UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Nicole Tafnes de Brito Silva Honório

Identificação e validação de epítopos potencialmente antigênicos de *Babesia bovis* por abordagens de vacinologia reversa, genética molecular e imunologia experimental

Juiz de Fora
2026

Nicole Tafnes de Brito Silva Honório

Identificação e validação de epítopos potencialmente antigênicos de *Babesia bovis* por abordagens de vacinologia reversa, genética molecular e imunologia experimental

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração: Imunologia e Doenças Infecto-parasitárias

Orientador(a): Profa. Dra. Marta Fonseca Martins
Coorientador(a): Dra. Emanuelle Baldo Gaspar

Juiz de Fora
2026

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração
automática da Biblioteca Universitária da UFJF,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Tafnes de Brito Silva Honório, Nicole.
Identificação e validação de epítopos potencialmente antigênicos de Babesia bovis por abordagens de vacinologia reversa, genética molecular e imunologia experimental / Nicole Tafnes de Brito Silva Honório. -- 2026.
117 f. : il.

Orientadora: Marta Fonseca Martins
Coorientadora: Emanuelle Baldo Gaspar
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2026.

1. Babesia bovis. 2. Vacinologia reversa. 3. Epítopos. 4. ELISA. 5. PBMCs. I. Fonseca Martins , Marta , orient. II. Baldo Gaspar , Emanuelle, coorient. III. Título.

Nicole Tafnes de Brito Silva Honório

Identificação e validação de epítopos potencialmente antigênicos de *Babesia bovis* por abordagens de vacinologia reversa, genética molecular e imunologia experimental

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração: Imunologia e Doenças Infectoparasitárias.

Aprovada em 25 de setembro de 2026.

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Marta Fonseca Martins - Orientadora
EMBRAPA Gado de Leite

Profª Drª Emanuelle Baldo Gaspar
EMBRAPA Gado de Leite

Prof. Dr. Eugênio Damaceno Hottz
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profª Drª Beatriz Rossetti Ferreira
Universidade de São Paulo

Juiz de Fora, 21/08/2026.

Documento assinado eletronicamente por **MARTA FONSECA MARTINS**, **Usuário Externo**, em 28/09/2026, às 08:23, 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 **Emanuelle Baldo Gaspar**, **Usuário Externo**, em 09/10/2026, às 07:57, 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 **Beatriz Rossetti Ferreira**, **Usuário Externo**, em 09/10/2026, às 09:23, 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 **Eugenio Damaceno Hottz**, **Professor(a)**, em 10/10/2026, às 09:29, 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 Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **3162893** e o código CRC **D7A1210D**.

Ao meu pai, a quem tive a sorte de vir filha e o privilégio de me tornar fã.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, antes de tudo, a Deus. Sem Ele, nada seria possível na minha vida. Em cada momento de desespero, diante de cada imprevisto e nas tantas vezes em que não soube como seguir, encontrei no Espírito Santo a presença que me acalmou, me fortaleceu e me lembrou de que eu nunca estive sozinha. Creio que parte da ação do Espírito Santo de Deus na minha vida pode ser percebida e sentida pelas pessoas que Ele colocou ao meu redor ao longo de toda a minha caminhada, especialmente nos momentos em que mais precisei.

À minha família, agradeço por todas as vezes em que me enxergaram muito além daquilo que eu mesma acreditava ser. Sempre deram uma importância enorme ao fato de eu ser bióloga e cientista, enquanto eu, tantas vezes, me senti apenas uma menininha brincando de ciência. Talvez uma das maiores sortes da minha vida tenha sido justamente essa: enquanto eu ainda aprendia a acreditar em mim, minha família já enxergava em mim a cientista que eu poderia me tornar.

À minha mãe, Rosilene, agradeço pelo maior presente de todos: ter me dado o privilégio de vir a este mundo. Obrigada por ser parte essencial da pessoa que sou.

À minha avó Margarida, que foi morar com Deus justamente no ano em que concluo esta etapa, agradeço por todo o amor, por todo o orgulho que sempre demonstrou de mim e por tudo aquilo que permanece em mim através dela. Creio que ela está na paz do Nosso Senhor Jesus Cristo, de onde continua me direcionando a força necessária para seguir.

Ao meu pai, Antônio Carlos, é simplesmente impossível colocar em palavras o quanto de você existe na Nicole que sou hoje. Existe você na Nicole que pôde estudar na melhor escola que você podia proporcionar; na Nicole que foi aprovada em uma Universidade Federal na primeira tentativa; na Nicole que chegou ao Mestrado antes mesmo de concluir a Graduação. Mas existe, sobretudo, você na Nicole que aprendeu a valorizar o caráter, a verdade, a responsabilidade e a capacidade de cultivar boas ações e bons relacionamentos ao longo da vida. Tudo o que sou carrega um pouco de você. Você é meu maior herói, e ser sua filha é o maior título que eu poderia

conquistar na vida. Obrigada por todo o apoio, por todo o suporte e, principalmente, por ter tido a coragem de entender que, para que eu pudesse conquistar os meus sonhos, seria preciso me deixar voar para longe dos seus braços. Talvez essa tenha sido uma das maiores provas de amor que você poderia me dar: me ensinar a voar sem nunca deixar de ser meu lugar seguro para voltar. Se hoje posso olhar para trás e reconhecer a mulher, a bióloga e a cientista que me tornei, é porque, muito antes de eu acreditar em qualquer um desses títulos, você já acreditava em mim.

Aos amigos que a vida me permitiu cultivar, agradeço por terem permanecido, mesmo quando os caminhos mudaram, as distâncias aumentaram e a vida nos levou para lugares diferentes.

À Ana Laura, Maria Isadora, Beatriz, Laura e Manuela, minhas amigas desde a infância e os tempos de escola, agradeço por uma amizade que atravessou diferentes fases da vida e que continua aqui. Obrigada por ouvirem meus choros, celebrarem minhas conquistas, acolherem minhas inseguranças e, principalmente, por nunca deixarem que a distância ou o tempo diminuíssem a nossa amizade. Algumas pessoas fazem parte da nossa história porque estiveram presentes em determinados momentos; vocês fazem parte dela porque estiveram presentes em tantos deles.

Ao Hyago e à Clarissa, agradeço de uma maneira especialmente difícil de traduzir em palavras. Muitas vezes, vocês foram a rocha que me sustentou, tanto nas questões profissionais quanto nas pessoais. Nossa amizade nasceu dentro desse ambiente, mas há muito deixou de pertencer somente a ele. Levarei comigo tudo o que construímos e tenho certeza de que essa amizade continuará seguindo muito além da Embrapa, das bancadas, dos experimentos, do nosso sofázinho e dos anos que passamos juntos.

À Gabrielle, Francelly e Carla, agradeço pelo carinho, pelo acolhimento e pela amizade que também encontrei nesse caminho. Vocês foram amor em momentos em que eu precisava de amor, apoio quando eu precisava de apoio e, ao mesmo tempo, referências profissionais que contribuíram para que eu me tornasse uma cientista melhor.

Ao Robert, agradeço por todas as vezes em que compartilhou comigo um pouco da sua grandeza e da sua inteligência. Sua contribuição foi muito além daquilo que é

possível mensurar em um trabalho acadêmico: os conhecimentos que compartilhou comigo contribuíram significativamente para a construção desta dissertação e, sobretudo, ampliaram a maneira como eu compreendo a ciência. Sou muito grata por ter tido a oportunidade de aprender com você.

À minha orientadora, Profa. Dra. Marta Fonseca Martins, agradeço por uma das experiências mais transformadoras da minha trajetória. Tê-la como orientadora foi muito além de aprender a fazer ciência. Marta é assustadoramente inteligente, visionária, estratégica e, ao mesmo tempo, uma tutora para a vida profissional e pessoal. Ao longo desses anos, aprendi com você a olhar para a ciência com mais profundidade, a pensar de forma mais estratégica, a reconhecer oportunidades e, principalmente, a compreender que formar uma cientista também significa formar uma pessoa capaz de enfrentar os desafios que existem para além da bancada.

À minha co-orientadora, Dra. Emanuelle Baldo Gaspar, agradeço por ter sido, igualmente, uma orientadora acadêmica e para a vida. Você me “adotou” ainda na iniciação científica e contribuiu com uma parte muito grande do descobrimento do meu amor pela Imunologia desde então. Obrigada por todo o conhecimento compartilhado, por cada ensinamento, pelo acolhimento tão amoroso e por todas as vezes em que esteve presente ao longo dessa caminhada.

Sem vocês duas segurando a minha mão do início ao fim, não apenas este trabalho seria impossível, como também a evolução pessoal que vivi durante os quatro anos em que fiz parte da equipe da Embrapa teria sido muito diferente. Vocês me ensinaram, orientaram, desafiaram e acolheram de uma maneira que ultrapassa qualquer definição formal de orientação. Por isso, com todo o carinho e a gratidão que essas palavras podem carregar, agradeço às minhas “mães científicas”, que me ensinaram tanto e que fizeram dessa trajetória uma parte tão especial da minha vida.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora (PPGCBio/UFJF), pela formação acadêmica e científica proporcionada ao longo do Mestrado.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), em especial à Embrapa Gado de Leite, agradeço pela estrutura, pelas oportunidades e pelo ambiente de

pesquisa que contribuíram de forma fundamental para a realização deste trabalho e para a minha formação científica.

Agradeço também pelo suporte proporcionado por meio do projeto SEG Embrapa 10.2203.024.00.00.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), agradeço pelo apoio financeiro e pela concessão da bolsa de estudos, fundamentais para o desenvolvimento desta pesquisa e para minha formação acadêmica e científica.

Por fim, agradeço à Nicole criança. À menina que sonhou em ser cientista e que acreditava que um dia produziria todas as vacinas contra todas as doenças que existiam no mundo. Talvez ela ainda não saiba, mas chegamos muito mais longe do que ela imaginava. E, se eu pudesse conversar com ela agora, diria que continuamos com a mesma vontade de contribuir para a ciência e que estamos cada vez mais capacitadas para fazer isso. Talvez você não tenha criado uma vacina por dia, Nicole, mas continua tentando ajudar a construir um mundo em que elas existam. E, por enquanto, acho que isso já é um começo bastante bonito.

“Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar.”

(Josué 1:9)

RESUMO

A Tristeza Parasitária Bovina (TPB) é um complexo de enfermidades hemoparasitárias causado por *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale*, sendo *B. bovis* o agente associado aos quadros clínicos mais severos da TPB. Seu controle envolve o manejo do carrapato vetor, a quimioprofilaxia e a utilização de vacinas vivas, estratégias que apresentam limitações relacionadas à resistência a acaricidas, à manutenção da estabilidade enzoótica e aos riscos e dificuldades associados ao uso de agentes infecciosos viáveis. Nesse contexto, o desenvolvimento de vacinas baseadas em antígenos definidos representa uma alternativa promissora, e a vacinologia reversa, integrada a ferramentas de bioinformática e imunoinformática, permite a identificação e priorização racional de candidatos a partir de informações genômicas. Assim, este estudo teve como objetivo identificar e avaliar epítopos candidatos de *B. bovis* por meio da integração de vacinologia reversa, genética molecular e imunologia experimental. Inicialmente, o proteoma predito a partir do genoma de referência da linhagem de *B. bovis* T2Bo, constituído por 3.959 proteínas codificadoras, foi analisado *in silico*, e a aplicação dos critérios de seleção permitiu priorizar nove proteínas de membrana plasmática com escores de antigenicidade superiores a 0,7 no VaxiJen, a partir das quais foram preditos 31 epítopos candidatos. As regiões gênicas correspondentes aos candidatos selecionados foram avaliadas em isolados brasileiros de *B. bovis* por PCR, sequenciamento e análise de alinhamento. Foi observada elevada conservação das regiões analisadas do gene BBOV_IV000770, que codifica a proteína predita XP_001609243.1 e contém cinco dos epítopos selecionados. A partir dessa validação, foram sintetizados os peptídeos CNPGL-Bbovis-5E2, CNPGL-Bbovis-5E3 e CNPGL-Bbovis-5E5, inicialmente conjugados à proteína carreadora KLH. Os peptídeos conjugados foram avaliados quanto à imunorreatividade por ELISA indireto, utilizando soros de bovinos submetidos à infecção experimental por *B. bovis*, e quanto à modulação da atividade metabólica de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), utilizando células provenientes de animais previamente expostos à infecção natural por *B. bovis*. Os peptídeos também foram avaliados em sua forma livre nos ensaios de ELISA e de redução da resazurina. Os peptídeos conjugados à proteína carreadora KLH não apresentaram reconhecimento por IgG atribuível aos peptídeos e não diferiram de forma consistente do KLH isolado quanto à atividade metabólica das PBMCs. Na forma livre, os peptídeos CNPGL-Bbovis-5E3 e CNPGL-Bbovis-5E5

apresentaram reconhecimento sorológico por IgG em parte dos animais positivos para *B. bovis*, com heterogeneidade entre as amostras, e os três peptídeos apresentaram perfis distintos de modulação da atividade metabólica das PBMCs, destacando-se o CNPGL-Bbovis-5E3 por apresentar efeitos associados à concentração e ao tempo de incubação. Em conjunto, os resultados permitiram priorizar candidatos de *B. bovis* com evidências de conservação, reconhecimento sorológico e atividade funcional, destacando o CNPGL-Bbovis-5E3 como candidato antigênico promissor. Estudos específicos de imunogenicidade e proteção ainda são necessários para determinar seu potencial vacinal e, adicionalmente, avaliar a aplicabilidade dos candidatos em estratégias imunodiagnósticas.
Palavras-chave: *Babesia bovis*. Vacinologia reversa. Epítopos. ELISA. PBMCs

