

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico
Curso de Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

**Otimização do processo de obtenção da proteína rGP19 de *Ehrlichia canis* em
Escherichia coli.**

Vitória Adrielly Catschor dos Santos

Pelotas, 2019.

Vitória Adrielly Catschor dos Santos

**Otimização do processo de obtenção da proteína rGP19 de *Ehrlichia canis* em
Escherichia coli.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Bacharelado em
Biotecnologia da Universidade Federal de
Pelotas, como requisito parcial à obtenção
do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora de Estágio: Dra. Neida Lucia Conrad
Orientador Acadêmico: Prof. PhD. Fábio Pereira Leivas Leite

Pelotas, 2019.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S237o Santos, Vitória Adrielly Catschor dos

Otimização do processo de obtenção da proteína rGP19 de *Ehrlichia canis* em *Escherichia coli* / Vitória Adrielly Catschor dos Santos ; Fábio Pereira Leivas Leite, orientador ; Neida Lucia Conrad, coorientadora. — Pelotas, 2019.

47 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. rGp19. 2. Expressão de proteína. 3. Erliquiose canina. 4. Padronização da indução. 5. EMC. I. Leite, Fábio Pereira Leivas, orient. II. Conrad, Neida Lucia, coorient. III. Título.

CDD : 636.70896

Vitória Adrielly Catschor dos Santos

Otimização do processo de obtenção da proteína rGP19 de *Ehrlichia canis* em *Escherichia coli*.

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 29 de novembro de 2019

Banca examinadora:

Prof. PhD, Fábio Pereira Leivas Leite (Orientador)

Doutorado em Veterinary Sciences pela University of Wisconsin - Madison, WI, US.

Prof. Dra. Thais Larré de Oliveira

Doutora em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas

Me. Mara Thais de Oliveira Silva

Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas

Me. Vitória Sequeira Gonçalves

Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas

Dedico a todos que de alguma forma me ajudaram ao longo deste ciclo.

Agradecimentos

Aos meus pais Analú e Leandro, por terem dado todo o apoio e estrutura para que eu não perdesse a oportunidade de seguir o meu sonho.

Aos meus irmãos Larissa e Gabriel, por me manterem motivada a seguir em frente, por me permitirem ser um exemplo, e por nunca deixarem a distância e a saudade serem um peso. Que vocês tenham as mesmas chances que eu tive, e saibam que eu estarei lá pra apoiar quando decidirem o futuro de vocês.

A minha família, que acompanhou meu progresso e crescimento, e mesmo sem bem entender minhas escolhas, vibraram por mim.

Ao meu namorado Vinicius, por todo o suporte e amor que eu poderia ter recebido em uma trajetória tão tumultuada, e principalmente por acreditar em mim mais do que ninguém, e jamais me deixar desistir. Se esse trabalho existe, em parte ele também é teu. Obrigada por ser meu abrigo.

Ao meu orientador Fábio Leivas Leite, por sempre me motivar a buscar soluções me orientando pelo caminho certo, e por levar tudo com bom humor me mostrando no meio do meu desespero que pra tudo de alguma forma existe uma solução. Acima de tudo, a ti sou grata pelas oportunidades, pelo conhecimento compartilhado, pela paciência e persistência. Obrigada por confiar.

A todos os colegas de laboratório que tive o prazer de conviver ao longo desses 4 anos, vocês foram muito importantes pro meu aprendizado pessoal e profissional e principalmente por quem eu sou hoje.

Aos meus amigos que longe ou perto se fizeram presentes nessa trajetória, e me trouxeram muitas histórias pra encher a mala. Em especial ao grupo da panela e a todas as aventuras, da faculdade. Espero leva-los pra vida.

Aos meus gatinhos Eevee e Leafeon que não podem estar lendo isso, mas com toda certeza sabem o quanto sou grata por terem feito o meu caminho mais leve, e meus dias melhores.

A todos que fizeram ciência antes de mim, e me despertaram a descobrir o que eu realmente amo.

Resumo

DOS SANTOS, Vitória Adrielly Catschor. **Otimização do processo de obtenção da proteína rGP19 de *Ehrlichia canis* em *Escherichia coli***. 2019. 47f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Biotecnologia) – Curso de Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

A Erliquiose Monocítica Canina (EMC) causada pelo patógeno *Ehrlichia canis* é uma doença de distribuição mundial, que ocorre principalmente em regiões de clima quente e tropical coincidindo com o *habitat* do seu vetor o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* um artrópode hematófago ectoparasita obrigatório. EMC acomete canídeos, durante o repasto sanguíneo quando o carrapato anteriormente infectado pelo sangue de um cão já na fase aguda da doença, se alimenta de um cão saudável, transmitindo *E. canis* através da saliva invadindo os monócitos do sistema fagocitário do cão, e impedindo a fusão fagolisossomal inibindo a ativação de enzimas degradativas para evitar a fagocitose e permanecem ali para se multiplicar. Cães com EMC podem apresentar sinais clínicos que vão desde estado febril e letargia até hemorragia, e complicações neurológicas, podendo atingir quadros severos e até a morte do cão infectado. EMC hoje não dispõe de vacina comercial, tornando o controle do vetor um dos poucos métodos de profilaxia, o que torna o diagnóstico precoce de suma importância. Testes de diagnóstico sorológico utilizando epítomos específicos apresentam alta sensibilidade, especificidade e podem ser rápidos. A glicoproteína GP19 de *E. canis*, está localizada na superfície externa da membrana, é reconhecida pelo soro de animais infectados e induz uma rápida resposta imune, ainda na fase aguda da doença. Estas características sugerem que rGP19 seja um alvo promissor para uso no diagnóstico de EMC. Atualmente a produção de proteínas recombinantes como antígenos para testes diagnósticos é amplamente trabalhada, por ser um processo mais seguro, barato e eficiente que a produção de proteínas pelo próprio patógeno. A obtenção da proteína GP19 de forma recombinante (rGP19) é um processo laborioso devido a toxicidade celular causada durante a sua expressão. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a expressão de rGP19 em diferentes etapas, a fim de determinar as melhores condições para otimizar o processo de expressão. Foram avaliadas cepas de *Escherichia coli* capazes de suportar processos de expressão de proteínas tóxicas para a célula, onde a cepa C43 (DE3) apresentou melhores resultados passando para a etapa de caracterização do pré-inóculo onde foram testados diferentes tempos para diferentes concentrações provenientes de placa e de glicerol 80% mostrando que o melhor pré-inóculo é realizado a partir de células em glicerol incubadas por 16 h em uma concentração de 1 colônia/mL de cultivo, passando então para a determinação da concentração ideal para indução, onde foi possível observar um melhor resultado com densidade ótica de 1,0. Todos os resultados obtidos foram importantes para elucidar melhor o processo, visando padronizar e otimizar a expressão de rGP19.

Palavras-chave: Erliquiose Canina; EMC; expressão de proteína; C43 (DE3); C41 (DE3); padronização da indução; pré-inóculo, densidade ótica.

Abstract

DOS SANTOS, Vitória Adrielly Catschor. **Optimization of the process of obtaining the *Ehrlichia canis* rGP19 protein in *Escherichia coli***. 2019. 47f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Biotecnologia) – Curso de Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Canine Monocytic Erlichiosis (EMC) caused by the pathogen *Ehrlichia canis* is a worldwide disease that occurs mainly in regions of warm and tropical climate coinciding with the habitat of its vector, the tick *Rhipicephalus sanguineus*, an obligate ectoparasite hematophagous arthropod. EMC affects canids during blood meal when the tick previously infected by a dog's blood already in the acute phase of the disease feeds on a healthy dog, transmitting *E. canis* through saliva invading the monocytes of the dog's phagocyte system, and preventing phagolysosomal fusion inhibiting the activation of degradative enzymes to prevent phagocytosis and remain there to multiply. Dogs with CME may present clinical signs ranging from feverishness and lethargy to hemorrhage, and neurological complications, and may lead to severe conditions and even death of the infected dog. EMC today has no commercial vaccine, making vector control one of the few prophylaxis methods, which makes early diagnosis of paramount importance. Serological diagnostic tests using specific epitopes have high sensitivity, specificity and may be rapid. *E. canis* GP19 glycoprotein, located on the outer surface of the membrane, is recognized by the serum of infected animals and induces a rapid immune response even in the acute phase of the disease. These features suggest that rGP19 is a promising target for use in diagnosing CME. Nowadays the production of recombinant proteins as antigens for diagnostic tests is widely worked because it is a safer, cheaper and efficient process than the protein production by the pathogen itself. Recombinantly obtaining GP19 protein (rGP19) is a laborious process due to cellular toxicity caused during its expression. Thus, this work aimed to evaluate the expression of rGP19 in different stages, in order to determine the best conditions to optimize the expression process. *Escherichia coli* strains capable of supporting cell-toxic protein expression processes were evaluated, where strain C43 (DE3) showed better results moving to the pre-inoculum characterization stage where different times were tested for different concentrations from plaque. and 80% glycerol showing that the best pre-inoculum is made from glycerol cells incubated for 16 h in a contraction of 1 colony / mL of culture, then moving to the determination of the ideal concentration for induction, where it was possible to observe better result with optical density of 1.0. All results obtained were important to better elucidate the process, aiming to standardize and optimize rGP19 expression.

Key-words: Canine erlichiosis; EMC; protein expression; C43 (DE3); C41 (DE3); standardization of induction; pre-inoculum, optical density.

Lista de Figuras

Figura 1	Imagem microscópica de uma mórula de <i>Ehrlichia canis</i> no citoplasma de um monócito (100x). Fonte: SAINZ et al., 2015...	20
Figura 2	Avaliação do plasmídeo pAE/GP19.....	32
Figura 3	Clonagem do gene de interesse no vetor plasmidial.	33
Figura 4	Avaliação da expressão de rGP19 nas cepas C41 (DE3) e C43 (DE3) de <i>Escherichia coli</i> por <i>Dot-blot</i>	33
Figura 5	Avaliação da expressão de rGP19 na cepa C43.....	34
Figura 6	Avaliação da purificação de rGP19	35
Figura 7	Avaliação da expressão de rGP19 induzida com D.O. 0,6.	37
Figura 8	Avaliação da expressão de rGP19 induzida com D.O. 0,8.....	37
Figura 9	Avaliação da expressão de rGP19 induzida com D.O. 1,0.	38
Figura 10	Avaliação da expressão de rGP19 induzida com D.O. 1,2.....	39
Figura 11	Avaliação da expressão de rGP19 através de <i>Dot blot</i>	40
Figura 12	Análise da expressão de rGP19 por <i>Western blot</i>	41

Lista de Abreviaturas e Siglas

DAB	3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride
DDP	Diferença do potencial elétrico
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão fosfato-salino)
PBS-T	<i>Phosphate Buffered Saline</i> + 0,05% Tween 20 (Tampão fosfato-salino + 0,05% Tween 20)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride (fluoreto de fenilmetilsulfonil)
RIFI	Reação Da Imunofluorescência Indireta
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Acido Ribonucleico)
Rpm	Rotações por minuto
SDS	Sodium dodecyl sulfate
VFC	Variabilidade da frequência cardíaca

Lista de Símbolos

%	Porcentagem
μ	Micro
β	Beta
Ng	Nanograma
Nm	Nanômetro
μL	Microlitro
mL	Mililitros
L	Litros
mM	Milimolar
M	Molar
V	Volts
α	Alfa

SUMÁRIO

1. Introdução.....	12
2. Revisão bibliográfica.....	15
2.1. Eriquiose canina	15
2.1.1. Agente etiológico	16
2.1.1.1. Taxonomia	16
2.1.1.2. Morfologia	17
2.1.2. Vetor e patogenia.....	18
2.1.3. Sinais clínicos	20
2.1.4. Prevenção e controle	21
2.2. Diagnóstico da doença	22
2.3. GP19	24
2.4. Mecanismos de expressão	24
3. Objetivos.....	26
3.1. Objetivo geral.....	26
3.2. Objetivo específico	26
4. Material e Métodos	27
4.1. Plasmídeo e PCR	27
4.2. Seleção da cepa de expressão.....	27
4.3. Padronização do pré-inóculo	28
4.4. Padronização da concentração celular para indução da expressão de rGP19...29	
4.5. Expressão de rGP19.....	29
4.6. Avaliação da expressão e caracterização de rGP19	29
5. Resultados e discussão	31
6. Conclusão e perspectivas.....	40
7. Referências.....	41

1. Introdução

Ehrlichia canis, agente causador de Erliquiose Monocítica Canina (EMC), é uma bactéria pleomórfica Gram-negativa, intracelular obrigatória, que infecta primariamente os leucócitos (principalmente monócitos) de cães (COHN, 2003). Esse microrganismo apresenta distribuição global, com maior impacto em regiões de clima temperado quente e em áreas tropicais, sendo transmitido entre os cães por vetores artrópodes, principalmente carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* lato sensu (WOODY; HOSKINS, 1991). A transmissão da EMC ocorre quando o carrapato realiza repasto sanguíneo em um cão infectado e, posteriormente, em outro cão, transmitindo a infecção para este último. Larvas, ninfas e adultos de carrapatos se infectam quando eles se alimentam em um cão na fase aguda da doença pela ingestão de leucócitos infectados. Dentro do carrapato, *E. canis* é disseminada por hemócitos do intestino para as glândulas salivares (DAGNONE et al., 2003).

