARS VETERINARIA**, v. 22, n. 2, p. 98-102, 2006.

KUMAR, A.; SARKAR T. K.; MAURYA P. S.; THAKUR, V.; JITHIN, M. V.; JENY K.; JOHN, J. K.; RAMAKANT. Therapeutic effects of doxycycline and minocycline in monocytic ehrlichiosis in canine. **Pharma Innovation**, v. 12, n. 4, p. 831-835, 2023.

LANZA-PEREA, M.; KUMTHEKAR, S. M.; SABARINATH, A.; KARPATY, S. E.; SHARMA, R. N.; STONE, D. M. Doxycycline treatment of asymptomatic dogs seropositive for *Ehrlichia canis*, **West Indian Veterinary Journal**, v. 9, p. 11–13, 2009.

LIMA, A. L.; SANTOS, G. J. L.; ROATT, B. M.; REIS, A. B.; FREITAS, J. C. C.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S. Serum TNF- α and IL-10 in *Ehrlichia* spp. naturally infected dogs. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 43, p. 1-7, 2015.

LIMA, E. R.; SILVA, W. M.; TEIXEIRA, M. N.; DA SILVA, V. C. L.; MARINHO, M. L.; LINDEN, L. A.; DER, V.; OLIVEIRA, R. A. S. Clinical and laboratory aspects in dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, 4(3), 3471-3484, 2021.

LIN, M., RIKIHISA, Y. *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* lack genes for lipid A biosynthesis and incorporate cholesterol for their survival. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 5324–5331, 2003

LINA, T. T.; FARRIS, T.; LUO, T.; MITRA, S.; ZHU, B.; MCBRIDE, J. W. Hacker within! *Ehrlichia chaffeensis* Effector Driven Phagocyte Reprogramming Strategy. **Frontiers in Cell and Infection Microbiology**, v. 6, 2016.

LINDERKAMP, O.; RUEF, P.; ZILOW, E. P.; HOFFMANN, G. F. Impaired deformability of erythrocytes and neutrophils in children with newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 42, n. 7, p. 865–869., 1999.

MAHAN, S. M.; ALLSOPP, B.; KOCAN, K. M.; PALMER, G. H.; JONGEJAN, F.

Vaccine strategies for *Cowdria ruminantium* infections and their application to other ehrlichial infections. **Parasitology Today**, v. 15, p. 290-294, 1999.

MARSHET, B.; DESSIE, D.; A review on canine ehrlichiosis and its zoonotic implications. **International Journal of Veterinary Sciences and Animal Husbandry**, v. 5 n. 3, p. 36-42, 2020.

MARTINS E SILVA, J. Principles of blood rheology. **Acta Médica Portuguesa**, v. 4, p. 5-7, 1983.

MAVROMATIS, K.; DOYLE, C. K.; LYKIDIS, A.; IVANOVA, N.; FRANCINO, M. P.; CHAIN, P.; SHIN, M.; MALFATTI, S.; LARIMER, F.; COPELAND, A.; DETTER, J. C.; LAND, M.; RICHARDSON, P. M.; YU, X. J.; WALKER, D. H.; MCBRIDE, J. W.; KYRPIDES, N. C. The genome of the obligately intracellular bacterium *Ehrlichia canis* reveals themes of complex membrane structure and immune evasion strategies. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 11, p. 4015-4023, 2006.

MCBRIDE, J. W.; CORSTVET, R. E.; GAUNT, S. D.; BOUDREAUX, C.; GUEDRY, T.; WALKER, D. H. Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* immunoreactive proteins. **Infection and Immunity**, v. 71 n. 5, p. 2516-2524, 2003.

MCBRIDE JW, WALKER DH. Molecular and cellular pathobiology of **Ehrlichia** infection: targets for new therapeutics and immunomodulation strategies. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 13, n. e3, 2011

MCCLURE, E. E.; CHÁVEZ, A. S. O.; SHAW, D. K.; CARLYON, J. A.; GANTA R. R.; NOH, S. M.; WOOD, D. O.; BAVOIL, P. M.; BRAYTON, K. A.; MARTINEZ J. J.; MCBRIDE, J. W.; VALDIVIA, R. H.; MUNDERLOH, U. G.; PEDRA, J. H. F. Engineering of obligate intracellular bacteria: progress, challenges and paradigms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 9, p. 544–558, 2017.

MCLURE, J. C.; CROTHERS, M. L.; SCHAEFER, J. J.; STANLEY, P. D.; NEEDHAM, G. R.; EWING, S. A. Efficacy of a doxycycline treatment regimen initiated during three different phases of experimental ehrlichiosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, p. 5012–5020, 2010.

MENDLOWITZ, M. The effect of anemia e polycythemia on digital intravascular blood viscosity. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 27, n. 5, p. 565-571, 1948.

MOUTZOURI, A. G.; ATHANASSIOU, G. A.; DIMITROPOULOU, D.; SKOUTELIS, A. T.; GOGOS, C. A. Severe Sepsis and Diabetes Mellitus Have Additive Effects on Red Blood Cell Deformability. **Journal of Infection**, v. 57, p. 147–151, 2008.

MYLONAKIS, M. E.; HARRUS, S.; BREITSCHWERDT E. B. An update on the treatment of canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). **Veterinary Journal**, v. 246, p. 45-53, 2019.

MYLONAKIS, M. E.; KOUTINAS, A. F.; BILLINIS, C.; LEONTIDES, L. S.; KONTOS, V.; PAPADOPOULOS, O.; RALLIS, T.; FYTIANOU, A. Evaluation of

cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. **Veterinary Microbiology**, v. 91, n. 2–3), p. 97–204, 2003.

MYLONAKIS, M. E.; KOUTINAS, A. F.; BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; BILLINIS, C. D.; LEONTIDES, L. S.; KONTOS, V. S. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 40, p. 174-184, 2004.

MYLONAKIS, M. E.; THEODOROU, K. N. Canine monocytic ehrlichiosis: an update on diagnosis and treatment. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 67, p. 299-317, 2017.

NAKAGHI, A. C. H.; MACHADO, R. Z.; COSTA, M. T.; ANDRÉ, M. R.; BALDANI, C. D. Canine Ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p. 766-770, 2008.

NAKAGHI, A. C. H.; MACHADO, R. Z.; FERRO, J. Á.; LABRUNA, M. B.; CHRYSSAFIDIS, A. L.; ANDRÉ, M. R.; BALDANI, C. D. Sensitivity evaluation of a single-step PCR assay using *Ehrlichia canis* p28 gene as a target and its application in diagnosis of canine ehrlichiosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, p. 75-79, 2010.

PRUNEAU, L.; MOUMÈNE, A.; MEYER, D. F.; MARCELINO, I.; LEFRANÇOIS, T.; VACHIÉRY, N. Understanding Anaplasmatidae pathogenesis using “Omics” approaches. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.4, n. 86, p. 1-7, 2014.

OBENG, E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. **Brazilian Journal of Biology** [Internet], v. 81, n. 4, p. 1133–1143, 2021.

OLIVEIRA, L. S.; OLIVEIRA, K. A.; MOURÃO, L. C.; PESCATORE, A. M.; ALMEIDA, M. R.; CONCEIÇÃO, L. G.; GALVÃO, M. A.; MAFRA, C. I. First report of *Ehrlichia ewingii* detected by molecular investigation in dogs from Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. 2, p. 55-56, 2009.

PACHECO, T. A.; MAERLE, M. O.; WITTER, R.; MENEGUZZI, M.; MELO, A. L. T.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; AGUIAR, D. M.; PACHECO, R. C. Serological and molecular survey of tick-borne pathogens among dogs in Northern Brazil. **Archives of Veterinary Sciences**, v. 26, p. 31-47, 2021.

PALACIOS, M.; ARTEAGA, R.; CALVO, G. High-Dose Filgrastim Treatment of Nonregenerative Pancytopenia Associated With Chronic Canine Ehrlichiosis. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 32, p. 28–30, 2017

PATTERSON, L. L.; BYERLY, C. D.; SOLOMON, R.; PITTNER, N.; BUI, D. C.; PATEL, J.; MCBRIDE, J. W. *Ehrlichia* Notch signaling induction promotes XIAP stability and inhibits apoptosis. **bioRxiv** [Preprint], 2023.

PEÑA, G. I.; FLORANGEL, V. F.; ARNALDO, D. T. R.; HERNÁNDEZ R ALIESKY, H. R. Uso de la oxitetraciclina en el tratamiento de la ehrlichiosis canina: estudio

retrospectivo de 15 casos en Camagüey, Cuba. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v. 29, n. 2, p. 699-705, 2018.

PEREZ, M., BODOR, M., ZHANG, C., XIONG, Q., RIKIHISA, Y. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1078, p. 110-117, 2006.

QUARESMA, P. F.; MURTA, S. M.; FERREIRA, E. DE C.; DA ROCHA-LIMA, A. C.; XAVIER, A. A.; GONTIJO, C. M. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. **Acta tropica**, v. 111, n. 3, p. 289–294, 2009

QUINN, P. J., MARKEY, B. K., LEONARD, F. C., FITZPATRICK, E. S., FANNING, S., HARTIGAN, P. J. Rickettsiales and Coxiella burnetii. In: _____ **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**. Chichester: Wiley-BlackWell, 2011: não paginado.

RAMAKANT, R. K.; VERMA, H. C.; DIWAKAR, R. P. Canine ehrlichiosis: A review. **Journal of Entomology and Zoology Studies**. v. 8, p. 1849-1852, 2020.

REINHART, W. H.; BERCHTOLD, P. E. Effect of high-dose intravenous immunoglobulin therapy on blood rheology. **The Lancet**, v. 339, n. 8794, p. 662-664, 1992.

RISHEEN, G. D.; WALWADKER, K. K.; MISHRA, K. K.; SHRIVASTAVA, S. Therapeutic efficacy of homeopathy (*Crotalus horridus*) and allopathy (Doxycycline) drugs in Canine ehrlichiosis. **The Pharma Innovation Journal**, v. 11, n. 3, p. 253-256, 2022.

RIZVI, S. I.; ZAID, M. A. Intracellular reduced glutathione content in normal and type 2 diabetic erythrocytes: effect of insulin and (-) epicatechin. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 52, n. 3, p. 483–488, 2001.

RODRÍGUEZ-ALARCÓN, C. A.; BERISTAIN-RUIZ, D. M.; OLIVARES-MUÑOZ, A.; QUEZADA-CASASOLA, A.; PÉREZ-CASIO, F.; ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, J. A.; TAPIA-ALANÍS, J.; LIRA-AMAYA, J. J.; RIVERA-BARRENO, R.; CERA-HURTADO, O. S.; IBANCOVICH-CAMARILLO, J. A.; SOON-GÓMEZ, L.; ADAME-GALLEGOS, J. R.; FIGUEROA-MILLÁN, J. V. Demonstrating the presence of *Ehrlichia canis* DNA from different tissues of dogs with suspected subclinical ehrlichiosis. **Parasite and Vectors**, v. 13, n. 1, p. 518, 2020.

ROGAN, M. R.; PATTERSON, L. L.; BYERLY, C. D.; LUO, T.; PAESSLER, S.; VELJKOVIC, V.; QUADE, B.; & MCBRIDE, J. W. *Ehrlichia chaffeensis* TRP120 Is a Wnt Ligand Mimetic That Interacts with Wnt Receptors and Contains a Novel Repetitive Short Linear Motif That Activates Wnt Signaling. **mSphere**, v. 6, n. 2, e00216-21, 2021.

RUDOLER, N., BANETH, G., EYAL, O., VAN STRATEN, M., HARRUS, S. Evaluation of an attenuated strain of *Ehrlichia canis* as a vaccine for canine

monocytic ehrlichiosis. **Vaccine**. 2012 Dec 17;31(1):226-33. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.10.003. Epub 2012 Oct 13. PMID: 23072894.

SAHOO, K. K.; GUPTA, D. K.; ROY, K.; TIWARI, A.; RAIKWAR, A.; PRADHAN, S.; NAMDEO, S.; CHOUDHARY, G. P.; SAWHNEY, A.; BHATT, S.; SINGH, M. Canine ehrlichiosis: A review. **The Pharma Innovation Journal**, v. 11, n. 2S, p. 474-480, 2022.

SAINZ, Á.; ROURA, X.; MIRÓ, G.; ESTRADA-PENÑA, A.; KOHN, B.; HARRUS, S.; SOLANO-GALLEGO, L. **Guideline for Veterinary Practitioners on Canine Ehrlichiosis and Anaplasmosis in Europe**. *Parasite and Vectors*, v. 8, p. 1-20, 2015. .

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. R.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** (2nd ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANCHEZ, I. X. B.; SOCARRAS, T. DE J. O.; SILVA, M. L.; PEREIRA, N. B.; MACHADO, R. Z.; VASCONCELOS, A. C. Apoptose na infecção experimental de cães domésticos com *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, v. 42, n. 8, p. 1457–1463, 2012.

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

SCHERER, E. F.; CANTARINI, D.G.; SIQUEIRA, R.; RIBEIRO, E. B.; BRAGA, É. M.; HONÓRIO-FRANÇA, A. C.; FRANÇA, E. L. Cytokine Modulation of Human Blood Viscosity from Vivax Malaria Patients. **Acta Tropica**, v. 158, p. 139–147, 2016.

SCHOCH, C. L.; CIUFO, S.; DOMRACHEV, M.; HOTTON, C. L.; KANNAN, S.; KHOVANSKAYA, R.; LEIPE, D.; MCVEIGH, R.; O'NEILL, K.; ROBBERTSE, B.; SHARMA, S.; SOUSSOV, V.; SULLIVAN, J. P.; SUN, L.; TURNER, S.; KARSCH-MIZRACHI, I. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. **Database (Oxford)**, n 1, 2020.

SHERDING RG. Rickettsiosis, Ehrlichiosis, Anaplasmosis, and Neorickettsiosis. In: BIRCHARD SJ, SHERDING RG. **Manual Saunders of Small Animal Practice**. St Louis: Saunders Elsevier, 2006, p. 178-185.

SHROPSHIRE, S.; OLVER, C.; LAPPIN, M. Characteristics of hemostasis during experimental *Ehrlichia canis* infection. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 32, p. 1334-1342, 2018.

SILVA, J. N.; ALMEIDA, A. B. P. F.; SORTE, E. C. B.; FREITAS, A. G.; SANTOS, L. G. F.; AGUIAR, D. M.; SOUSA, V. R. F. Soroprevalência de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* em cães de Cuiabá, Mato Grosso. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 2, p. 108-111, 2010.

SILVA, J. N.; COTRIM, A. C.; CONCEIÇÃO, L. A. V.; MARINS, C. M. F.; MARCHI, P. G. F.; HONÓRIO-FRANÇA, A. C.; ALMEIDA, A. B. P. F.; FRANÇA, E. L.; SOUSA, V. R. F. Immunohaematological and rheological parameters in canine visceral leishmaniasis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, p. 211-217, 2018.

SINGH, V.; KHURANA, A.; NAVIK, U.; ALLAWADHI, P.; BHARANI, K. K.; WEISKIRCHEN, R. Apoptosis and Pharmacological Therapies for Targeting Thereof for Cancer Therapeutics. **Sci**, v. 4, n. 2, p. 15, 2022.

SKOTARCZAK, B. Canine ehrlichiosis. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, v. 10, n. 2, 2003.

SMITH, R. D.; RISTIC, M.; HUXSOLL, D. L.; BAYLOR, R. A. Platelet kinetics in canine ehrlichiosis: evidence for increased platelet destruction as the cause of thrombocytopenia. **Infection and Immunity**, v. 11, p. 1216-1221, 1975.

SMITH, R. D.; SELLS, D. M.; STEPHENSON, E. H.; RISTIC, M. R.; HUXSOLL D. L. Development of *Ehrlichia canis*, causative agent of Canine Ehrlichiosis, in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and its differentiation from a symbiotic rickettsia. **American Journal of Veterinary Research**, v. 37, n. 2, p. 119-126, 1976.

SOCOLOVSCHI, C.; GOMEZ, J.; MARIÉ, J.L.; DAVOUST, B.; GUIGAL, P.M.; RAOULT, D.; PAROLLA, P. *Ehrlichia canis* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks in the Ivory Coast. **Ticks and Tick Borne Disease**, v. 3, p. 411–413, 2012.

SONGER, J. G.; POST, K. W. The Family Anaplasmataceae. In: _____ **Veterinary Microbiology: Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease**. St. Louis: Elsevier Saunders, 2005. Não paginado.

SOUZA, D. R. D.; MELO, A. L. T.; MURARO, L. S.; AGUIAR, D. M.; ALBUQUERQUE, D. Levamisole enhances global and differential leukocyte numbers in peripheral blood of dogs with ehrlichiosis. **Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences**, v. 37, n. 6, 2013.