ABSTRACT

Bovine Parasitic Sadness (BPS) is a complex of hemoparasitic diseases caused by *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale*, with *B. bovis* being the agent associated with the most severe clinical manifestations of BPS. Its control involves management of the tick vector, chemoprophylaxis, and the use of live vaccines, strategies that present limitations related to acaricide resistance, maintenance of enzootic stability, and the risks and practical difficulties associated with the use of viable infectious agents. In this context, the development of vaccines based on defined antigens represents a promising alternative, and reverse vaccinology, integrated with bioinformatics and immunoinformatics tools, enables the identification and rational prioritization of candidates based on genomic information. Therefore, this study aimed to identify and evaluate candidate epitopes of *B. bovis* through the integration of reverse vaccinology, molecular genetics, and experimental immunology. Initially, the predicted proteome derived from the reference genome of the *B. bovis* T2Bo strain, comprising 3,959 protein-coding genes, was analyzed *in silico*, and application of the selection criteria allowed the prioritization of nine plasma membrane proteins with VaxiJen antigenicity scores above 0.7, from which 31 candidate epitopes were predicted. The gene regions corresponding to the selected candidates were evaluated in Brazilian *B. bovis* isolates by PCR, sequencing, and alignment analysis. High conservation was observed in the analyzed regions of the BBOV_IV000770 gene, which encodes the predicted protein XP_001609243.1 and contains five of the selected epitopes. Based on this validation, the peptides CNPGL-Bbovis-5E2, CNPGL-Bbovis-5E3, and CNPGL-Bbovis-5E5 were synthesized, initially conjugated to the carrier protein KLH. The conjugated peptides were evaluated for immunoreactivity by indirect ELISA using sera from cattle experimentally infected with *B. bovis*, and for their effects on the metabolic activity of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) using cells obtained from animals previously exposed to natural *B. bovis* infection. The peptides were also evaluated in their free form using ELISA and the resazurin reduction assay. The peptides conjugated to the carrier protein KLH showed no IgG recognition attributable to the peptides and did not consistently differ from KLH alone in terms of PBMC metabolic activity. In their free form, the peptides CNPGL-Bbovis-5E3 and CNPGL-Bbovis-5E5 showed serological IgG recognition in a subset of *B. bovis*-positive animals, with heterogeneity among samples, while the three peptides exhibited distinct profiles of modulation of PBMC metabolic activity. CNPGL-

Bbovis-5E3 stood out by showing effects associated with peptide concentration and incubation time. Overall, the results enabled the prioritization of B. bovis candidates based on evidence of conservation, serological recognition, and functional activity, highlighting CNPGL-Bbovis-5E3 as a promising antigenic candidate. Further studies specifically addressing immunogenicity and protection are required to determine its vaccine potential and, additionally, to assess the applicability of these candidates in immunodiagnostic strategies.
Keywords: *Babesia bovis*. Reverse vaccinology. Epitopes. ELISA. PBMCs.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ciclo de vida de *Babesia bovis*. 22
Figura 2 – Fluxograma do *pipeline* de bioinformática utilizado para a seleção de epítopos imunogênicos da linhagem T2Bo de *Babesia bovis*.....34
Figura 3 – Delineamento experimental empregado na padronização do ELISA indireto com peptídeos conjugados ao KLH.....41
Figura 4 – Delineamento experimental do ELISA indireto com peptídeos livres.....44
Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir de DNA de *Babesia bovis*.....61
Figura 6 – Alinhamento parcial da sequência nucleotídica obtida por sequenciamento Sanger do amplicon GN5A com a sequência de referência do gene BBOV_IV000770 da linhagem T2Bo *Babesia bovis*. 63
Figura 7 – Alinhamento parcial da sequência nucleotídica obtida por sequenciamento Sanger do *amplicon* GN5B com a sequência do gene BBOV_IV000770 da linhagem T2Bo *Babesia bovis*. 64
Figura 8 – Atividade metabólica relativa de PBMCs estimuladas com o peptídeo CNPGL-Bbovis-5E2 conjugado ao KLH e com KLH isolado, em diferentes concentrações (20, 10, 5 e 2,5 µg/mL e tempos de incubação (48, 72 e 96 h).....76
Figura 9 – Atividade metabólica relativa de PBMCs estimuladas com o peptídeo CNPGL-Bbovis-5E3 conjugado ao KLH e com KLH isolado, em diferentes concentrações (20, 10, 5 e 2,5 µg/mL e tempos de incubação (48, 72 e 96 h).....77
Figura 10 – Atividade metabólica relativa de PBMCs estimuladas com o peptídeo CNPGL-Bbovis-5E5 conjugado ao KLH e com KLH isolado, em diferentes concentrações (20, 10, 5 e 2,5 µg/mL e tempos de incubação (48, 72 e 96 h). 78
Figura 11 – Atividade metabólica relativa de PBMCs estimuladas com os peptídeos livres CNPGL-Bbovis-5E2, CNPGL-Bbovis-5E3 e CNPGL-Bbovis-5E5 em diferentes concentrações (20, 10 e 5 µg/mL) e diferentes tempos de incubação (48, 72 e 96 h). ..... .81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – *Primers* utilizados para o diagnóstico molecular de agentes da Tristeza Parasitária Bovina por PCR em Tempo Real. 36

Tabela 2 – Caracterização *in silico* de proteínas de membrana plasmática e de epítopos candidatos da linhagem *Babesia bovis* T2Bo. 54

Tabela 3 – *Primers* desenhados para amplificação das regiões codificadoras dos epítopos imunogênicos selecionados *in silico* nas proteínas candidatas de *Babesia bovis* linhagem T2Bo. 59

Tabela 4 – Porcentagem de positividade e classificação das amostras individuais segundo o *cut-off* calculado para os peptídeos CNPGL-Bbovis-5E3 e CNPGL-Bbovis-5E5. 72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIEC	Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes
ACK	*Ammonium-Chloride-Potassium*
AMA	*Apical Membrane Antigen*
ART	*Aligned Rank Transform*
ART-C	*Aligned Rank Transform Contrast*
BLASTn	*Basic Local Alignment Search Tool – nucleotide*
BLASTp	*Basic Local Alignment Search Tool – protein*
BoLA	*Bovine Leukocyte Antigen*
ConA	Concanavalina A
Ct	*Cycle threshold*
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	*Enzyme-linked immunosorbent assay*
EUA	Estados Unidos da América
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GRAVY	*Grand Average of Hydropathy*
HPLC	*High-performance liquid chromatography*
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IEDB	*Immune Epitope Database*
IFN-γ	Interferon-gamma
IUPAC	*International Union of Pure and Applied Chemistry*
KLH	*Keyhole Limpet Hemocyanin*
MSA	*Merozoite Surface Antigen*
NCBI	*National Center for Biotechnology Information*
NK	*Natural killer*
NO	Óxido nítrico
OPD	*o-Phenylenediamine dihydrochloride*
PBS	*Phosphate-buffered saline*
PBS-T	*Phosphate-buffered* saline com Tween 20
PBMCs	*Peripheral blood mononuclear cells*
PCR	*Polymerase chain reaction*

PMA	*Phorbol 12-myristate 13-acetate*
PP	Porcentagem de positividade
RAP	*Rhoptry-Associated Protein*
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute*
SFB	Soro fetal bovino
SPPS	*Solid-phase peptide synthesis*
TPB	Tristeza Parasitária Bovina

SUMÁRIO

1 Introdução 15
2 Revisão de literatura 18
2.1 Tristeza parasitária bovina 18
2.2 Babesiose Bovina 20
2.2.1 Estratégias atuais de controle da babesiose bovina e suas limitações 25
2.3 Vacinologia reversa 28
3 Objetivos 31
3.1 Objetivo geral 31
3.2 Objetivos específicos 31
4 Material e Métodos 32
4.1 Identificação *in silico* 32
4.2 Diagnóstico das amostras por PCR em tempo real 34
4.3 Validação genômica dos epítopos 36
4.4 Peptídeos sintéticos 39
4.5 ELISA Indireto 40
4.5.1 Padronização das condições do ELISA indireto, por titulação em *chessboard*, utilizando peptídeos conjugados ao KLH 40
4.5.2 Padronização das condições do ELISA indireto, por titulação em *chessboard*, utilizando peptídeos livres 43
4.5.3 Avaliação da reatividade sorológica de amostras individuais 46
4.6 Ensaio de atividade metabólica celular por redução de resazurina 47
4.6.1 Ensaio de atividade metabólica com peptídeos conjugados com KLH 47
4.6.2 Ensaio de atividade metabólica com peptídeos livres 50
4.6.3 Avaliação estatística 51
5 Resultados e Discussão 53
5.1 Seleção *in silico* de epítopos candidatos 53
5.2 Conservação dos genes codificadores das proteínas candidatas em isolados brasileiros 59
5.3 ELISA 66
5.3.1 ELISA indireto utilizando peptídeos conjugados ao KLH 66
5.3.2 ELISA indireto utilizando peptídeos livres 68
5.3.3 Avaliação da reatividade sorológica de amostras individuais 70
5.4 Ensaio de atividade metabólica celular por redução de resazurina 74
5.4.1 Peptídeos conjugados com KLH 74

5.4.2 Peptídeos livres 81
5.4.3 Discussão integrada dos ensaios de atividade metabólica 84
6 Conclusão 90
Referências 92
Apêndices 101
Declaração de uso de Inteligência Artificial 112

1 INTRODUÇÃO

A pecuária bovina apresenta grande importância econômica e social no Brasil, contribuindo de forma expressiva para as cadeias produtivas de carne e leite e ocupando posição de destaque no cenário agropecuário nacional e internacional. Em 2024, o efetivo bovino brasileiro atingiu aproximadamente 238,2 milhões de cabeças, correspondendo a cerca de 15% do rebanho bovino mundial, estimado em aproximadamente 1,58 bilhão de animais (FAO, 2025; IBGE, 2025a). No mesmo ano, foram abatidos 39,27 milhões de bovinos sob inspeção sanitária (IBGE, 2025b), enquanto a produção de leite alcançou 35,7 bilhões de litros (IBGE, 2025a). As exportações brasileiras de carne bovina atingiram aproximadamente 2,89 milhões de toneladas e movimentaram US$ 12,8 bilhões, estabelecendo recorde histórico (ABIEC, 2025). Em 2024, o agronegócio representou 23,2% do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro, enquanto o ramo pecuário apresentou crescimento de 12,48% no período (CEPEA, 2025). Nesse contexto, a manutenção da sanidade dos rebanhos constitui um dos principais fatores para a sustentabilidade e a eficiência dos sistemas de produção, uma vez que enfermidades infecciosas e parasitárias comprometem o desempenho produtivo e geram perdas econômicas associadas à redução da produtividade, mortalidade e custos elevados com tratamento e medidas de controle.

A Tristeza Parasitária Bovina (TPB) constitui um importante problema sanitário para a bovinocultura brasileira, sendo causada pelos hemoparasitas *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale*. Entre esses agentes, *B. bovis* apresenta maior relevância clínica por estar associado às formas mais severas e a maiores taxas de mortalidade, especialmente em animais susceptíveis (Suarez et al., 2019; Bock et al., 2004). A doença pode resultar em mortalidade, redução do ganho de peso e da produção leiteira, além de custos associados ao tratamento e às medidas de prevenção e controle.

A ocorrência da babesiose bovina está diretamente relacionada à distribuição do carrapato *Rhipicephalus microplus*, seu principal vetor, tornando a prevenção e o controle da infecção desafios relevantes para a manutenção da sanidade e da produtividade dos rebanhos. O controle da babesiose envolve principalmente o controle do vetor por meio do uso de acaricidas e a administração de fármacos babesicidas para prevenção ou tratamento da doença. Entretanto, o uso frequente de acaricidas tem favorecido a seleção de populações de carrapatos resistentes, reduzindo a eficácia dos tratamentos disponíveis, enquanto a utilização de

quimioterápicos babesicidas, como o dipropionato de imidocarb e o diaceturato de diminazeno apresenta limitações relacionadas à toxicidade, aos resíduos em produtos de origem animal e à possibilidade de seleção de parasitos resistentes. Além disso, o controle intensivo do vetor pode reduzir a exposição natural dos animais aos hemoparasitas e interferir na manutenção da estabilidade enzoótica dos rebanhos.

Vale mencionar ainda que, apesar de sua importância histórica, as vacinas vivas também apresentam limitações, principalmente relacionadas à biossegurança, produção, armazenamento e variabilidade dos isolados utilizados (Abbas et al., 2014; Rodríguez-Vivas et al., 2018; De Waal, 2006). Por isso, estas vacinas não estão mais disponíveis no Brasil e não existe interesse da indústria em retomar sua produção. Diante dessas limitações, o desenvolvimento de estratégias vacinais baseadas em antígenos definidos representa uma alternativa de interesse para a prevenção da babesiose bovina. Diferentemente das abordagens fundamentadas na utilização de parasitos vivos, vacinas de subunidades e estratégias baseadas em epítopos permitem direcionar a resposta imunológica para regiões específicas dos antígenos, evitando a utilização de agentes infecciosos vivos (Parvizpour et al., 2020). Entretanto, a elevada complexidade antigênica de *B. bovis* e a variabilidade genética observada entre seus isolados tornam a identificação de candidatos adequados uma etapa desafiadora.