A EMC tem significativas taxas de prevalência global, como mostrado por estudos sorológicos internacionais conduzidas em diferentes populações de cães. Nestes inquéritos, verificou-se que 78% dos cães no Senegal (PARZY et al., 1991), 68% na Tunísia (BROUQUI et al., 1991) e 66,7% na Espanha (SAINZ; AMUSATEGUI; TESOURO, 1999) apresentam anticorpos para *E. canis*. No Brasil, estudos de soroprevalência demonstraram diferentes taxas de infecção, dependendo da localização geográfica e do método diagnóstico utilizado (VIEIRA et al., 2011). No Rio Grande do Sul foi observada a taxa de soroprevalência em aproximadamente 43% dos cães, através do diagnóstico laboratorial utilizado como padrão ouro, o de Imunofluorescência Indireta (RIFI)(SAITO et al., 2008), enquanto que, pelo kit imunoenzimático comercial (*dot-enzyme-linked immunosorbent assay*) (ELISA) (SNAP@3DX, IDEXX Laboratories Inc., Portland, ME, USA) observou-se a taxa soroprevalência em 1,7 % dos cães (LABARTHE et al., 2003). A prevalência de *E. canis* é bastante variável entre os estados brasileiros, no caso de São Paulo, SANTOS et al., (2009) observaram uma prevalência de 38,9% entre as amostras analisadas. Entretanto, cabe salientar que os dados obtidos nos estudos brasileiros, diferentes metodologias foram utilizadas, desta forma ficando difícil comparar e estimar números quando são usadas técnicas distintas.

O diagnóstico de EMC pode ser realizado através da detecção de anticorpos específicos no soro de animais ou de identificação de parasitos em esfregaços sanguíneos. Técnicas moleculares sensíveis e específicas foram avaliadas para a

detecção de antígenos, porém ainda não estão disponíveis para utilização em diagnósticos de rotina devido aos seus custos elevados (CADMAN et al., 1994). O diagnóstico definitivo é baseado na constatação de inclusões nas células mononucleares do sangue periférico. No entanto, é difícil observar a forma típica da mórula pois o parasito está presente em pequenas quantidades no sangue e isso pode levar a resultados falso-negativos (DAGNONE et al., 2003). *Ehrlichia canis* raramente é identificada na citologia por suas inclusões intracitoplasmáticas pois as mórulas aparecem com mais frequência na fase aguda da doença, caracterizada por sinais clínicos leves (DAGNONE et al., 2003).

Neste contexto torna-se necessário o desenvolvimento de um teste de diagnóstico sensível e específico, capaz de identificar precocemente a presença de anticorpos anti *E. canis* no soro de cães e assim diagnosticar de forma confiável animais infectados, permitindo a implementação de medidas de tratamento rápidas e adequadas. Testes de diagnóstico sorológico, utilizando antígenos específicos, envolvidos na patogênese da doença e expostos na superfície da bactéria tendem a apresentar alta sensibilidade e especificidade.

Foram reconhecidas em torno de oito proteínas de *E. canis* através do soro de cães inoculados experimentalmente com a bactéria. A presença de anticorpos contra as proteínas da família de multigenes P28/P30, principais proteínas da membrana externa, foi desenvolvida apenas 2 semanas após a infecção, enquanto que outras duas glicoproteínas, gp19 e gp36, induziram uma rápida resposta de anticorpos ainda na fase aguda (MCBRIDE et al., 2003). Estudos anteriores mostraram que gp19 e gp36 de *E. canis* são os principais antígenos imunorreativos como alvos dominantes da resposta precoce de anticorpos e, portanto, são alvos de alta prioridade para o desenvolvimento das técnicas de diagnóstico sorológico. A glicoproteína gp19 é uma proteína de membrana externa altamente conservada, provavelmente secretada extracelularmente, que desempenha função de adesão e internalização às células hospedeiras (FERREIRA et al., 2014). Devido a sua imunogenicidade e a presença de anticorpos anti-GP19 durante a primeira semana de infecção, acredita-se no seu potencial para uso como antígeno em testes de diagnóstico sorológico de EMC.

Nosso grupo de pesquisa vem trabalhando na obtenção de GP19 de forma recombinante para posterior uso como antígeno no diagnóstico sorológico de EMC em cães. Contudo, trata-se de um processo de expressão fastidioso, pois sabe-se que a expressão é extensiva, e difícil pelo fato de GP19 apresentar toxicidade celular

(OLIVEIRA et al., 2015), Dessa forma, o objetivo desse estudo é otimizar o processo de obtenção de rGP19 em *Escherichia coli* elucidando melhor suas etapas.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Erliquiose canina

A erliquiose canina, também conhecida como Erliquiose Monocítica Canina (EMC), Pancitopenia Canina Tropical; Febre Hemorrágica Canina; Tifo Canino; ou Doença do Carrapato (COUTO, 1998; RIKIHISA et al., 1992), foi descrita pela primeira vez na Argélia em 1935 (DONATIEN; LESTOQUARD, 1935) e ganhou relevância na pesquisa científica mundial após um surto epizootico durante a Guerra do Vietnã, infectando e causando a morte de muitos cães militares da raça pastor alemão (HUXSOLL et al., 1970; NIMS et al., 1970; SAMLASKA, CURT, 1994).

No Brasil, a doença foi descrita pela primeira vez em Belo Horizonte - Minas Gerais (COSTA et al., 1973), então em Curitiba - Paraná (KAVINSKI, 1988). Posteriormente, passou a atingir aproximadamente 20% dos cães atendidos em hospitais e clínicas veterinárias de estados das regiões Nordeste, Sudeste, Sul e Centro Oeste (AGUIAR et al., 2007; LABARTHE et al., 2003; MOREIRA et al., 2003). Atualmente é considerada uma doença endêmica, principalmente nas áreas urbanas (AGUIAR et al., 2007; LABRUNA; PEREIRA, 2001), podendo acometer cães de todas as idades, independente de sexo ou raça (ISOLA; CADIOLI; NAKAGE, 2012)

EMC é uma riquetsiose hemorrágica infectocontagiosa causada por uma bactéria do gênero *Ehrlichia*, que afeta canídeos através do contato do animal sadio com o carrapato infectado. Apresenta uma vasta distribuição mundial, com relatos em praticamente todos os continentes (STRAUBE, 2011), caracterizada por uma alta morbidade e variada mortalidade em regiões de clima quente (BARR; BOWMAN, 2010; RIKIHISA et al., 1992). Locais de clima temperado, tropical e subtropical, os quais apresentam taxas elevadas de erliquiose, coincidem com os locais de prevalência do seu vetor, o carrapato marrom (CASTRO, 1997). Este também é capaz de transmitir outros hemoparasitas (DANTAS-TORRES, 2008), causando coinfeções com *Anaplasma* sp. (DAGNONE et al., 2003, 2009; MOREIRA et al., 2003), *Babesia* sp. (BORIN; CRIVELENTI; FERREIRA, 2009; MOREIRA et al., 2003; SOARES et al., 2006; TRAPP et al., 2006), *Bartonella* sp. (DE PAIVA DINIZ et al., 2007), *Hepatozoon* sp. (MUNDIM et al., 2008; O'DWYER et al., 2006), *Leishmania* sp. (DE PAIVA DINIZ et al., 2007) e *Mycoplasma* sp. (MOREIRA et al., 2003; MOREIRA; MACHADO; PASSOS, 2005). Um mesmo cão pode apresentar até cinco coinfeções simultâneas, conforme já foi relatado no Chipre em 2017 (ATTIPA et al., 2017).

2.1.1. Agente etiológico

Erlíquias são parasitas intracelulares obrigatórios de células hematopoiéticas maduras ou imaturas, especialmente do sistema fagocitário mononuclear (ANDEREG; PASSOS, 1999; DUMLER et al., 2001). Várias espécies do gênero *Ehrlichia* podem parasitar o cão, como por exemplo, *Ehrlichia canis*, que infecta monócitos, *E. equi* agente causador da erliquiose granulocitotrópica equina e que infecta neutrófilos, *E. platys* que infecta plaquetas e *E. chaffeensis* agente causador da Erliquiose Monocítica Humana (EMH). Dentre estas, *E. canis* é a espécie mais frequentemente encontrada em cães em todo o mundo. (OLIVEIRA et al., 2000). *E. canis* se aloja no vacúolo do leucócito mononucleado, propiciando a formação de mórulas visíveis ao microscópio. O ciclo de vida de *Ehrlichia* é constituído de três fases principais: a) penetração dos corpos elementares nos monócitos, onde permanecem em crescimento por aproximadamente 2 dias; b) multiplicação do agente, por um período de 3 a 5 dias, com a formação do corpo inicial; c) formação das mórulas, sendo estas constituídas por um conjunto de corpos elementares envoltos por uma membrana (DAVOUST, 1993; GREGORY, C.; FORRESTER, 1990).

2.1.1.1. Taxonomia

As riquetsioses são doenças de características semelhantes, as quais provém de bactérias intracelulares obrigatórias pertencentes a ordem Rickettsiales. Também pertenciam a esta ordem as famílias Rickettsiaceae e Anaplasmataceae, na qual a primeira costumava compreender o gênero *Ehrlichia* e suas espécies, agrupadas com base no tropismo celular de acordo com a célula hospedeira infectada, como por exemplo: *E. canis*, *E. risticii*, *E. sennetsu* que afetam monócitos; *E. ewingii*, *E. equi*, *E. phagocytophila* que afetam granulócitos e *E. platys* que afeta trombócitos. Porém, este sistema apresentava várias limitações, incluindo o fato de que o tropismo celular não é absoluto, e uma única infecção pode ocorrer em mais de um tipo de célula (PADDOCK; CHILDS, 2003).

Com o advento da biologia molecular, novas técnicas puderam ser aplicadas com o propósito de reorganizar a taxonomia (MORAES; ALMOSNY; LABARTHE, 2004). A maioria das espécies de *Ehrlichia* foi sequenciada, então em um estudo publicado por DUMLER em 2001, uma série de sugestões que se baseavam na presença das sequências do RNA ribossômico 16S e outros genes como, operon

groESL (INOKUMA et al., 2002) e genes das proteínas de superfície para determinar a relação genética entre vários organismos (COHN, 2003).

Em 2002 a Sociedade Americana de Microbiologia aceitou as modificações para o gênero *Ehrlichia*. Sendo este realocado da família Rickettsiaceae para a família Anaplasmataceae, e algumas espécies passaram do gênero *Ehrlichia* para o gênero *Anaplasma*, mantendo assim um agrupamento de espécies filogeneticamente relacionadas, mas geneticamente e antigenicamente diversificadas (COHN, 2003). Atualmente, o gênero *Ehrlichia* consiste em cinco espécies (Figura 1): *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* e *E. ruminantium* (anteriormente *Cowdria ruminantium*) (GARRITY et al., 2007). Os organismos restantes foram reclassificados para o gênero *Anaplasma*: *Anaplasma platys* (anteriormente *E. platys*) e *Anaplasma phagocytophilum* (uma combinação dos seguintes organismos pertencentes a antiga classificação: *E. equi*, *E. phagocytophila*) e para o gênero *Neorickettsia*: *Neorickettsia helminthoeca*, *Neorickettsia risticii* (anteriormente *E. risticii*) e *Neorickettsia sennetsu* (anteriormente *E. sennetsu*) (VIEIRA et al., 2011). Por fim, a família Anaplasmatacea compreende os gêneros *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia* e *Wolbachia*.

2.1.1.2. Morfologia

E. canis, bem como as outras bactérias do gênero *Ehrlichia*, apresentam morfologia cocobacilar pleomórfica de forma ovóide a elipsoidal, é Gram-negativa e multiplica-se por fissão binária (DUMLER et al., 2001; NAKAGHI et al., 2008). Durante a infecção no hospedeiro as bactérias se agregam na forma de corpúsculos fundamentais firmemente envolvidos por uma membrana, conferindo um aspecto de mórula (ANDEREG; PASSOS, 1999; NAKAGHI et al., 2008; SWANSON, 1990), podendo haver em uma mesma célula mais de uma mórula (COUTO, 1998).

Segundo DAVOUST, 1993 e KEYSARY et al., 1996 quando analisada por microscopia eletrônica de transmissão, a mórula de *E. canis* se apresenta limitada por uma membrana vacuolar simples, contendo 2 a 40 corpos elementares ou ovóides em uma membrana dupla originária da célula hospedeira, sendo possível observar seus corpos elementares em divisão sob formato de haltere. Já YU em 2007 relatou que a observação de *E. canis* por microscopia eletrônica apresentava duas formas morfológicas distintas, uma forma pleomórfica maior (0,7-1,9 μm) com filamentos nucleóides dispersos (reticulados) e uma forma menor (0,4-0,6 μm) núcleo denso) com filamentos nucleóides condensados, o que pode caracterizar os

estágios de desenvolvimento da bactéria já relatados, sendo eles: corpúsculo elementar, corpúsculo inicial e mórula (ALMOSNY et al., 2002; DAVOUST, 1993; GREGORY, C.; FORRESTER, 1990; MCBRIDE et al., 2001).