STIVAL, C.; EDNA APARECIDA DA SILVA SUZUKI, E. A. S.; ISABELLA GOMES OLIVEIRA, I. G.; DO CARMO, V. F. Erliquiose monocitotrópica canina: Revisão, **Pubvet**, v. 15, n. 1, 2021.

SUMNER, J. W.; NICHOLSON, W. L.; MASSUN, R. F. PCR Amplification and Comparison of Nucleotide Sequences from the groESL Heat Shock Operon of *Ehrlichia* Species. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 3, n. 8, p. 2081-2092, 1997.

TAJIMA, T.; WADA, M. Inhibitory effect of interferon gamma on frequency of *Ehrlichia canis*-infected cells in vitro. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 156, n. 3-4, p. 200–204, 2013.

THEODOROU, K.; MYLONAKIS, M. E.; SIARKOU, V. I.; LEONTIDES L,

KOUTINAS, A. F.; KOUTINAS, C. K.; KRITSEPI-KONSTANTINOOU, M.; BATZIAS, G.; FLOURAKI, E.; EYAL, O.; KONTOS, V.; HARRUS, S. Efficacy of rifampicin in the treatment of experimental acute canine monocytic ehrlichiosis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 7, p. 1619-1626, 2013.

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

TOMINELLO, T. R.; OLIVEIRA, E. R. A.; HUSSAIN, S. S.; ELFERT, A.; WELLS, J.; GOLDEN, B.; ISMAIL, N. Emerging Roles of Autophagy and Inflammasome in Ehrlichiosis. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. 1011, 2019.

TIZZARD, IR. Imunidade Inata: macrófagos e recuperação da inflamação. In: _____ **Imunologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014: 41-51.

UNVER, A.; HUANG, H.; RIKIHISA, Y. Cytokine gene expression by peripheral blood leukocytes in dogs experimentally infected with a new virulent strain of *Ehrlichia canis*. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 482-486, 2006.

VIEIRA, R. F. DA C.; BIONDO, A. W.; GUIMARÃES, A. M. S.; SANTOS, A. P. DOS.; SANTOS, R. P. DOS.; DUTRA, L. H.; DINIZ, P. P. V. DE P.; MORAIS, H. A. DE.; MESSICK, J. B.; LABRUNA, M. B.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in Brazil. **Revista Brasileira De Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 1–12, 2011.

VILLAESCUSA, A.; GARCÍA-SANCHO, M.; RODRÍGUEZ-FRANCO, F.; TESOURO, M.; SAINZ, T. Effects of Doxycycline on Haematology, Blood Chemistry and Peripheral Blood Lymphocyte Subsets of Healthy Dogs and Dogs Naturally Infected with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Journal**, v. 204, p. 263–268, 2015.

YU, X. J.; WALKER, D. H. Epidemiology, Molecular Biology, and Pathogenic Mechanisms of *Ehrlichia* Infections. In: THOMAS, S. **Rickettsiales**. Springer, Cham, 2016.

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

APENDICE A

Artigo 1 – submetido

Revista: Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

CLASSIFICAÇÃO QUALIS A2

PLATAFORMA Sucupira ACESSO RESTRITO

INÍCIO >> Qualis >> Qualis Periódicos

Qualis Periódicos

Evento de Classificação:
CLASSIFICAÇÕES DE PERIÓDICOS QUADRIÊNIO 2017-2020

Área de Avaliação:
☒ MEDICINA VETERINÁRIA

ISSN:
☒ 1984-2961

Título:
☐

Classificação:
☐ -- SELECIONE --

[Consultar](#) [Cancelar](#)

Periódicos

ISSN	Título	Área com publicação no quadriênio	Classificação	Área mãe
1984-2961	REVISTA BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA (ONLINE)	MEDICINA VETERINÁRIA	A2	MEDICINA VETERINÁRIA

[Início](#) [Anterior](#) [1](#) [Próxima](#) [Fim](#)

1 a 1 de 1 registro(s)

Fator de impacto 1.3

CBPV Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária

Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

HOME SOBRE A RBPV VOLUMES CORPO EDITORIAL GUIA DO AUTOR CONTATO

Buscar Artigos

O que você procura? [Buscar](#)

Edição Atual

Veja as capas das edições anteriores. [Clique aqui](#)

Editora-chefe
Rosângela Zacarias Machado (FCV/UNESP)

Fator de Impacto
1,3

Periodicidade
Fluxo contínuo

Publicado por
Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária

Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

A Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária - Brazilian Journal of Veterinary Parasitology (ISSN impresso - 0103-846X; ISSN eletrônico 1984-2961) é o órgão oficial de divulgação do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária - CBPV. Saiba mais...

A revista publica artigos de acesso aberto de acordo com a Licença Creative Commons Atribuição - CC BY, a qual permite uso irrestrito, distribuição e reprodução em qualquer meio, desde que o trabalho original seja devidamente citado.

Atenção! A RBPV faz a triagem de todos os manuscritos submetidos, para detecção de plágio.

[Submeter artigo](#)

Indexadores

CABI, Periódicos, LILACS, Scopus, PubMed, SciELO, AGRICOLA, BVS, Web of Science Group, DOAJ, BIOSIS, BVS-Vet, AGRIS, PMC

Comprovante de submissão



Saulo Pereira Cardoso <saulopereiracardoso@gmail.com>

Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária - Manuscript ID RBPV-2024-0030

Rosângela Machado <onbehalf@manuscriptcentral.com>

9 de fevereiro de 2024 às 20:34

Responder a: cbpv_rbpv.fcav@unesp.br

Para: valeriaregia27@gmail.com

Cc: saulopereiracardoso@gmail.com, adenildacht@gmail.com, luanasalesvet@hotmail.com, mariaclarabianchini1@gmail.com, arlyson-sousa@hotmail.com, arleferreira@gmail.com, dr.eduardo.franca@gmail.com, lucnaka@gmail.com, valeriaregia27@gmail.com

09-Feb-2024

Dear Prof. Sousa:

Your manuscript entitled "Hematological and biochemical parameters correlated to hemorheology in Canine Monocytic Ehrlichiosis" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.

Your manuscript ID is RBPV-2024-0030.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc04.manuscriptcentral.com/rbpv-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/rbpv-scielo>.

Thank you for submitting your manuscript to the Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.

Sincerely,
Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária Editorial Office

Hematological and biochemical parameters correlated to hemorheology in Canine

Monocytic Ehrlichiosis

Parâmetros hematológicos e bioquímicos correlacionados à hemorreologia na Erliquiose Monocítica Canina

Hemorheology in Canine Monocytic Ehrlichiosis

Saulo Pereira Cardoso^{1,2}; Adenilda Cristina Honório-França³; Luana Paula Sales Silva³; Maria Clara Bianchini Neves²; Arlyson Sousa Ferreira²; Arleana do Bom Parto Ferreira Almeida²; Eduardo Luzia França³; Luciano Nakazato²; Valéria Régia Franco Sousa^{2*}

1- Unidade de Ensino e Produção Agropecuária, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso, Barra do Garças, Mato Grosso, Brasil.

2- Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária (FAVET), Cuiabá, Mato Grosso, Brasil.

3- Laboratório de Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT) campus Universitário do Araguaia II, Barra do Garças, Mato Grosso, Brasil.

Abstract

Canine monocytic ehrlichiosis (CME) is an infectious vector-borne disease that causes hematological changes in dogs. This study aimed to correlate hematological and hemorheological parameters, serum proteins, and triglycerides in dogs with CME. A total of 59 blood and/or bone marrow samples were collected from dogs with or without clinical signs suggestive of CME. Blood samples with EDTA were subjected to rheological analysis to investigate blood viscosity. After real-time molecular testing (qPCR), 20 dogs with *Ehrlichia canis* infection and 20 dogs without clinical signs were selected. The selected samples were negative for *Leishmania infantum* and *Babesia* sp.. Hematological and biochemical data were also obtained from total protein, albumin, globulin, and triglycerides. The blood viscosity of infected dogs is lower compared to the control group. The mean values of erythrocytes, hematocrit, hemoglobin, platelets and albumin of infected dogs were lower than those of the control group. The decrease in erythrocytes had an influence on the decrease in blood viscosity. Total protein and albumin correlated with

blood viscosity in infected dogs. Dogs with CME have decreased blood viscosity, mainly due to anemia caused by the disease and the interaction with negative acute phase proteins.

Keywords: *Ehrlichia canis*, blood viscosity, hysteresis curve, anemia, acute fase protein.

Resumo

A erliquiose monocítica canina (CME) é uma doença infecciosa, transmitida por um vetor, que causa alterações hematológicas em cães. Este estudo objetivou correlacionar parâmetros hematológicos, hemorreológicos, proteínas séricas e triglicérides em cães com CME. Foram coletadas 59 amostras de sangue e/ou medula óssea de cães com ou sem alterações clínicas sugestivas de CME. As amostras de sangue com EDTA foram submetidas a análise reológica para investigação da viscosidade sanguínea. Após exames moleculares em tempo real (qPCR), foram selecionados 20 cães com infecção por *Ehrlichia canis* e 20 cães sem alterações clínicas. As amostras selecionadas foram negativas para *Leishmania infantum* e *Babesia* sp.. Também foram obtidos dados hematológicos e bioquímicos de proteína total, albumina, globulina e triglicérides. A viscosidade sanguínea de cães infectados é menor em relação ao grupo controle. Os valores médios de eritrócitos, hematócrito, hemoglobina, plaquetas e albumina dos cães infectados foram menores do que os do grupo controle. A diminuição de eritrócitos influenciou a diminuição da viscosidade sanguínea. As proteínas totais e albumina se correlacionaram com a viscosidade sanguínea nos cães infectados. Os cães com CME apresentam diminuição da viscosidade sanguínea, principalmente devido a anemia causada pela enfermidade e a interação com proteínas de fase aguda negativa.

Palavras-chave: *Ehrlichia canis*, viscosidade sanguínea, curva de histerese, anemia, proteína de fase aguda.

Introduction

Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME) is a vector-borne disease that affects dogs in tropical and subtropical regions (Sainz et al., 2015). *Ehrlichia canis* is a bacterium from the phylum Proteobacteriota, order Alphaproteobacteria, and class Rickettsiales (Schoch et al., 2020), infects the phagocytic-mononuclear system, with a preference for macrophages. The main vector is *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodida), which transmits the bacteria during blood meals in dogs. The larval and adult forms of the tick can transmit the pathogen to other hosts upon infection (Azis et al., 2022).

Clinical signs are related to the pathogenesis of CME, which is systemic and

affects multiple tissues in dogs, causing vascular lesions (Castro et al., 2022). The differentiation of the three phases of the disease (acute, subclinical, and chronic) in natural infections by *E. canis* is not distinctly clear because clinical and clinical-laboratory signs are non-specific and common to the different phases (Diniz & Aguiar, 2022). Laboratory findings such as anemia and thrombocytopenia are common in dogs with CME, especially in the acute phase (Azis et al., 2022). The acute phase is characterized by fever, hemorrhage, lymphadenopathy, anorexia, depression, anemia, and thrombocytopenia. The subclinical phase usually only presents thrombocytopenia and hyperglobulinemia. Dogs can develop the chronic form, which has a worse prognosis with pancytopenia, bone marrow aplasia, hemorrhage, and secondary infections (Diniz & Aguiar, 2022).

CME can be diagnosed by various techniques such as visualization of the *Ehrlichia* morulae within monocytes in blood smears, by rapid serological tests using qualitative commercial kits, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) or indirect immunofluorescence and by molecular polymerase chain reaction techniques (conventional PCR) or real-time PCR (Sainz et al., 2015).

Hematologic changes caused by infection with bacteria of the Anaplasmataceae family, such as anemia and thrombocytopenia, may result in changes in blood rheological parameters. Thereby, there is a decrease in blood viscosity in dogs infected with Anaplasmataceae bacteria compared to healthy dogs (Cardoso et al., 2020). In dogs infected with *Leishmania infantum*, the decrease in erythrocytes caused by this disease is also related with a decrease in blood viscosity as well as an increase in shear rate (Silva et al., 2018).

Hemorheological behavior can be influenced not only by blood viscosity, but also by several factors such as the number of cellular components of blood plasma, peripheral resistance on blood vessels, circulating blood volume and intravascular blood flow pressure (Martins & Silva, 1983; Silva et al., 2018). Other parameters that can alter the rheological behavior of blood are circulating lipids, which affect the viscosity of blood plasma (Irace et al., 2014), and immunoglobulins, which can influence blood viscosity directly or indirectly by increasing erythrocyte aggregation (Kwaan, 2010).

The increased concentration of blood components such as leukocytes and platelets in the blood can disrupt the normal flow of erythrocytes passage, mainly in the microcirculation, due to the smaller caliber of the capillaries. Therefore, viscosity is also altered if an illness alters the number of cells, erythrocyte deformability, or serum components (Martins & Silva, 1983; Baskurt & Meiselman, 2003).

Rheometry is an auxiliary, low-cost technique for monitoring the hematological conditions and hemorheological behavior of animals with infectious diseases. However, few studies in veterinary medicine have been conducted on this topic, and there is a wide range of research fields to be studied.

This work aimed to characterize the hemorheological profile of dogs infected with *E. canis* and correlate it with hematological, biochemical parameters of serum proteins and triglycerides.

Material and methods

Animals

In the years 2021 and 2022, blood and/or bone marrow samples were randomly collected from 59 dogs at a private veterinary hospital in the city of Barra do Garças, Brazil (-15.8891, 15 ° 53' 24" South, -52.2634, 52° 15' 24" West). Samples positive for *E. canis* by qPCR were included in the study. In addition, samples that showed DNA amplification by qPCR for *Leishmania infantum* and *Babesia* sp. would be excluded. A total of 19 animals that showed positive for *Leishmania* were excluded, and none were positive for *Babesia*.

Thus, two groups were paired: 20 dogs with CME and another 20 dogs without clinical signs or DNA amplification for *E. canis* were selected for the control group. Blood and serum samples were obtained from each dog to perform hemorheological, hematological, and biochemical evaluations. Subsequently, qualitative and semi-quantitative data including sex, age, body score, clinical signs (anorexia, fever, lymphadenopathy, splenomegaly, pale mucosa, bleeding, etc.) were recorded.

Qualitative Real Time PCR (qPCR)

DNA was extracted from whole blood and/or bone marrow was performed using the phenol-chloroform method (Sambrook & Russell, 2001). The DNA was dissolved in 50µl of ultrapure water, and its concentration was measured using a NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific). All samples were treated with RNase and subjected to PCR to detect the endogenous canine β-globin gene to ensure that the DNA was pure and free of inhibitors. This gene amplifies a 119bp fragment (Quaresma et al., 2009). The *E. canis* DNA detection process used the primers E_can0503F (5'-CAG CAA ATT CCA ATC TGC ACT TC-3') and E_can0503R (5'-GAG CTT CCA ATT GAT GGGTCT G-3') in which the gene Ecaj_0503 encodes 147bp of a hypothetical protein [system E_can0701] (Socolovschi et al., 2012).

The qPCR analysis was performed using a StepOne™ Real-Time PCR System Sequence Detection (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Reactions were prepared in a final volume of 25µl containing non-specific double-stranded DNA intercalators (Sybr Green® Master Mix, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), 0.3µM of each primer and 2µl of target DNA. The reaction consisted of 94°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of 94°C for 15 seconds for denaturation and 60°C for 30 seconds for annealing and extension. A canine sample with *E. canis* morulae confirmed by PCR (positive control) and a DNA-free reaction (negative control) were used as a control for the reaction.

For *Leishmania infantum* qPCR, the primers RV1-5'-CTT TTC TGG TCC GGG TAG G-3' and RV2-5'-CCA CCT GGC TAT TTT ACA CCA-3' were used, which amplify 145 bp of the *L. infantum* kinetoplast (Lachaud et al., 2002).

End point Polymerase Chain Reaction (PCR)

In the PCR for *Babesia* sp. primers BAB143-167 -5'- CCG TGC TAA TTG TAG GGC TAA TAC A - 3' and BAB694-667 - 5'- GCT TGA AAC ACT CTA RTT TTC TCA AAG - 3' were used, which amplifies a region of approximately 550bp of the 18S rRNA gene (Almeida et al., 2012). The amplified products were fractionated by electrophoresis in a 1.5% agarose gel, stained with Gel Red and visualized under a transilluminator (UV-300 nm).

Hemorheological parameters

Fresh EDTA whole blood from each dog was subjected to hemorheological analysis to obtain data on blood viscosity. A compact modular rheometer, model Anton-Paar® Cone-Plate – MCR 102 [Anton Paar® GmbH, Ostfildern, Germany], was used, and the graphs were obtained with the Rheoplus® software.

For hemorheological analysis, 750µL of whole blood with EDTA was used, maintaining a temperature of 37°C on the plate with 60 flow measurement points, as proposed by França et al. (2014).

Hematological and biochemical analyzes

Samples of whole blood with EDTA from the dogs were sent for hematological analyzes such as erythrogram, leukogram and platelet count on an Icounter Vet automated device, model D Check D Plus [DIAGNO®, Belo Horizonte, Brazil], according to Sirois (2020).