Nesse cenário, a vacinologia reversa constitui uma abordagem relevante para a identificação racional de candidatos vacinais a partir de informações genômicas. Inicialmente proposta como uma estratégia para identificação de antígenos a partir da informação genômica de patógenos, essa abordagem foi posteriormente ampliada pelo avanço da bioinformática e da imunologia, permitindo a seleção e priorização *in silico* de proteínas e regiões com potencial de reconhecimento imunológico. Para organismos complexos, como *B. bovis*, essa estratégia possibilita ampliar a prospecção de candidatos além daqueles tradicionalmente investigados, integrando diferentes características dos antígenos e reduzindo o número de candidatos a serem posteriormente avaliados experimentalmente (Rappuoli, 2001; Goodswen et al., 2012; Jiang et al., 2023).

Entretanto, a identificação *in silico* não é suficiente para estabelecer relevância biológica dos antígenos. A utilização de sequências provenientes de linhagens de referência pode limitar a aplicabilidade dos candidatos quando existem diferenças genéticas em relação aos isolados circulantes na população-alvo. Assim, a avaliação

da conservação das regiões selecionadas em isolados brasileiros, seguida da caracterização experimental do reconhecimento imunológico e dos possíveis efeitos sobre células do hospedeiro, constitui uma etapa importante para a priorização de epítopos candidatos de *B. bovis*.

Desse modo, este estudo integrou abordagens de vacinologia reversa, genética molecular, bioinformática e imunologia experimental para identificar e avaliar epítopos candidatos de *B. bovis*. Inicialmente, foram selecionados epítopos potencialmente imunogênicos a partir do proteoma predito do genoma de referência da linhagem de *B. bovis* T2Bo. Em seguida, as regiões gênicas correspondentes foram avaliadas em isolados brasileiros quanto à sua conservação, e, a partir dos candidatos priorizados, três peptídeos foram sintetizados para avaliação do reconhecimento sorológico e da atividade metabólica de células mononucleares do sangue periférico de bovinos. A hipótese deste estudo é que epítopos candidatos de *B. bovis* podem ser identificados por abordagens de vacinologia reversa, apresentar conservação em isolados brasileiros e exibir características imunológicas favoráveis quando avaliados experimentalmente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TRISTEZA PARASITÁRIA BOVINA

A pecuária bovina desempenha papel estratégico para a economia brasileira, contribuindo de forma expressiva para as cadeias produtivas de carne e leite e para a geração de empregos. A manutenção da sanidade dos rebanhos é fundamental para a eficiência desses sistemas, uma vez que enfermidades infecciosas e parasitárias podem comprometer o desempenho produtivo e gerar perdas econômicas. Estimativas realizadas no Brasil indicaram perdas econômicas potenciais anuais de aproximadamente US$ 13,96 bilhões associadas às principais parasitoses de bovinos avaliadas, sendo cerca de US$ 3,24 bilhões atribuídos ao carrapato *R. microplus*, considerando perdas na produção de carne e leite, prejuízos diretos ao hospedeiro em decorrência da infestação e doenças transmitidas por eles (Grisi et al., 2014). No setor leiteiro, especificamente, a infestação por *R. microplus* foi associada a uma redução potencial estimada de 90,24 L de leite por vaca por lactação, correspondendo a aproximadamente US$ 922,36 milhões em perdas quando extrapolada para o rebanho leiteiro considerado no estudo (Grisi et al., 2014). Nesse contexto, a Tristeza Parasitária Bovina (TPB), que é transmitida principalmente por *R. micropus,* constitui um importante problema sanitário para a bovinocultura.

A TPB é um complexo de enfermidades hemoparasitárias que acomete bovinos e é causado por três principais agentes etiológicos: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* (Farias, 1995, 2001). As espécies do gênero *Babesia* spp., protozoários intraeritrocitários pertencentes ao filo Apicomplexa, são responsáveis pela babesiose bovina, enquanto *A. marginale*, uma bactéria Gram-negativa da ordem Rickettsiales, é o agente etiológico da anaplasmose bovina. Essas enfermidades podem ocorrer de forma isolada ou concomitante nos animais infectados e, embora sejam causadas por agentes taxonomicamente distintos, apresentam similaridades quanto às manifestações clínicas e à epidemiologia, o que justifica seu agrupamento sob a denominação de TPB (Silva et al., 2021).

A transmissão das espécies de *Babesia* depende obrigatoriamente da participação de carrapatos como vetores biológicos. Em bovinos, *R. microplus* é o principal vetor de *B. bovis* e *B. bigemina*, sendo o parasito adquirido pelo carrapato durante o repasto sanguíneo e posteriormente transmitido ao hospedeiro vertebrado sob a forma de esporozoítos presentes nas glândulas salivares. Em *B. bovis,* a transmissão ocorre principalmente por larvas infectadas de *R. microplus*, enquanto *B.*

bigemina é transmitida principalmente pelos estágios de ninfa e adulto. Essa diferença está relacionada ao tempo necessário para o desenvolvimento dos esporozoítos no vetor: em *B. bovis*, esse processo ocorre poucos dias após o início do repasto larval, enquanto *B. bigemina* necessita de período mais prolongado para completar seu desenvolvimento infectante (Bock et al., 2004).

Diferentemente das babesioses, *A. marginale* pode ser transmitido tanto biologicamente por carrapatos quanto mecanicamente por dípteros hematófagos, como moscas e tabanídeos, e por fômites contaminados, incluindo agulhas, instrumentos cirúrgicos e materiais utilizados no manejo dos animais (Kocan et al., 2010). A distribuição da TPB está, portanto, diretamente relacionada à ocorrência dos vetores e às condições ambientais que favorecem sua manutenção. Para *R. microplus*, temperaturas elevadas e alta umidade relativa favorecem o desenvolvimento e a persistência do vetor, especialmente em regiões tropicais e subtropicais (Farias, 2001; Sales et al., 2024).

A dinâmica de transmissão dos agentes da TPB também está diretamente relacionada aos conceitos de estabilidade e instabilidade enzoótica. Em regiões de estabilidade enzoótica, nas quais a presença do vetor permite exposição relativamente contínua dos bovinos aos hemoparasitas ao longo do ano, a maioria dos animais entra em contato com os agentes ainda nos primeiros meses de vida, período em que apresenta maior resistência ao desenvolvimento das manifestações clínicas da doença. A exposição precoce favorece o estabelecimento de imunidade parcial protetora e reduz a ocorrência de doença clínica em animais adultos. Entretanto, animais susceptíveis, como bovinos provenientes de áreas livres do carrapato, nascidos de mães soronegativas, animais taurinos e rebanhos submetidos a falhas nos programas de controle sanitário, podem permanecer vulneráveis à doença. Em contrapartida, regiões de instabilidade enzoótica apresentam interrupções ou reduções temporárias na transmissão em alguns períodos do ano, frequentemente relacionadas a seca ou baixas temperaturas, que limitam o desenvolvimento de *R. microplus*. Nessas condições, uma parcela dos animais permanece susceptível até a idade adulta, aumentando o risco de surtos clínicos quando a exposição aos agentes é restabelecida. Situação semelhante pode ocorrer em rebanhos submetidos ao controle intensivo ou à erradicação do carrapato, nos quais a redução da exposição precoce aos hemoparasitas pode comprometer o

desenvolvimento da imunidade protetora (Mahoney; Ross, 1972; Bock et al., 2004; Guimarães et al., 2011; Souza et al., 2018; Suarez; Noh, 2011).

Os agentes da TPB apresentam tropismo por células sanguíneas e podem desencadear alterações hematológicas e inflamatórias de intensidade variável. Na babesiose bovina, a destruição de eritrócitos pode resultar em anemia, febre, icterícia, hemoglobinúria, apatia, anorexia, fraqueza, perda de peso e redução da produtividade, enquanto a anaplasmose é caracterizada principalmente por anemia hemolítica extravascular e icterícia. Nos casos graves de babesiose, especialmente em animais susceptíveis infectados por B. bovis, a doença pode evoluir rapidamente para alterações sistêmicas severas e morte (Bock et al., 2004; Kocan et al., 2010).

Entre os agentes etiológicos da TPB, *B. bovis* apresenta particular relevância por sua elevada patogenicidade e associação com as formas mais severas da babesiose bovina. Além da destruição eritrocitária, a infecção por *B. bovis* está associada à modificação da superfície das hemácias e à citoaderência dos eritrócitos infectados ao endotélio vascular, favorecendo seu sequestro na microcirculação. Esse fenômeno contribui para a obstrução do fluxo sanguíneo e está diretamente relacionado à ocorrência das formas neurológicas da babesiose, incluindo a babesiose cerebral (Bock et al., 2004; O'Connor et al., 1999; Sondgeroth et al., 2013).

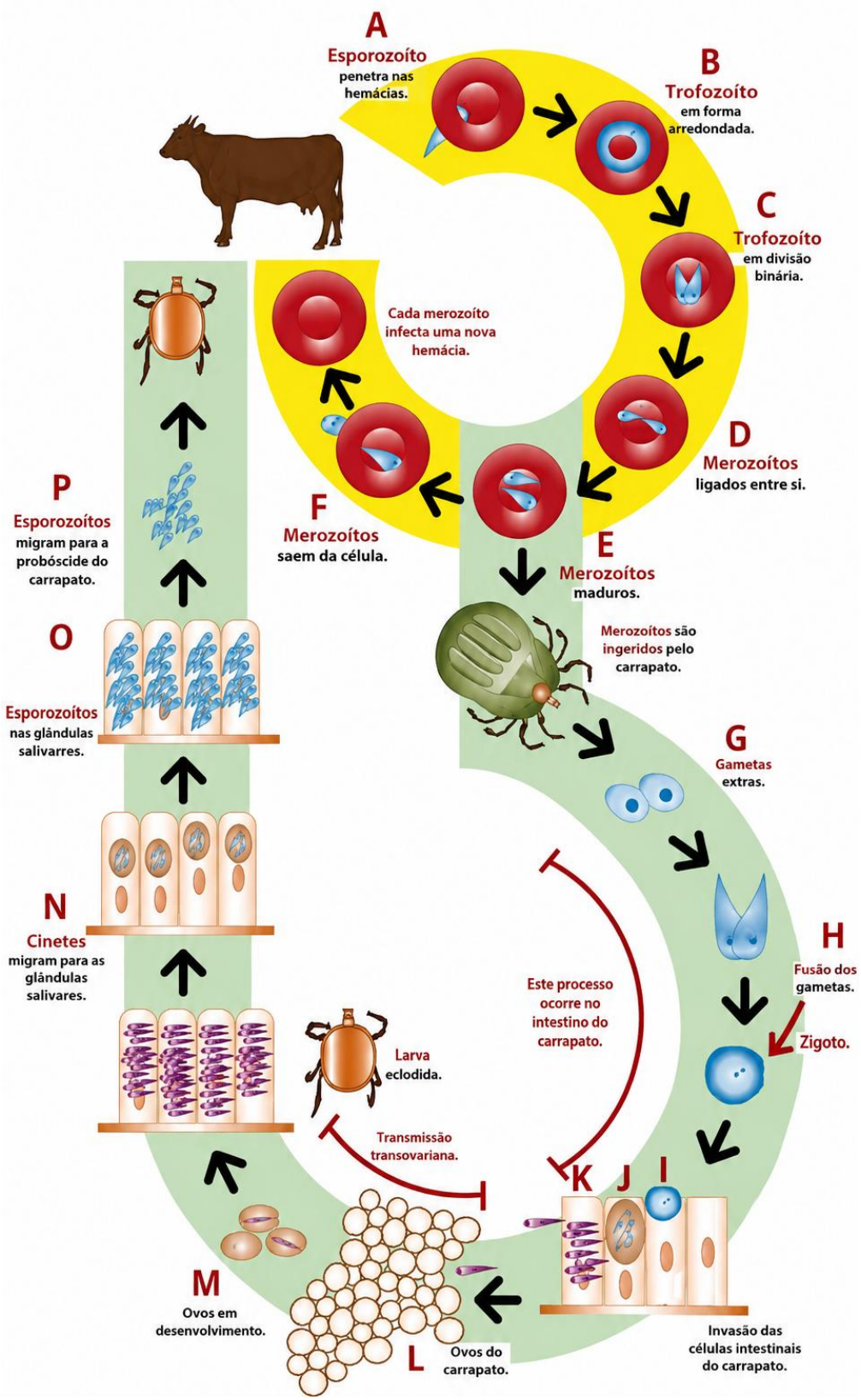
2.2 BABESIOSE BOVINA

Durante o ciclo biológico de *B. bovis*, o parasito alterna entre o hospedeiro vertebrado e o vetor, *R. microplus* (Figura 1). Durante o repasto sanguíneo sobre bovinos infectados, formas parasitárias presentes nos eritrócitos são ingeridas pelo carrapato e sofrem diferenciação no trato digestório. No intestino do vetor, ocorre a diferenciação das formas ingeridas em gametas, seguida de sua fusão e formação do zigoto, caracterizando a fase sexuada do ciclo. O zigoto posteriormente se diferencia em cineto, que atravessa o epitélio intestinal e se dissemina pela hemolinfa, alcançando diferentes tecidos do vetor, incluindo os ovários e as glândulas salivares. Essa disseminação possibilita a transmissão transovariana e a perpetuação do parasito entre gerações do carrapato. Nas glândulas salivares, ocorre a esporogonia e a formação de esporozoítos infectantes, que serão inoculados em novos hospedeiros vertebrados durante o repasto sanguíneo do carrapato (Mehlhorn; Schein, 1984; Bock et al., 2004).