Apesar de serem Gram-negativas, erliquias não possuem componentes típicos da parede celular bacteriana gram-negativa, como lipopolissacarídeo e peptidoglicano (YU; MCBRIDE; WALKER, 2007), levando assim a se assemelham mais estreitamente ao gênero das Rickettsias do que à outros organismos gram-negativos, pois não causam endotoxemia devido à ausência desses lipolissacarídeos, além de necessitarem de um vetor capaz de promover sua transmissão através da secreção salivar (COHN, 2003; DAWSON et al., 1991; PADDOCK; CHILDS, 2003; PANCIERA; EWING; CONFER, 2001).

2.1.2. Vetor e patogenia

Erliquias tem um ciclo de vida complexo que envolve o patógeno, um vetor, e um hospedeiro (STRAUBE, 2011). A transmissão da erliquiose canina se dá através da inoculação de sangue proveniente de um cão infectado para um cão sadio, pelo intermédio do carrapato (SILVA, 2015). A doença também pode ser transmitida aos cães por transfusões sanguíneas (COUTO, 1998). Apesar de relatos de transmissão através de outros vetores artrópodes (COSTA JR et al., 2007), o vetor mais comum é o *Rhipicephalus sanguineus*, também conhecido como carrapato marrom, carrapato vermelho ou carrapato do cão. (COUTO, 1998; TILLEY; SMITH; FRANCIS, 2003)

Carrapatos são artrópodes hematófagos, ectoparasitas obrigatórios não permanentes e de extrema importância na transmissão de enfermidades zoonóticas (VIEIRA et al., 2002), podendo parasitar diversos tipos de animais, tais como anfíbios, répteis, aves e mamíferos (LUZ; FACCINI, 2013). Porém, percebe-se uma maior infestação em mamíferos domésticos como bovinos, equinos, canídeos e até mesmo no homem, ficando presos à pele do hospedeiro por semanas, se alimentando de seu fluido biológico (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO; BRANDÃO-FILHO, 2006) e podendo contrair e transmitir diversas doenças.

No caso da EMC, esses ectoparasitas se infectam com *E. canis* no repasto ao se alimentarem de leucócitos infectados de cão hospedeiro infectado que esteja na fase aguda da doença (FRUET, 2005; VIGNARD-ROSEZ; ALVES; BLEICH, 2001). No carrapato, *E. canis* se multiplica nos hemócitos e se dissemina do epitélio intestinal para a glândula salivar. Neste momento ocorre a transmissão transestadial no

carrapato, que vai da fase de larvas, ninfas e adultos. A transmissão transovariana não foi demonstrada (ANDEREG; PASSOS, 1999; GROVES et al., 1975; WOODY; HOSKINS, 1991). *R. sanguineus* é considerado seu vetor, mas não o reservatório da erliquiose canina (ALMOSNY et al., 2002; SILVA et al., 2011).

A partir do momento em que o carrapato inocula a secreção salivar, contaminada com erlíquias em um novo hospedeiro sadio durante o repasto sanguíneo, o patógeno entra na corrente sanguínea do hospedeiro e se multiplica nos hemócitos, mesogastro, células das glândulas salivares para então, infectar células epiteliais do trato digestivo (SMITH et al., 1976). As proteínas salivares vetorais, injetadas no microambiente dérmico durante a ingestão do sangue, modulam o sistema imunológico do hospedeiro, criando um ambiente favorável à sobrevivência e replicação do agente infeccioso (DAY, 2011).

Nesse momento inicia o ciclo de *E. canis* no corpo do hospedeiro, que é constituído de três fases principais: a) penetração dos corpos elementares nos monócitos, durante a fagocitose, onde impedem a fusão fagolisossomal inibindo a ativação de enzimas degradativas. Nesta fase podem permanecer em período de incubação até começarem a crescer e se multiplicar dentro do fagossomo por aproximadamente 2 dias (POPOV et al., 1998; SANTAREM, 2003), b) na segunda fase acontece a multiplicação do agente por fissão binária, por um período de 3 a 5 dias, na qual pequenos corpos elementares começam a se agrupar formando os corpúsculos iniciais, c) na terceira e última fase no hospedeiro que ocorre entre 7 a 12 dias após a infecção, os corpúsculos iniciais vão se multiplicando até formação da mórula (Figura 2), sendo estas constituídas por um conjunto de corpos elementares envoltos por uma membrana (GREGORY, C.; FORRESTER, 1990). As mórulas liberam corpos elementares quando as células infectadas se rompem ou então são liberadas por exocitose (COUTO, 1998).

O cão é infectante apenas na fase aguda da doença, quando existe uma quantidade importante de hemoparasitas no sangue (WOODY; HOSKINS, 1991). Porém, as erlíquias são capazes de permanecer por um longo período de tempo no hospedeiro, apresentando um estado de latência até que a estação e o ambiente sejam propícios (LEWIS et al., 1977).

Os efeitos da interação do patógeno e do vetor na imunidade do hospedeiro costumam promover respostas humorais reguladas por linfócitos tipo Th2, que sobrepõem as respostas mediadas por linfócitos Th1 (DAY, 2011).

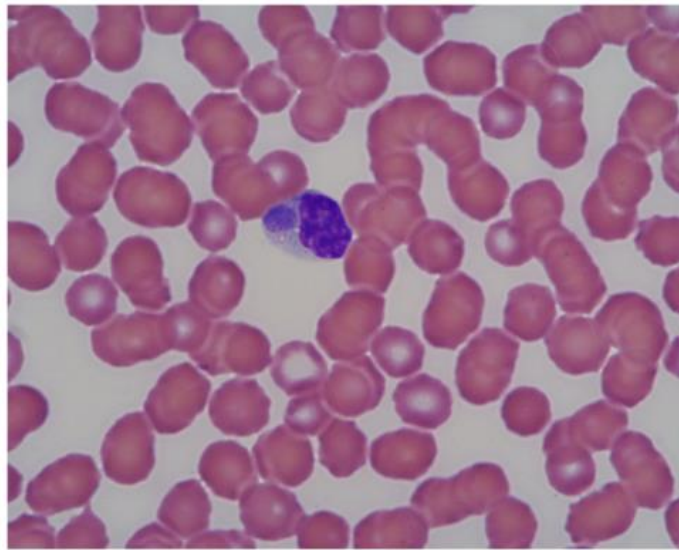


Figura 2. Imagem microscópica de uma mórula de *Ehrlichia canis* no citoplasma de um monócito (x100). Fonte: SAINZ et al., 2015.

2.1.3. Sinais clínicos

A EMC é caracterizada por manifestações clínicas multissistêmicas, variando na intensidade de acordo com as fases da doença: aguda, assintomática (subclínica) e crônica (NAKAGHI et al., 2008). A evolução destas não apresenta uma distinção clara, tornando a EMC uma doença potencialmente fatal em cães, requerendo um diagnóstico rápido e preciso a fim de iniciar a terapia apropriada, levando a um prognóstico favorável (MCBRIDE et al., 2001; SKOTARCZAK, 2003).

A primeira fase ou fase aguda é a única em que é possível a visualização de mórulas, porém o percentual de células infectadas neste estágio raramente ultrapassa 1%, dificultando exames laboratoriais como o de esfregaço sanguíneo (CADMAN et al., 1994). Essa fase pode durar de 3 a 5 semanas, em qual os sintomas apresentados pelo animal podem contar com anormalidades hematológicas, dentre elas as mais comuns são trombocitopenia (deficiência de plaquetas) e anemia (SMITH et al., 1975), outros sintomas comuns são estado febril com temperatura corporal de 39,5 a 41,5 °C, anorexia, depressão, letargia, (HARRUS; WANER, 2011) linfadenopatia (alteração no tamanho e na consistência dos linfonodos) e esplenomegalia (aumento do baço). Com menor frequência pode ocorrer secreção óculo-nasal serosa ou purulenta, mucosas pálidas, tendências a hemorragias, ou sinais neurológicos como ataxia (incapacidade de coordenação dos movimentos), paresia (disfunção ou interrupção dos movimentos de um ou mais membros) e paralisia devido a infiltração de células

mononucleares ou hemorragias na meninge (CODNER et al., 1992; CODNER; ROBERTS; AINSWORTH, 1985; HOSKINS; BARTA; ROTHSCMITT, 1983).

Após a fase aguda, se o sistema imune do cão não conseguir combater o patógeno inicia-se a fase crônica, caracterizada por alterações clínicas e laboratoriais mais severas (MENESES et al., 2008), apresentando de forma mais severa os sintomas da fase aguda. Nesta fase, os cães podem apresentar baixa resposta a terapia com antibióticos, levando ao risco de morte por hemorragia ou grave debilidade, tornando-os suscetíveis a infecções secundárias (SAINZ et al., 2015; SHIPOV et al., 2008). Estudos já mostraram que cães afetados por EMC na fase crônica podem desenvolver miocardite infecciosa, arritmias e alterações na variabilidade da frequência cardíaca (VFC) (LIMA et al., 2019).

Ainda que se recuperem, naturalmente ou através de tratamento, dos sinais clínicos das fases aguda e crônica, alguns cães são incapazes de eliminar o agente infeccioso do seu organismo, desenvolvendo a chamada fase subclínica, tornando-se portadores assintomáticos. (WANER et al., 1997) Esta fase é a mais longa podendo persistir por vários anos e embora seja assintomática, ainda é possível encontrar discretas anormalidades hematológicas características da doença como trombocitopenia e leucopenia (HARRUS et al., 2004), bem como elevados títulos de anticorpos contra *E. canis* no soro (IQBAL; RIKIHISA, 1994; MENESES et al., 2008). Por este motivo, recomenda-se avaliação hematológica e sorológica periódica de animais em áreas endêmicas (BANETH et al., 1996; WANER et al., 1997).

2.1.4. Prevenção e controle

A vacinação é a medida profilática mais promissora para o controle de doenças infecciosas. (DUIJZER; VAN JAARSVELD; DEKKER, 2018) Contudo, embora a busca por alvos vacinais seja promissora (MCBRIDE; WALKER, 2011), ainda não existe uma vacina comercial disponível contra erliquiose ou seu vetor, o carrapato. Este fato torna a busca pela compreensão das interações patógeno-hospedeiro, dos mecanismos de virulência e de proteínas com potencial imunológico para uso em vacinas e testes diagnósticos de suma importância.

Estudos sugerem que determinadas cepas, quando atenuadas e inoculadas, são capazes de conferir resposta imunológica, reduzir a severidade dos sinais clínicos e a carga bacteriana em cães pós-desafio com uma cepa selvagem (RUDOLER et al., 2012). O tratamento da doença hoje se dá através da terapia com antibióticos da

família das tetraciclinas, como a doxiciclina. Apesar de parecer simples, o tratamento exige cuidados a longo prazo, é relativamente caro e nem sempre é eficaz (MYLONAKIS; HARRUS; BREITSCHWERDT, 2019). Estudos relataram falhas na atuação destes antibióticos, principalmente quando administrado fora da fase aguda, mostrando que a infecção por *E. canis* pode persistir mesmo após tratamento prolongado com doxiciclina (SUZUKI, 2013).

2.2. Diagnóstico da doença

Os cães são animais domésticos que convivem intensamente com os seres humanos, necessitando de cuidados especiais tanto para preservar e cuidar da sua própria saúde, como também em relação à saúde pública. Em vista disso, algumas doenças caninas, como a erliquiose requerem uma atenção especial e uma necessidade maior na rapidez do diagnóstico dessas doenças.

O diagnóstico clínico da erliquiose canina é feito com base na interpretação integrada do histórico, de exames físicos, hematológicos e testes imunológicos específicos para *E. canis* (FARIA et al., 2010; MYLONAKIS; THEODOROU, 2017; NAKAGHI et al., 2008). Na análise do histórico e sinais clínicos do animal, busca-se por relatos, evidências da presença de carrapato no animal e sinais clínicos compatíveis com a erliquiose canina, para uma avaliação presuntiva (NAKAGHI et al., 2008). Posteriormente, costuma-se realizar o esfregaço sanguíneo, que serve para averiguação da presença das típicas mórulas nos leucócitos do animal entre outras alterações hematológicas (HARRUS; WANER, 2011). A técnica possui a desvantagem de ser demorada e não muito confiável, uma vez que, as mórulas só são encontradas em um baixo número de esfregaços de sangue durante a fase aguda da infecção (MYLONAKIS et al., 2003; SAINZ et al., 2015; WANER et al., 1997). Além de que, os esfregaços são avaliados pela técnica de microscopia, a qual apresenta uma sensibilidade de aproximadamente 4% (SAINZ et al., 2015). Amostras de sangue também podem ser utilizadas para testes bioquímicos, estudos já relataram como anormalidades comuns da doença atividades de hiperproteinemia, hiperglobulinemia e hipoalbuminemia (ELITOK; UNGUR, 2016).

Com o desenvolvimento das técnicas moleculares e imunológicas, ocorreu também um refinamento de protocolos para diagnóstico da EMC. Atualmente técnicas como Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), Reação da Imunofluorescência

Indireta (RIFI) e Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (ELISA) são amplamente aplicadas (MYLONAKIS; THEODOROU, 2017).