Serum samples from the dogs were sent for biochemical analysis to determine the values of total protein, albumin, globulins, and triglycerides in an automated Smart 200+

device [BioTécnica®, Varginha, Brazil], according to Sirois (2020). The reference values were considered as proposed by Rizzi et al (2010).

Statistical analysis

Data were expressed as mean values and were within the normality curve. Statistically significant differences in mean hematological values, blood viscosity, and biochemical parameters between groups were analyzed using the parametric Student's t-test for paired analysis of variance with Tukey's post-test. Correlations between hematological and biochemical parameters and blood viscosity were analyzed using Pearson's linear correlation. The statistical software used for analysis was Biostat 5.0, and statistical significance was established for P values less than 0.05.

Results

Data from dogs selected in both groups, such as sex, age, and body score, are briefly described in Table 1.

Dogs with *E. canis* infection presented various clinical signs in their history obtained from medical records. Changes in blood counts and biochemical tests were also obtained (Table 2).

Regarding hematological parameters (Table 3), the differences in mean values between the groups were notable in relation to erythrocytes, hematocrit, hemoglobin, and platelets the group of dogs with CME showed a decrease in the concentration of each of these mentioned parameters. In Table 3 it is also possible to see that dogs with CME had a statistically significant decrease in albumin compared to the control group.

Dogs with CME had a lower mean blood viscosity value with statistical significance compared to the control group (Figure 1). The curves formed between the rheological parameters viscosity and shear rate are shown in Figure 2A. Both groups have similar hysteresis areas (Figure 2B). The group of dogs with CME has a hysteresis area curve more towards the right of the graph compared to the control group.

Pearson's linear correlation analysis between rheological and hematological parameters (Table 4) demonstrated that dogs with CME showed a strong and directly proportional relationship between blood viscosity and erythrocyte, hematocrit, and hemoglobin parameters. The group of dogs with CME also showed a directly proportional and medium-strength correlation between blood viscosity and total protein, and another direct and weak-strength correlation between blood viscosity and albumin.

In the group of dogs with CME serum albumin showed a linear correlation of

medium strength with erythrocytes, hematocrit, hemoglobin, and platelets (Table 5). In the control group, there was only a directly proportional correlation and average strength of albumin with platelets. Medium strength and directly proportional correlations were also observed between triglycerides and erythrocytes, and triglycerides and neutrophils.

Discussion

CME is a disease with worldwide distribution and causes important hematological changes in dogs (Sainz et al., 2015), as shown in the results of the present study. Furthermore, CME causes different clinical signs in dogs because it is a systemic disease that causes mononuclear inflammation in several tissues of whole the animal's body (Castro et al., 2022).

The semi-quantitative clinical-laboratory findings most frequently observed in this study were thrombocytopenia, anemia, and lymphopenia, representing 80%, 70% and 60%, respectively of dogs with CME. Dogs with CME often exhibit a range of clinical signs, including apathy, a lack of energy and enthusiasm, hyporexia, a decreased appetite, pyrexia, an elevated body temperature, and pale mucous membranes, a sign of reduced blood flow. Although these signs are nonspecific, they are frequently reported in dogs with this disease and can indicate the presence of CME (Diniz & Aguiar, 2022). Thrombocytopenia and anemia are frequent findings in *E. canis* infections (Azis et al., 2022). *Ehrlichia canis* use the iron available in blood serum for its survival metabolism, especially in the acute phase. Therefore, the higher the degree of bacteremia, the lower the iron levels would lead to anemia in dogs with CME (Bottari et al., 2016). Thrombocytopenia can be caused by different mechanisms such as excessive platelet consumption due to endothelial lesions, destruction by immunological action and increased splenic sequestration of these platelets (Shropshire et al., 2018). Lymphopenia in dogs with CME is also reported as a clinical and laboratory alteration (Fonseca et al., 2013). After a few days of acute infection, moving into the subclinical phase of CME, there is a decrease in the production of cytokines that recruit lymphocytes, which could lead to lymphopenia (Faria et al., 2011).

In the analysis of the mean between groups using the Student's t-test, the anemia observed in dogs with CME is a frequent hematological change in dogs infected by *E. canis* (Parashar et al., 2016). Infections that affect hematological parameters in dogs such as *Leishmania* sp. (Silva et al., 2018) and infections with bacteria from the Anaplasmataceae family (Cardoso et al., 2020) also demonstrated a decrease in erythrocytes. Dogs infected

by *E. canis* may present a decrease in lymphocyte counts (Cardoso et al., 2023), as seen in the results of this study.

Infected dogs demonstrated a lower average albumin concentration. Decreased albumin was observed in some dogs, as described by Harrus et al. (1996). Harrus et al. (1996) also described that dogs with CME presented high total protein values compared to the control group. This study did not find a significant difference between groups for this parameter. The increase in total protein values is due to hyperglobulinemia (Lobetti et al., 2000), a common change in the subclinical phase of dogs with CME (Azis et al., 2022). Although there was no statistical difference when comparing mean values between groups for globulin parameters, higher values were observed for dogs with CME.

The hemorheological analysis is an important tool for characterizing the rheological behavior of blood from dogs with CME. With this analysis it was possible to obtain the hysteresis areas of both groups in this study, verifying that they behaved similarly from a rheological point of view. The hysteresis areas are obtained after applying a controlled force to the blood samples, obtaining an area delimited by an ascending line and a descending line that originates at the zero point (Scherer et al., 2016; Silva et al., 2018). These areas formed within the curves in the relationship between the shear stress and shear rate parameters (Figure 2B) showed the same behavior in both groups. This mechanism was also observed in other studies on infection by parasites, such as *Plasmodium vivax* in humans (Scherer et al., 2018), *Leishmania* sp. in dogs (Silva et al., 2018), and intracellular bacteria from the Anaplasmataceae family (Cardoso et al., 2020).

It is crucial to note that the thixotropic property mentioned above remains intact even in cases of *E. canis* infection. This ensures that the blood flow in affected dogs is not compromised, regardless of the varying shear rates at which the intravascular fluid is affected (França et al., 2014). The precise maintenance of blood flow is important to constantly carry nutrients and oxygen molecules to tissues, especially those with limited tissue storage capacity for these components to maintain cellular life (Willie et al., 2014). In this study, it is evident that even with *E. canis* infection, the hysteresis area is maintained, which could indicate an adaptation of dogs to maintain homeostasis.

This behavior may have remained constant due to factors not yet investigated, such as the interaction of serum cytokines. In dogs with Canine Visceral Leishmaniasis, the modulation of viscosity by cytokines has already been reported (Silva et al., 2019), as well as in dogs infected by bacteria from the Anaplasmataceae family (Cardoso et al., 2020). On the other hand, in some diseases, such as diabetes mellitus in humans, the

thixotropic property increases due to a reduction in the deformability of erythrocytes and the high rate of erythrocyte aggregation that occurs due to changes in plasma proteins (McMillan, 1983).

The correlation of erythrocyte, hematocrit, and hemoglobin parameters with blood viscosity was not verified in the control group despite being observed in the CME group. Thus, the decrease in these hematological parameters directly influences the blood's rheological behavior. When these parameters decrease, the viscosity also decreases. Therefore, blood viscosity was expected to be lower in dogs with CME compared to healthy dogs. Likewise, dogs infected by *Leishmania* sp. (Silva et al., 2018) or by bacteria from the Anaplasmataceae family (Cardoso et al., 2020) showed a strong and directly proportional correlation, with a decrease in erythrocytes and a decrease in blood viscosity.

The correlation between the hematocrit and hemoglobin parameters with blood viscosity, in dogs positive for *E. canis* could be important to understand the mechanisms of rheological changes in dogs with CME, as these interactions were not observed in dogs infected by *Leishmania* sp. (Silva et al., 2018) nor in the hemorheological evaluation of infections caused by bacteria from the Anaplasmataceae family, that is, more generic and not specific to *E. canis* (Cardoso et al., 2020). This study found no correlations between any of the leukocytes and blood viscosity. However, in humans with high white blood cell counts, as in the case of leukemias, blood viscosity may increase (Steinberg & Charm, 1971).

Total proteins influenced blood viscosity in a directly proportional way in dogs with CME, so viscosity decreases when the concentration of total protein also decreases. In the present study, albumin stood out as the serum protein responsible for this correlation. In a human study, albumin is reported to be a protein that influences the viscosity of blood plasma and fibrinogen (Meisami et al., 2022). In other studies, no correlations were observed between total serum proteins and blood viscosity (Silva et al., 2018; Cardoso et al., 2020). In dogs infected with *Leishmania* sp., IgG and IgM immunoglobulins did not directly influence blood viscosity (Silva et al., 2018). However, it is unknown whether IgG and IgM can influence blood viscosity in dogs with CME, an area to be researched. Other candidate proteins for this influence on rheological behavior could be cytokines. They are proteins reported in other studies responsible for the interaction in hemorheological behavior. They also contribute to decreased blood viscosity in dogs infected by bacteria from the Anaplasmataceae family (Cardoso et al., 2020).

The decrease in albumin, a negative acute phase protein, may be related to the

inflammatory condition of the disease which leads to albumin sequestration in the third space and also to decreased production in inflammatory conditions in response to pro-inflammatory cytokines in the body (Vieira et al., 2013). This study showed that albumin is correlated with erythrocytes and hematocrit. The interaction of albumin on erythrocytes and hematocrit could influence rheological behavior in the group and dogs with CME. Previous works have not described such interaction (Silva et al, 2018; Cardoso et al., 2020). Despite this, it is still unknown how these parameters can interact with other parameters that affect blood rheology, mainly cytokines (Scherer et al., 2016). Elevated serum albumin is related to increased infection and injury severity in cows with clinical or subclinical mastitis. Moreover, the production of cytokines also accompanies this infectious and inflammatory process (Shaheen et al., 2020). Other parameters to be investigated would be the immunoglobulin profile (Kwaan, 2010) or even blood plasma (Irace et al., 2014), which are parameters that influence the rheological behavior of blood in dogs with CME

Other blood components, such as platelets, are recognized as influencing changes in blood viscosity (Ho, 2004). In this study, platelets showed a direct correlation with albumin, which in turn was directly correlated with blood viscosity in the group of dogs with CME. There may be an indirect connection between the two parameters, as they are found to be correlated in dogs with CME. However, previous studies on dogs with CME did not report any correlation between platelets and viscosity (Cardoso et al., 2023).

Triglycerides can influence the viscosity of blood and blood plasma (Rosenson et al., 2002). These lipids did not influence blood viscosity in any of the groups studied. The correlation observed between triglycerides and erythrocytes in the group of dogs with CME does not influence blood viscosity directly. However, there could be some indirect influence, as was observed in the analysis. In humans, it is reported that high cholesterol levels and high counts of erythrocytes and platelets are associated with vascular diseases, and erythrocytes and serum lipids correlate with each other (Fessler et al., 2013). Another study in dogs shows that hypertriglyceridemia increases blood viscosity (Rosenson et al., 2002).

Furthermore, in the present study, neutrophils were correlated with triglycerides in a group of dogs with CME. Other research in mice reports evidence of greater production of pro-inflammatory cytokines by adipose tissue in individuals with hypertriglyceridemia, which leads to leukocytosis associated with vascular diseases (Sawant et al., 2021). By understanding this dynamic, perhaps triglycerides play an influential role in altering rheological behavior in dogs with CME, as these animals, in addition to developing

vasculitis, which leads to the production of cytokines (Castro et al., 2022). Triglycerides can also contribute to inflammation, which can directly influence changes in blood viscosity, as reported in other studies. (Scherer et al., 2016; Silva et al., 2018).

It is noticeable that hematological changes, especially in erythrocytes, hematocrit, and hemoglobin, interfere with the rheological parameters of the blood. Therefore, any other component or parameter interacting with these first two can indirectly influence the blood viscosity of dogs with CME. The rheological behavior of healthy dogs and dogs infected by *E. canis* remains similar, probably due to an adaptation of the animal organism to maintain thixotropic properties and homeostasis. Albumin is an important negative acute phase protein to be monitored in dogs with CME and is related to the change with the decrease in blood viscosity in these animals. More studies are needed to understand hemorheological changes in dogs with CME, mainly involving cytokines, to elucidate the role of other serum proteins and the lipid profile on hemorheological behavior.

Ethics statement

The procedures developed in this work were approved by the Animal Use Ethics Committee of the University of Mato Grosso – Campus Universitário Araguaia, Barra do Garças, Mato Grosso, Brazil (number 23108.087992/2020-21).

Thanks

To CNPq for the Research Productivity Grant (CNPq N° 09/2022).

References

- Almeida AP, Marcili A, Leite RC, Nieri-Bastos FA, Domingues LN, Martins JR, Labruna MB. *Coxiella* symbiont in the tick *Ornithodoros rostratus* (Acari:Argasidae). *Ticks Tick Borne Dis* 2012;3(4):203-206. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.02.003>.
- Aziz MU, Hussain S, Song B, Ghauri HN, Zeb J, Sparagano OA. Ehrlichiosis in Dogs: A Comprehensive Review about the Pathogen and Its Vectors with Emphasis on South and East Asian Countries. *Vet Sci* 2022;29;10(1):21. <https://doi.org/10.3390/vetsci10010021>.

Baskurt OK, Meiselman HJ. Blood rheology and hemodynamics. *Semin Thromb Hemost* 2003;29(5):435-50. <https://doi.org/10.1055/s-2003-44551>.

Bottari NB, Crivellenti LZ, Borin-Crivellenti S, Oliveira JR, Coelho SB, Contin CM, Tatsch E, Moresco RN, Santana AE, Tonin AA, Tinucci-Costa M, Da Silva AS. Iron metabolism and oxidative profile of dogs naturally infected by *Ehrlichia canis*: Acute and subclinical disease. *Microb Pathog* 2016;92:26-29. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.11.030>.

Cardoso SP, Honório-França AC, França DCH, Silva LPS, Fagundes-Triches DLG, Neves MCB, Cotrim ACdM, Almeida AdBPFd, França EL, Sousa VRF. Effects of Doxycycline Treatment on Hematological Parameters, Viscosity, and Cytokines in Canine Monocytic Ehrlichiosis. *Biology* 2023;12(8):1137. <https://doi.org/10.3390/biology12081137>.

Cardoso SP, Paludo, GR, Silva JN, Honório-França AC, França EL. Hemorheological Evaluation and Cytokine Pro-duction in Dogs Naturally Infected with Anaplasmatidae. In *Parasitology and Microbiology Research*, 1st ed.; Pacheco GAB., Ed.; IntechOpen: London, UK, 2020; pp. 1-25. <https://doi.org/10.5772/intechopen.91191>.

Castro MB, Szabó MPJ, Aquino LPCT, Dagnoni AS, Alessi AC, Costa MT, Nakaghi ACH, Santi MD, Calchi AC, André MR, Machado RZ. Immunophenotypical and pathological changes in dogs experimentally infected with *Ehrlichia canis*. *Rev Bras Parasitol Vet* 2022; 31(2), e021621. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612022020>.

Diniz PPVP, Moura de Aguiar D. Ehrlichiosis and Anaplasmosis: An Update. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2022;52(6):1225-1266. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2022.07.002>

Faria JLM, Munhoz TD, João CF, Vargas-Herández 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. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612011000100015>.

Fessler MB, Rose K, Zhang Y, Jaramillo R, Zeldin DC, Relationship between serum

cholesterol and indices of erythrocytes and platelets in the US population. *J Lipid Res* 2013;54(11):3177-3188. <https://doi.org/10.1194/jlr.P037614>.

França EL, Ribeiro EB, Scherer EF, Cantarini DG, Pessôa RS, França FL, Honório-França AC. Effects of *Momordica charantia* L. on the blood rheological properties in diabetic patients. *BioMed Res Int* 2014, 840379. <https://doi.org/10.1155/2014/840379>.

Fonseca JP, Hirsch C, Guimarães AM. Erliquiose monocítica canina: epidemiologia, imunopatogênese e diagnóstico. *PUBVET* 2013;7(8):231. <https://doi.org/10.22256/pubvet.v7n8.1529>

Harrus S, Waner T, Avidar Y, Bogin E, Peh H, Bark H. Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. *Vet Parasitol* 1996;66(3-4):241-9. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(96\)01013-8](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(96)01013-8).

Ho, CH. White blood cell and platelet counts could affect whole blood viscosity. *J Chin Med Assoc* 2004;67:394–397.

Irace C, Carallo C, Scavelli F, Esposito T, De Franceschi MS, Tripolino C, Gnasso A. Influence of blood lipids on plasma and blood viscosity. *Clin Hemorheol Microcirc* 2014;57(3):267-74. <https://doi.org/10.3233/CH-131705>.