Após a inoculação no hospedeiro bovino, os esporozoítos invadem eritrócitos e diferenciam-se em trofozoítos, originando posteriormente merozoítos capazes de se multiplicar intracelularmente. A lise das hemácias infectadas promove a liberação dessas formas parasitárias e a invasão de novos eritrócitos, contribuindo para disseminação da infecção e progressão da parasitemia no organismo bovino (Bock et al., 2004; Suarez; Noh, 2011).

Assim, o presente estudo teve como objetivo geral identificar e avaliar epítopos candidatos para futuras estratégias vacinais contra a babesiose bovina causada por *B. bovis* por meio de abordagens de vacinologia reversa, genética molecular e avaliação imunológica.

Figura 1 – Ciclo de vida de *Babesia bovis.*



Fonte: Adaptado de Mosqueda et al. (2012) traduzido pela autora com auxílio da ferramenta ChatGPT(OpenAI).

Nos bovinos, durante a infecção aguda por *B. bovis*, especialmente em animais infectados por linhagens mais virulentas, o quadro clínico pode evoluir para manifestações neurológicas graves, como hiperexcitabilidade, incoordenação motora, opistótono, tremores musculares, paralisia dos membros pélvicos, movimentos de pedalagem, andar em círculos, cegueira e agressividade, sendo frequentemente fatal (Oliveira et al., 2018). Esse agravamento ocorre devido à obstrução do fluxo sanguíneo e ao comprometimento da perfusão tecidual, levando à hipóxia, processo diretamente relacionado à citoaderência de eritrócitos infectados às células endoteliais e ao consequente sequestro capilar das hemácias parasitadas, principalmente no sistema nervoso central (Sondgeroth et al., 2013).

A invasão eritrocitária por *B. bovis* depende da interação altamente específica entre proteínas expressas na superfície do parasito e receptores presentes na membrana das hemácias bovinas. Diversas proteínas expressas pelos merozoítos já foram caracterizadas e associadas aos processos de reconhecimento, adesão e internalização celular, incluindo proteínas de superfície de merozoítos (*Merozoite Surface Antigens*, ou MSAs), proteínas associadas às roptrias (*Rhoptry-Associated Proteins,* ou RAPs) e proteínas do complexo apical, como AMA-1 (*Apical Membrane Antigen 1*) (Mosqueda et al., 2002; Wilkowsky et al., 2003; Hidalgo-Ruiz et al., 2022). Essas proteínas desempenham papel fundamental no estabelecimento da infecção e na sobrevivência do parasito no hospedeiro, além de constituírem importantes alvos da resposta imune humoral e celular. Dessa forma, moléculas localizadas na superfície parasitária e associadas ao processo de invasão eritrocitária têm recebido destaque na busca por candidatos vacinais e marcadores diagnósticos, especialmente por estarem diretamente envolvidas na interação parasito–hospedeiro.

A resposta imunológica contra a infecção por *B. bovis* envolve mecanismos inatos e adaptativos que atuam de forma integrada no controle da parasitemia e na limitação da progressão clínica da doença. Nos estágios iniciais da infecção, a resistência observada em bezerros jovens está associada à transferência passiva de anticorpos maternos, especialmente por meio do colostro e à ativação precoce da resposta imune inata. Essa resposta envolve a ativação de células *natural killer* (NK) e macrófagos, especialmente no baço, com participação de citocinas do perfil Th1, como o interferon-gama (IFN-γ), e de mecanismos efetores associados à produção de óxido nítrico (NO). Em bezerros, a indução esplênica de IL-12 e IFN-γ ocorre

precocemente durante a infecção primária por *B. bovis*, seguida pela ativação de iNOS e produção de NO, contribuindo para o controle do parasita e da parasitemia. Em bovinos adultos, essas respostas também podem ocorrer, porém sua indução tende a ser mais tardia e ocorre em um contexto regulatório distinto, com participação de IL-10. A importância do baço nesse processo é evidenciada pela maior suscetibilidade à infecção observada após a esplenectomia. Além disso, o baço desempenha papel crucial nesse processo, atuando tanto na remoção de eritrócitos parasitados quanto na ativação da resposta imune celular. Animais esplenectomizados apresentam aumento significativo da parasitemia, evidenciando a importância desse órgão no controle da infecção (Brown et al., 2006).

À medida que a infecção progride, a resposta adaptativa torna-se mais evidente, com destaque para a participação dos linfócitos T $CD4^+$, que promovem a ativação de macrófagos e auxiliam na produção de anticorpos neutralizantes, especialmente da subclasse IgG2, capazes de se ligar a merozoítos livres e eritrócitos infectados. A ativação de macrófagos e a produção de óxido nítrico contribuem para a eliminação das formas parasitárias, enquanto as citocinas produzidas durante a infecção participam do controle da parasitemia. Entretanto, a produção exacerbada de mediadores inflamatórios também pode estar relacionada ao agravamento das lesões observadas nos casos clínicos mais severos. A ativação de linfócitos T $CD8^+$ também pode contribuir para o controle da infecção, embora sua relevância funcional ainda necessite de maior elucidação nesse modelo (Brown et al., 2006).

Animais previamente infectados podem desenvolver imunidade concomitante (*concomitant immunity*), caracterizada pela persistência de pequenas quantidades do parasito, associada à proteção contra reinfecções e formas clínicas graves da doença (Brown et al., 2006). Essa característica evidencia a complexidade da interação parasito–hospedeiro em *B. bovis*, na qual o sistema imune é capaz de controlar parcialmente a infecção, mas frequentemente não promove a eliminação completa do parasito. Nesse contexto, a identificação de antígenos capazes de induzir respostas imunológicas mais eficientes tem recebido crescente atenção, especialmente proteínas e epítopos associados à invasão eritrocitária e ao reconhecimento imunológico, considerados promissores para aplicação em estratégias vacinais baseadas em imunoinformática (Hidalgo-Ruiz et al., 2022).

2.2.1 **Estratégias atuais de controle da babesiose bovina e suas limitações**

O controle da babesiose bovina e dos demais agentes envolvidos na TPB é um importante desafio sanitário para a pecuária, especialmente em regiões tropicais e subtropicais, onde a ampla distribuição do carrapato *R. microplus* favorece a manutenção da transmissão dos hemoparasitas no ambiente (Bock et al., 2004; Souza et al., 2018). Embora diferentes estratégias profiláticas e terapêuticas estejam disponíveis, muitas apresentam limitações relacionadas à eficácia, aplicabilidade em campo, custos operacionais e sustentabilidade sanitária a longo prazo.

Em regiões endêmicas, a prevenção da babesiose bovina está relacionada ao estabelecimento precoce de imunidade protetora nos animais jovens, favorecido pela exposição precoce ao *Rhipicephalus microplus* infectado e consequente infecção natural por *B. bovis*. Isso ocorre porque os bezerros, nos primeiros meses de vida, apresentam maior resistência ao desenvolvimento das formas clínicas graves da doença quando comparados aos animais adultos (Mahoney; Ross, 1972; Goff et al., 2001). Essa maior resistência está associada, sobretudo, à indução mais rápida e eficiente da resposta imune inata durante a infecção primária, favorecendo o controle inicial da parasitemia. Essa característica também fundamentou historicamente o desenvolvimento de estratégias de premunição e de vacinas vivas atenuadas, administradas preferencialmente nessa faixa etária, com o objetivo de induzir imunidade protetora antes do período de maior susceptibilidade dos animais adultos. Entretanto, apesar da capacidade de induzir proteção, o uso de parasitos vivos apresenta limitações relacionadas à segurança, à padronização e à produção dessas vacinas, o que reforça o interesse no desenvolvimento de alternativas vacinais baseadas em antígenos definidos.

Atualmente, o controle da TPB depende fundamentalmente do manejo adequado de *R. microplus*. Nesse contexto, o uso de acaricidas químicos permanece como uma das principais ferramentas empregadas no controle do carrapato em sistemas de produção bovina. Entretanto, o uso intensivo desses compostos favoreceu a seleção e disseminação de populações de carrapatos resistentes às principais bases químicas disponíveis comercialmente, reduzindo progressivamente a eficácia dos tratamentos convencionais (Abbas et al., 2014; Rodríguez-Vivas et al., 2018). Além de favorecer a seleção de populações resistentes, o uso contínuo de acaricidas também pode resultar em contaminação ambiental, presença de resíduos

em produtos de origem animal e potenciais riscos toxicológicos para animais e manipuladores.

Do ponto de vista epidemiológico, o controle excessivo do vetor também pode comprometer a manutenção da estabilidade enzoótica nos rebanhos, reduzindo a exposição precoce dos animais aos agentes hemoparasitários e aumentando a susceptibilidade à ocorrência de surtos clínicos graves em bovinos adultos. Situação semelhante pode ocorrer em decorrência de condições sazonais. No Brasil, existem regiões de instabilidade enzoótica nas quais o desenvolvimento do carrapato é temporariamente interrompido durante períodos de seca ou baixas temperaturas, reduzindo a transmissão dos agentes etiológicos da doença (Souza et al., 2018). Em ambas as condições, muitos animais deixam de entrar em contato com os hemoparasitas durante a fase de maior resistência natural (quando jovens), permanecendo altamente susceptíveis ao desenvolvimento da doença em exposições futuras (Guimarães et al., 2011).

Na situação oposta, altas infestações por carrapatos também representam importante problema sanitário e produtivo. Elevadas cargas parasitárias favorecem maior inoculação dos agentes etiológicos da TPB, podendo resultar em quadros clínicos severos, inclusive em animais jovens. Além da transmissão dos agentes etiológicos da TPB, o próprio parasitismo causado por *R. microplus* também resulta em prejuízos diretos ao hospedeiro, relacionados à espoliação sanguínea, estresse fisiológico, lesões cutâneas e redução dos índices produtivos (Jonsson et al., 2006).

Diante das limitações relacionadas ao controle do vetor e da indisponibilidade de vacinas comerciais amplamente utilizadas contra a TPB no Brasil, métodos alternativos como a quimioprofilaxia passaram a ser empregados em algumas regiões endêmicas. Essa abordagem baseia-se principalmente na administração preventiva de babesicidas, como o dipropionato de imidocarb, antes da exposição ao vetor ou do aparecimento dos sinais clínicos (de Vos et al., 1986; Kuttler;Johnson, 1986; Vial; Gorenflot, 2006). Nesse método, espera-se que, à medida que a concentração da droga diminua na circulação, os animais passem gradativamente a entrar em contato com carrapatos infectados e desenvolvam imunidade protetora sem evolução para doença clínica.

Entretanto, para que essa estratégia seja efetiva, é fundamental que os animais sejam expostos a baixas cargas parasitárias do vetor, permitindo a inoculação dos agentes da TPB. Apesar de apresentar potencial profilático em determinadas

situações epidemiológicas, a quimioprofilaxia ainda é considerada um método de difícil controle em condições de campo, uma vez que sua eficácia depende diretamente do equilíbrio entre exposição parasitária e proteção farmacológica. Além disso, o uso frequente de quimioterápicos pode favorecer problemas relacionados à toxicidade, à presença de resíduos em produtos de origem animal e à seleção de parasitos resistentes (Alves et al., 2023; Reck et al., 2024).

Outra estratégia historicamente empregada na prevenção da babesiose bovina é a premunição, também chamada de pré-imunização, baseada na inoculação de sangue contendo formas viáveis dos agentes da TPB em animais susceptíveis, com o objetivo de induzir uma infecção deliberadamente estabelecida capaz de estimular o desenvolvimento de imunidade protetora (Todorovic et al., 1975). O sangue de um animal doador infectado é colocado sob refrigeração antes da inoculação, buscando reduzir parcialmente a virulência do inóculo e possibilitar eventual intervenção terapêutica durante o curso da infecção.

Essa estratégia baseia-se no princípio da imunidade concomitante, porém, apesar de sua relevância histórica, a premunição apresenta importantes limitações sanitárias e operacionais. A utilização de sangue proveniente de animais infectados envolve risco potencial de transmissão de outros agentes infecciosos, além da possibilidade de evolução para quadros clínicos severos nos animais receptores, em decorrência da variabilidade da virulência dos isolados utilizados. Além disso, a dificuldade de padronização do método e a necessidade de monitoramento veterinário constante limitam sua aplicação em larga escala (De Waal, 2006).

O princípio da indução da imunidade protetora por meio da exposição controlada ao parasito também impulsionou o desenvolvimento das primeiras vacinas contra *B. bovis*. Estas vacinas são baseadas em linhagens vivas atenuadas, obtidas a partir de passagens sucessivas em animais esplenectomizados e são compostas por sangue parasitado. Essas vacinas demonstraram capacidade de induzir proteção clínica em bovinos, reduzindo a ocorrência de manifestações severas da doença em animais imunizados (Callow; Mellors, 1966; Sacco et al., 2001).