A PCR é uma técnica considerada confiável para diagnosticar a infecção, apresenta alta sensibilidade e permiti a detecção do DNA de *E. canis* em até 4 dias após a infecção (IQBAL; CHAICHANASIRIWITHAYA; RIKIHISA, 1994). O ensaio pode ser realizado com sangue total, soro, aspirados do baço, linfonodos ou medula óssea. Contudo, os resultados negativos devem ser interpretados com cautela, uma vez que não se pode excluir totalmente a presença do agente na amostra e que a contagem de plaquetas e a sorologia funcionam como um bom painel diagnóstico (MYLONAKIS; THEODOROU, 2017).

Para estudos moleculares das espécies do gênero *Ehrlichia* tem sido utilizada a análise filogenética de fragmentos do gene 16S rRNA amplificados pela nested-PCR (CARVALHO et al., 2008; MACHADO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2009; SANTOS et al., 2009) e pela PCR convencional (PINYOOWONG et al., 2008), a qual além de ser sensível e específica para a detecção de *E. canis* no diagnóstico laboratorial também é útil para a verificação da eficácia *in vivo* de antibióticos contra essa infecção (WEN et al., 1997).

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) é atualmente utilizada como padrão ouro para avaliação de EMC, baseando-se na detecção da presença de IgG específicas contra *E. canis* no soro do animal. O método é recomendado para confirmar o diagnóstico de erliquiose pois apresenta alta sensibilidade, contudo pode apresentar reação cruzada com outras riquetsias. Apesar disso, dentre os testes sorológicos, a RIFI tem sido considerada a mais aceita e amplamente usada para o diagnóstico da infecção por *Ehrlichia* spp. (HARRUS; WANER, 2011; NAKAGHI et al., 2008; WANER; STRENGER; KEYSARY, 2000).

Testes comerciais do tipo ELISA também são empregados e detectam a presença de IgG contra *E. canis* no soro do animal, muito útil no monitoramento dos níveis de anticorpos, principalmente nas fases subclínica e crônica, na qual é muito difícil encontrar *E. canis* em esfregaço sanguíneo.(MYLONAKIS et al., 2003; NAKAGHI et al., 2008)

2.3. GP19

A glicoproteína GP19, descrita na literatura como uma das principais proteínas imunorreativas de *E. canis*, que bem como a GP36 (MCBRIDE et al., 2007), apresenta a capacidade de induzir uma rápida resposta de anticorpos, ainda na fase aguda (OLIVEIRA et al., 2015) mostrando-se como um excelente antígeno para desenvolvimento das técnicas de diagnóstico sorológico. Esta proteína consiste em um conjunto polipeptídico localizado na superfície da membrana com aproximadamente 19 kDa, (MCBRIDE et al., 2001, 2007; MCBRIDE; DOYLE, 2017), se apresentando como uma proteína altamente conservada, que já se mostrou interessante para tipificação gênica e antigênica (ZHANG et al., 2008) sendo capaz de induzir fortes respostas imunológicas do hospedeiro, e está associada a interações patógeno-hospedeiro (LUO et al., 2008). GP19 compreende os principais epítomos de células B, é encontrada em células reticuladas e densas, está presente na matriz extracelular e é associado à mórula mórbida, indicando que a proteína é secretada. (MCBRIDE; DOYLE, 2017)

Proteínas obtidas de forma recombinante são hoje uma excelente proposta para o desenvolvimento de testes diagnósticos, uma vez que sua expressão não depende do cultivo do patógeno em si, se tornando relativamente mais barato, seguro e com maiores taxas de expressão do produto final (BANEYX, 1999; ROSANO; CECCARELLI, 2014). Neste cenário podemos perceber a importância da caracterização de proteínas com potencial imunológico para o desenvolvimento de tais testes.

2.4. Mecanismos de expressão

O sistema de expressão do promotor do bacteriófago T7 é amplamente utilizado para a superexpressão de proteínas procarióticas e eucarióticas. Na cepa de *E. coli* BL21 (DE3), comumente usada na expressão de proteínas heterólogas, a RNA polimerase T7 é produzida a partir do prófago lisogênico λ DE3 (CHAMBERLIN; MCGRATH; WASKELL, 1970) e sua expressão está sob o controle do promotor lac UV5 induzível por Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (DUMON-SEIGNOVERT; CARIOT; VUILLARD, 2004). A polimerase de RNA T7 produzida a partir de um gene induzível no cromossomo de *E. coli* BL21 (DE3) e estirpes derivadas, transcreve seletivamente quase qualquer sequência de DNA clonada em um vetor plasmidial em várias cópias, sob controle da sequência promotora do T7

altamente conservada, que não está presente no cromossomo (STUDIER, 2018). Embora diversas proteínas sejam expressas em elevados níveis com sucesso na cepa BL21 (DE3), muitas vezes a superprodução não pode ser alcançada devido à toxicidade da proteína alvo, que pode causar a morte celular bacteriana. A partir da cepa BL21 (DE3) foram isoladas duas cepas mutantes, chamadas C41 (DE3) e C43 (DE3), que apresentam a característica de crescer até atingir alta densidade e altos níveis de expressão sem sofrer com os efeitos tóxicos (MIROUX; WALKER, 1996), sugerindo que tenham evoluído de BL21 (DE3) pelo estresse na produção de nutrientes e proteínas (SCHLEGEL; GENEVAUX, 2015). As cepas C41 (DE3) e C43 (DE3) se diferenciam de outras comumente utilizadas na transformação e expressão de proteínas recombinantes, como é o caso da BL21, Plyss, Rosetta, Star e afins, justamente por terem a capacidade de manter a estabilidade do plasmídeo dentro da célula. (DUMON-SEIGNOVERT; CARIOT; VUILLARD, 2004; GOPAL; KUMAR, 2013). Com isso as cepas mutantes C41 (DE3) e C43 (DE3) derivadas de BL21 (DE3) se apresentam como uma excelente estratégia para a expressão de GP19.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Avaliar e buscar otimizar o processo de obtenção da proteína recombinante rGP19 de *Ehrlichia canis*.

3.2. Objetivo específico

- Testar as cepas C41 (DE3) e C43 (DE3) de *Escherichia coli* para selecionar a melhor cepa de *E. coli* para a expressão de rGP19;
- Determinar a concentração ideal do pré-inóculo;
- Avaliar a indução da expressão de rGP19 com diferentes concentrações celulares;
- Analisar o período ideal de expressão após a indução;
- Confirmar a expressão da proteína através da técnica de *Dot blot* e *Western blot*.

4. Material e Métodos

4.1. Plasmídeo

O plasmídeo pAE/GP19 contendo o gene que codifica para GP19 utilizado foi obtido a partir do acervo do Laboratório de Microbiologia do Núcleo de Biotecnologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTEC da Universidade Federal de Pelotas, anteriormente obtido pelo grupo de pesquisa do laboratório a partir da estirpe de *E. canis* Jaboticabal cultivada em células DH82, da qual extraíram o DNA total, para amplificar e clonar o gene em vetor pAE a partir de protocolos descritos por BRUM, 2011 e OLIVEIRA, 2015. O grupo também propagou este plasmídeo em cepa de *E. coli* TOP10 através de transformação por choque térmico, e conservado em glicerol 80% a -20° C.

Para a utilização neste projeto, pAE/GP19 passou por uma etapa prévia de verificação de sua integridade e viabilidade através da quantificação em espectrômetro NanoVue™ Plus UV-Vis (GE Healthcare©) em um comprimento de onda de 260 nm e posterior PCR utilizando como iniciadores as sequências promotora e terminadora do fago T7 bem como *primers* específicos para o gene da proteína GP19 em uma reação com 35 ciclos de 95° C por 30 segundos, anelamento a 62° C por 30 segundos, e 68° C por 5 minutos.

4.2. Seleção da cepa de expressão

Estudos já apresentaram que as cepas C41 (DE3) e C43 (DE3) isoladas como mutadas de BL21 (DE3) são evolutivamente mais resistentes a processos de expressão citotóxicos, e se adaptam bem a expressões envolvendo o mecanismo da polimerase de RNA T7 (DUMON-SEIGNOVERT; CARIOT; VUILLARD, 2004; MIROUX; WALKER, 1996; WAGNER et al., 2008). A localização das mutações em C41 (DE3) e C43 (DE3) não são conhecidas, mas hipóteses plausíveis sobre a mutação C41 (DE3) são que elas afetam a atividade da polimerase de RNA T7 ou reduzem a quantidade de polimerase produzida. Ambos os efeitos provavelmente ajudariam a impedir o desacoplamento da transcrição e tradução. Supõe-se que a mutação C43 (DE3) também pode ajudar a evitar o desacoplamento da transcrição e tradução, mas, além de atrasar o início da transcrição, também parece afetar o dobramento e a inserção de proteínas na membrana bacteriana de modo com que facilite essa inserção sem interferir na conformação.(ARECHAGA et al., 2000; MIROUX; WALKER, 1996)

Dessa forma, neste estudo, o plasmídeo foi testado em duas diferentes cepas de *E. coli* sendo elas BL21 (DE3) C41 e BL21 (DE3) C43. A transformação das cepas de expressão foi realizada pelo processo de choque térmico. Brevemente, 2 µL de DNA plasmidial e 1 colônia fresca da cepa de transformação (C41 ou C43) foram adicionados em 100 µL de CaCl₂ (100 mM), incubados no gelo por 15 min, em seguida em banho maria por 1 min a 42°C, e então novamente no gelo por 2 min. Em seguida, as células foram incubadas em meio Luria Bertani (LB) sob agitação em *shaker* orbital a 37 °C por 2 h para recuperação das células. Uma alíquota de 100 µL do cultivo transformado foi semeada em placas de meio LB adicionado de ampicilina para confirmação da transformação, através da observação do crescimento de colônias recombinantes, uma vez que o vetor onde o gene está inserido também apresenta resistência ao antibiótico em questão. O restante dos cultivos transformados foram transferidos para 10 mL de meio LB contendo ampicilina sendo estes utilizados como pré-inóculo de cultivos de 50 mL que foram então incubados, induzidos e lisados conforme o protocolo de OLIVEIRA et al., 2015. Ao final do processo a expressão de ambas as cepas foi avaliada em pelas técnicas de Eletroforese em gel de poli-acrilamida 12% (*SDS-PAGE*) e *Dot-blot*. A cepa que apresentou expressão teve o processo repetido maior escala utilizando um cultivo de 500 mL, seguindo o protocolo até a fase de purificação em coluna de cromatografia de afinidade ao níquel e a presença da proteína nas porções eluídas foi avaliada pelas mesmas técnicas citadas anteriormente.

4.3. Padronização do pré-inóculo

Para a padronização do pré-inóculo a ser utilizado para o inóculo este foi preparado de maneiras distintas: a) a partir de uma única colônia transformada; b) 4-5 colônias transformadas; c) 5 µL da cepa transformada armazenada em glicerol 80% (em uma proporção de uma colônia por mL), d) 250 µL da cepa armazenada em glicerol 80% (correspondente a 5% do volume total do pré-inóculo). Todos os pré-inóculos foram adicionados a 5 mL de LB e os cultivos foram incubados a 37 °C por 4 h ou 16h, totalizando 8 diferentes pré-inóculos. Após o período de incubação a densidade óptica (D.O.) foi aferida em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 600 nm. Para avaliar a concentração de UFC/ml, 1 mL de cada cultivo foi centrifugado, o *pellet* eluído em 100 µL de tampão fosfato-salino (PBS), realizada diluição seriada até a concentração de 10⁻⁹ UFC/mL, e então, 25 µL de cada diluição

foram semeados em placas de LB acrescido de antibiótico. As placas foram incubadas por 16 h em estufa 37 °C.

4.4. Padronização da concentração celular para indução da expressão de rGP19

Após a escolha da cepa e determinação do pré-inóculo, a próxima etapa foi para padronizar a melhor concentração celular para indução, foram feitos 4 cultivos de 100 mL de meio LB adicionado de 100 µL de ampicilina (100ng/mL) em frascos Erlenmeyer de 500mL, nos quais foram adicionados o pré-inoculos, preparados conforme estabelecido anteriormente e incubadas sob agitação de 180 rpm a 37 °C até que atingissem as seguintes as concentrações por densidade óptica: 0,6; 0,8; 1,0; e 1,2 aferidas em espectrofotômetro a 600nm. Ao chegar na concentração determinada cada cultivo foi induzido com 100 mM de IPTG. Após a indução foram realizadas coletas a cada uma hora durante três horas a fim de: verificar a concentração dos cultivos em espectrofotômetro a 600nm, e avaliar a expressão por SDS-PAGE utilizando 4 ml do cultivo que foi centrifugado, e suspenso em 400 µL de PBS 1X.

4.5. Expressão de rGP19

Após estabelecidas as condições ideais para a expressão, o protocolo foi testado em maior escala, através de um cultivo de 500 mL de meio LB em Erlenmeyer de 2 L. O pré-inóculo e a concentração celular para indução foram realizados conforme descritos anteriormente. Amostras foram coletadas a cada hora durante as 3 horas de expressão. Após este período, o cultivo foi centrifugado por 15 minutos a 8000 rpm, o *pellet* foi eluído em 20 mL de tampão *Wash* (0,234% de NaH₂PO₄, 2,92% de NaCl e 0,068% de imidazole) com ureia 8 M, acrescido de lisozima 1 µg/mL e incubados sob agitação por 1 h a 4 °C. Após incubação foi realizado o rompimento da parede celular através de sonicação (5 ciclos de 20 segundos a 60 Hz) e as amostras foram então centrifugadas por 20 min a 5.3 x g, o sobrenadante foi coletado, acrescido de 100mM de *phenylmethylsulfonyl fluoride* (PMSF) para inibição de enzimas do tipo protease e armazenado para posterior caracterização da proteína recombinante através da análise por *Dot blot* e *Western blot*.