Kalelioglu T, Karamustafalioglu N, Celikel G, Genc A, Emul M. Serum osmolarity and blood viscosity as a potential explanation for the pathophysiology of neuroleptic malignant syndrome. *Int J Psychiatry Clin Pract* 2019;23(4):307-310. <https://doi.org/10.1080/13651501.2019.1617884>.

Kwaan HC. Role of plasma proteins in whole blood viscosity: a brief clinical review. *Clin Hemorheol Microcirc* 2010;44(3):167-76. <https://doi.org/10.3233/CH-2010-1271>.

Lobetti RG, Möhr AJ, Dippenaar T, Myburgh E. A preliminary study on the serum protein response in canine babesiosis. *J S Afr Vet Assoc* 2000 Mar;71(1):38-42. <https://doi.org/10.4102/jsava.v71i1.675>.

Mavromatis K, Doyle CK, Lykidis A, Ivanova N, Francino Mp, Chain P, Shin M, Malfatti M, Larimer F, Copeland A, Detter JC, Land M, Richardson PM, Yu Xj, Walker DH, McBride JW, Kyrpides NC. The Genome of the Obligately Intracellular Bacterium *Ehrlichia canis* Reveals Themes of Complex Membrane Structure and Immune Evasion Strategies. *J Bacteriol* 2006;188(11):4015–4023. <https://doi.org/10.1128/JB.01837-05>.

Martins E Silva J. *Principles of blood rheology*. Acta Médica Portuguesa. 1983;4:5-7.

McMillan DE. The effect of diabetes on blood flow properties. *Diabetes* 1983 May;32 Suppl 2:56-63. <https://doi.org/10.2337/diab.32.2.s56>.

Meisami AH, Abbasi M, Mosleh-Shirazi S, Azari A, Amani AM, Vaez A, Golchin A. Self-propelled micro/nanobots: A new insight into precisely targeting cancerous cells through intelligent and deep cancer penetration. *Eur J Pharmacol* 2022;926:175011. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.175011>.

Mendlowitz M. The effect of anemia and polycythemia on digital intravascular blood viscosity. *J Clin Invest* 1948;27(5):565-571. <https://doi.org/10.1172/JCI102001>.

Nimsuphan B, Prasroedsang S, Kengradomkij C, Thayananuphat A, Kromkhun P. Characterization of serum protein fractions of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis* or *Anaplasma platys* associated with uveitis. *Trop Biomed* 2020;37(3):551-559. <https://doi.org/10.47665/tb.37.3.551>.

Parashar R, Sudan V, Jaiswal AK, Srivastava A, Shanker D. Evaluation of clinical, biochemical and hematological markers in natural infection of canine monocytic ehrlichiosis. *J Parasit Dis* 2016; 40(4): 1351-1354. <https://doi.org/10.1007/s12639-015-0688-7>.

Rosenson RS, Shott S, Tangney CC. Hypertriglyceridemia is associated with an elevated blood viscosity Rosenson: triglycerides and blood viscosity. *Atherosclerosis* 2002;161(2): 433-9. [https://doi.org/10.1016/s0021-9150\(01\)00656-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9150(01)00656-6).

Sainz Á, Roura X, Miró G, Estrada-Peña A, Kohn B, Harrus S, Solano-Gallego L.

Guideline for Veterinary Practitioners on Canine Ehrlichiosis and Anaplasmosis in Europe. *Parasit Vectors* 2015;8, 1-20. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0649-0>.

Sawant S, Tucker B, Senanayake P, Waters DD, Patel S, Rye KA, Ong KL, Cochran BJ. The association between lipid levels and leukocyte count: A cross-sectional and longitudinal analysis of three large cohorts. *AHJ Plus: Cardiology Research & Practice* 2021;4:100024. <https://doi.org/10.1016/j.ahjo.2021.100024>.

Scherer EF, Cantarini DG, Siqueira R, Ribeiro EB, Braga ÉM, Honório-França AC, França EL. Cytokine Modulation of Human Blood Viscosity from Vivax Malaria Patients. *Acta Trop* 2016; 158, 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.03.001>.

Schoch CL, Ciufo S, Domrachev M, Hotton CL, Kannan S, Khovanskaya R, Leipe D, Mcveigh R, O'Neill K, Robbertse B, Sharma S, Soussov V, Sullivan JP, Sun L, Turner S, Karsch-Mizrachi I. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database (Oxford)* 2020;2020:baaa062. <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>.

Shaheen T, Ahmad SB, Rehman MU, Muzamil S, Bhat RR, Hussain I, Bashir N, Mir MUR, Paray BA, Dawood MAO. Investigations on cytokines and proteins in lactating cows with and without naturally occurring mastites. *J King Saud Univ Sci* 2020; 32(6):2863-2867. doi:10.1016/s0021-9150(01)00656-6.

Shropshire S, Olver C, Lappin M. Characteristics of hemostasis during experimental *Ehrlichia canis* infection. *J Vet Intern Med.* 2018;32:1334-1342. <https://doi.org/10.1111/jvim.15130>.

Silva JN, Cotrim AC, Conceição LAV, Marins CMF, Marchi, PGF, Honório-França AC, Almeida ABPF, França EL, Sousa VRF. Immunohaematological and rheological parameters in canine visceral leishmaniasis. *Rev Bras Parasitol Vet* 2018; 27, 211-217. <https://doi.org/10.1590/S1984-296120180021>.

Sirois M. Automated Analyzers. In *Laboratory procedures for veterinary technicians*, 7th ed.; Sirois, M. Ed.; Elsevier: St. Louis, USA, 2020, Volume 1, pp. 41-46.

Socolovschi C, Gomez J, Marié JL, Davoust B, Guigal PM, Raoult D, Parolla P. *Ehrlichia canis* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks in the Ivory Coast. *Ticks Tick Borne Dis* 2012; 3, 411–413. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.10.005>.

Steinberg MH, Charm SE. Effect of High Concentrations of Leukocytes on Whole Blood Viscosity. *Blood* 1971; 38(3): 299-301. <https://doi.org/10.1182/blood.V38.3.299.299>.

Vieira MC, Sobreira MFR, GALVÃO ALB, Lega E, Santana AE. Proteínas de fase aguda em cães - revisão de literatura. *Nucleus Animalium* 2013;5(2):35-46. <https://doi.org/10.3738/1982.2278.953>.

Willie CK, Tzeng YC, Fisher JA, Ainslie PN. Integrative regulation of human brain blood flow. *J Physiol* 2014;1;592(5):841-59. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.268953>.

Table 1.

Number of dogs for each of the variables: sex, age and body score (from 1 to 5 scale).

Caption: F = female; M = male; n = number of dogs; non = not informed; (+) positive result for *E. canis*

Table 1.

Number of dogs for each of the variables: sex, age and body score (from 1 to 5 scale).

Caption: F = female; M = male; n = number of dogs; non = not informed; (+) positive result for *E. canis*

Table 2.

Hematological and biochemical parameters of dogs positive for *E. canis* and the control group expressed as mean values and standard deviation (Student's t test).

Caption: (+) positive result for *E. canis*.

Table 3.

Pearson's linear correlation between the hematological and rheological parameters of dogs positive for *E. canis* and the control group.

Caption: (+) positive result for *E. canis*.

Table 4.

Pearson's linear correlation between the hematological and biochemical parameters of dogs positive for *E. canis* and the control group.

Caption: (+) positive result for *E. canis*.

Figure 1.

A. Curve of the relationship between the variables blood viscosity and shear rate in dogs with Canine Monocytic Ehrlichiosis (in red) and the control group (in blue). B. Hysteresis areas of dogs with Monocytic Ehrlichiosis (in red) and control group (in blue).

Figure 2.

Analysis of variance (Student's t test) of the blood viscosity parameter of dogs in the control group (blue) and dogs with Canine Monocytic Ehrlichiosis (red).

Table 1.

Group	Sex		Years		Body escore	
	F/M	n	class	n	scale	n
<i>Control</i>	F	10	1 a 5	16	< 3	0
	M	10	6 a 10	2	3	18
			>10	2	> 3	2
			NI	0	NI	0
	subtotal	20	subtotal	20	subtotal	20
<i>E. canis</i> (+)	F	11	1 a 5	14	< 3	2
	M	9	6 a 10	5	3	11
			>10	1	> 3	5
			NI	0	NI	2
	subtotal	20	subtotal	20	subtotal	20
Total		40		40		40

Table 2.

Clinical examination		Laboratory examination			
Clinical signs	%	Hematological alterations	%	Biochemical alterations	%

Apathy	30	Thrombocitopenia	80	Hyperproteinemia	40
Hyporexia	30	Anemia	70	Hyperglobulinemia	35
Pyrexia	25	Lymphopenia	60	Hypoalbuminemia	35
Pale mucous membranes	20	Eosinopenia	35	Hypoproteinemia.	5
Dermatopathy	20	Monocytopenia	10		
Lethargy	15	Monocytosis	10		
Hemorrhage	10	Neutrophilia	5		
Lymphadenomegaly	10	Neutropenia	5		
Onychogryphosis	10	Eosinophilia	5		
Emesis	10				
Weight loss	10				
Ophthalmopathy	10				
Diarrhea	5				
Convulsions	5				

Table 3.

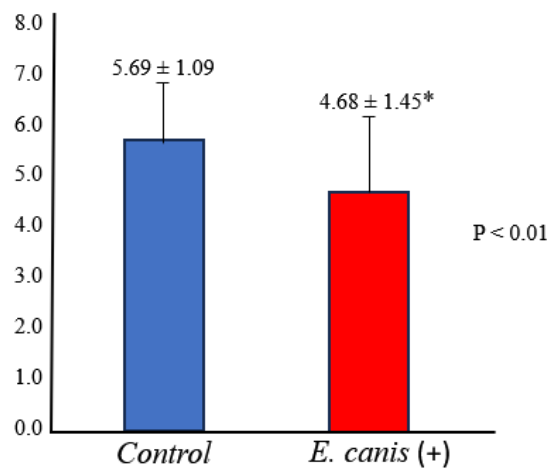
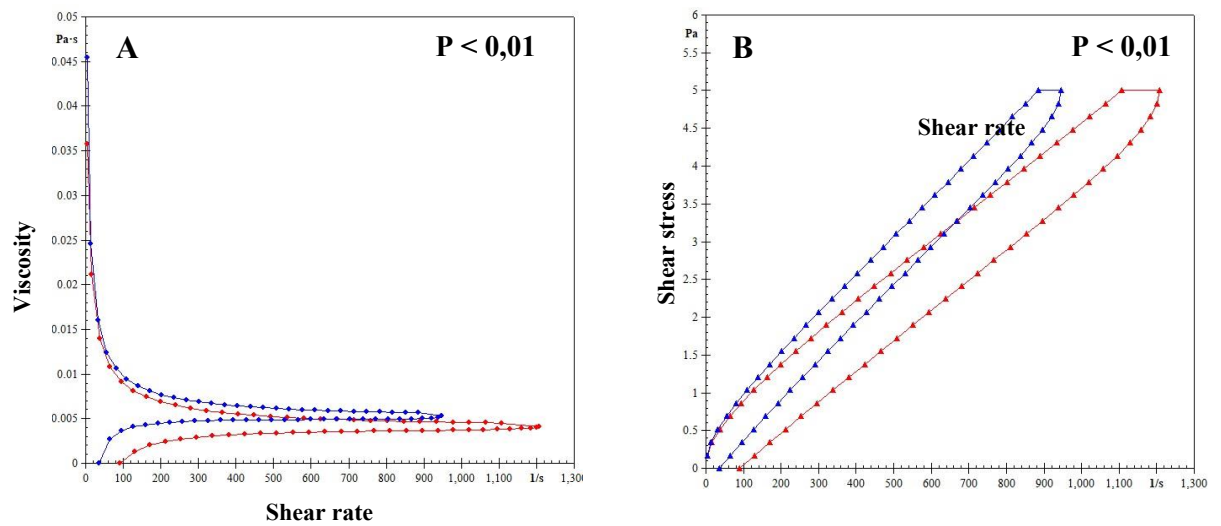
Hematologic parameters	<i>Control</i>	<i>E. canis</i> (+)	P
Erythrocytes (10 ⁶ /mm ³)	6.71 ± 1.21	4.96 ± 1.51	< 0.05
Hematocrit (%)	45.23 ± 8.12	33.02 ± 10.10	< 0.05
Hemoglobin (g/dL)	15.76 ± 2.81	11.17 ± 4.27	< 0.05
Platelets (10 ³ /mm ³)	235.6 ± 91.37	150.0 ± 110.43	< 0.05
Leukocytes (10 ³ /mm ³)	10.28 ± 4.04	8.85 ± 4.68	0.11
Neutrophils (10 ³ /mm ³)	6.55 ± 2.72	5.76 ± 3.31	0.16
Lymphocytes (10 ³ /mm ³)	1.64 ± 1.53	1.44 ± 1.37	0.27
Monocytes (10 ³ /mm ³)	0.31 ± 0.17	0.35 ± 0.27	0.33
Eosinophils (10 ³ /mm ³)	0.41 ± 0.35	0.26 ± 0.25	0.10
Biochemical parameters			
Total protein (g/dL)	7.20 ± 0.81	7.17 ± 1.85	0.48
Albumin (g/dL)	3.04 ± 0.93	2.5 ± 0.70	< 0.05
Globulins (g/dL)	4.15 ± 1.15	4.62 ± 1.77	0.17
Triglycerides (mg/dL)	80.06 ± 30.46	77.78 ± 33.70	0.38

Table 4.

Hematologic parameters	Blood viscosity			
	Control		<i>E. canis</i> (+)	
	r	P	r	P
Erythrocytes	0.17	0.45	0.8459	< 0.05
Hematocrit	0.14	0.53	0.8382	< 0.05
Hemoglobin	0.05	0.83	0.7833	< 0.05
Platelets	-0.02	0.92	0.2696	0.26
Leukocytes	-0.07	0.78	0.33	0.17
Neutrophils	0.12	0.62	0.24	0.33
Lymphocytes	0.02	0.91	0.05	0.84
Monocytes	-0.13	0.59	-0.01	0.98
Eosinophils	0.05	0.83	-0.16	0.51
Biochemical parameters				
Total protein	-0.18	0.44	0.5143	< 0.05
Albumin	-0.13	0.56	0.4588	< 0.05
Globulins	-0.01	0.93	0.3539	0.12
Triglycerides	0.10	0.64	0.3483	0.13

Table 5.

Hematologic parameter	Total proteins				Albumin				Globulin				Triglycerides			
	Control		<i>E. canis</i> (+)		Control		<i>E. canis</i> (+)		Control		<i>E. canis</i> (+)		Control		<i>E. canis</i> (+)	
	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P
Erythrocytes	-0.03	0.89	0.19	0.43	-0.15	0.54	0.62	< 0.05	0.10	0.69	-0.05	0.82	-0.08	0.73	0.45	< 0.05
Hematocrit	-0.02	0.92	0.17	0.48	-0.19	0.42	0.62	< 0.05	0.14	0.57	-0.07	0.76	-0.01	0.96	0.41	0.07
Hemoglobin	0.04	0.87	0.16	0.51	-0.23	0.33	0.60	< 0.05	0.21	0.37	-0.08	0.75	-0.10	0.96	0.37	0.11
Platelets	-0.02	0.94	0.24	0.31	0.53	< 0.05	0.60	< 0.05	-0.33	0.27	0.01	0.97	0.16	0.49	-0.03	0.89
Leukocytes	0.01	0.99	0.04	0.88	0.08	0.74	0.13	0.60	-0.07	0.79	-0.02	0.94	-0.14	0.57	0.21	0.40
Neutrophils	0.01	0.99	-0.12	0.63	0.16	0.51	0.20	0.42	-0.13	0.60	-0.21	0.39	0.24	0.32	0.50	< 0.05
Lymphocytes	-0.05	0.83	0.02	0.94	-0.44	0.08	-0.37	0.16	0.31	0.24	0.20	0.45	-0.28	0.29	-0.48	0.06
Monocytes	0.22	0.39	0.01	0.98	-0.03	0.91	0.09	0.73	0.16	0.50	-0.04	0.89	-0.19	0.44	-0.45	0.06
Eosinophils	-0.46	0.06	0.29	0.26	-0.10	0.70	-0.10	0.69	-0.35	0.18	0.36	0.16	-0.02	0.92	-0.40	0.12

Figure 1.**Figure 2.**

APENDICE B

Artigo 2 publicado

Revista: Biology (On Line)

CLASSIFICAÇÃO QUALIS A1

The screenshot shows the Sucupira platform interface for Qualis Periodicals classification. The header includes the Sucupira logo and a navigation bar with 'Qualis' and 'Qualis Periódicos'. The main content area is titled 'Qualis Periódicos' and contains a form for classification. The form includes a dropdown for 'Evento de Classificação' (CLASSIFICAÇÕES DE PERIÓDICOS QUADRIENIO 2017-2020), a dropdown for 'Área de Avaliação' (MEDICINA VETERINÁRIA), a text input for 'ISSN' (2076-7737), a dropdown for 'Título' (Biology), and a dropdown for 'Classificação' (SELECIONE --). There are 'Consultar' and 'Cancelar' buttons. Below the form is a table titled 'Periódicos' with columns: ISSN, Título, Área com publicação no quadriênio, Classificação, and Área mbo. The table contains one row: 2076-7737, BIOLOGY, MEDICINA VETERINÁRIA, A1, and BIOTECNOLOGIA. At the bottom, there are navigation links: '1º Início', '< Anterior', '1', 'Próximo', and 'Fim 10'.