Entretanto, apesar de sua eficácia parcial, as vacinas vivas apresentam importantes limitações relacionadas à biossegurança, produção e estabilidade biológica. Entre as principais desvantagens, destacam-se o risco de transmissão de outros patógenos presentes no sangue inoculado, a possibilidade de reversão da virulência, a necessidade de manutenção de cadeia fria, os elevados custos de

produção e armazenamento, além das preocupações éticas relacionadas à utilização de animais esplenectomizados para manutenção das linhagens vacinais (Bock et al., 2004; Santos et al., 2023). O cultivo *in vitro* de *B. bovis* constitui uma alternativa à produção de parasitos vacinais por passagens em animais, e diferentes sistemas de cultivo já foram desenvolvidos e empregados para obtenção e atenuação de linhagens parasitárias, inclusive com estratégias de redução de componentes de origem animal e escalonamento em biorreatores (Álvarez Martínez et al., 2021; Álvarez; Rojas; Figueroa, 2020). No Brasil, embora existam relatos históricos de cultivo *in vitro* de cepas brasileiras e de utilização de produtos derivados de cultura em estudos experimentais, não foram identificados, na literatura consultada, protocolos atualmente padronizados e validados para a produção rotineira de vacinas vivas de *B. bovis* por essa abordagem (Patarroyo et al., 1995). Soma-se a isso a variabilidade genética observada entre diferentes isolados de *B. bovis*, fator que pode comprometer a eficácia protetora das formulações vacinais em distintas regiões endêmicas (Santos et al., 2023).

2.3 VACINOLOGIA REVERSA

Os avanços nas áreas de imunologia, genética molecular, biotecnologia, genômica e bioinformática ocorridos nas últimas décadas revolucionaram o desenvolvimento de vacinas, possibilitando a identificação racional de antígenos candidatos a partir das informações genômicas dos patógenos. Nesse contexto, surgiu a vacinologia reversa, estratégia inicialmente proposta por Rappuoli (2001), que inverteu a abordagem tradicional de desenvolvimento de vacinas ao propor a análise do genoma completo do patógeno para identificar potenciais antígenos, que posteriormente foram sintetizados e avaliados experimentalmente. A abordagem foi inicialmente aplicada a *Neisseria meningitidis* do sorogrupo B e permitiu a identificação sistemática de candidatos vacinais a partir da informação genômica, sem a necessidade de recorrer exclusivamente à caracterização experimental prévia do agente infeccioso.

Com o avanço da bioinformática e a crescente disponibilidade de dados genômicos, proteômicos e estruturais, a vacinologia reversa foi progressivamente ampliada, incorporando ferramentas computacionais para a triagem e priorização de proteínas candidatas. As abordagens atuais podem considerar características como localização subcelular, presença de peptídeos sinal, domínios transmembrana,

conservação entre linhagens e potencial antigênico, permitindo a redução sistemática do número de candidatos a serem submetidos à validação experimental (Goodswen; Kennedy; Ellis, 2023).

Assim, o desenvolvimento de vacinas de subunidades baseadas em proteínas ou epítopos definidos constitui uma abordagem promissora, uma vez que utiliza componentes antigênicos específicos do patógeno, sem a presença do agente infeccioso íntegro. Dessa forma, no caso de formulações que não contêm microrganismos vivos, não há possibilidade de reversão da virulência do agente vacinal, além de ser possível direcionar a resposta imune para antígenos ou epítopos de interesse (Parvizpour et al., 2020).

Nos últimos anos, a integração entre imunologia, bioinformática, genômica, proteômica e ferramentas de predição imunológica vem permitindo a identificação mais precisa de epítopos B e T potencialmente imunogênicos, reduzindo custos e tempo experimentais associados à triagem convencional de antígenos candidatos (Jiang et al., 2023). Estudos recentes demonstram a eficiência da vacinologia reversa aplicada ao desenvolvimento de vacinas contra parasitos bovinos, destacando seu potencial na identificação racional de proteínas conservadas e imunologicamente relevantes (Nogueira et al., 2024). Além disso, essas abordagens permitem selecionar proteínas e regiões imunogênicas associadas a processos fundamentais para sobrevivência e virulência do parasito, como adesão celular, invasão eritrocitária e evasão imunológica. Entretanto, a seleção de candidatos baseada em genomas de referência torna necessária a avaliação de sua conservação em isolados representativos da população-alvo, uma vez que variações genéticas entre linhagens podem comprometer a aplicabilidade de antígenos selecionados exclusivamente por meio de abordagens computacionais.

No caso de *B. bovis*, a vacinologia reversa apresenta especial relevância devido à elevada complexidade antigênica do parasito e à variabilidade genética observada entre diferentes isolados geográficos (Leroith et al., 2005; Ramos et al., 2012). Diversas proteínas associadas à superfície dos merozoítos e ao complexo apical vêm sendo investigadas como potenciais alvos vacinais, incluindo proteínas pertencentes às famílias MSA-1, MSA-2a, MSA-2c, RAP-1 e AMA-1, diretamente relacionadas aos processos de invasão eritrocitária e à interação parasito–hospedeiro (Lau et al., 2010; Sivakumar et al., 2013; Matos et al., 2020; El-Alfy et al., 2023). Alterações nas sequências gênicas que codificam essas proteínas podem interferir

diretamente na estrutura e no reconhecimento imunológico dos epítopos, comprometendo a eficácia de candidatos vacinais desenvolvidos a partir de uma única sequência de referência. Dessa forma, a confirmação da conservação dessas regiões em isolados representativos da população-alvo constitui uma etapa importante para aumentar a confiabilidade da seleção de candidatos vacinais.

Nesse contexto, estudos voltados à identificação de proteínas conservadas e imunologicamente relevantes vêm recebendo crescente atenção no desenvolvimento de estratégias vacinais baseadas em vacinologia reversa e imunoinformática (Lau et al., 2010; Matos et al., 2020; El-Alfy et al., 2023). Considerando que as análises *in silico* são frequentemente realizadas com linhagens de referência disponíveis em bancos públicos de sequências, a validação experimental da conservação das regiões selecionadas em isolados provenientes da população onde se pretende aplicar a vacina representa uma etapa importante para fortalecer o potencial translacional desses candidatos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar e avaliar epítopos candidatos para futuras estratégias vacinais contra a babesiose bovina causada por *Babesia bovis* por meio de abordagens de vacinologia reversa, bioinformática e avaliação imunológica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar epítopos candidatos de *Babesia bovis* com potencial imunogênico por meio de abordagens de vacinologia reversa e imunoinformática.
- Avaliar a conservação das regiões gênicas em isolados brasileiros que codificam os epítopos selecionados por vacinologia reversa, a partir do genoma de referência da linhagem T2Bo de *B. bovis*.
- Avaliar a imunorreatividade dos peptídeos correspondentes aos epítopos selecionados, frente a anticorpos presentes em soros de bovinos naturalmente infectados por *B. bovis*.
- Avaliar o efeito dos peptídeos correspondentes aos epítopos selecionados sobre a atividade metabólica celular associada à viabilidade e proliferação de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de bovinos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 IDENTIFICAÇÃO *IN SILICO*

O proteoma predito a partir do genoma completo da linhagem *B. bovis* T2Bo (ASM16539v) foi obtido a partir do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information (*NCBI) no formato FASTA (NCBI Resource Coordinators, 2015). A triagem inicial das proteínas foi conduzida por meio da predição de localização subcelular utilizando a plataforma CELLO v2.5 (Yu et al., 2006), sendo priorizadas proteínas associadas à membrana plasmática, devido ao seu potencial envolvimento na interação parasito–hospedeiro.

As proteínas selecionadas foram posteriormente submetidas à análise de antigenicidade utilizando a ferramenta VaxiJen v2.0, adotando-se *threshold* de 0,7 para priorização de candidatos com maior potencial imunogênico (Doytchinova; Flower, 2007). Em seguida, a presença de peptídeo sinal foi avaliada utilizando o SignalP-5.0 (Almagro-Armenteros et al., 2019), enquanto proteínas ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GPI) foram preditas utilizando a plataforma PredGPI (Pierleoni et al., 2008).

As regiões intrinsecamente desordenadas das proteínas, caracterizadas por segmentos sem uma conformação tridimensional rigidamente definida e com maior flexibilidade estrutural, foram identificadas utilizando o IUPred3, adotando-se *cutoff* de 0,3 para segmentos contendo mais de nove aminoácidos (Erdős et al., 2021). Adicionalmente, a topologia transmembrana foi avaliada utilizando a ferramenta deepTMHMM, sendo priorizadas regiões classificadas como extracelulares (*outside*) devido ao maior potencial de exposição ao sistema imune do hospedeiro (Hallgren et al., 2022).

A predição de epítopos lineares de células B foi conduzida utilizando as plataformas BepiPred 2.0 e IEDB, adotando-se threshold de 0,5 (Jespersen et al., 2017; Larsen et al., 2006). Para a identificação de potenciais epítopos de células T com capacidade de ligação a moléculas BoLA de classe I, foi utilizada a ferramenta NetMHC 4.0, considerando peptídeos de nove aminoácidos e seis alelos BoLA de classe I, com cutoff de 0,5 (Andreatta; Nielsen, 2016; Nielsen et al., 2003).

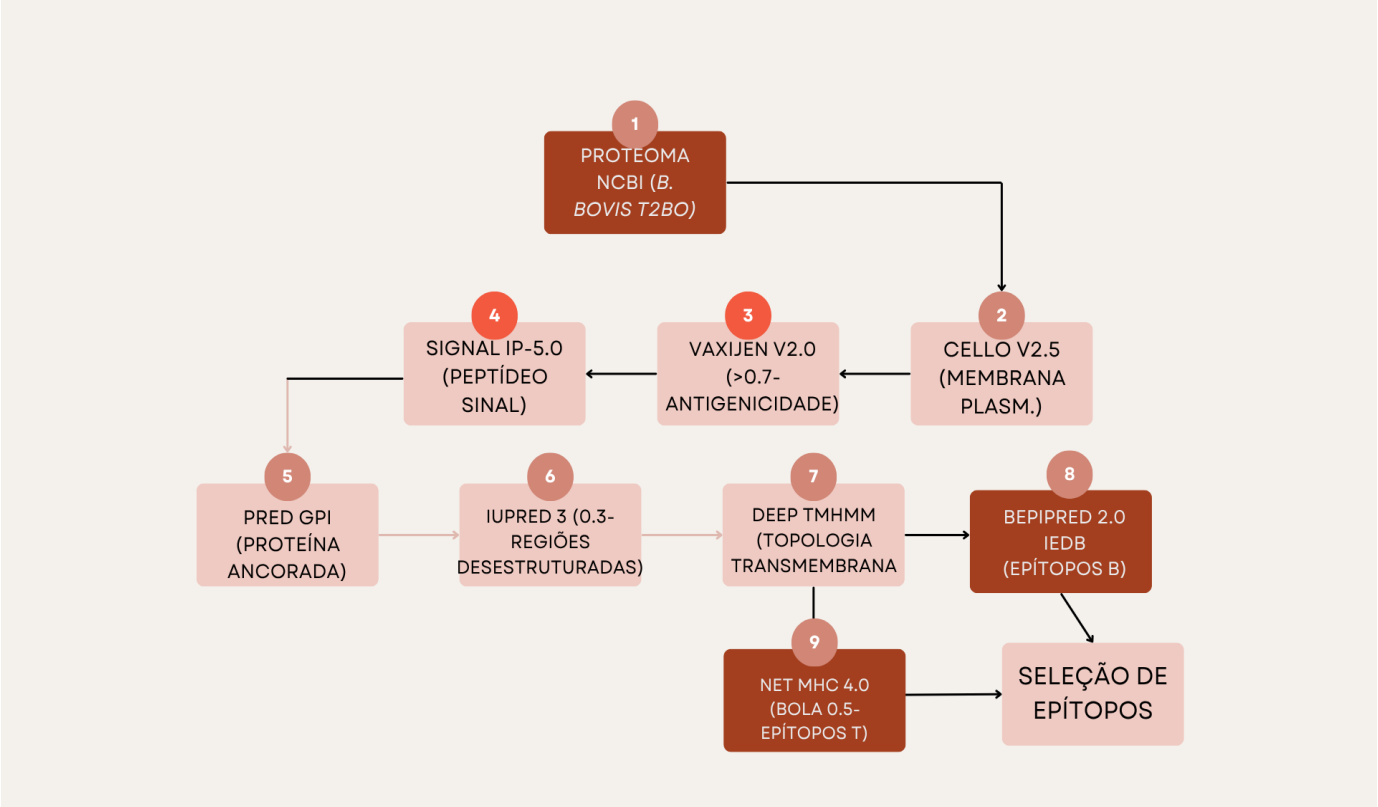
A seleção final dos epítopos baseou-se na sobreposição entre epítopos B e T localizados em regiões extracelulares e intrinsecamente desordenadas, sendo priorizados fragmentos contendo no mínimo 15 aminoácidos. Os epítopos selecionados foram posteriormente reavaliados quanto à antigenicidade utilizando

novamente o VaxiJen v2.0, além de serem submetidos à predição de alergenicidade pelo AllerTOP v2.0 (Dimitrov et al., 2014) e de toxicidade utilizando a ferramenta ToxinPred, adotando-se *cutoff* de 0,6 (Gupta et al., 2014).

As propriedades físico-químicas das proteínas contendo os epítopos selecionados foram avaliadas utilizando a plataforma ExPASy ProtParam (Wilkins et al., 1999), incluindo peso molecular, ponto isoelétrico, índice de instabilidade, índice alifático e GRAVY (*Grand Average of Hydropathicity*). Foram priorizadas proteínas com peso molecular inferior a 110 kDa e índice de instabilidade inferior a 40, visando selecionar moléculas com maior potencial de estabilidade estrutural (Guruprasad et al., 1990). A carga total das proteínas foi estimada utilizando a ferramenta Protein Calculator v3.4.

Por fim, a análise de homologia foi conduzida utilizando BLASTp (Lu; Noble; Keich, 2024), comparando as sequências selecionadas com o proteoma de *Bos taurus*, com o objetivo de reduzir potenciais reatividades cruzadas, e com sequências de isolados brasileiros de *B. bovis* depositadas no NCBI, visando avaliar a conservação das regiões contendo os epítopos selecionados (Hu; Kurgan, 2018). O fluxo geral da estratégia de vacinologia reversa empregada para a seleção de proteínas neste estudo encontra-se representado na Figura 2, passos 1 a 9. Apenas os candidatos que atenderam a todos os critérios definidos seguiram para a etapa final de seleção de epítopos.