4.6. Avaliação da expressão e caracterização de rGP19

A análise da expressão da proteína recombinante foi verificada através de *SDS-PAGE* em gel de 12%. Para isso, foram coletadas amostras do cultivo ao longo do

processo de expressão e ao final deste, após lise celular para obtenção da proteína. Estas foram adicionadas de tampão de amostra (glicerol 10%, β -mercaptoetanol 5%, SDS 2,3%, Tris-HCl pH 6,8 0,0625 M) e submetidas a tratamento térmico (100 °C por 20 min). Posteriormente, foram aplicados 20 μ L de cada amostra às cavidades do gel. A eletroforese foi realizada a 100 V. Posteriormente, os géis foram corados com solução *Comassie Blue overnight* para visualização do perfil proteico.

A confirmação e caracterização da expressão foi realizada através da técnica *Western blot*. Inicialmente as proteínas foram submetidas à técnica de SDS-PAGE e eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare) por 3 h, com a fonte ajustada para diferença de potencial elétrico (DDP) 100 V. A membrana foi bloqueada em solução de PBS com 0,05% de Tween 20 (PBS-T) contendo 5% de leite em pó desnatado por 1 h, sob agitação a temperatura ambiente. Posteriormente, a membrana foi incubada por 1 h a temperatura ambiente em PBS-T contendo anticorpo monoclonal de camundongo anti-cauda de histidina (Anti- 6x His, Sigma) (1:6000) e depois, em PBS-T contendo anticorpo de cabra anti-imunoglobulina (Ig) de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma) (1:10000). A membrana foi submetida a três lavagens com PBS-T após cada uma das incubações. Por fim, a reação na membrana foi revelada em solução cromógena de tetrahydroclorato de diaminobenzedina (DAB 0,6 mg de 3.3 diaminobenzidinatetrahydroclorato; 12 μ L de H₂O₂ 30%; 9 mL de Tris-HCl 50 mM pH 7,6; 1 mL de Sulfato de Níquel 0,3%) por 15-20 minutos.

Outra técnica usada em algumas etapas para avaliação foi a de *Dot blot*. Na qual a amostra é aplicada à membrana de nitrocelulose (3 μ l) e, após seca, esta foi bloqueada em solução contendo 5% de leite em pó, e então adicionado anticorpo monoclonal de camundongo anti-cauda de histidina (Anti-His, Sigma) (1:6000). Posteriormente, foi adicionado o anticorpo de cabra anti-imunoglobulina (Ig) de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma) (1:10000), cada anticorpo foi incubado por 1 h e ao fim desse tempo, a membrana foi lavada com PBS-T. a revelação da membrana também se deu em solução cromógena de tetrahydroclorato de diaminobenzedina (DAB 0,6 mg de 3.3 diaminobenzidinatetrahydroclorato; 12 μ L de H₂O₂ 30%; 9 mL de Tris-HCl 50 mM pH 7,6; 1 mL de Sulfato de Níquel 0,3%) por 15-20 minutos.

5. Resultados e discussão

O plasmídeo PAE/GP19 foi previamente construído por OLIVEIRA et al., 2015 e utilizado neste estudo para a transformação em células de *E. coli* e expressão da proteína recombinante rGP19 que posteriormente, poderá ser utilizada em testes de imunodiagnóstico para *E. canis*. Inicialmente o plasmídeo foi propagado em células de *E. coli* TOP10 F e avaliado através de eletroforese em gel de agarose 1%. A integridade do plasmídeo pode ser visualizada na Figura 2.

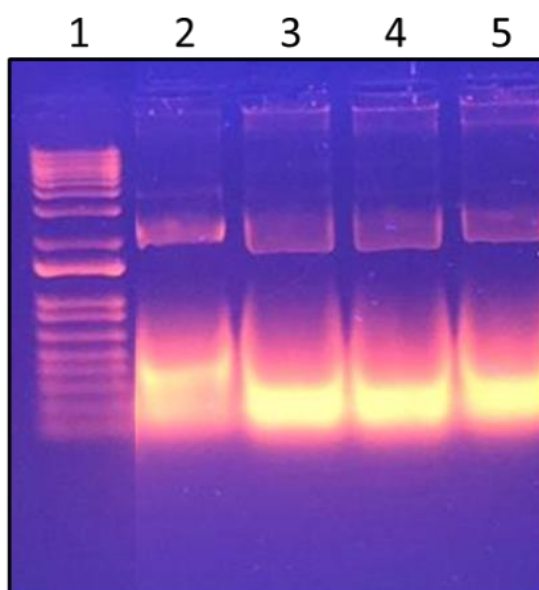


Figura 2. Avaliação do plasmídeo pAE/Gp19 através de eletroforese em gel de agarose 1%. 1. Marcador 1KbPlus DNA Ladder, 2-5. eluições do plasmídeo propagado.

Para verificar se o gene de interesse estava inserido no plasmídeo foi realizada a amplificação do DNA plasmidial através de PCR utilizando *primers* Forward (5'GCGGTACCTAATGTTACACGTTCAAAT-3'), Reverse (5'GCGAATTCTTACGCACAATCACAAC-3') específicos para o gene que codifica para a glicoproteína GP19, também as sequências promotora e terminadora do fago T7, uma vez que a sequência do T7 pode ser encontrada no desenho do vetor (OLIVEIRA, 2015). As reações de PCR foram analisadas em gel de agarose 1% (Fig. 3) onde é possível observar as bandas correspondentes ao produto de PCR com 429pb.

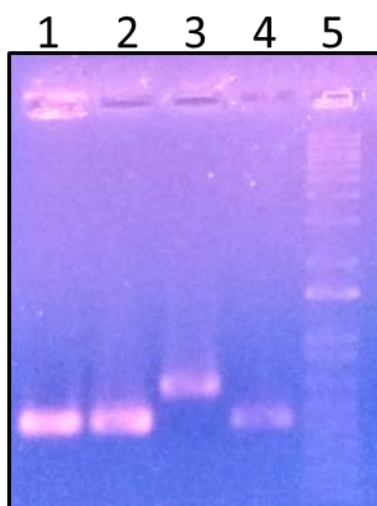


Figura 3. Amplificação do gene de interesse no vetor plasmidial. Eletroforese em gel de agarose 1%. 1. Amplificação do gene da GP19 com seus primers sintéticos específicos; 2. Amplificação do gene da GP19 com as sequências do T7; 3. Controle de Mix para PCR + DNA; 4. Controle de Mix para PCR + primers sintéticos específicos; 5. Marcador 1 kb plus.

A fim de selecionar a melhor cepa para a expressão de rGP19, o plasmídeo pAE/GP19 foi transformado nas cepas C41 e C43. Inicialmente, as cepas foram transformadas por choque térmico e expressas em pequena escala (50 mL) em duplicata. A expressão foi avaliada através da técnica de *Dot-blot* (Fig. 4), onde verificou-se que rGP19 foi expressa somente na cepa C43.

Estudos realizados por DUMON-SEIGNOVERT em 2004 já mostraram que as cepas de *E. coli* C41 (DE3) e C43 (DE3) derivadas da cepa BL21 (DE3) apresentam melhores resultados na expressão de proteínas recombinantes cuja expressão seja um processo estressante, tóxico e destrutivo para a célula. É ainda interessante ressaltar que no mesmo estudo a cepa C43 (DE3) destacou-se na tolerância a proteínas potencialmente tóxicas, sendo 92% mais resistente a essa toxicidade do que a cepa BL21 (DE3) e até 46% do que a cepa C41 (DE3). OLIVEIRA et al., 2015, já avaliaram a expressão de rGP19 nas cepas BL21 (DE3) Star, BL21 (DE3) codon Plus Ril, BL21 (DE3) Plyss, BL21 (DE3) C43 PAVD10, BL21 (DE3) Roseta gami B, BL21 (DE3) Roseta, BL21 (DE3) TRX, BL21 (DE3) codon Plus RP, BL21 (DE3) C41, BL21 (DE3) C43, e JM 109, obtendo os melhores resultados nas cepas mutantes derivadas de BL21 (DE3). Os resultados obtidos neste trabalho na comparação das cepas corroboram com estes estudos.

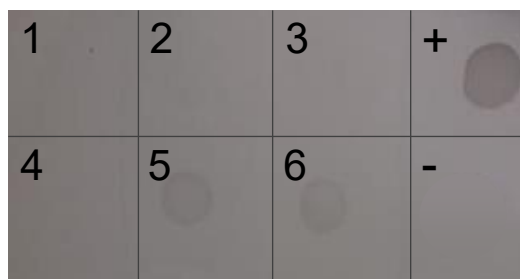


Figura 4. Seleção da cepa de expressão. *Dot-blot* das expressões em C41 e C43. 1. Cultivo com cepa C41 transformada, sem indução; 2 e 3. Duplicatas do cultivo com cepa C41 transformada, induzida com IPTG; 4. Cultivo em cepa C43 sem indução; 5 e 6. Duplicatas do cultivo com cepa C41 transformada, induzida com IPTG. +: proteína com cauda de histidina utilizada como controle positivo; -: PBS utilizado como controle negativo.

Dessa forma, a cepa C43 foi selecionada para expressão em uma escala maior (500 mL). Após a expressão, o cultivo foi processado e o *pellet* foi suspenso em tampão *Wash* com ureia 8 M para solubilização da proteína. A expressão foi avaliada através de eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) na qual observou-se uma banda de aproximadamente 25 kDa, peso molecular esperado para rGP19 (Figura 5).

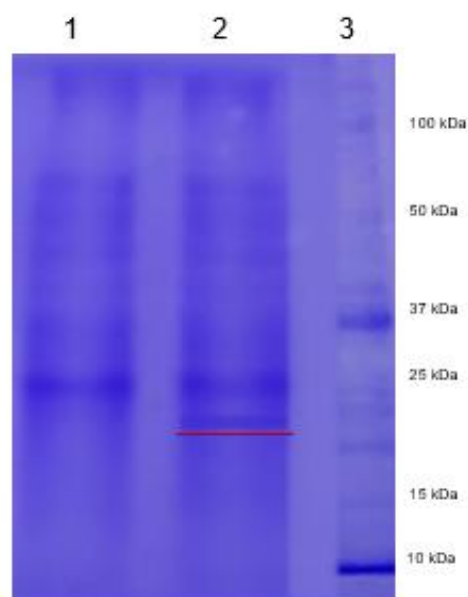


Figura 5: Avaliação da expressão de rGP19 na cepa C43. 1) Amostra do cultivo antes da indução com IPTG; 2) Expressão induzida 3: Marcador de peso molecular.

A proteína foi purificada em cromatografia de afinidade ao níquel, e eluída em diferentes gradientes de imidazol. Na avaliação da purificação, observou-se a

presença de uma banda característica de rGP19 nas eluições de 10% e 15% de imidazol (Figura 6 A). Posteriormente, foi realizado um *Dot-blot* utilizando o anticorpo monoclonal anti-histidina, confirmando a eluição da proteína recombinante nos gradientes de eluição de 10% e 15% (Figura 6 B.).

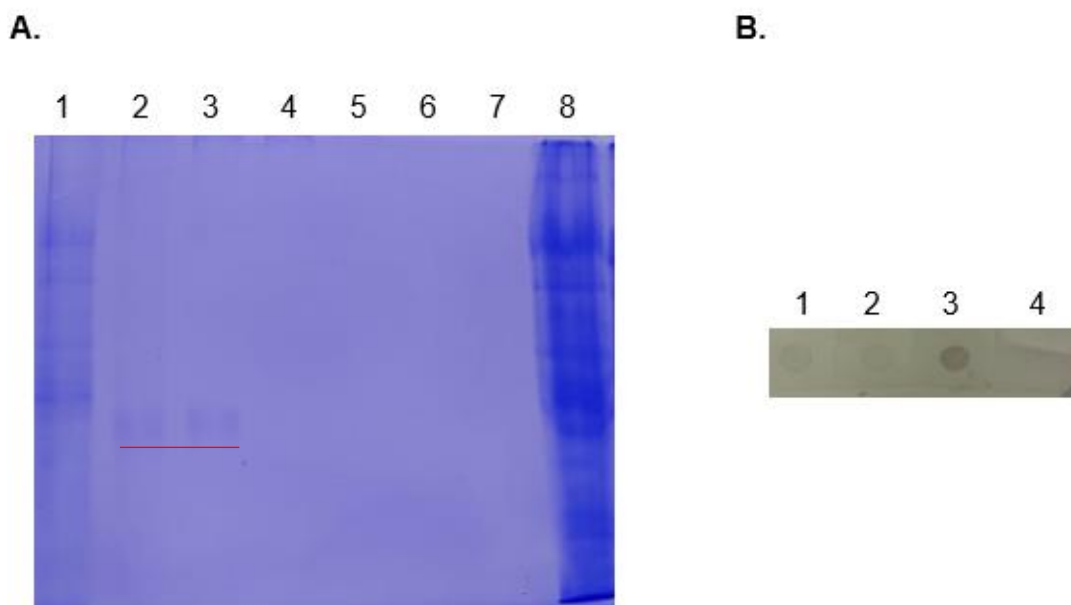


Figura 6: Avaliação da purificação de rGP19 em coluna de cromatografia por afinidade ao Níquel. A.) Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. 1) Eluição de *Wash* com ureia 8M; 2. Imidazol 10%; 3. Imidazol 15%; 4. Imidazol 20%; 5. Imidazol 30%; 6. Imidazol 40%, 7. Imidazol 50%; 8. Descarte da purificação; B) *Dot-blot* com as eluições purificadas correspondentes às que apresentaram expressão no gel SDS-PAGE. 1. Eluição de 10%; 2. Eluição 15%; 3. Controle positivo (proteína recombinante); 4. Controle negativo (*E. coli* não transformada).