Fator de impacto 4.2

The screenshot shows the MDPI Biology journal homepage. The header includes the MDPI logo and navigation links: Journals, Topics, Information, Author Services, Initiatives, and About. There is a 'Sign In / Sign Up' button and a 'Submit' button. Below the header is a search bar with the text 'Search for Articles:' and input fields for 'Title / Keyword', 'Author / Affiliation / Email', 'Biology', and 'All Article Types'. There is a 'Search' button and an 'Advanced' link. The main content area features a large banner image with the text 'Proteome Profiling of Brain Vessels in a Mouse Model of Cerebrovascular Pathology'. Below the banner is the journal title 'Biology' and a description: 'Biology is an international, peer-reviewed, open access journal of biological sciences published monthly online by MDPI. The Spanish Society for Nitrogen Fixation (SEFIN) and Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) are affiliated with Biology, and their members receive discounts on the article processing charges.' There are two bullet points: 'Open Access' (free for readers, with article processing charges (APC) paid by authors or their institutions) and 'High Visibility' (indexed within Scopus, SCIE (Web of Science), PubMed, PMC, PubAq, CAPplus /). On the right side, there is a section for 'E-Mail Alert' with a text input for 'Enter Your E-Mail Address...' and a 'Subscribe' button. Below that is a 'News' section with two items: '7 February 2024 Biology | Top 10 Most Cited Papers in 2023' and '1 February 2024 Acknowledgment of the Reviewers of Biology in 2023'. At the bottom, there is a date '31 January 2024' and a link 'MDPI Initiates The SCIE Index'.

Comprovante de publicação



Article

Effects of Doxycycline Treatment on Hematological Parameters, Viscosity, and Cytokines in Canine Monocytic Ehrlichiosis

Saulo Pereira Cardoso ^{1,2}, Adenilda Cristina Honorio-França ^{3,*}, Danielle Cristina Honorio França ³, Luana Paula Sales Silva ³, Danny Laura Gomes Fagundes-Triches ³, Maria Clara Bianchini Neves ², Aron Carlos de Melo Cotrim ³, Arleana do Bom Parto Ferreira de Almeida ², Eduardo Luzia França ³ and Valéria Régia Franco Sousa ^{2,*}

¹ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso, Barra do Garças 78607-899, MT, Brazil; saulo.cardoso@ifmt.edu.br

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária (FAVET), Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Cuiabá 78060-900, MT, Brazil; mariaclarabianchini1@gmail.com (M.C.B.N.)

³ Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Básicas e Aplicadas (PPGIP), Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Barra do Garças 78605-091, MT, Brazil; luanasalesvet@hotmail.com (L.P.S.S.); dannyauragf@hotmail.com (D.L.G.F.-T.); aroncarlosbg@gmail.com (A.C.d.M.C.); eduardo.franca@ufmt.br (E.L.F.)

* Correspondence: adenilda.franca@ufmt.br (A.C.H.-F.); valeriaregia27@gmail.com (V.R.F.S.)

Simple Summary: Canine Monocytic Ehrlichiosis is a disease of dogs caused by intracellular bacteria transmitted through tick bites. This disease can cause changes in a dog's blood, affecting the Count of cells and components of the defense system, such as cytokines, as well as the viscosity of the blood. This study was conducted to explore these changes in naturally infected dogs with ehrlichiosis, who were untreated and treated with a doxycycline-based antibiotic at a dose of 10 mg/kg Every 12 h for 28 days. Even after treatment, infected dogs exhibited a decrease in blood viscosity. The infection decreased total white blood cells, lymphocytes, and the cytokine tumor necrosis factor alpha level and increased cytokine interleukin-1-beta. Infected dogs showed a correlation between cytokines interleukin 10 and 12 with blood viscosity. Treating dogs with monocytic ehrlichiosis with doxycycline can help restore blood parameters such as platelets and eosinophils, but it may also elevate levels of interleukin-1-beta and monocytes. Therefore, assessing viscosity and cytokine levels is vital when treating dogs with this condition.

Abstract: This study aimed to analyze the hematological parameters, blood viscosity, and cytokines of dogs infected by *Ehrlichia canis* untreated and treated with doxycycline. Initially, 47 dogs were examined, and 36 were suspected to have canine monocytic ehrlichiosis, which was confirmed through molecular polymerase chain reaction tests. This study consisted of 25 dogs, with 11 being healthy and 14 testing positive for *E. canis*. The dogs were divided into experimental groups based on their test results, including a control group of healthy dogs (N = 11), a group of infected dogs without treatment (N = 7), and a group of infected dogs treated with doxycycline (N = 7) at a 10 mg/kg dose every 12 h for 28 days. Blood samples were taken to determine hematological parameters, viscosity, and cytokine levels. It was observed that, regardless of doxycycline treatment, there was a reduction in total leukocytes and lymphocytes in infected dogs with *Ehrlichia canis*. The eosinophils and platelets decreased in dogs with *Ehrlichia canis* infections without treatment. Monocytes, eosinophils, and platelets increased when the dogs were treated with doxycycline. Regardless of treatment, infected dogs' blood viscosity was

lower than uninfected dogs. Infected dogs showed lower TNF- α and increased IL-10. There was a correlation between the blood viscosity with the cytokines IL-10 and IL-12 in the infected dogs. The eosinophil count correlated with TNF- α in the group of infected and untreated dogs. In conclusion, treating dogs with monocytic ehrlichiosis using doxycycline can increase platelet and eosinophil levels but may also increase IL-10 and monocyte levels, exacerbating inflammation. Therefore, evaluating viscosity and cytokine levels is important when treating dogs with this condition.

Keywords: Ehrlichia canis; leukocytes; platelets; dogs; doxycycline

1. Introduction

Bacteria of the Anaplasmataceae family can infect blood cells such as erythrocytes, leukocytes, or platelets, leading to systemic disorders in animals and humans [1]. One such disorder is Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME), caused by an obligate intracellular Gram-negative bacterium, Ehrlichia canis (E. canis), which has an affinity for monocytes. This bacterium is commonly found in domestic dogs and is transmitted through bites from hard ticks (Ixodidae) such as Rhipicephalus sanguineus. CME is a globally distributed disease in tropical and subtropical regions [2], with Brazil being one of the countries where the disease is prevalent. Studies have shown that CME is widely disseminated in Brazil [3,4], and the rates of E. canis infections in dogs vary across different regions of the country, resulting in a prevalence of the disease between 22% and 76% [5–7].

CME evolves with different clinical signs. In the acute phase, the following can be observed: fever, serous or purulent oculonasal discharge, anorexia, weight loss, dyspnea, lymphadenopathy, splenomegaly, pale mucous membranes, hemorrhages, neurological signs, thrombocytopenia, edema, uremia, jaundice, and lameness [8]. In the subclinical phase, clinical signs may often not be observed or not detected during the clinical evaluation due to the apparent physical health of the dog [8]. Still, splenomegaly and intermitente fever may occur, or even signs not commonly reported by the dog's owners [9]. Finally, the chronic phase can be mild or severe and is characterized by clinical signs of bleeding tendencies [10], depression, weight loss, lymphadenopathy, thrombocytopenia, anemia, pancytopenia [8], polyarthritis, and severe ocular injuries [9].

To cause infection, E. canis needs to escape elimination by the immune system, causing disturbances in the cellular environment and modulating the production of cytokines to favor persistent infection. The survival of the bacteria in the host depends on the inhibition of the immune response of the T helper 1 (Th1) type. The cytokine interferon-gamma (IFN- γ), linked to the Th1 response, activates infected monocytes to eliminate intracellular microorganisms [11].

E. canis infection can lead to significant hematological abnormalities in dogs, including pancytopenia [12,13]. In addition, studies have shown that individuals with anemia [14], altered blood pressure [15], hyperviscosity syndrome [16], and diabetes [17] experience changes in blood viscosity. Similarly, dogs infected with bacteria from the Anaplasmataceae family demonstrated decreased viscosity [18]. However, the effects of E. canis infection on blood viscosity in animals have yet to be fully understood.

Blood viscosity is crucial in maintaining systemic arterial pressure and gasometry [19], as it helps maintain the blood's rheological properties and restore homeostatic conditions [20]. In addition, infections, such as malaria, can cause changes in blood viscosity, and the interaction with cytokines may act as an immunomodulatory agent during the infection [21]. Dogs infected with E. canis showed changes in cytokine levels, which may be related to hematological changes in the disease.

Also, studies indicate that doxycycline is a highly effective drug for treating E. canis infections [22–25] because of its capacity to penetrate cells. Moreover, no research establishes a connection between the effects of doxycycline on viscosity and cytokines. Therefore, this study aimed to analyze the hematological parameters, blood viscosity, and serum cytokines of dogs infected by E. canis and either untreated or treated with doxycycline.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Blood samples were collected from 47 dogs, with different ages (>1 year) and no distinction of sex or breed that were haphazardly selected and evaluated in the city of Barra do Garças, State of Mato Grosso, Brazil (-15.8891, 15°53'24" South, -52.2634, 52°15'24" West). Regardless of disease stage, dogs regardless

of disease stage, dogs with at least three clinical signs of CME were initially subjected to rapid serological testing. Of the total, 36 dogs with suspected CME were positive in commercial serological test kits (Alere®, Waltham, MA, USA). Next, *E. canis*-positive animals were tested via PCR to detect *E. canis*-specific DNA. All animals positive in rapid serological tests and confirmed by PCR were included in the study. Dogs that showed clinical signs of CME but tested negative in the PCR test, dogs that tested positive for *Leishmania* sp., *Babesia* sp., dogs under one year old, and dogs whose owners did not give permission were not included in the study. Finally, dogs were treated for CME with doxycycline (Syntec, São Paulo, Brazil) at 10 mg/kg every 12 h for 28 consecutive days [25]. Seven dogs returned for blood collection immediately after completing doxycycline treatment. According to the results of the diagnostic tests, clinical signs of the disease, and treatment adherence, the following groups were formed: dogs in the control group, negative for *E. canis* in both tests and without clinical EMC signs (N = 11); dogs infected by *E. canis*, reactive in both tests, and untreated (N = 7); and dogs reactive in both tests for *E. canis* and treated with doxycycline (N = 7). The scheme for obtaining samples and experimental design is described in Figure 1.

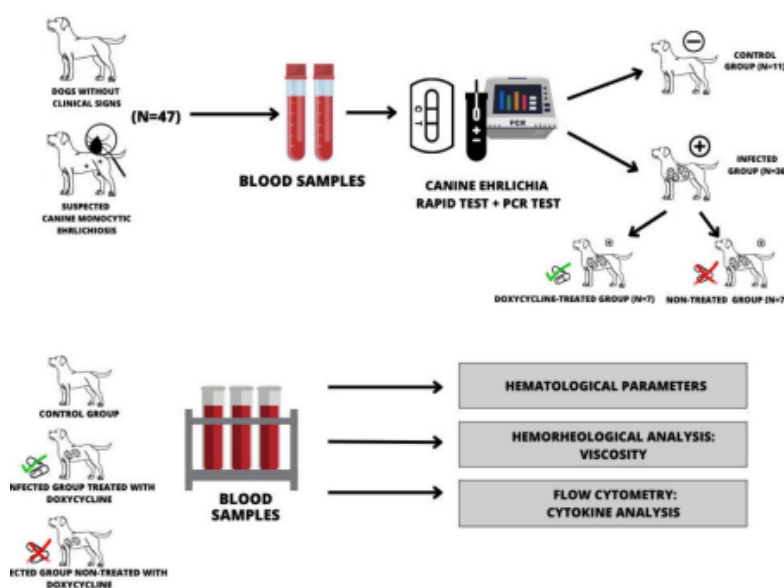


Figure 1. Representative scheme for obtaining samples and experimental design.

2.2. Serological Tests

Serological tests were applied using whole blood with EDTA. In addition, the Ehrlichiosis Ac Test Kit–Alere test® (Waltham, MA, USA), which has immunochromatographic technology, was applied in dogs. The tests were used following the guidelines of their respective manufacturers.

2.3. Polymerase Chain Reaction (PCR)

DNA extraction from whole blood was performed using the phenol-chloroform method [26]. The DNA was dissolved in 20 mg/mL of ultrapure water and stored at -20°C . To ensure the DNA's purity and lack of inhibitors, we tested the samples using a PCR method to detect the canine b-globin gene. This gene amplifies a 119 bp fragment [27].

The DNA detection process used primers E_can0503F (50'-CAG CAA ATT CCA ATC TGC ACT TC-30') and E_can0503R (50'-GAG CTT CCA ATT GAT GGGTCT G-30') in which the Ecaj_0503 gene encodes 146 base pairs of a hypothetical protein (E_can0503 system) [28].

Qualitative PCR analysis was performed using a StepOne™ Real-Time PCR System Sequence Detection System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Reactions were prepared in a final volume of 25 μL containing non-specific double-stranded DNA intercalators (SYBR Green® Master Mix, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 0.3 μM of each primer, and 2 μL of target DNA. The reaction program consisted of the following steps: 94°C for 10 min, followed by 40 cycles of 94°C for 15 s for denaturation, and 60°C for 30 s for annealing and extension.

Positive control was an animal positive for *E. canis* in PCR with morulae in blood smear, and negative control (DNA-free reaction) was included in all PCR. Amplified products were subjected to 1.5% agarose gel electrophoresis. They were all stained with Gel Red and visualized in a transilluminator (UV-300 nm) Chemi-doc (Bio-Rad TM, Berkeley, CA, USA).

2.4. Hematological Parameters

Whole blood samples with EDTA from the dogs were sent for laboratory analysis to obtain hematological data such as erythrogram, leukogram, and platelet count in an automated device Icounter Vet, model D Check D Plus (DIAGNO, Belo Horizonte, Brazil), according to the literature [29]. In addition, reference values were considered, as proposed in the literature [30].

2.5. Hemorheological Parameters

Whole blood with EDTA from each dog was subjected to hemorheology analysis to obtain data on blood viscosity. A compact modular rheometer, Anton-Paar® Cone-Plate model-MCR 102 (Anton Paar® GmbH, Ostfildern, Germany), was used, and the graphs were obtained using the Rheoplus software. For hemorheology analysis, 750 µL of Whole blood with EDTA was used, maintaining a temperature of 37 °C in the plate with 60 flow measurement points [17].

2.6. Cytokines

The dog's blood serum samples were submitted for preparation for flow cytometry examination. Pro-inflammatory and regulatory cytokines were measured, such as IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, and TNF-α [14,21]. This process was carried out with a Flow Cytometer, model FACScalibur (BD Biosciences, St. Louis, MI, USA), with specific marking using antibodies for each cytokine. Cytometric Bead Array (CBA) kits (BD Biosciences, St. Louis, MI, USA) were used for this quantification, and the procedure was executed as per the instructions provided by the manufacturer.

2.7. Statistical Analysis

Data were expressed as a mean and standard error. We analyzed the differences in blood properties and cytokine levels between noninfected, infected, and infected animals treated with doxycycline. A D'Agostino normality test and variance analysis (ANOVA) were used, followed by Tukey's test between animals noninfected, infected, and infected and treated. The Student t-test for two related samples was used to compare before and after dogs treated with doxycycline. Additionally, we analyzed correlations between blood properties, cytokine levels, and hematological parameters using Pearson's linear correlation. Biostat 5.0 was the software used for statistical analysis. If the p value is below 0.05, it indicates statistical significance.

3. Results

Out of the 36 dogs with clinical signs of CME, 9/36 displayed pyrexia, 9/36 showed apathy, 5/36 had pale mucosa, 5/36 suffered from hyporexia, and 4/36 had hemorrhages and lymphadenopathy. Furthermore, 2/36 dogs experienced vomiting, while 2/36 showed weight loss and diarrhea. Additionally, 1/36 of the dogs had onychogryphosis, stomatitis, and seizures.

Regardless of doxycycline treatment, there was a reduction in total leukocytes and lymphocytes in infected dogs (Table 1). In addition, the eosinophils and platelet concentrations decreased in dogs with *E. canis* infections without treatment. Conversely, there was an increase in monocytes, eosinophils, and platelets in dogs infected after the treatment of doxycycline.

Table 1. Hematological values (mean and standard error) in noninfected dogs and infected dogs with *E. canis* untreated and treated with doxycycline.