Figura 2 – Fluxograma do *pipeline* de bioinformática utilizado para a seleção de epítopos imunogênicos da linhagem T2Bo de *Babesia bovis*. O proteoma predito a partir do genoma completo (1) foi obtido no banco de dados NCBI e submetido às análises de localização subcelular (2), antigenicidade (3), presença de peptídeo sinal (4), ancoragem por GPI (5), regiões intrinsecamente desordenadas (6), topologia transmembrana (7) e predição de epítopos de células B (8) e T (9).



Fonte: elaborada pela autora (2026).

4.2 DIAGNÓSTICO DAS AMOSTRAS POR PCR EM TEMPO REAL

Amostras de sangue total de bovinos provenientes das regiões endêmicas: Coronel Pacheco (MG), Lavras (MG), Bagé (RS) e Campo Grande (MS), foram utilizadas para o diagnóstico molecular dos agentes associados à TPB. As coletas foram realizadas em tubos Vacutainer® contendo EDTA, e as amostras foram armazenadas a 4°C até o processamento.

A extração de DNA genômico foi realizada a partir de 100 µL de sangue total, utilizando o *DNeasy Blood & Tissue Kit* (QIAGEN, Hilden, Alemanha), conforme as instruções do fabricante. Adicionalmente, parte das amostras foi processada por extração utilizando o método de fenol-clorofórmio modificado de Sambrook e Russell (2001), realizada a partir de 500 µL de sangue total como material de partida. Após a

lise celular e digestão proteica, foram adicionados 300 µL de fenol e 300 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), seguidas homogeneização e centrifugação a 275 x g por 5 min. A fase aquosa foi então transferida para um novo tubo, adicionando-se 80 µL de acetato de sódio (NaOAc 3 M) e 600 µL de isopropanol previamente resfriado a −20 °C. Após incubação a −20 °C por, no mínimo, 2 h, as amostras foram centrifugadas a 275 x g por 10 min. O sobrenadante foi descartado, e o pellet foi lavado com 400 µL de etanol 70% gelado, seguido de centrifugação a 275 x g por 1 min. Após secagem à temperatura ambiente por 30 min, o DNA foi ressuspendido em 500 µL de tampão de eluição (TE, composto por 10 mM Tris HCL pH 8,0 e 1 mM EDTA pH 8,0) e armazenado a −20 °C ou −80 °C até o uso.

Ambos os métodos foram empregados para obtenção de DNA genômico adequado às análises moleculares subsequentes. A concentração de DNA (ng/µL) e sua pureza foram avaliadas por espectrofotometria utilizando o NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA).

O diagnóstico molecular foi realizado por PCR em Tempo Real, visando a detecção dos três principais agentes da TPB. A detecção de *A. marginale* foi realizada com base no gene *msp5*, utilizando o sistema AMTR descrito por Bacanelli *et al.* (2014). Para *B. bovis* e *B. bigemina*, foram utilizados os sistemas descritos por Buling *et al.* (2007), baseados nos conjuntos de *primers cbosg* e *cbisg*, respectivamente (Tabela 1). As reações foram realizadas em volume final de 15 µL, contendo 50 a 100 ng de DNA, 7,5 µL de Power SYBR® Green PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Warrington, Reino Unido), 0,5 µM de cada *primer* e água livre de nucleases para completar o volume final. As reações foram conduzidas no equipamento Applied Biosystems™ 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), sob as seguintes condições de ciclagem: etapa inicial de 2 min a 50°C, desnaturação inicial de 2 min a 95°C, seguidas de 40 ciclos de 95°C por 30 seg e 60°C por 1 min.

Tabela 1 – *Primers* utilizados para o diagnóstico molecular de agentes da Tristeza Parasitária Bovina por PCR em Tempo Real.

Agente	Gene-alvo	Primer	Sequência (5'–3')	Amplicon	Referência
A. marginale	*msp5*	AMTR F	AAGGCGAGGAGCTGTTTAAG	104 pb	Bacanelli et al. (2014)
A. marginale	*msp5*	AMTR R	CTACTGCCTCACAAGGACGA	104 pb	Bacanelli et al. (2014)
B. bovis	citocromo b mitocondrial	cbosg F	TGTTCCTGGAAGCGTTGATTC	88 pb	Buling et al. (2007)
B. bovis	citocromo b mitocondrial	cbosg R	AGCGTGAAAATAACGCATTGC	88 pb	Buling et al. (2007)
B. bigemina	citocromo b mitocondrial	cbisg F	TGTTCCAGGAGATGTTGATTC	88 pb	Buling et al. (2007)
B. bigemina	citocromo b mitocondrial	cbisg R	AGCATGGAAATAACGAAGTGC	88 pb	Buling et al. (2007)

Fonte: elaborada pela autora (2026).

Cada ensaio incluiu controle positivo (DNA previamente confirmado para cada agente) e controle negativo (amostra sem DNA). As amostras foram consideradas positivas quando apresentaram valores de $C_t \leq 35$, associado a curva de amplificação característica. Adicionalmente, foi realizada análise de curva de dissociação (*melting curve*) para verificação da especificidade dos produtos amplificados (He *et al.*, 2025).

Com base nos resultados obtidos, foram selecionadas amostras positivas para *B. bovis* para utilização nas etapas subsequentes de validação genômica e ensaios experimentais.

4.3 VALIDAÇÃO GENÔMICA DOS EPÍTOPOS

Com o objetivo de verificar se as regiões gênicas correspondentes aos epítopos selecionados por vacinologia reversa a partir da linhagem de *B. bovis T2Bo* estavam conservadas em isolados brasileiros, foi realizada uma etapa de validação molecular composta por análises *in silico* e experimentais. Para as análises de amplificação e sequenciamento, foram utilizadas duas amostras individuais positivas para *B. bovis*, provenientes do rebanho do Campo Experimental José Henrique Bruschi, em Coronel Pacheco, Minas Gerais, disponíveis no período de realização dos experimentos. Inicialmente, os identificadores de acesso das proteínas contendo os epítopos selecionados foram utilizados para rastrear os genes correspondentes no

genoma completo de *B. bovis* disponível no banco de dados do NCBI, utilizando-se a extensão *GenBank Flat File Format* (.gbff), que permite a análise anotada das regiões genômicas (NCBI Resource Coordinators, 2015).

Com base no identificador de acesso da proteína, obteve-se o identificador do gene correspondente por meio da interface do NCBI Gene. Em seguida, localizou-se a região genômica de interesse no arquivo completo do genoma, acessando a posição anotada no final do arquivo gbff. A sequência correspondente à região codificadora foi então extraída e sua fidelidade confirmada com base na ferramenta *ExPASy Translate Tool*, verificando-se se a tradução da sequência nucleotídica recuperada correspondia à sequência de aminoácidos esperada, conforme os epítopos previamente registrados (Gasteiger *et al*., 2003).

Após a identificação da sequência codificadora correspondente, foi realizada a marcação da posição das regiões previamente associadas aos epítopos. Em seguida, os *primers* foram desenhados com a plataforma *Primer3Plus* (Untergasser et al., 2012). A sequência genômica foi inserida na interface da ferramenta, e a posição dos epítopos foi destacada por meio do campo "*target*", indicando a necessidade de flanqueamento específico. Os parâmetros utilizados incluíram temperatura de anelamento (Tm), tamanho dos *primers* e do *amplicon*, além de controles para formação de dímeros e para a estrutura secundária. Considerando a capacidade do sequenciamento pelo método de Sanger em relação ao tamanho e à qualidade das leituras obtidas, os *primers* foram desenhados para gerar *amplicons* com comprimento entre 300 e 600 pb. Em proteínas cujos epítopos estavam distribuídos ao longo de regiões mais extensas da sequência gênica, foram necessários múltiplos pares de *primers* para garantir a cobertura da região codificadora de interesse. Nesses casos, os pares de *primers* foram denominados A e B (3A; 3B; 5A; 5B; 7A; 7B).

Os pares de *primers* gerados foram selecionados com base em critérios de especificidade, eficiência e ausência de complementaridade cruzada. As sequências foram registradas em planilhas próprias e submetidas à análise de especificidade por meio do BLASTn, sendo comparadas contra o genoma de referência de *B. bovis* para confirmar a especificidade intraespécie e contra o genoma de *Bos taurus*, com o objetivo de descartar oligonucleotídeos com homologia significativa ao hospedeiro, evitando a amplificação do DNA do hospedeiro (Altschul et al., 1990).

Após a validação *in silico*, os *primers* foram sintetizados e utilizados para padronização de PCR convencional, com o intuito de amplificar as regiões gênicas de

interesse a partir de amostras individuais de DNA genômico provenientes de bovinos previamente identificados como positivos para *B. bovis* nos ensaios de PCR em Tempo Real descritos anteriormente. Para os ensaios com amostras individuais, foram utilizados DNAs obtidos a partir de sangue total. Os ensaios foram realizados em volume final de 20 µL, contendo 10 µL de *GoTaq® Green Master Mix* 2X (Promega Corporation, Madison, WI, EUA), 1 µL de cada *primer* (*forward* e *reverse*; 10 µM), 7,5 µL de DNA molde (150 ng) e 0,5 µL de água livre de nucleases, para completar o volume final.

As amplificações foram conduzidas no equipamento Applied Biosystems™ Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), utilizando protocolo com estratégia de *touchdown* PCR, conforme descrito a seguir: etapa inicial de desnaturação a 95°C por 10 min, seguida por 10 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 s, com temperatura de anelamento decrescente de 65 °C a 55°C, em redução de 1°C a cada ciclo, por 60 s, e extensão a 72°C por 60 s. Em seguida, foram realizados 30 ciclos adicionais de desnaturação a 95°C por 30 s, anelamento a 55°C por 60 s e extensão a 72°C por 60 s. Ao final, foi realizada extensão final a 72°C por 7 min.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, utilizando marcador molecular de 100 pb (Promega Corporation, Madison, WI, EUA; código G2101) para verificação do tamanho e da especificidade das bandas. Em cada ensaio, foram incluídos um controle positivo (Pool+), constituído por amostras de DNA de animais positivos para *B. bovis*, selecionadas entre aquelas que apresentaram baixos valores de C_t nos ensaios de PCR em Tempo Real; um controle negativo (Pool−), composto por amostras previamente identificadas como negativas para *B. bovis*; e um controle branco, contendo os componentes do ensaio na ausência de DNA molde. Os *amplicons* que apresentaram amplificação específica e tamanho compatível com o esperado foram selecionados para as etapas subsequentes de purificação e sequenciamento por Sanger, realizadas pela ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Alvorada, RS, Brasil).

As sequências obtidas foram avaliadas no software *DNA Baser* quanto à qualidade dos cromatogramas, considerando-se a definição e a nitidez dos picos correspondentes às bases nucleotídicas. As regiões iniciais e finais de baixa qualidade foram removidas, e as sequências resultantes foram utilizadas para a montagem dos *contigs*. Posteriormente, as sequências consenso foram alinhadas à

sequência de referência do gene correspondente da linhagem T2Bo de *B. bovis* utilizando a ferramenta *Clustal Omega*. Posições com sobreposição de sinais ou incerteza na determinação da base foram mantidas como bases ambíguas e representadas de acordo com os códigos IUPAC.

4.4 PEPTÍDEOS SINTÉTICOS

A síntese dos peptídeos foi realizada pela empresa GenOne Biotechnologies (Rio de Janeiro, RJ, Brasil), utilizando síntese química em fase sólida (*solid-phase peptide synthesis*, SPPS), seguida de purificação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e confirmação por espectrometria de massas. Os três epítopos selecionados para síntese, originalmente identificados como 5.E2, 5.E3 e 5.E5, foram denominados CNPGL-Bbovis-5E2, CNPGL-Bbovis-5E3 e CNPGL-Bbovis-5E5, respectivamente, e esses códigos foram utilizados para identificar os peptídeos correspondentes nas etapas experimentais subsequentes.

Os peptídeos selecionados foram inicialmente sintetizados na forma conjugada à proteína carreadora KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin), uma hemocianina proveniente da hemolinfa do gastrópode marinho Megathura crenulata (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA; H7017), na extremidade C-terminal, com adição prévia do espaçador GGGGS, considerando a intenção de utilizar esses mesmos candidatos em etapas posteriores do projeto destinadas à avaliação de sua imunogenicidade em camundongos. A conjugação a uma proteína carreadora foi adotada em razão da limitada imunogenicidade que peptídeos sintéticos podem apresentar quando administrados isoladamente, permitindo potencializar a resposta imunológica contra as sequências de interesse. Dessa forma, a primeira síntese foi planejada para atender simultaneamente às diferentes etapas experimentais do projeto, incluindo a caracterização dos candidatos no presente estudo e sua posterior utilização em estudos de imunização. Os peptídeos foram produzidos na escala de 1 a 4 mg, com grau de pureza superior a 75% e fornecidos na forma liofilizada, sendo posteriormente ressuspendidos para utilização nos ensaios de imunorreatividade.