A fim de otimizar o processo de expressão e obter uma maior concentração de rGP19, diferentes formas de preparo do cultivo do pré-inóculo, períodos de incubação, bem como a concentração final deste, foram avaliadas. Todos os pré-inóculos foram cultivados a partir de clones recombinantes semeados em placas ou congelados em glicerol. Os cultivos foram realizados em 5 mL de meio LB e incubados sob agitação a 37 °C por 4 ou 16 h. Ao final deste período, a concentração celular foi determinada por densidade óptica (D.O) aferida em espectrofotômetro e também através da contagem de Unidade Formadora de Colônia (UFC). Como resultado então foi observado que o cultivo dos pré-inóculos a partir de clones recombinantes (pAE/GP19 em *E. coli* C43 (DE3)) incubados por 4 h, independentes de serem originários de

placas ou glicerol, apresentaram maior discrepância de concentração em relação aos cultivos com 16 h. Já o crescimento a partir de clones na placa mostrou diferenças de crescimento, concentração e morfologia quando testada a duplicata, mostrando que essa forma prejudica reprodutibilidade.

Os pré-inóculos feitos a partir de 5 ou 250 μ L obtidos do glicerol, incubados por 16 h, não apresentaram diferença relevante entre si. Dessa forma, para os ensaios posteriores, padronizou-se o cultivo do pré-inóculo utilizando 5 μ L de cultivo a partir de glicerol incubado por 16 h.

Além de determinar a condição ideal do pré-inóculo, também foi estabelecida a melhor concentração celular para a indução da expressão de rGP19. Cultivos de 100 mL de LB foram induzidos quando apresentaram as concentrações de 0,6; 0,8; 1,0 e 1,2 (densidade óptica). Na avaliação da expressão induzida com a D.O de 0,6 e 0,8 foram obtidos resultados semelhantes. Na análise através de *SDS-PAGE* não foi possível observar uma banda característica de rGP19 que se destacasse dentre as proteínas da cepa de expressão *E. coli* C43 (Figura 7A e 8A). Contudo, no ensaio de *Western blot*, utilizando o anticorpo monoclonal anti-histidina, observa-se a presença de rGP19, em uma banda de aproximadamente 20 kDa, após 3 horas de indução (Figura 7B e 8B).

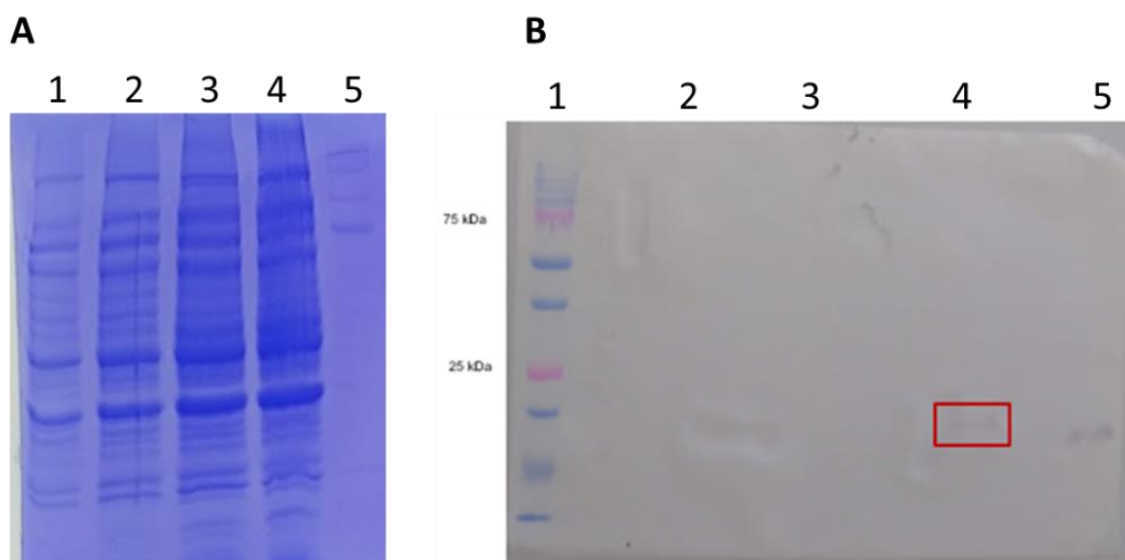


Figura 7: Avaliação da expressão de rGP19 induzida com D.O. 0,6. A) Eletroforese em gel de poliacrilamida. 1. Cultivo sem indução; 2-4: 1, 2 e 3 horas após indução; 5 Marcador F; B) Western blot com anti-histidina 1. Marcador; 2-4. 1, 2 e 3 horas após indução, 5. Controle positivo (rGP19).

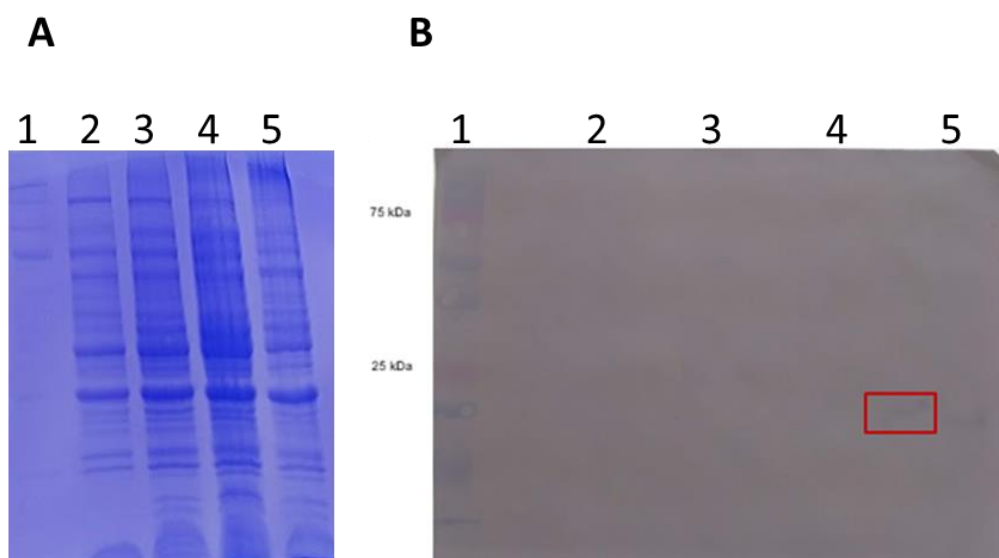


Figura 8. Avaliação da expressão de rGP19 induzida com D.O 0,8. A) Eletroforese em gel de poliacrilamida. 1. Marcador; 2. Cultivo sem indução; 3-5. 1, 2 e 3 horas após indução. B) Western blot com anti-histidina 1. Marcador; 2-4. 1, 2 e 3 horas após indução; 5. Controle positivo (rGP19).

No ensaio avaliando a indução da expressão de rGP19 com D.O 1,0 foi observada a presença da proteína após 2 e 3h após da indução. A análise da expressão através de eletroforese em gel de poliacrilamida foi inconclusiva (Figura 9A), sendo confirmada através de *Western blot* (Figura 9 B). A expressão induzida com maior concentração (D.O 1,2) não apresentou expressão da proteína rGP19 (Figura 10A e 10B), sugerindo que apesar da cepa suportar a superexpressão e a toxicidade do processo o ambiente inicialmente com maior densidade celular pode levar mais rapidamente a escassez e inibição do substrato disponível. Outro fator que pode afetar a expressão é o aparecimento de subprodutos metabólicos e alteração de pH e osmolaridade do meio (PRESSER; RATKOWSKY; ROSS, 1997; RIESENBERG et al., 1991).

O aumento da concentração do cultivo foi acompanhado por espectrofotometria (600 nm) apresentando um crescimento celular constante. Os dados sugerem que pode haver algum fator de estresse que não iniba o crescimento celular, mas interfira na expressão ou na indução da proteína recombinante, já que esta não foi expressa quando a indução foi realizada a partir da D.O. 1,2.

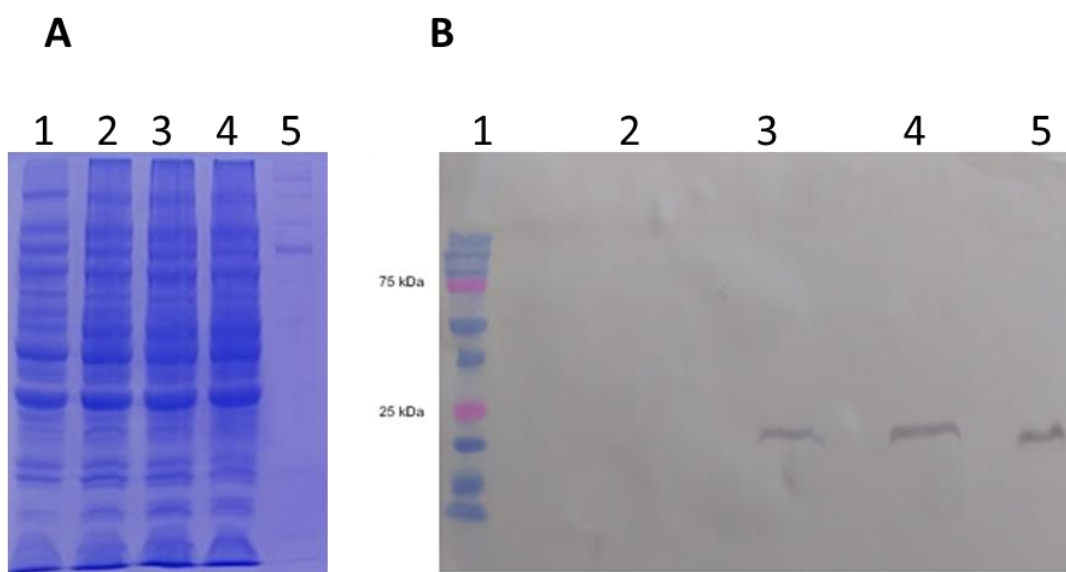


Figura 9. Avaliação da expressão de rGP19 induzida com D.O 1,0. A) Eletroforese em gel de poliacrilamida. 1. Cultivo sem indução; 2-4. 1, 2 e 3 horas após indução. 5. Marcador; B) Western blot com anti-histidina 1. Marcador; 2-4. 1, 2 e 3 horas após indução; 5. Controle positivo (rGP19).

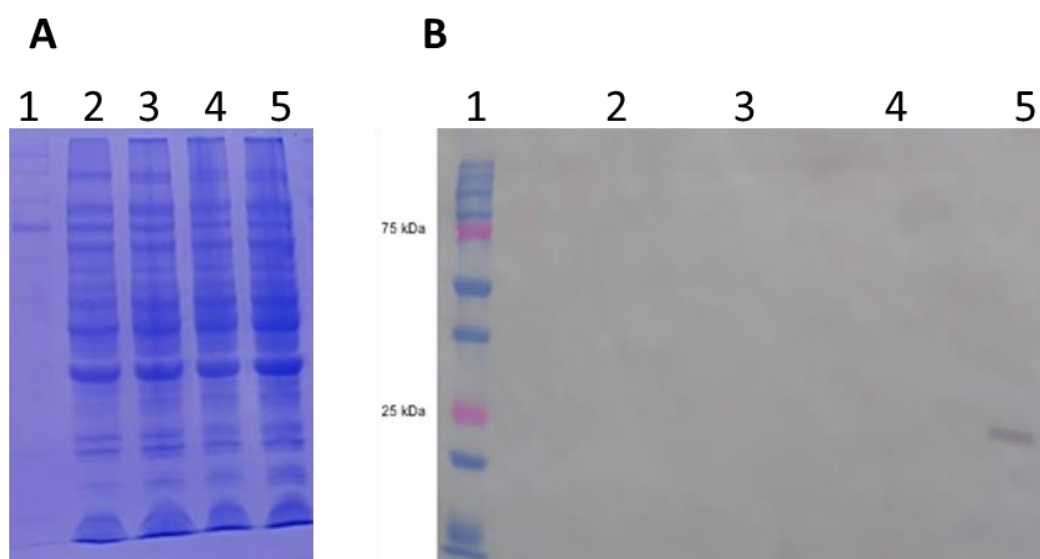


Figura 10. Avaliação da expressão de rGP19 induzida com D.O 1,2 A) Eletroforese em gel de poliacrilamida. 1. Marcador; 2. Cultivo sem indução; 3 – 5. 1, 2 e 3 horas após indução. B) Western blot com anti-histidina 1. Marcador; 2 – 4. 1, 2 e 3 horas após indução; 5. Controle positivo (rGP19).