Parameters	<i>E. canis</i> (-)	<i>E. canis</i> (+)	<i>E. canis</i> (+) Doxycycline	<i>p</i>
Erythrocytes (10 ⁶ /µL)	6.42 ± 1.82	5.73 ± 2.08	5.69 ± 1.64	0.9545
Hemoglobin (g/dL)	14.72 ± 3.98	13.23 ± 5.36	14.06 ± 3.86	0.8443
Hematocrit (%)	43.36 ± 11.85	37.58 ± 14.29	38.73 ± 11.06	0.8654
Leukocytes (10 ³ /µL)	10.27 ± 2.98 ^a	8.36 ± 2.49 ^b	8.70 ± 3.81 ^b	0.0119
Neutrophils (10 ³ /µL)	6.32 ± 2.21	6.88 ± 2.61	6.35 ± 2.98	0.5564
Lymphocytes (10 ³ /µL)	2.84 ± 1.98 ^a	1.25 ± 0.79 ^b	1.31 ± 0.77 ^b	0.0086
Monocytes (10 ³ /µL)	0.33 ± 0.12 ^a	0.30 ± 0.21 ^a	0.64 ± 0.36 ^b	0.0257
Eosinophils (10 ³ /µL)	0.67 ± 0.78 ^a	0.26 ± 0.28 ^b	0.60 ± 0.36 ^a	0.0290
Platelets (10 ³ /µL)	211.90 ± 161.28 ^a	183.68 ± 113.72 ^b	298.26 ± 178.50 ^c	0.0124

E. canis (-): dogs negative for *Ehrlichia canis*; *E. canis* (+): dogs positive for *Ehrlichia canis*; *E. canis* (+) doxycycline: dogs treated with doxycycline. Averages followed by different letters differ significantly by *p* < 0.05, considering the same parameters. ANOVA test followed by the Tukey was used post-test.

There was no significant difference in the erythrocytes, hemoglobin, hematocrit, leukocytes, neutrophils, and lymphocyte levels between dogs infected with and without treatment ($p > 0.05$). However, the doxycycline treatment increased the monocytes, platelets, and eosinophils (Figure 2) and restored the levels to similar values found in noninfected dogs (Table 1).

Figure 3 shows the blood viscosity of dogs non-infected or infected with *E. canis* treated or not with doxycycline. The mean blood viscosity of animals infected by *E. canis* decreased independently of treatment (Figure 3). The blood viscosity in dogs infected with untreated *E. canis* and treated with doxycycline is shown in Figure 4. The treatment with doxycycline reduced the blood viscosity in dogs with infection.

Table 2 shows the cytokine levels in dogs infected with *E. canis* serum. The IL1- β level was higher in dogs with CME, and there was no difference between treated and untreated dogs. The TNF- α , regardless of the treatment, showed lower concentrations in the serum of infected dogs. The lowest levels of TNF- α were in infected and untreated dogs. There was no significant difference in the concentrations of IL-6, IL-8, IL-10, and IL-12 between the groups studied.

After treatment with doxycycline, an increase in IL-6 concentrations was observed in infected dogs (Figure 5). However, no difference was observed without and with treatment for the other cytokines evaluated.

The cytokines were correlated with hematological parameters. IL-12 showed an inversely proportional correlation with hematocrit in infected and untreated dogs. There was a directly proportional correlation between TNF- α and IL-12 and the eosinophils in the untreated group. In the infected and treated dogs group, the leukocyte parameter showed a strong and inversely proportional correlation with cytokine IL-10 (Table 3).

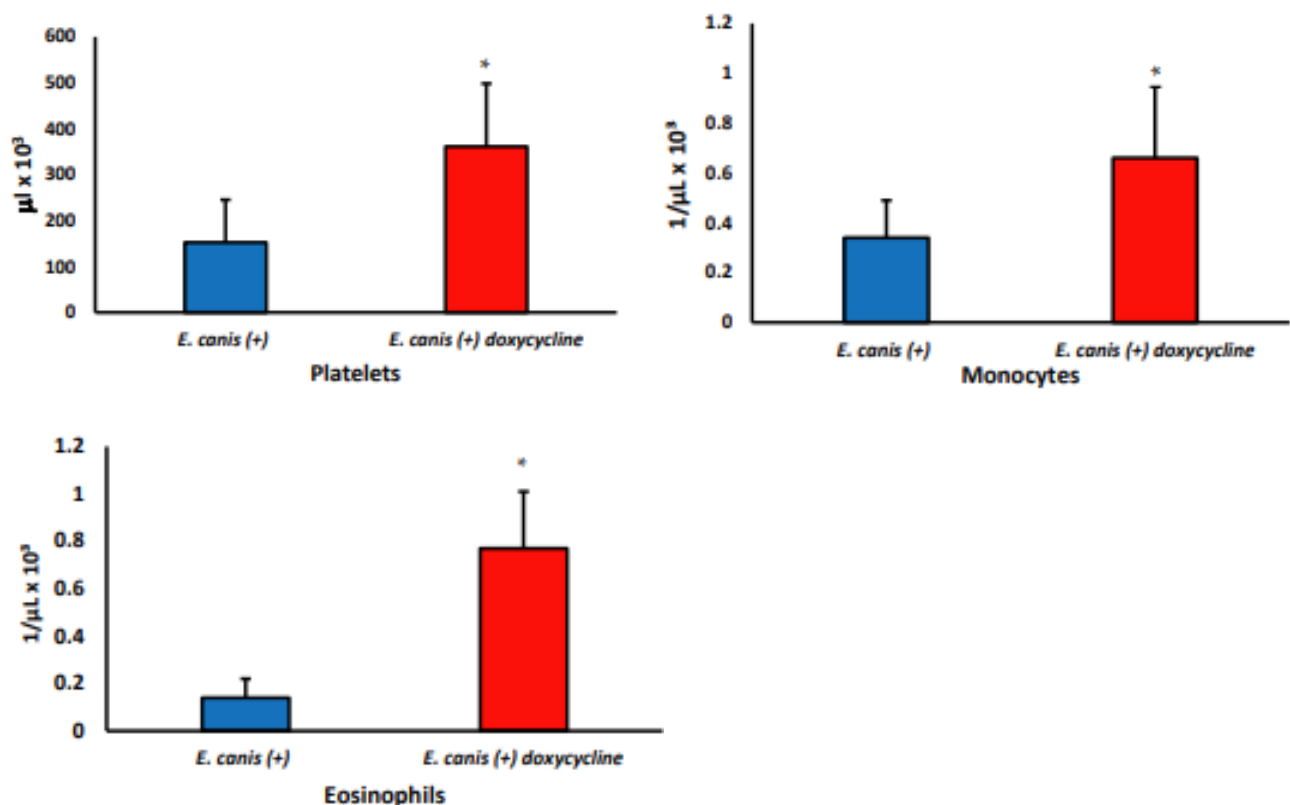


Figure 2. Effect of doxycycline of platelets, monocytes, and eosinophils in blood of dogs with CME untreated (blue color) and treated (red color) treatment. Student t-test for two related samples. * differences between before and after treatment. Platelets $p = 0.0377$, monocytes $p = 0.0303$, and eosinophils $p = 0.0025$.

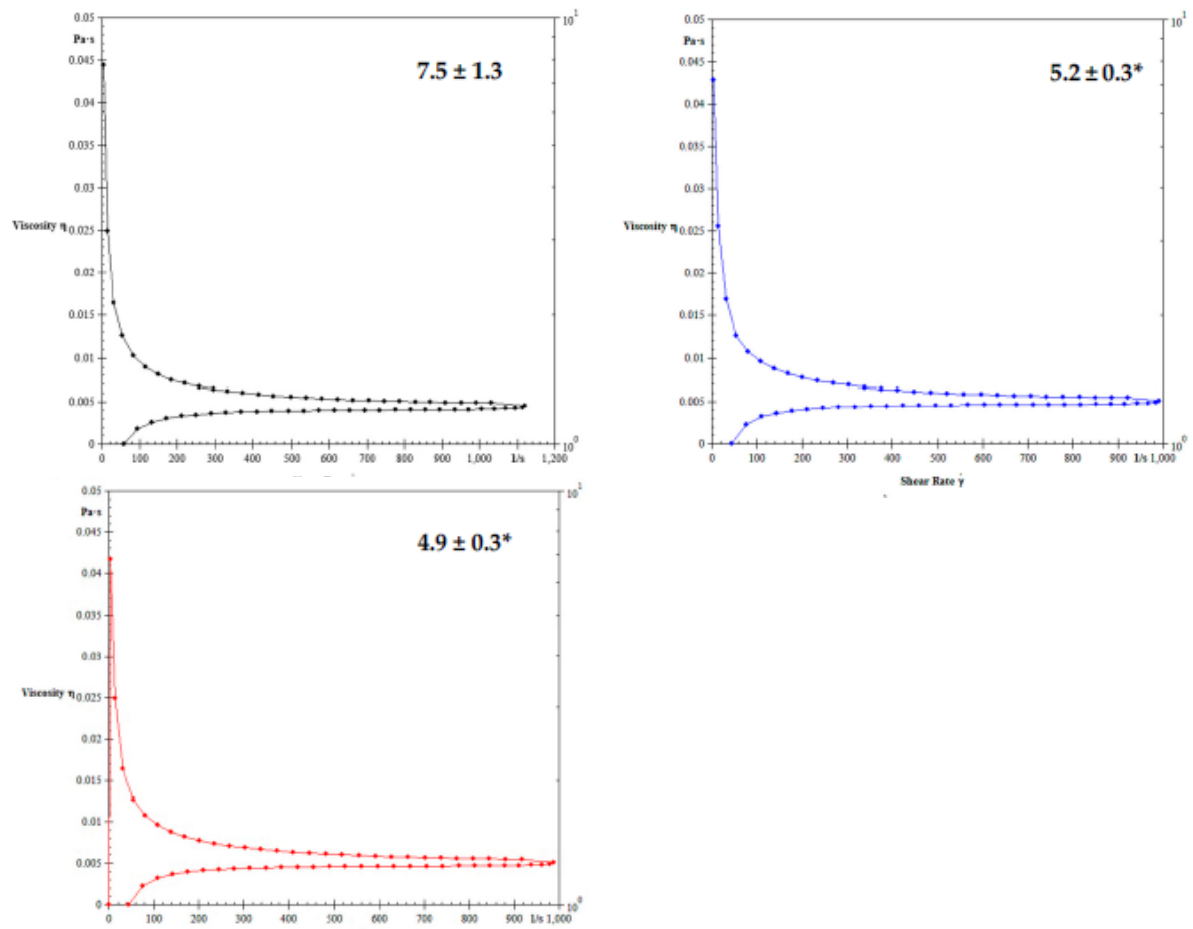


Figure 3. Blood viscosity of the noninfected dogs (black color), infected dogs (blue color), and infected dogs treated with doxycycline (red color). * $p < 0.05$ difference between noninfected dogs (control) with the infected dogs (treated or not with doxycycline). ANOVA test followed by Tukey test was used post-test

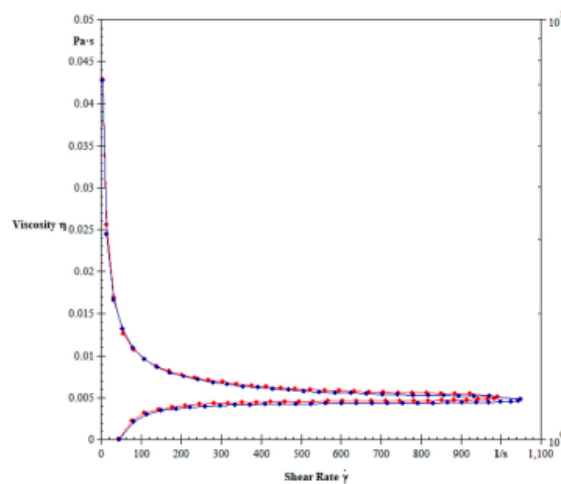


Figure 4. Effect of doxycycline on blood viscosity of dogs with untreated CME (blue color) and treated (red color) with doxycycline. difference between untreated dogs and dogs treated with doxycycline. Student t-test for two related samples. $p < 0.0001$.

Table 2. Serum cytokine values (mean and standard error) in noninfected dogs and infected dogs with *E. canis* untreated and treated with doxycycline

Cytokines (pg/mL)	<i>E. canis</i> (-)	<i>E. canis</i> (+)	<i>E. canis</i> (+) Doxycycline	<i>p</i>
IL-1 β	25.59 $\pm$ 8.61	56.72 $\pm$ 24.75 a	55.38 $\pm$ 30.76 a	0.0150
IL-6	28.66 $\pm$ 14.04	14.42 $\pm$ 8.03	23.63 $\pm$ 13.85	0.1588
IL-8	20.40 $\pm$ 3.60	31.17 $\pm$ 20.51	33.95 $\pm$ 22.62	0.5416
IL-10	34.39 $\pm$ 12.60	30.46 $\pm$ 30.59	46.83 $\pm$ 26.45	0.3815
IL-12	28.38 $\pm$ 9.16	32.47 $\pm$ 11.97	25.24 $\pm$ 8.86	0.4985
TNF- α	589.75 $\pm$ 197.56 a	32.97 $\pm$ 37.09 b	340.40 $\pm$ 26.65 c	0.0001

E. canis (-): dogs negative for *Ehrlichia canis*; *E. canis* (+): dogs positive for *Ehrlichia canis*; *E. canis* (+) doxycycline: dogs treated with doxycycline. Averages followed by different letters differ significantly by $p < 0.05$, considering the same parameters. ANOVA test followed by the Tukey test was used post-test.

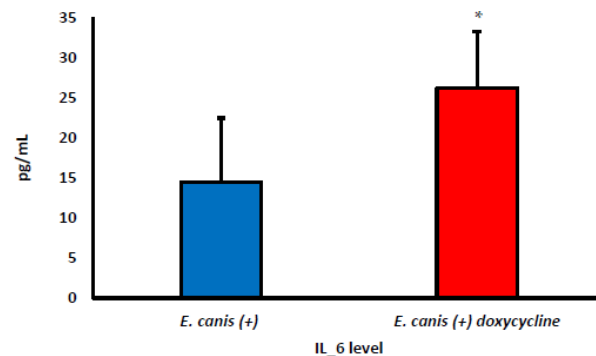


Figure 5. Effect of doxycycline on IL-6 levels of dogs with CME without (blue color) and with (red color) treatment with doxycycline. $p < 0.0073$; *difference between infected and untreated dogs and dogs treated with doxycycline. Student t-test for two related samples.