Posteriormente, também foram sintetizados peptídeos livres correspondentes às mesmas regiões antigênicas. Nesta segunda síntese, foi adicionada uma sequência espaçadora composta por cinco resíduos de glicina (SGGGG) na extremidade amino-terminal, mantendo a extremidade carboxi-terminal amidada (–NH_2). Os peptídeos livres foram fornecidos na forma liofilizada, com grau de pureza

superior a 90% para utilização em ensaios imunológicos. A síntese dos peptídeos em sua forma livre permitiu, posteriormente, avaliar as sequências de interesse sem a contribuição da proteína carreadora, especialmente nos ensaios destinados à caracterização da reatividade sorológica e da atividade metabólica celular.

Para a preparação das soluções estoque, os peptídeos liofilizados, tanto os conjugados à KLH quanto os sintetizados na forma livre, foram ressuspendidos diretamente em PBS 1X estéril, preparado a partir da diluição de 100 mL de PBS 10X em 900 mL de água ultrapura estéril. O PBS 1X apresentou composição final de 8,0 g/L de NaCl, 0,2 g/L de KCl, 1,44 g/L de Na_2HPO_4 e 0,24 g/L de KH_2PO_4, com pH 7,4. Os peptídeos foram ressuspendidos na concentração final de 2 mg/mL. As soluções foram aliquotadas em microtubos estéreis e armazenadas a −20°C para uso rotineiro e a −80°C para armazenamento prolongado, evitando-se ciclos repetidos de congelamento e descongelamento.

A proteína carreadora KLH (Sigma-Aldrich Brasil Ltda., Cajamar, SP, Brasil; H7017-50MG), fornecida separadamente na forma liofilizada, foi utilizada como controle experimental nos ensaios imunológicos. Conforme recomendação do fabricante, o material foi solubilizado em 1 mL de água ultrapura estéril, resultando em concentração final de 10 mg/mL. A solução foi aliquotada e armazenada a −20°C para uso rotineiro e a −80°C para armazenamento prolongado. Após o descongelamento, as alíquotas foram mantidas em gelo até o momento da utilização.

4.5 ELISA INDIRETO

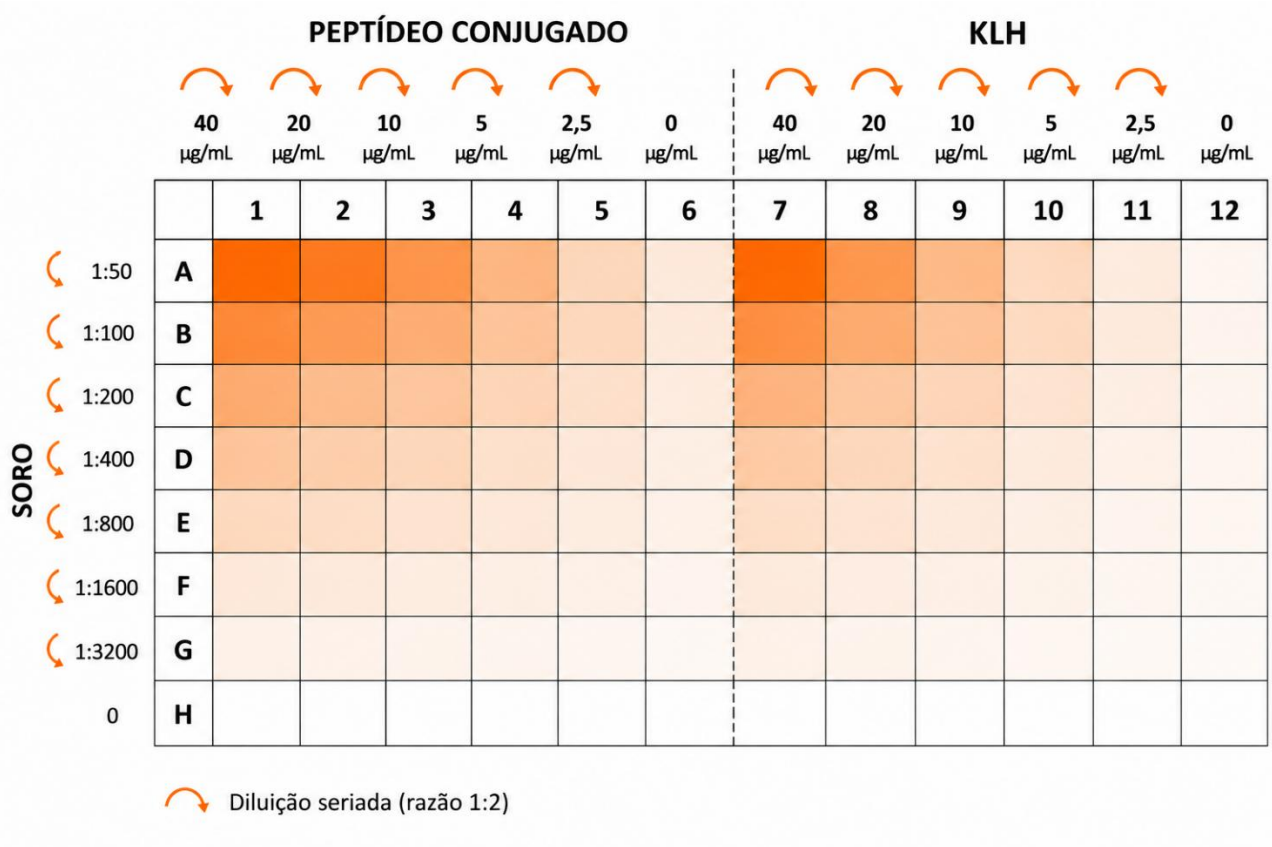
4.5.1 Padronização das condições do ELISA indireto, por titulação em *chessboard*, utilizando peptídeos conjugados ao KLH

A padronização das condições experimentais para o ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) indireto foi realizada em placas de poliestireno de alta capacidade de adsorção proteica, Corning® Costar® 3590 High Binding (Corning Inc., Corning, NY, EUA). O delineamento experimental foi baseado no método de titulação por *chessboard* (Crowther, 2009), permitindo a avaliação simultânea de diferentes concentrações antigênicas em combinação com diferentes diluições séricas, conforme ilustrado na Figura 3.

Os peptídeos sintéticos conjugados à proteína carreadora KLH e o KLH isoladamente foram diluídos em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6). A partir das soluções estoque (2 mg/mL para os peptídeos e 10 mg/mL para o KLH), foram

preparadas diluições seriadas correspondentes às concentrações finais de 40, 20, 10, 5 e 2,5 µg/mL. O KLH, isoladamente, foi incluído como controle antigênico para avaliar a contribuição da proteína carreadora para a reatividade sorológica observada. Foram também incluídos poços contendo apenas tampão, sem antígeno nem soro, como controle de fundo da placa (branco).

Figura 3 – Delineamento experimental empregado na padronização do ELISA indireto com peptídeos conjugados ao KLH. Peptídeos conjugados ao KLH são representados nas colunas 1–5, em concentrações de 40, 20, 10, 5 e 2,5 µg/mL, respectivamente, e o KLH isoladamente nas colunas 7–11, nas mesmas concentrações. As colunas 6 e 12 correspondem aos controles sem antígeno. As linhas A–G representam as diluições séricas de 1:50 a 1:3200, respectivamente, e a linha H corresponde ao controle sem soro. As setas indicam a diluição seriada na razão de 1:2.



Fonte: elaborada pela autora (2026), com auxílio da ferramenta ChatGPT (OpenAI).

Após a sensibilização com os antígenos, as placas foram incubadas em câmara úmida a 4°C *overnight* para permitir a adsorção proteica. Em seguida, o conteúdo foi descartado e as placas foram lavadas quatro vezes com PBS 1X

contendo 0,05% de Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) (PBS-T). O bloqueio dos sítios de ligação inespecíficos foi realizado com PBS-T suplementado com 5% de leite desnatado (Oxoid™ Skim Milk Powder), durante 2 h a 37°C, seguido de nova etapa de lavagem.

Para a etapa de padronização, foram utilizados soros bovinos provenientes do banco de amostras do laboratório, originalmente coletados na Embrapa Pecuária Sul, em Bagé, RS, Brasil, e armazenados sob condições controladas desde 2005. As amostras positivas encontravam-se previamente classificadas quanto ao *status* de infecção por *B. bovis*, conforme os registros do banco de amostras (Benavides; Sacco, 2007). As amostras negativas eram provenientes de uma área livre de babesiose. Foram preparados um *pool* de soros positivos e outro de soros negativos. O *pool* positivo foi constituído pela combinação de 200 µL de cinco amostras classificadas como positivas para *B. bovis*, enquanto o *pool* negativo foi composto pela combinação de 200 µL de sete amostras classificadas como negativas. Os *pools* foram submetidos a diluições seriadas de 1:50 a 1:3200 em PBS-T e distribuídos nas placas conforme o delineamento experimental apresentado na Figura 3.

As placas foram incubadas com o soro diluído, por 1 h a 37°C e posteriormente lavadas quatro vezes com PBS-T. Em seguida, foi adicionado anticorpo secundário anti-IgG bovino conjugado à peroxidase, diluído a 1:20.000, seguido de incubação por 1 h a 37°C. Após nova etapa de lavagem, a revelação foi realizada utilizando o substrato cromogênico SIGMAFAST™ OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), preparado conforme as instruções do fabricante. A reação foi mantida por 15 min, protegida da luz e interrompida pela adição de ácido sulfúrico 3 M. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro de microplacas Eon™ (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA) a 492 nm.

As absorbâncias foram inicialmente corrigidas pela subtração da absorbância do respectivo branco da placa, correspondente aos poços contendo apenas tampão, sem antígeno nem soro. Posteriormente, para cada combinação de concentração antigênica e diluição sérica, os valores corrigidos dos poços contendo antígeno e soro foram subtraídos dos respectivos valores corrigidos dos controles contendo apenas soro (na ausência de antígeno) e apenas antígeno (na ausência de soro). Na configuração experimental apresentada na Figura 3, os poços contendo apenas antígeno corresponderam à linha H, enquanto os poços contendo apenas soro corresponderam às colunas 6 e 12. Dessa forma, foi obtida uma resposta residual

correspondente à reatividade observada em cada combinação de concentração antigênica e diluição sérica, após a remoção das contribuições associadas ao branco da placa, ao antígeno isoladamente e ao soro na ausência de antígeno. Esse procedimento teve como objetivo estimar a reatividade associada à presença simultânea do antígeno e do soro em cada condição experimental, minimizando a influência das respostas de fundo atribuíveis, isoladamente, aos componentes do ensaio.

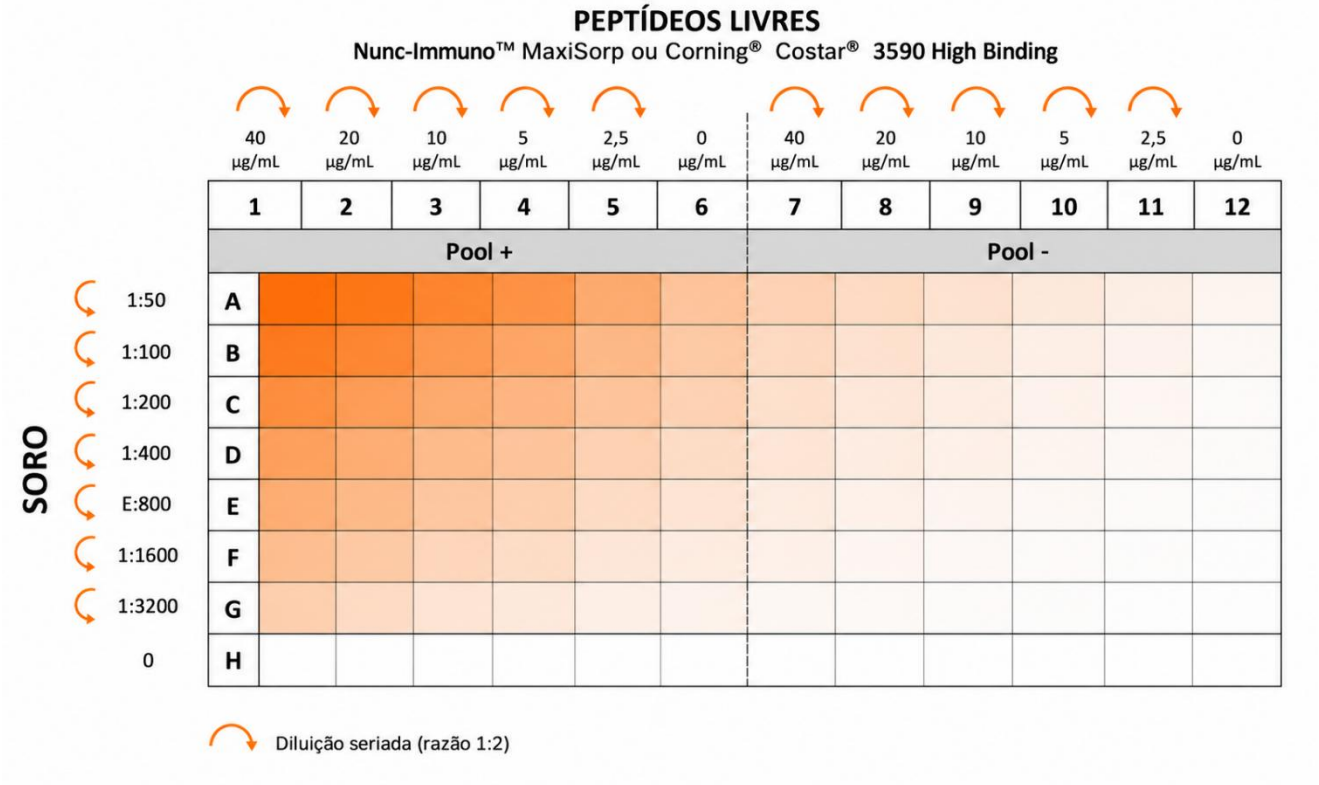
Para avaliar a contribuição da proteína carreadora na resposta observada, o mesmo procedimento de correção foi aplicado aos poços contendo KLH isoladamente. Posteriormente, para cada combinação de concentração antigênica e diluição sérica, foi calculada a diferença entre a resposta residual dos poços contendo o peptídeo conjugado ao KLH e aquela obtida nos poços contendo apenas KLH, considerando-se a mesma concentração e diluição sérica. Essa diferença foi utilizada como estimativa da resposta adicional associada ao peptídeo em relação à proteína carreadora.