Determinadas as condições do pré-inóculo e a verificado que concentração celular ideal para a indução da expressão de rGP19 é a de D.O. 1,0, estas foram avaliadas em maior escala (500 mL). Para isso, foi realizado um pré-inóculo a partir de 5 μ l do clone recombinante armazenado em glicerol, cultivado por 16 h sob agitação a 37°C, e inoculado em 500 mL de LB. Quando a concentração celular atingiu a D.O

de 1,0 foi realizada a indução da expressão com 100mM de IPTG, e após 3 horas de indução o cultivo foi processado e analisada a expressão.

A expressão foi inicialmente avaliada por *Dot-blot* servindo como uma triagem para avaliar a necessidade de realizar os próximos passos de avaliação da expressão e caracterização da proteína. No *Dot-blot* foi possível perceber a presença da proteína recombinante (Fig. 11). foram avaliadas por *Western blot* foi realizado com as alíquotas de cada hora. (Fig. 12). Neste teste as bandas identificadas não apresentaram tamanho e características esperadas, mas ainda assim confirmando que ocorreu interação com o anticorpo nas mesmas horas que a expressão em menor escala. O poço correspondente ao cultivo já lisado e processado com ureia não apresenta bandas, não se sabe se a proteína foi perdida no processamento ou na realização das técnicas de *SDS-Page* e *Western blot*, uma vez que ela já havia marcado no *Dot-blot*.

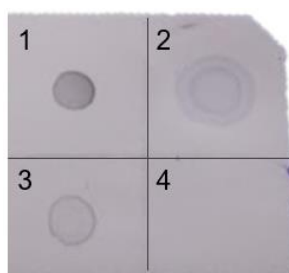


Figura 11: Avaliação da expressão de rGP19 através de *Dot blot* utilizando o anticorpo anti-histidina. 1. Controle positivo; 2. rGP19 expressão de 500 mL, 3. Controle com rGP19 concentrada, 4. Controle negativo.

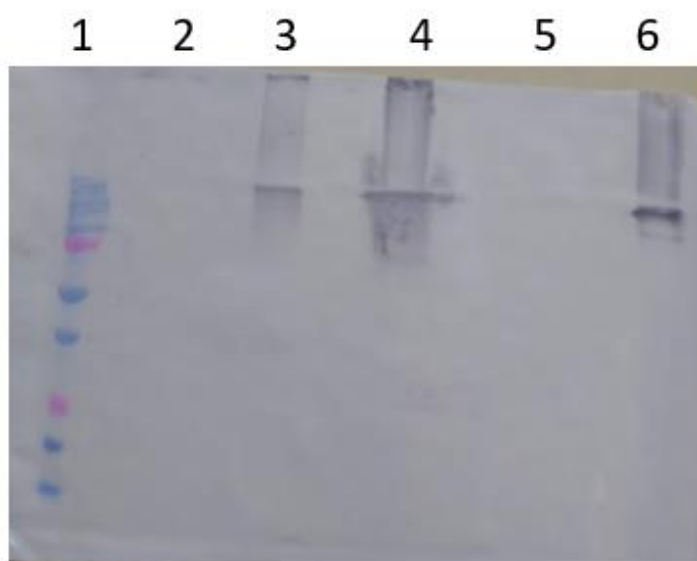


Figura 12: Análise da expressão de rGP19. *Western blot* 1. Marcador de peso molecular; 2. 1 h após a indução; 3. 2h após a indução; 4. 3 h após a indução; 5. Cultivo 500 mL após lise, centrifugação e eluição em tampão com ureia 8M. 6. Controle com rGP19 concentrada.

6. Conclusão e perspectivas

O trabalho propôs a avaliação e otimização de etapas do processo de expressão da rGP19. A partir dos dados apresentados, conclui-se que este trabalho elucidou detalhes de algumas etapas, trazendo informações consideráveis sobre o pré-inóculo ideal de 1 µl/mL de inóculo, a partir de células no glicerol, bem como a melhor concentração para indução, de densidade óptica 1,0, e o tempo de expressão após indução, de 3 h. Outro fator muito importante também trabalhado foi a determinação da cepa C43 (DE3) de *Escherichia coli* para expressão de rGP19 sem que a célula sofra com os efeitos citotóxicos dessa expressão, minimizando possíveis efeitos diretos na obtenção da proteína.

A avaliação dessas etapas acabou proporcionando uma maior compreensão dos passos iniciais para a expressão da proteína rGP19. O processo de expressão apresentou uma redução no tempo de execução quando comparado a trabalhos anteriores com a mesma proteína e ainda padronizou concentrações de pré-inóculo, confirmando a expressão em cada etapa posterior através de western blot

Como perspectiva futura, a análise de parâmetros mais detalhados durante o cultivo, como pH e produção de metabólitos, afim de estabelecer um protocolo completo padronizado para ser utilizado em expressão e possível escalonamento para na produção de antígenos para teste diagnóstico. Bem como conseguir purificar e quantificar a proteína com o propósito de obter dados quantitativos da expressão.

7. Referências

- AGUIAR, Daniel Moura et al. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, [s. l.], v. 37, n. 3, p. 796–802, 2007.
- ALMOSNY, Nádia R. P. et al. Hemoparasitoses em pequenos animais domésticos e como zoonoses. **1º edição Rio de Janeiro: LF livros de Veterinária Ltda**, [s. l.], 2002.
- ANDEREG, P. I.; PASSOS, L. M. F. Erliquiose canina: revisão. **Clínica Veterinária**, [s. l.], v. 4, n. 18, p. 31–38, 1999.
- ARECHAGA, Ignacio et al. Characterisation of new intracellular membranes in *Escherichia coli* accompanying large scale over-production of the b subunit of F1Fo ATP synthase. **FEBS letters**, [s. l.], v. 482, n. 3, p. 215–219, 2000.
- ATTIPA, Charalampos et al. Canine tick-borne pathogens in Cyprus and a unique canine case of multiple co-infections. **Ticks and tick-borne diseases**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 341–346, 2017.
- BANETH, G. et al. Survey of *Ehrlichia canis* antibodies among dogs in Israel. **Veterinary Record**, [s. l.], v. 138, n. 11, p. 257–259, 1996.
- BANEYX, François. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Current opinion in biotechnology**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 411–421, 1999.
- BARR, S. C.; BOWMAN, D. D. Doenças Infecciosas e Parasitárias em Cães e Gatos—Consulta em 5 minutos. **Rio de Janeiro: Revinter**, [s. l.], 2010.
- BORIN, S.; CRIVELENTI, 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**, [s. l.], p. 566–571, 2009.
- BROUQUI, Ph et al. Serological evaluation of *Ehrlichia canis* infections in military dogs in Africa and Reunion Island. **Veterinary microbiology**, [s. l.], v. 26, n. 1–2, p. 103–105, 1991.
- CADMAN, H. F. et al. Comparison of the dot-blot enzyme linked immunoassay with immunofluorescence for detecting antibodies to *Ehrlichia canis*. **Veterinary Record**, [s. l.], v. 135, n. 15, p. 362, 1994.
- CARVALHO, F. S. et al. Epidemiological and molecular study of *Ehrlichia canis* in dogs in Bahia, Brazil. **Genet Mol Res**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 657–662, 2008.
- CASTRO, M. B. Avaliação das alterações hematológicas, imunológicas e anatomopatológicas na infecção aguda experimental de cães por *Ehrlichia canis* (DONATIEN; LESTOQUARD, 1935) ou MOSHKOVKI, 1945. 1997. 69 fDissertação (Mestrado em Medicina Veterinária—Área de concentração ..., , 1997.
- CHAMBERLIN, Michael; MCGRATH, Janet; WASKELL, Lucy. New RNA polymerase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T7. **Nature**, [s. l.], v. 228, n. 5268, p. 227, 1970.
- CODNER, E. C. et al. Investigation of glomerular lesions in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. **American journal of veterinary research**, [s. l.], v. 53, n. 12, p. 2286–2291, 1992.
- CODNER, E. C.; ROBERTS, R. E.; AINSWORTH, A. G. Atypical findings in 16 cases of canine ehrlichiosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, [s. l.], v. 186, n. 2, p. 166–169, 1985.
- COHN, Leah A. Ehrlichiosis and related infections. [s. l.], v. 33, p. 863–884, 2003.
- COSTA, J. O. et al. *Ehrlichia canis* infection in dog in Belo Horizonte, Brazil. **Arq Esc Vet Bela Horizonte**, [s. l.], 1973.

- COSTA JR, Livio Martins et al. Sero-prevalence and risk indicators for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil. **The Veterinary Journal**, [s. l.], v. 174, n. 3, p. 673–676, 2007.
- COUTO, C. G. Doenças rickettsiais. **Manual Saunders: Clínica de Pequenos Animais. Roca, São Paulo**, [s. l.], p. 139–142, 1998.
- DAGNONE, Ana Sílvia et al. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 117, n. 4, p. 285–290, 2003.
- DAGNONE, Ana Sílvia et al. Molecular diagnosis of Anaplasmataceae organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 20–25, 2009.
- DANTAS-TORRES, Filipe. The brown dog tick , *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille , 1806) (Acari : Ixodidae) : From taxonomy to control. [s. l.], v. 152, p. 173–185, 2008.
- DANTAS-TORRES, Filipe; FIGUEREDO, Luciana Aguiar; BRANDÃO-FILHO, Sinval Pinto. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 64–67, 2006.
- DAVOUST, B. L'ehrlichiose canine. **Le Point vétérinaire: revue d'enseignement post-universitaire et de formation permanente**, [s. l.], v. 25, n. 151, p. 43–51, 1993.
- DAWSON, J. E. et al. Isolation and characterization of an *Ehrlichia* sp. from a patient diagnosed with human ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 29, n. 12, p. 2741–2745, 1991.
- DAY, Michael J. The immunopathology of canine vector-borne diseases. **Parasites & Vectors**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 48, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-48>>
- DE PAIVA DINIZ, Pedro Paulo Vissotto et al. Surveillance for zoonotic vector-borne infections using sick dogs from southeastern Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 689–698, 2007.
- DONATIEN, A.; LESTOQUARD, F. Existence en Algérie d'une Rickettsia du chien. **Bull. Soc. Pathol. Exot**, [s. l.], v. 28, p. 418–419, 1935.
- DUIJZER, Lotty Evertje; VAN JAARSVELD, Willem; DEKKER, Rommert. Literature review: The vaccine supply chain. **European Journal of Operational Research**, [s. l.], v. 268, n. 1, p. 174–192, 2018.
- DUMLER, J. S. et al. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combi. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY**, [s. l.], v. 51, n. 6, p. 2145–2165, 2001.
- DUMON-SEIGNOVERT, Laurence; CARIOT, Guillaume; VUILLARD, Laurent. The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21 (DE3), C41 (DE3), and C43 (DE3). **Protein expression and purification**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 203–206, 2004.
- ELITOK, Bulent; UNGUR, Bulent. Prevalence of *Ehrlichia Canis* Infection in Uşak and Investigation of Clinical, Hematological and Biochemical Signs in Infected Dogs. **International Biological and Biomedical Journal**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 134–139, 2016.
- FARIA, Joice Lara Maia et al. *Ehrlichia canis* morulae and DNA detection in whole blood and spleen aspiration samples. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 98–102, 2010.
- FERREIRA, Renata Fernandes et al. Genetic diversity of *Ehrlichia canis* strains from naturally infected dogs in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia**