Table 3. Pearson's linear correlations and values of linear coefficients (r) and statistical significance (p) between hematological parameters and serum cytokines in noninfected dogs and dogs infected with *E. canis* either untreated or treated with doxycycline

Parameters	Group	IL-1 β		IL-6		IL-8		IL-10		IL-12		TNF- α	
		r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Erythrocytes	<i>E. canis</i> negative	-0.024	0.958	-0.270	0.420	-0.619	0.138	-0.457	0.157	0.134	0.773	-0.118	0.728
	<i>E. canis</i> positive	-0.248	0.591	-0.190	0.683	-0.711	0.073	-0.244	0.597	-0.738	0.057	-0.660	0.106
	<i>E. canis</i> positive + doxycycline	-0.324	0.477	0.156	0.738	-0.166	0.722	0.681	0.092	0.101	0.828	0.142	0.760
Hematocrit	<i>E. canis</i> negative	0.073	0.875	-0.528	0.094	-0.579	0.172	-0.466	0.148	0.121	0.795	-0.122	0.719
	<i>E. canis</i> positive	-0.360	0.427	-0.166	0.720	-0.745	0.054	-0.316	0.488	-0.783	0.037 *	-0.726	0.064
	<i>E. canis</i> positive + doxycycline	-0.578	0.173	-0.165	0.722	0.057	0.902	0.668	0.100	0.219	0.637	-0.113	0.808
Hemoglobin	<i>E. canis</i> negative	0.063	0.892	-0.489	0.126	-0.651	0.112	-0.464	0.150	0.057	0.903	-0.062	0.855
	<i>E. canis</i> positive	-0.233	0.613	-0.061	0.896	-0.559	0.191	-0.121	0.795	-0.623	0.131	-0.654	0.110
	<i>E. canis</i> positive + doxycycline	-0.519	0.231	-0.172	0.711	-0.019	0.967	0.678	0.093	0.239	0.604	-0.111	0.812
Leukocytes	<i>E. canis</i> negative	0.113	0.809	0.037	0.912	-0.594	0.159	0.015	0.964	0.353	0.436	-0.463	0.150
	<i>E. canis</i> positive	0.215	0.642	0.472	0.284	-0.278	0.545	0.506	0.298	0.148	0.751	-0.095	0.838
	<i>E. canis</i> positive + doxycycline	0.500	0.252	0.243	0.599	-0.145	0.755	-0.757	0.048 *	0.318	0.487	0.486	0.268
Neutrophils	<i>E. canis</i> negative	0.080	0.863	-0.152	0.654	-0.162	0.727	0.224	0.506	0.282	0.539	-0.396	0.227
	<i>E. canis</i> positive	0.119	0.799	0.314	0.492	-0.386	0.391	0.410	0.360	0.068	0.884	-0.183	0.694
	<i>E. canis</i> positive + doxycycline	0.686	0.088	0.366	0.418	-0.229	0.619	-0.747	0.053	0.155	0.739	0.525	0.225
Monocytes	<i>E. canis</i> negative	0.051	0.913	0.168	0.620	-0.579	0.172	0.296	0.376	-0.001	0.997	-0.226	0.502
	<i>E. canis</i> positive	-0.234	0.613	0.022	0.961	-0.075	0.871	-0.466	0.291	-0.273	0.552	-0.004	0.992
	<i>E. canis</i> positive + doxycycline	-0.753	0.050	-0.337	0.459	0.191	0.681	0.2749	0.550	0.185	0.691	-0.080	0.863
Lymphocytes	<i>E. canis</i> negative	-0.555	0.195	0.190	0.573	0.461	0.297	0.015	0.964	0.512	0.239	-0.073	0.831
	<i>E. canis</i> positive	-0.021	0.963	-0.257	0.577	0.187	0.686	-0.399	0.374	-0.233	0.614	0.123	0.792
	<i>E. canis</i> positive + doxycycline	-0.313	0.493	-0.368	0.416	-0.077	0.868	-0.201	0.664	0.692	0.084	0.095	0.838
Eosinophils	<i>E. canis</i> negative	0.631	0.128	0.065	0.849	-0.297	0.517	0.144	0.671	-0.471	0.285	-0.343	0.300
	<i>E. canis</i> positive	0.506	0.246	0.388	0.389	0.177	0.703	0.523	0.227	0.784	0.056 *	0.847	0.016 *
	<i>E. canis</i> positive + doxycycline	0.429	0.335	-0.029	0.950	-0.111	0.811	-0.001	0.997	-0.560	0.190	0.077	0.868
Platelets	<i>E. canis</i> negative	-0.184	0.692	-0.040	0.906	-0.388	0.388	0.240	0.645	-0.090	0.846	-0.035	0.918
	<i>E. canis</i> positive	-0.179	0.699	-0.338	0.457	-0.013	0.977	-0.014	0.976	-0.293	0.523	-0.597	0.156
	<i>E. canis</i> positive + doxycycline	0.160	0.730	-0.175	0.706	0.409	0.361	0.113	0.808	-0.005	0.991	-0.600	0.154

(negative) dogs negative for *Ehrlichia canis*; (positive) dogs positive for *Ehrlichia canis*; positive + doxycycline: dogs positive for *Ehrlichia canis* treated with doxycycline.

The group of uninfected dogs showed an inversely proportional correlation between TNF- α and blood viscosity. The IL-10 correlated inversely with blood viscosity in the group of infected and untreated dogs and correlated directly proportionally in the dogs treated with doxycycline. Cytokines IL-1 β and IL-12 showed an inversely proportional correlation with blood viscosity in infected dogs not treated with doxycycline (Table 4).

Table 4. Pearson's linear correlations and values of linear coefficients (r) and statistical significance (p) between serum cytokines and blood viscosity parameters in noninfected dogs and dogs infected with *E. canis* untreated or treated with doxycycline.

Cytokine	Group	Blood Viscosity	
	<i>E. canis</i>	r	p
IL-1 β	negative	-0.195	0.673
	positive	-0.762	0.046 *
	positive + doxycycline	0.208	0.654
IL-6	negative	0.134	0.694
	positive	-0.082	0.860
	positive + doxycycline	0.044	0.924
IL-8	negative	-0.395	0.379
	positive	-0.697	0.081
	positive + doxycycline	0.153	0.742
IL-10	negative	0.294	0.379
	positive	-0.797	0.031 *
	positive + doxycycline	0.882	0.019 *
IL-12	negative	0.135	0.772
	positive	-0.838	0.018 *
	positive + doxycycline	0.598	0.155
TNF- α	negative	-0.930	>0.001 *
	positive	-0.672	0.097
	positive + doxycycline	0.142	0.760

(negative) dogs negative for *Ehrlichia canis*; (positive) dogs positive for *Ehrlichia canis*; positive + doxycycline: dogs positive for *Ehrlichia canis* treated with doxycycline.

Pearson's linear correlations between the hematological parameters and blood viscosity of the three groups are shown in Table 5. There was a proportional correlation between the viscosity and leukocytes and neutrophils in dogs treated with doxycycline.

Table 5. Pearson's linear correlations and values of linear coefficients (r) and statistical significance (p) between hematological and blood viscosity parameters in noninfected dogs and dogs infected with *E. canis* untreated or treated with doxycycline.

Hematological Parameters	Group	Blood Viscosity	
	<i>E. canis</i>	r	p
Erythrocytes	negative	0.022	0.946
	positive	0.647	0.115
	positive + doxycycline	-0.266	0.563
Hematocrit	negative	0.026	0.939
	positive	0.722	0.066
	positive + doxycycline	-0.316	0.489
Hemoglobin	negative	-0.033	0.922
	positive	0.558	0.192
	positive + doxycycline	-0.350	0.441
Leukocytes	negative	0.378	0.2504
	positive	-0.274	0.552
	positive + doxycycline	0.917	0.003
Neutrophils	negative	0.351	0.289
	positive	-0.272	0.554
	positive + doxycycline	0.804	0.029
Monocytes	negative	0.269	0.423
	positive	0.577	0.174
	positive + doxycycline	-0.036	0.938

Lymphocytes	negative	0.032	0.924
	positive	0.439	0.324
	positive + doxycycline	0.523	0.228
Eosinophils	negative	0.247	0.462
	positive	-0.541	0.209
	positive + doxycycline	-0.578	0.173
Platelets	negative	0.087	0.797
	positive	-0.180	0.699
	positive + doxycycline	-0.332	0.465

(negative) dogs negative for *Ehrlichia canis*; (positive) dogs positive for *Ehrlichia canis*; positive + doxycycline: dogs positive for *Ehrlichia canis* treated with doxycycline.

4. Discussion

E. canis is a common infection that affects dogs and can show varying clinical signs. However, it is challenging to determine the stage of the disease in naturally infected dogs compared to experimentally infected dogs. In this study, dogs exhibited clinical signs such as fever, lethargy, pale gums, loss of appetite, bleeding, and swollen lymph nodes, characteristic of CME. Other authors have reported similar clinical findings [31]. Clinical, laboratory, serological, and molecular findings are necessary to diagnose canine ehrlichiosis. Early diagnosis is crucial for effective treatment of the disease [32].

The disease can cause significant changes in a dog's blood count [12,13,33]. In this study, dogs infected with *E. canis* showed alterations in blood cells, particularly in lymphocytes, eosinophils, and platelets. This infection also affected the rheological behavior and cytokine levels of the blood. Although doxycycline treatment improved hematological parameters, no significant changes were observed in blood viscosity levels after the treatment in infected animals.

CME is challenging to diagnose due to its various stages and clinical manifestations. Hematological abnormalities have been reported in infected dogs [34]. Here, the evaluation of leukocytes in infected dogs shows lymphopenia, and no effects on these cells were observed after the doxycycline treatment. A review update about the treatments used for CME in dogs showed in the conclusions that the first line of treatment with doxycycline could be performed within 3 to 4 weeks [25], as used in the present study. Similarly, another study also cites doxycycline treatment with a duration of 3 to 4 weeks [33]. Thus, the duration of the treatment of 4 weeks demonstrates effectiveness for eliminating the infection of *E. canis* in dogs, and it is not necessary to apply the treatment for up to 6 weeks [35].

Interestingly, the concentration of some cells increased due to doxycycline. Hematological alteration in dogs with CME is also reported in the literature [36]. Tetracyclines are drugs that have immunomodulatory effects in addition to antimicrobial effects. Thus, doxycycline is cited as an antibiotic that causes changes in the counts of subpopulations of lymphocytes in dogs with CME and healthy dogs by inhibiting lymphocyte proliferation or inducing cell death [37]. Doxycycline is an antibiotic used to treat ehrlichiosis [25], but it demonstrates this undesirable effect on lymphocytes.

Studies in literature have reported a decrease in eosinophil levels in dogs infected with *E. canis* [38]. However, this study found that treatment corrected eosinopenia despite the initial reduction in eosinophil levels in infected dogs. Regarding thrombocytopenia in infected dogs with *E. canis*, it is a very common alteration described in CME [38]. The use of doxycycline, in addition to the antimicrobial effect on *E. canis* [39], has a specific effect on platelet proliferation [37]. This description was shown in our study by the increase in platelets in the group of dogs with treatment, an effect also reported in other studies [37,40].

Hematological parameters play a vital role in regulating blood viscosity. Variations in the plasma or cellular components can impact resistance to blood flow in the vascular system and affect tissue perfusion [41]. In addition, blood viscosity is crucial for maintaining the rheological properties of blood [20], and studies have correlated changes in viscosity with infections or metabolic diseases [17,21].

Hemorheology is an important tool for characterizing the rheological behavior of the blood of sick dogs, especially diseases that cause changes in hematological parameters. Thus, blood viscosity is a parameter obtained by the hemorheology technique essential to be analyzed along with hematological parameters and serum cytokines to understand the pathophysiological changes in infectious diseases such as CME. Other articles also observed this mechanism that studied obligate intracellular parasites or bacteria and hemorheology changes caused by the infectious process [14,18,21].

This study showed interesting hematological, circulatory, and immunomodulation changes in infected dogs untreated and treated with doxycycline. There was a decrease in the blood viscosity of dogs infected with *E. canis*. Similarly reported in another study with dogs infected with bacteria from the

Anaplasmataceae family, PCR-positive animals had lower blood viscosity than noninfected animals [18]. In addition, CME can lead to blood viscosity and circulatory flow alterations and predispose to complications such as thrombosis, the so-called hyperviscosity syndrome [16]. Few studies have shown data about blood viscosity in infectious diseases in dogs. The blood viscosity of dogs infected with *Leishmania* sp. decreases compared to noninfected ones [14]. The treatment with doxycycline for 28 days reduced the blood viscosity. Research has revealed that dogs with *E. canis* infection display hypercoagulation and indicate that after five weeks of treatment with doxycycline, the fibrinolytic effects can be reversed, potentially restoring blood viscosity in infected animals [33]. Further studies are required to explore the optimal duration of doxycycline treatment and its impact on blood viscosity in dogs with *E. canis* infection.

During the acute phase of CME, there is an increase in the pro-inflammatory cytokine TNF- α [42], attracting TNF-producing cytotoxic T lymphocytes. However, there is a decrease in *Ehrlichia*-specific helper T lymphocytes [43]. This study found that TNF- α levels were lower in dogs infected with *E. canis* than in noninfected dogs, regardless of treatment. This decrease in TNF- α production may be due to the direct effect of the antibiotic doxycycline, which inhibits its production [37,40]. It could also be related to the lymphopenia observed in dogs with CME [44]. As time passes after infection, the serum concentration of TNF- α produced by lymphocytes decreases [42], indicating that dogs with CME may be in the subclinical phase of the disease. To improve the immune response to *E. canis* during treatment, a drug with immunobiological action, such as levamisole [45], could activate phagocytosis and improve the immune response to *E. canis* during treatment.

Notably, animals infected with *E. canis* showed a rise in IL-1 β and monocytes when given doxycycline treatment. IL-1 β is a significant player in immune responses and inflammation. This cytokine group includes 11 ligands—7 agonists, 3 receptor antagonists, and 1 anti-inflammatory cytokine—and contributes to the resolution of acute inflammation [46,47]. The increase in these cytokines in dogs infected with *E. canis* might be a valuable indicator for diagnosing the acute stage of CME.

Some studies have shown that in dogs with acute *Ehrlichia* sp. infection, there is no significant difference in serum TNF- α and IL-10 levels between infected and noninfected groups [44]. However, another study found that 18 days after infection, there is a significant increase in TNF- α and IL-10 levels in infected dogs, but this difference disappears after 30 days [44]. Similarly, a study on *Babesia rossi*, another intracellular pathogen, showed a difference in TNF- α and IL-10 cytokine levels between groups of infected and noninfected dogs [48].

This study shows that in dogs treated with doxycycline, there is a correlation between IL-10 and leukocytes. This correlation is not present in untreated animals, suggesting that doxycycline has an immunomodulatory effect. IL-10 is an important cytokine that helps balance the Th1/Th2 cell response in dogs with CME. Previous research has shown immunomodulation between TNF- α and IL-10 [44]. In dogs infected with *E. canis*, IL-10 is inverse correlated with blood viscosity, which becomes proportional with doxycycline treatment. In untreated infected dogs, IL-12 also has an inverse correlation with blood viscosity. IL-10 plays a vital role in regulating macrophages and monocytes and suppressing inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6, IL-12, and TNF- α [49]. Another study that correlated viscosity and cytokines demonstrates that Interferon Gamma (IFN- γ) correlates with blood viscosity in dogs infected with bacteria from the Anaplasmataceae family, indicating that the higher the level of IFN- γ , the greater the value of blood viscosity [18]. Still, this study observed data from infected individuals and not post-treatment with doxycycline.

Data on changes in blood viscosity in dogs with infectious diseases are scarce [14,18]. Blood viscosity in this study correlated with TNF- α values in the uninfected dogs with high serum concentrations of this cytokine. Perhaps high levels play an important role in modulating blood viscosity in dogs. A human study demonstrated that patients with sickle cell disease had higher levels of TNF- α and blood viscosity when compared to healthy individuals [50].

Another hematological parameter that demonstrated an effect on viscosity was the leukocytes and neutrophils in the group treated with doxycycline. White blood cell and platelet counts are reported as components affecting blood viscosity [51]. As the infected group had a lower leukocyte count than the noninfected group, this could explain one of the causes of the decrease in blood viscosity and the decrease in TNF- α levels. Blood components such as erythrocytes, hematocrit, and platelets can influence the variation in blood viscosity [51]. However, no correlations were observed between these parameters and blood viscosity in any of the groups in this study.

To ensure that ehrlichiosis is diagnosed accurately, it is recommended to use multiple diagnostic assays, including serology-based tests like ELISA and molecular assays. Studies have shown that confirming the diagnosis through a combination of serology and PCR testing is effective for canine ehrlichiosis. Real-

time PCR can measure bacterial loads and identify specific gene fragments, with sequencing revealing the *Ehrlichia* species responsible for the infection [1,52,53]. However, clinical and hematological evaluations must also be considered. In this study, dogs showing symptoms of CME were initially screened with rapid serological tests and then examined using PCR to detect *E. canis* DNA. However, it is important to note that this approach may have some limitations. Furthermore, the timing of the dogs' infection was not precisely determined because they were naturally infected animals, which could have influenced some of the laboratory results. More research is needed on alternative diagnostic tests to improve the detection of ehrlichiosis and other markers that may help identify disease progression in naturally infected dogs.

5. Conclusions

The findings of this study indicate that dogs with *E. canis* had lower total leukocytes, lymphocytes, eosinophils, platelets, blood viscosity, and TNF- α . The treatment with doxycycline was able to increase platelet and eosinophil levels. However, the drug increased IL-1 β and monocyte levels, which could exacerbate inflammation. Thus, when treating a dog with monocytic ehrlichiosis using doxycycline, it is important to evaluate viscosity parameters and cytokine levels.

References

1. Sainz, Á.; Roura, X.; Miró, G.; Estrada-Peña, A.; Kohn, B.; Harrus, S.; Solano-Gallego, L. Guideline for Veterinary Practitioners on Canine Ehrlichiosis and Anaplasmosis in Europe. *Parasites Vectors* **2015**, *8*, 75. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Mavromatis, K.; Doyle, C.K.; Lykidis, A.; Ivanova, N.; Francino, M.P.; Chain, P.; Shin, M.; Malfatti, S.; Larimer, F.; Copeland, A.; et al. The Genome of the Obligately Intracellular Bacterium *Ehrlichia canis* Reveals Themes of Complex Membrane Structure and Immune Evasion Strategies. *J. Bacteriol.* **2006**, *188*, 4015–4023. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Guedes, P.E.B.; De Andrade Oliveira, T.N.; Carvalho, F.S.; Carlos, R.S.A.; Albuquerque, G.R.; Munhoz, A.D.; Wenceslau, A.A.; Silva, F.L. Canine Ehrlichiosis: Prevalence and Epidemiology in Northeast Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* **2015**, *24*, 115–121. [\[CrossRef\]](#)
4. Paula, W.V.d.F.; Taques, Í.I.G.G.; Miranda, V.C.; Barreto, A.L.G.; de Paula, L.G.F.; Martins, D.B.; Damasceno, A.D.; Muñoz-Leal, S.; Sevá, A.P.; Dantas-Torres, F.; et al. Seroprevalence and Hematological Abnormalities Associated with *Ehrlichia canis* in Dogs Referred to a Veterinary Teaching Hospital in Central-Western Brazil. *Cienc. Rural* **2022**, *52*, e20201131. [\[CrossRef\]](#)
5. Vieira, R.F.C.; Biondo, A.W.; Guimarães, M.A.S.; Santos, A.P.; Santos, R.P.; Dutra, L.H.; Diniz, P.P.V.P.; Morais, H.A.; Messick, J.B.; Labruna, M.B.; et al. Ehrlichiosis in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* **2011**, *20*, 1–12. [\[CrossRef\]](#)
6. Dantas-Torres, F.; Figueredo, L.A.; Sales, K.G.S.; Miranda, D.E.O.; Alexandre, J.L.A.; Silva, Y.Y.; Silva, L.G.; Valle, G.R.; Ribeiro, V.M.; Otranto, D.; et al. Prevalence and incidence of vector-borne pathogens in unprotected dogs in two Brazilian regions. *Parasites Vectors* **2020**, *13*, 195. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Pacheco, T.A.; Maerle, M.O.; Witter, R.; Meneguzzi, M.; Melo, A.L.T.; Nakazato, L.; Dutra, V.; Aguiar, D.M.; Pacheco, R.C. Serological and molecular survey of tick-borne pathogens among dogs in Northern Brazil. *Arch. Vet. Sci.* **2021**, *26*, 31–47.
8. Ramakant, R.K.; Verma, H.C.; Diwakar, R.P. Canine ehrlichiosis: A review. *J. Entomol. Zool.* **2020**, *8*, 1849–1852.
9. Mylonakis, M.E.; Theodorou, K.N. Canine monocytic ehrlichiosis: An update on diagnosis and treatment. *Act. Vet.* **2017**, *67*, 299–317. [\[CrossRef\]](#)
10. Mylonakis, M.E.; Koutinas, A.F.; Breitschwerdt, E.B.; Hegarty, B.C.; Billinis, C.D.; Leontides, L.S.; Kontos, V.S. Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): A retrospective study of 19 natural cases. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* **2004**, *40*, 174–184. [\[CrossRef\]](#)
11. Lina, T.T.; Farris, T.; Luo, T.; Mitra, S.; Zhu, B.; McBride, J.W. Hacker within! *Ehrlichia chaffeensis* Effector Driven Phagocyte Reprogramming Strategy. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2016**, *6*, 58. [\[PubMed\]](#)
12. Palacios, M.; Arteaga, R.; Calvo, G. High-Dose Filgrastim Treatment of Nonregenerative Pancytopenia Associated With Chronic Canine Ehrlichiosis. *Top. Companion Anim. Med.* **2017**, *32*, 28–30. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Bonilla-Aldana, D.K.; Gutiérrez-Grajales, E.J.; Osorio-Navia, D.; Chacón-Peña, M.; Trejos-Mendoza, A.E.; Pérez-Vargas, S.; Valencia-Mejía, L.; MarínArboleda, L.F.; Martínez-Hidalgo, J.P.; Reina-Mora, M.A.; et al. Hematological Alterations Associated with Selected Vector-Borne Infections and Exposure in Dogs from Pereira, Risaralda, Colombia. *Animals* **2022**, *12*, 3460. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Silva, J.N.; Cotrim, A.C.; Conceição, L.A.V.; Marins, C.M.F.; Marchi, P.G.F.; Honório-França, A.C.; Almeida, A.B.P.F.; França, E.L.; Sousa, V.R.F. Immunohaematological and rheological parameters in canine visceral leishmaniasis. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* **2018**, *27*, 211–217. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Dhas, Y.; Banerjee, J.; Mishra, N. Blood Viscosity, Glycemic Markers and Blood Pressure: A Study in Middle-Aged Normotensive and Hypertensive Type 2 Diabetics. *Indian J. Clin. Biochem.* **2020**, *35*, 102–108. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Moutzouri, A.G.; Athanassiou, G.A.; Dimitropoulou, D.; Skoutelis, A.T.; Gogos, C.A. Severe Sepsis and Diabetes Mellitus Have Additive Effects on Red Blood Cell Deformability. *J. Infect.* **2008**, *57*, 147–151. [\[CrossRef\]](#)

17. França, E.L.; Ribeiro, E.B.; Scherer, E.F.; Cantarini, D.G.; Pessôa, R.S.; França, F.L.; Honório-França, A.C. Effects of *Momordica charantia* L. on the blood rheological properties in diabetic patients. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 840379. [\[CrossRef\]](#)
18. Cardoso, S.P.; Paludo, G.R.; Silva, J.N.; Honório-França, A.C.; França, E.L. Hemorheological Evaluation and Cytokine Production in Dogs Naturally Infected with Anaplasmatidae. In *Parasitology and Microbiology Research*, 1st ed.; Pacheco, G.A.B., Ed.; IntechOpen: London, UK, 2020; pp. 1–25.
19. Cabrales, P.; Intaglietta, M.; Tsai, A.G. Increased plasma viscosity sustains microcirculation after resuscitation from hemorrhagic shock and continuous bleeding. *Shock* **2005**, *23*, 549–555.
20. Cabrales, P.; Tsai, A.G.; Intaglietta, M. Is resuscitation from hemorrhagic shock limited by blood oxygen-carrying capacity or blood viscosity? *Shock* **2007**, *27*, 380–389. [\[CrossRef\]](#)
21. Scherer, E.F.; Cantarini, D.G.; Siqueira, R.; Ribeiro, E.B.; Braga, É.M.; Honório-França, A.C.; França, E.L. Cytokine Modulation of Human Blood Viscosity from Vivax Malaria Patients. *Acta Trop.* **2016**, *158*, 139–147. [\[CrossRef\]](#)
22. Lanza-Perea, M.; Kumthekar, S.M.; Sabarinath, A.; Karpathy, S.E.; Sharma, R.N.; Stone, D.M. Doxycycline treatment of asymptomatic dogs seropositive for *Ehrlichia canis*. *West Indian Vet. J.* **2009**, *9*, 11–13.
23. McClure, J.C.; Crothers, M.L.; Schaefer, J.J.; Stanley, P.D.; Needham, G.R.; Ewing, S.A.; Stich, R.W. Efficacy of a doxycycline treatment regimen initiated during three different phases of experimental ehrlichiosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 5012–5020. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Fourie, J.J.; Horak, I.; Crafford, D.; Erasmus, H.L.; Botha, O.J. The Efficacy of a generic doxycycline tablet in the treatment of canine monocytic ehrlichiosis. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* **2015**, *86*, 1193. [\[CrossRef\]](#)
25. Mylonakis, M.E.; Harrus, S.; Breitschwerdt, E.B. An update on the treatment of canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). *Vet. J.* **2019**, *246*, 45–53. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Sambrook, J.; Russell, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, NY, USA, 2001; 2100p.
27. Quaresma, P.F.; Murta, S.M.; Ferreira, E.C.; Rocha-Lima, A.C.; Xavier, A.A.; Gontijo, C.M. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta Trop.* **2009**, *111*, 289–294. [\[CrossRef\]](#)
28. Socolovschi, C.; Gomez, J.; Marié, J.L.; Davoust, B.; Guigal, P.M.; Raoult, D.; Parolla, P. *Ehrlichia canis* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks in the Ivory Coast. *Ticks Tick-Borne Dis.* **2012**, *3*, 411–413. [\[CrossRef\]](#)
29. Sirois, M. Automated Analyzers. In *Laboratory Procedures for Veterinary Technicians*, 7th ed.; Sirois, M., Ed.; Elsevier: St. Louis, MO, USA, 2020; Volume 1, pp. 41–46.
30. Rizzi, T.E.; Meinkoth, J.H.; Clinkenbeard, K.D. Normal hematology of the dog. In *Schalm's Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*, 6th ed.; Weiss, D.J., Wardrop, K.J., Eds.; Blackwell Publishing Ltd.: Ames, IA, USA, 2010; pp. 799–810.
31. Parashar, R.; Sudan, V.; Jaiswal, A.K.; Srivastava, A.; Shanker, D. Evaluation of clinical, biochemical and hematological markers in natural infection of canine monocytic ehrlichiosis. *J. Parasit. Dis.* **2016**, *40*, 1351–1354. [\[CrossRef\]](#)
32. de Lima, E.R.; Silva, W.M.; Teixeira, M.N.; da Silva, V.C.L.; Marinho, M.L.; van der Linden, L.A.; Oliveira, R.A.S. Clinical and laboratory aspects in dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*. *Braz. J. Anim. Environ. Res.* **2021**, *4*, 3471–3484. [\[CrossRef\]](#)
33. Shropshire, S.; Olver, C.; Lappin, M. Characteristics of hemostasis during experimental *Ehrlichia canis* infection. *J. Vet. Intern. Med.* **2018**, *32*, 1334–1342. [\[CrossRef\]](#)
34. Harris, S.; Waner, T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (O): An overview. *Vet. J.* **2011**, *187*, 292–296. [\[CrossRef\]](#)
35. Harrus, S.; Waner, T.; Aizenberg, I.; Bark, H. Therapeutic effect of doxycycline in experimental subclinical canine monocytic ehrlichiosis: Evaluation of a 6-week course. *J. Clin. Microbiol.* **1998**, *36*, 2140–2142. [\[CrossRef\]](#)
36. Aguiar, D.M.; Rodrigues, F.P.; Ribeiro, M.G.; Santos, B.; Muraro, L.S.; Taques, I.I.G.G.; Campos, A.N.S.; Dutra, V.; Nakazato, L.; da Costa Vieira, R.F.; et al. Uncommon *Ehrlichia canis* Infection Associated with Morulae in Neutrophils from Naturally Infected Dogs in Brazil. *Transbound. Emerg. Dis.* **2020**, *67*, 135–141. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Villaescusa, A.; García-Sancho, M.; Rodríguez-Franco, F.; Tesouro, M.; Sainz, T. Effects of Doxycycline on Haematology, Blood Chemistry and Peripheral Blood Lymphocyte Subsets of Healthy Dogs and Dogs Naturally Infected with *Ehrlichia canis*. *Vet. J.* **2015**, *204*, 263–268. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Bhadesiya, C.M.; Raval, S.K. Hematobiochemical Changes in Ehrlichiosis in Dogs of Anand Region, Gujarat. *Vet. World* **2015**, *8*, 713–717. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Silva, A.C.T.; Santos, J.R.S.; Silva, R.M.N.; Santana, V.L.; Martins, F.S.M.; Falcão, B.M.R.; Tanikawa, A.; Almeida, T.M.; Vaz, A.F.M.; Souza, A.P. Prednisolone Associated with Doxycycline on the Hematological Parameters and Serum Proteinogram of Dogs with Ehrlichiosis. *Cienc. Rural* **2021**, *51*, e20200335. [\[CrossRef\]](#)
40. Rao, L.N.; Shobhamani, B.; Rao, V.; Subramanyam, K.V. Comparative Efficacy of Doxycycline and Imidocarb Diprionate in Treatment of Ehrlichiosis in Dogs. *J. Pharm. Innov.* **2022**, *11*, 1304–1309.
41. Nader, E.; Skinner, S.; Romana, M.; Fort, R.; Lemoine, N.; Guillot, N.; Gauthier, A.; Antoine-Jonville, S.; Renoux, C.; Hardy-Dessources, M.D.; et al. Blood Rheology: Key Parameters, Impact on Blood Flow, Role in Sick Cell Disease and Effects of Exercise. *Front. Physiol.* **2019**, *10*, 1329. [\[CrossRef\]](#)
42. Faria, J.L.M.; Munhoz, T.D.; João, C.F.; Vargas-Herández, G.; André, M.R.; Pereira, W.A.B.; Machado, R.Z.; Tinucci-Costa, M. *Ehrlichia canis* (Jaboticabal strain) induces the expression of TNF- α in leukocytes and splenocytes of experimentally infected dogs. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* **2011**, *20*, 71–74. [\[CrossRef\]](#)

43. Ismail, N.; Stevenson, H.L.; Walker, D.H. Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) and Interleukin-10 in the Pathogenesis of Severe Murine Monocytotropic Ehrlichiosis: Increased Resistance of TNF Receptor P55- and P75- Deficient Mice to Fatal Ehrlichial Infection. *Infect. Immun.* **2006**, *74*, 1846–1856. [[CrossRef](#)]
44. Lima, A.L.; Santos, G.J.L.; Roatt, B.M.; Reis, A.B.; Freitas, J.C.C.; Nunes-Pinheiro, D.C.S. Serum TNF- α and IL-10 in Ehrlichia spp. naturally infected dogs. *Act. Sci. Vet.* **2015**, *43*, 1322.
45. Dastjerdi, A.V.; Torkan, S.; Jafarian, M. Evaluation of the immunological changes in the use of Sumac herb powder (*Rhus coriaria*) compared with Levamisole in dogs. *J. Herb. Drug* **2018**, *9*, 17–22.
46. Qu, X.; Tang, Y.; Hua, S. Immunological approaches towards cancer and inflammation: A cross-talk. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 563. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Malik, A.; Kanneganti, T.D. Function and regulation of IL-1 α in inflammatory diseases and cancer. *Immunol. Rev.* **2018**, *281*, 124–137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Leisewitz, A.; Goddard, A.; De Gier, J.; Van Engelshoven, J.; Clift, S.; Thompson, P.; Schoeman, J.P. Disease Severity and Blood Cytokine Concentrations in Dogs with Natural Babesia rossi Infection. *Parasite Immunol.* **2019**, *41*, e12630. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Santos, C.O.; Costa, S.F.; Souza, F.S.; Mendes, J.M.F.; Pinheiro, C.G.M.; Moreira, D.R.M.; Silva, L.K.; Lima, V.M.F.; Oliveira, G.G.S. Blocking IL-10 signaling with soluble IL-10 receptor restores in vitro specific lymphoproliferative response in dogs with leishmaniasis caused by Leishmania infantum. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0239171. [[CrossRef](#)]
50. Bowers, A.S.; Reid, H.L.; Greenidge, A.; Landis, C.; Reid, M. Blood Viscosity and the Expression of Inflammatory and Adhesion Markers in Homozygous Sickle Cell Disease Subjects with Chronic Leg Ulcers. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e68929. [[CrossRef](#)]
51. Ho, C.H. White blood cell and platelet counts could affect whole blood viscosity. *J. Chin. Med. Assoc.* **2004**, *67*, 394–397.
52. Nakaghi, A.C.H.; Machado, R.Z.; Costa, M.T.; André, M.R.; Baldine, C.D. Canine ehrlichiosis: Clinical, hematological, serological, and molecular aspects. *Cienc. Rural* **2008**, *38*, 766–770. [[CrossRef](#)]
53. Diniz, P.P.V.P.; Aguiar, D.M. Ehrlichiosis and Anaplasmosis: An Update. *Vet. Clin. N. Am. Small Anim. Pract.* **2022**, *52*, 1225–1266. [[CrossRef](#)]

APENDICE C

Anexo – Modelo de Termo de Consentimento



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

TERMO DE CONSENTIMENTO

PROJETO DE PESQUISA

Eu, _____, RG/CPF
número _____, responsável pelo(s) animal (ais)
_____, da espécie _____, raça/linhagem
_____ e idade _____, autorizo a participação dos
mesmos no projeto de pesquisa intitulado **“Avaliação da relação de
parâmetros hemorreológicos com a liberação de citocinas em processos
de necrose e apoptose em cães com Erliquiose Monocítica Canina”**
coordenado pelo pesquisador **Me. Saulo Pereira Cardoso**.

_____, ____ de _____ de ____.

assinatura e data do proprietário ou responsável pelos animais

APENDICE D

Anexo – Certificado de aprovação pelo CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO COMITÊ DE ÉTICA NO USO
DE ANIMAIS DO ARAGUAIA (CEUA-Araguaia)

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo Nº 23108.087992/2020-21, do Projeto intitulado “**Avaliação da relação de parâmetros hemorreológicos com a liberação de citocinas em processos de necrose e apoptose em cães com Eriquiiose Monocítica Canina**”, sob a responsabilidade de **Saulo Pereira Cardoso, Adenilda Cristina Honório-França, Valéria Régia Franco Sousa e Eduardo Luzia França** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Araguaia (Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT / Campus do Araguaia), em reunião ordinária de **05/02/2021**.

CERTIFICATE

We certify that the Protocol Nº 23108.087992/2020-21, related to the Project entitled “**Evaluation of the hemorheological parameters relationship with the release of cytokines in processes of necrosis and apoptosis in dogs with Canine Monocytic Ehrlichiosis**”, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). This Project was approved by the Committee on Ethics in the Use of Animals of Araguaia (Federal University of Mato Grosso – UFMT / Campus of Araguaia) in reunion at **02/05/2021**.

Barra do Garças, 11 de fevereiro de 2021.

Prof. Dr. Kleber Eduardo de Campos
Presidente do CEUA-Araguaia

Prof. Dr. Kleber Eduardo de Campos
Presidente do CEUA-Araguaia
Portaria CONSEPE no. 07/PROPEq/2020