- Veterinária**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 301–308, 2014.
- FRUET, Caren Langone. Erliquiose em cães. [s. l.], 2005.
- GARRITY, G. et al. **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria**. [s.l.] : Springer US, 2007.
- GOPAL, Gopal Jee; KUMAR, Awanish. Strategies for the Production of Recombinant Protein in *Escherichia coli*. **The Protein Journal**, [s. l.], v. 32, n. 6, p. 419–425, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10930-013-9502-5>>
- GREGORY, C.; FORRESTER, S. *Ehrlichia canis*, *E. equi*, *E. risticii* infections. In: **GREENE, C. Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: WB Saunders, 1990.
- GROVES, M. G. et al. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). **American journal of veterinary research**, [s. l.], v. 36, n. 7, p. 937–940, 1975.
- HARRUS, Shimon; WANER, Trevor. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. **The Veterinary Journal**, [s. l.], v. 187, n. 3, p. 292–296, 2011.
- HOSKINS, J. D.; BARTA, O.; ROTHSCMITT, J. Serum hyperviscosity syndrome associated with *Ehrlichia canis* infection in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, [s. l.], v. 183, n. 9, p. 1011–1012, 1983.
- HUXSOLL, D. L. et al. Tropical canine pancytopenia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, [s. l.], v. 157, n. 11, p. 1627, 1970.
- INOKUMA, Hisashi et al. Determination of the Nucleotide Sequences of Heat Shock Operon *groESL* and the Citrate Synthase Gene (*gltA*) of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* for Phylogenetic and Diagnostic Studies. [s. l.], v. 9, n. 5, p. 1132–1136, 2002.
- IQBAL, Zafar; CHAICHANASIRIWITHAYA, Wiwat; RIKIHISA, Yasuko. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. **Journal of clinical microbiology**, [s. l.], v. 32, n. 7, p. 1658–1662, 1994.
- IQBAL, Zafar; RIKIHISA, Yasuko. Reisolation of *Ehrlichia canis* from blood and tissues of dogs after doxycycline treatment. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 32, n. 7, p. 1644–1649, 1994.
- ISOLA, JGMP; CADIOLI, Fabiano Antonio; NAKAGE, Ana Paula. Erliquiose canina–revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, [s. l.], p. 1–11, 2012.
- KAVINSKI, L. C. Ocorrência de um caso de erliquiose canina em Curitiba-PR. **Revista do Setor de Ciências Agrárias**, [s. l.], v. 10, n. 1–2, p. 217–219, 1988.
- KEYSARY, Avi et al. The first isolation, in vitro propagation, and genetic characterization of *Ehrlichia canis* in Israel. **Veterinary parasitology**, [s. l.], v. 62, n. 3–4, p. 331–340, 1996.
- LABARTHE, N. et al. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* infections in Brazil. **Veterinary therapeutics: research in applied veterinary medicine**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 67–75, 2003.
- LABRUNA, Marcelo Bahia; PEREIRA, Marcelo de Campos. Carrapato em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, [s. l.], v. 6, n. 30, p. 24–32, 2001.
- LEWIS, Jr G. E. et al. The brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* and the dog as experimental hosts of *Ehrlichia canis*. **American journal of veterinary research**, [s. l.], v. 38, n. 12, p. 1953–1955, 1977.
- LIMA, Mayra de Castro Ferreira et al. Conventional and Holter Electrocardiographic Assessment of Dogs Infected Naturally With Acute Canine Monocytic Ehrlichiosis. **Topics in companion animal medicine**, [s. l.], v. 35, p. 31–37, 2019.
- LUO, Tian et al. A variable-length PCR target protein of *Ehrlichia chaffeensis* contains

- major species-specific antibody epitopes in acidic serine-rich tandem repeats. **Infection and immunity**, [s. l.], v. 76, n. 4, p. 1572–1580, 2008.
- LUZ, Hermes Ribeiro; FACCINI, João Luiz Horácio. Parasitismo por carrapatos em anuros no Brasil. Revisão. **Vet Zootec**, [s. l.], v. 20, p. 100–111, 2013.
- MACHADO, Rosângela Zacarias et al. Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). **Veterinary parasitology**, [s. l.], v. 139, n. 1–3, p. 262–266, 2006.
- MCBRIDE, Jere W. et al. Immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* infection with recombinant proteins. **Journal of clinical microbiology**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 315–322, 2001.
- MCBRIDE, Jere W. et al. Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* immunoreactive proteins. **Infection and immunity**, [s. l.], v. 71, n. 5, p. 2516–2524, 2003.
- MCBRIDE, Jere W. et al. Identification of a glycosylated *Ehrlichia canis* 19-kilodalton major immunoreactive protein with a species-specific serine-rich glycopeptide epitope. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 75, n. 1, p. 74–82, 2007.
- MCBRIDE, Jere W.; DOYLE, Christopher K. **Immunoreactive glycoprotein GP19 Ehrlichia canis** Google Patents, , 2017.
- MCBRIDE, Jere W.; WALKER, David H. Molecular and cellular pathobiology of Ehrlichia infection: targets for new therapeutics and immunomodulation strategies. **Expert reviews in molecular medicine**, [s. l.], v. 13, 2011.
- MENESES, Iris Daniela Santos De et al. Perfil clínico-laboratorial da erliquiose monocítica canina em cães de Salvador e região metropolitana, Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, [s. l.], v. 9, n. 4, 2008.
- MIROUX, Bruno; WALKER, John E. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. **Journal of molecular biology**, [s. l.], v. 260, n. 3, p. 289–298, 1996.
- MORAES, H. A.; ALMOSNY, N. R. P.; LABARTHE, N. Diretrizes gerais para diagnóstico e manejo de cães infectados por *Ehrlichia spp.* **Clín. Vet**, [s. l.], v. 9, n. 48, p. 28–30, 2004.
- MOREIRA, S. M. et al. Retrospective study (1998-2001) on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, MG, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [s. l.], v. 55, n. 2, p. 141–147, 2003.
- MOREIRA, Simone Magela; MACHADO, Rosângela; PASSOS, Lygia Friche. Detection of *Ehrlichia canis* in bone marrow aspirates of experimentally infected dogs. **Ciência Rural**, [s. l.], v. 35, n. 4, p. 958–960, 2005.
- MUNDIM, Antonio Vicente et al. Clinical and hematological signs associated with dogs naturally infected by *Hepatozoon sp.* and with other hematozoa: a retrospective study in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 153, n. 1–2, p. 3–8, 2008.
- MYLONAKIS, M. E. et al. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): A comparison between five methods. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 91, n. 2–3, p. 197–204, 2003.
- MYLONAKIS, Mathios E.; HARRUS, Shimon; BREITSCHWERDT, Edward B. An update on the treatment of canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). **The veterinary journal**, [s. l.], 2019.
- MYLONAKIS, Mathios E.; THEODOROU, Konstantina N. Canine monocytic ehrlichiosis: An update on diagnosis and treatment. **Acta veterinaria**, [s. l.], v. 67, n. 3, p. 299–317, 2017.
- NAKAGHI, Andréa Cristina Higa et al. **Canine ehrlichiosis: clinical, hematological,**

serological and molecular aspects *Ciência Rural* scielo , , 2008.

NIMS, Robert M. et al. **INVESTIGATION OF A NEW DISEASE OF MILITARY DOGS.** [s.l.] : WALTER REED ARMY INST OF RESEARCH WASHINGTON DC, 1970.

O'DWYER, L. H. et al. Prevalence, hematology and serum biochemistry in stray dogs naturally infected by *Hepatozoon canis* in São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [s. l.], v. 58, n. 4, p. 688–690, 2006.

OLIVEIRA, D. et al. Anti-Ehrlichia canis antibodies detection by “Dot-ELISA” in naturally infected dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–5, 2000.

OLIVEIRA, Luciana Souza De et al. First report of *Ehrlichia ewingii* detected by molecular investigation in dogs from Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, [s. l.], v. 15, p. 55–56, 2009.

OLIVEIRA, Rômulo Silva De et al. Recombinant gp19 as a potential antigen for detecting anti-*Ehrlichia canis* antibodies in dog sera. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 290–297, 2015.

PADDOCK, Christopher D.; CHILDS, James E. *Ehrlichia chaffeensis*: a prototypical emerging pathogen. **Clinical microbiology reviews**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 37–64, 2003.

PANCIERA, R. J.; EWING, S. A.; CONFER, A. W. Ocular histopathology of ehrlichial infections in the dog. **Veterinary pathology**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 43–46, 2001.

PARZY, D. et al. Human pathogenicity of *Ehrlichia canis*. **The Lancet**, [s. l.], v. 337, n. 8750, p. 1169, 1991.

PINYOOWONG, Danai et al. Molecular characterization of Thai *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* strains detected in dogs. **Infection, Genetics and Evolution**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 433–438, 2008.

POPOV, V. L. et al. Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 47, n. 3, p. 235–251, 1998.

PRESSER, K. A.; RATKOWSKY, D. A.; ROSS, T. Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 63, n. 6, p. 2355 LP – 2360, 1997. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/63/6/2355.abstract>>

RIESENBERG, D. et al. High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. **Journal of biotechnology**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 17–27, 1991.

RIKIHISA, Y. et al. Analyses of *Ehrlichia canis* and a canine granulocytic Ehrlichia infection. **Journal of clinical microbiology**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 143–148, 1992.

ROSANO, Germán L.; CECCARELLI, Eduardo A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in microbiology**, [s. l.], v. 5, p. 172, 2014.

RUDOLER, Nir et al. Evaluation of an attenuated strain of *Ehrlichia canis* as a vaccine for canine monocytic ehrlichiosis. **Vaccine**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 226–233, 2012.

SAINZ, A.; AMUSATEGUI, I.; TESOURO, M. A. *Ehrlichia platys* infection and disease in dogs in Spain. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 382–384, 1999.

SAINZ, Ángel et al. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. **Parasites & vectors**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 75, 2015.

SAITO, Taís B. et al. Canine infection by *rickettsiae* and *ehrlichiae* in southern Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, [s. l.], v. 79, n. 1, p. 102–108, 2008.

SAMLASKA, CURT, P. Arthropod infestations and vectors of disease. In: **Military Dermatology**. Washington DC: Office of The Surgeon General at TMM Publications, 1994. v. 3p. 183–196.

- SANTAREM, Vamilton Álvares. Achados epidemiológicos, clínicos e hematológicos e comparação de técnicas para diagnóstico de *Ehrlichia canis*. [s. l.], 2003.
- SANTOS, Flávia et al. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **The Veterinary Journal**, [s. l.], v. 179, n. 1, p. 145–148, 2009.
- SCHLEGEL, Susan; GENEVAUX, Pierre. De-convoluting the Genetic Adaptations of *E. coli* Article De-convoluting the Genetic Adaptations of *E. coli* C41 (DE3) in Real Time Reveals How Alleviating Protein Production Stress Improves Yields. **CellReports**, [s. l.], v. 10, n. 10, p. 1758–1766, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.02.029>>
- SHIPOV, A. et al. Prognostic indicators for canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary parasitology**, [s. l.], v. 153, n. 1–2, p. 131–138, 2008.
- SILVA, I. P. M. ERLIQUIOSE CANINA–REVISÃO DE LITERATURA. **Revista Científica De Medicina Veterinária**, [s. l.], v. 24, 2015.
- SILVA, Marcos Vinícius Mendes et al. Erliquiose canina: revisão de literatura. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, [s. l.], v. 14, n. 2, 2011.
- SKOTARCZAK, Bogumila. Canine ehrlichiosis. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 137–142, 2003.
- SMITH, R. D. et al. 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**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 119–126, 1976.
- SMITH, Ronald D. et al. Platelet kinetics in canine ehrlichiosis: evidence for increased platelet destruction as the cause of thrombocytopenia. **Infection and immunity**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 1216–1221, 1975.
- SOARES, ALINE O. et al. Avaliação ectoparasitológica e hemoparasitológica em cães criados em apartamentos e casas com quintal na cidade de Juiz de Fora, MG. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 13–16, 2006.
- STRAUBE, Juliane. **Erliquiose canina – da infecção aguda a doença crônica** BOLETIM CVBD - BAYER. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.cvbd.org/en/tick-borne-diseases/ehrlichiosis/>>.
- STUDIER, F. William. T7 expression systems for inducible production of proteins from cloned genes in *E. coli*. **Current protocols in molecular biology**, [s. l.], v. 124, n. 1, p. e63, 2018.
- SUZUKI, Fernanda Teruno. Eficácia do medicamento Doxiciclina na resolução da enfermidade Erliquiose Monocítica Canina (EMC). [s. l.], 2013.
- SWANSON, James F. Ocular manifestations of systemic disease in the dog and cat: recent developments. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 849–867, 1990.
- TILLEY, Larry Patrick; SMITH, Francis W. K.; FRANCIS, W. K. **Consulta veterinária em 5 minutos: espécies canina e felina** São Paulo: Manole, , 2003.
- TRAPP, Silvia M. et al. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. **Veterinary parasitology**, [s. l.], v. 140, n. 3–4, p. 223–230, 2006.
- VIEIRA, M. I. et al. Resposta sorológica para *Anaplasma marginale* em bovinos submetidos a distintos regimes de controle do carrapato *Boophilus microplus*. In: EMBRAPA PECUÁRIA SUL-ARTIGO EM ANAIS DE CONGRESSO (ALICE) 2002, **Anais...** : In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINARIA, 12.; SEMINÁRIO DE ..., 2002.
- VIEIRA, Rafael Felipe da Costa et al. **Ehrlichiosis in Brazil** *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* scielo , , 2011.

- VIGNARD-ROSEZ, KSFV; ALVES, F. R.; BLEICH, I. Erliquiose canina. **Cães e gatos**, [s. l.], n. 96, p. 25–28, 2001.
- WAGNER, Samuel et al. Tuning *Escherichia coli* for membrane protein overexpression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 105, n. 38, p. 14371–14376, 2008.
- WANER, Trevor et al. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. **Veterinary parasitology**, [s. l.], v. 69, n. 3–4, p. 307–317, 1997.
- WANER, Trevor; STRENGER, Carmella; KEYSARY, Avi. Comparison of a clinic-based ELISA test kit with the immunofluorescence test for the assay of *Ehrlichia canis* antibodies in dogs. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 240–244, 2000.
- WEN, Bohai et al. Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 35, n. 7, p. 1852–1855, 1997.
- WOODY, Benny J.; HOSKINS, Johnny D. Ehrlichial diseases of dogs. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 75–98, 1991.
- YU, Xue jie; MCBRIDE, Jere W.; WALKER, David H. Restriction and expansion of Ehrlichia strain diversity. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 143, n. 3–4, p. 337–346, 2007.
- ZHANG, Xiaofeng et al. Genetic and antigenic diversities of major immunoreactive proteins in globally distributed Ehrlichia canis strains. **Clin. Vaccine Immunol.**, [s. l.], v. 15, n. 7, p. 1080–1088, 2008.