As análises foram conduzidas separadamente para os *pools* de soros positivos e negativos. Para cada combinação de concentração antigênica e diluição sérica, a resposta residual obtida para os peptídeos conjugados foi comparada àquela obtida para o KLH isoladamente, considerando-se a mesma concentração e diluição sérica. A seleção das condições experimentais foi baseada na identificação de respostas residuais superiores às observadas para o KLH, associadas à maior reatividade do *pool* positivo em relação ao *pool* negativo.

4.5.2 Padronização das condições do ELISA indireto, por titulação em *chessboard*, utilizando peptídeos livres

A padronização das condições experimentais para o ELISA indireto utilizando peptídeos livres foi realizada em placas de poliestireno de alta capacidade de adsorção proteica de dois fabricantes distintos: Corning® Costar® 3590 High Binding e Nunc-Immuno™ MaxiSorp™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), com o objetivo de avaliar comparativamente o desempenho das diferentes superfícies de adsorção. O delineamento experimental foi baseado no método de titulação em "*chessboard"* (Crowther, 2009), permitindo a avaliação simultânea de diferentes concentrações antigênicas em combinação com diferentes diluições séricas, conforme ilustrado na Figura 4.

Figura 4 – Delineamento experimental do ELISA indireto com peptídeos livres. Os dois blocos representam as placas Nunc-Immuno™ MaxiSorp™ ou Corning® Costar® 3590 High Binding, contendo os *pools* de soros positivo e negativo. As colunas 1–5 e 7–11 representam as concentrações de peptídeos de 40, 20, 10, 5 e 2,5 µg/mL, respectivamente, enquanto as colunas 6 e 12 correspondem à ausência de peptídeo. As linhas A–G representam as diluições séricas de 1:50 a 1:3200, respectivamente, e a linha H corresponde à ausência de soro. As setas indicam a diluição seriada na razão de 1:2.



Fonte: elaborada pela autora (2026), com auxílio da ferramenta ChatGPT (OpenAI).

Foram avaliadas cinco concentrações de peptídeos (40, 20, 10, 5 e 2,5 µg/mL) combinadas com sete diluições séricas (1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 e 1:3200), em arranjo fatorial. O mesmo delineamento foi aplicado a ambas as placas, conforme ilustrado na Figura 4. Foram utilizados os *pools* de soros positivos e negativos descritos na seção 4.5.1. Também foram incluídos poços contendo apenas tampão, sem peptídeo e sem soro, como controle de fundo da placa, além de controles contendo apenas peptídeo, na ausência de soro, e apenas soro, na ausência de peptídeo.

As etapas de sensibilização das placas, bloqueio e lavagem inicial foram realizadas conforme descrito na seção 4.5.1. Após o bloqueio, os *pools* de soros positivos e negativos foram submetidos a diluições seriadas de 1:50 a 1:3200 em PBS-T suplementado com 1% de leite desnatado (PBS-T-Molico 1%) e distribuídos nos respectivos poços, conforme o delineamento apresentado na Figura 4. As placas foram incubadas por 1 h a 37°C. Após a incubação dos soros, foram realizadas cinco lavagens com PBS-T. As etapas subsequentes de adição e incubação do anticorpo secundário, revelação e leitura da absorbância foram realizadas conforme descrito na seção 4.5.1.

As absorbâncias foram inicialmente corrigidas pela subtração da absorbância do respectivo branco da placa, correspondente aos poços contendo apenas tampão, sem peptídeo e sem soro. Posteriormente, para cada combinação de concentração antigênica e diluição sérica, os valores corrigidos dos poços contendo simultaneamente peptídeo e soro foram subtraídos dos respectivos valores corrigidos dos controles contendo apenas peptídeo, na ausência de soro, e apenas soro, na ausência de peptídeo. Dessa forma, foi obtida uma resposta residual correspondente à reatividade observada em cada combinação de concentração antigênica e diluição sérica, após a remoção das contribuições associadas ao branco da placa, ao peptídeo isoladamente e ao soro na ausência de antígeno. Esse procedimento teve como objetivo estimar a reatividade associada à presença simultânea do peptídeo e do soro em cada condição experimental, minimizando a influência das respostas de fundo atribuíveis, isoladamente, aos componentes do ensaio.

As análises foram realizadas separadamente para os *pools* de soros positivos e negativos, bem e para cada tipo de placa avaliado. A seleção das condições experimentais para a etapa subsequente de avaliação de amostras individuais foi realizada considerando, conjuntamente, a magnitude da resposta residual, o comportamento da reatividade em função da concentração do peptídeo e da diluição sérica, a capacidade de discriminação entre os *pools* positivo e negativo, a contribuição do fundo e o consumo de peptídeo e de soro. Valores residuais negativos ou próximos de zero foram mantidos nas análises, uma vez que resultaram diretamente das etapas de correção e indicaram ausência de reatividade residual detectável acima das contribuições dos controles considerados.

4.5.3 Avaliação da reatividade sorológica de amostras individuais

A avaliação da reatividade sorológica de amostras individuais foi realizada utilizando os peptídeos livres, nas condições selecionadas durante a etapa de padronização. Para os peptídeos CNPGL-Bbovis-5E3 e CNPGL-Bbovis-5E5, foram utilizadas as concentrações de 20 µg/mL e a diluição sérica de 1:200, condições selecionadas a partir da análise das respostas obtidas durante a padronização.

Foram analisadas amostras individuais previamente classificadas quanto ao *status* de infecção por *B. bovis*, incluindo 12 amostras de animais previamente identificados como positivos, sendo cinco correspondentes aos soros utilizados na composição do *pool* positivo e sete provenientes de animais adicionais, além de quatro amostras de animais previamente identificados como negativos. As amostras foram distribuídas nas placas de acordo com o delineamento experimental e analisadas em triplicata. Foram incluídos, adicionalmente, o *pool* de soros positivos e controles destinados à avaliação das contribuições do soro, do peptídeo e do fundo da placa. O *pool* de soros positivos foi utilizado como referência para a determinação relativa da reatividade das amostras individuais.

As etapas de sensibilização das placas, bloqueio, incubação dos soros, adição do anticorpo secundário, revelação e leitura da absorbância foram realizadas conforme descrito na seção 4.5.1. Os soros individuais foram diluídos em PBS-T suplementado com 1% de leite desnatado (PBS-T-Molico 1%) na diluição 1:200. Após a incubação dos soros, foram realizadas cinco lavagens com PBS-T antes da adição do anticorpo secundário.

As absorbâncias das amostras individuais foram inicialmente corrigidas pela subtração da absorbância média do controle de fundo da placa, correspondente aos poços sem peptídeo nem soro. A mesma correção foi aplicada às absorbâncias obtidas para o *pool* de soros positivos submetido à diluição seriada. Os controles contendo apenas soro, na ausência de peptídeo, e apenas peptídeo, na ausência de soro, foram incluídos no ensaio para monitoramento das contribuições individuais dos componentes, mas não foram utilizados como fatores adicionais na correção matemática das amostras individuais. Dessa forma, a absorbância utilizada nas análises correspondeu à leitura obtida após a correção pelo fundo da placa.

Para a expressão relativa da reatividade sorológica, foi utilizada a porcentagem de positividade (PP), tendo como referência a resposta do *pool* de soros positivos na mesma diluição empregada para as amostras individuais. O *pool* positivo foi

submetido a diluição seriada na razão de 1:2, e a resposta obtida na diluição 1:200 foi definida como 100% de positividade. A partir dessa referência, foram estabelecidas diluições seriadas correspondentes a 50%, 25%, 12,5% e 6,25% de positividade, além de diluições mais concentradas, correspondentes a 200% e 400%, compondo uma série de referência para a magnitude da resposta sorológica.

As médias das absorbâncias corrigidas do *pool* positivo em cada diluição foram utilizadas para construir uma curva de referência para cada peptídeo, relacionando absorbância e porcentagem de positividade. O ajuste foi realizado por regressão exponencial, que melhor descreveu a relação observada entre as variáveis. A equação obtida para cada peptídeo foi utilizada para estimar a porcentagem de positividade em relação ao *pool* positivo, correspondente às absorbâncias corrigidas das amostras individuais analisadas na diluição 1:200.

Para cada amostra individual, a porcentagem de positividade foi calculada aplicando-se a equação de regressão à média das absorbâncias corrigidas das três réplicas técnicas. A porcentagem de positividade foi utilizada como medida relativa da magnitude da reatividade sorológica frente aos peptídeos CNPGL-Bbovis-5E3 e CNPGL-Bbovis-5E5, permitindo a comparação das respostas entre as amostras avaliadas. Adicionalmente, foi determinado um ponto de corte para cada peptídeo a partir das médias das absorbâncias das amostras de referência negativas. O cálculo foi realizado conforme o método descrito por Frey, Di Canzio e Zurakowski (1998), utilizando o fator de correção de 2,335 que corresponde à condição de cinco controles e 95% de confiança. O ponto de corte foi calculado pela soma da média das absorbâncias das amostras de referência negativas e de 2,335 vezes o respectivo desvio-padrão. O cálculo foi realizado separadamente para os peptídeos CNPGL-Bbovis-5E3 e CNPGL-Bbovis-5E5. As amostras com absorbância superior ao respectivo ponto de corte foram classificadas como reativas, enquanto aquelas com valores iguais ou inferiores foram classificadas como não reativas.

4.6 ENSAIO DE ATIVIDADE METABÓLICA CELULAR POR REDUÇÃO DE RESAZURINA

4.6.1 Ensaio de atividade metabólica com peptídeos conjugados com KLH

A atividade metabólica de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) bovinas foi avaliada por meio do ensaio de redução da resazurina (Rolón et al., 2006). Para isso, amostras de sangue periférico provenientes de bovinos

previamente identificados como positivos para *B. bovis* por PCR em tempo real foram coletadas em tubos contendo heparina e processadas imediatamente para isolamento das PBMCs.

O sangue foi diluído em PBS 1 x estéril na proporção de 1:1. Em seguida, 30 mL dessa suspensão foram cuidadosamente transferidos para tubos contendo 20 mL de Ficoll-Paque™ PLUS (Cytiva Sweden AB, Uppsala, Suécia) à temperatura ambiente. As amostras foram submetidas à centrifugação em gradiente de densidade a 800 x g por 30 min, sem aceleração e sem freio. Após a centrifugação, a camada de células mononucleares localizada na interface plasma-Ficoll foi cuidadosamente coletada e transferida para tubos estéreis.

As células foram lavadas com PBS 1X e centrifugadas a 500 x g durante 10 min. Em seguida, o pelete celular foi ressuspendido em 4 mL de tampão de lise eritrocitária *Ammonium-Chloride-Potassium* (ACK), composto por 155 mM de NH_4Cl, 10 mM de $KHCO_3$ e 0,1 mM de EDTA (pH 7,4), previamente aquecido a 37°C. Após incubação por até 2 min, a lise foi interrompida pela adição de PBS 1X suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB), completando-se o volume para 15 mL. A suspensão celular foi centrifugada a 500 x g por 10 min e submetida a duas lavagens adicionais com PBS 1X.

Ao final do processamento, as células foram ressuspendidas em meio RPMI 1640 (Gibco™, Life Technologies Ltd., Paisley, Escócia, Reino Unido), contendo aminoácidos não essenciais e 110 mg/L de piruvato de sódio, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina e 1% de L-glutamina, constituindo o meio RPMI completo utilizado nos experimentos. A concentração e a viabilidade celulares foram determinadas pelo método de exclusão com azul de trypan na câmara de Neubauer. Posteriormente, a concentração celular foi ajustada para a distribuição de 5 x 10^5 células por poço, em placas de cultura celular de 96 poços, fundo chato, tratadas para cultura celular Costar® 3595 (Corning Incorporated, Corning, NY, EUA), em volume de 180 µL por poço.

Os peptídeos sintéticos foram previamente diluídos em meio RPMI 1640 completo e adicionados às culturas em volume de 20 µL por poço, de modo a atingir concentrações finais de 20, 10 e 5 µg/mL. Poços contendo apenas PBMCs cultivadas em meio RPMI 1640 completo foram utilizados como controle negativo e como referência (100%) para o cálculo da atividade metabólica relativa. Como controle positivo de ativação celular foi utilizado *Cell Stimulation Cocktail* (eBioscience™,

Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EUA; código 00-4970-93), contendo phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) e ionomicina, empregado na diluição final de 1:500, correspondente às concentrações finais de 81 nM e 1,34 µM, respectivamente. Adicionalmente, poços contendo apenas a proteína carreadora KLH foram incluídos para avaliação de possíveis respostas inespecíficas associadas ao carreador utilizado na síntese dos peptídeos, nas concentrações finais de 10, 5 e 2,5 µg/mL.

As culturas foram incubadas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 por períodos de 48, 72 e 96 h. Como controle de morte celular, Triton X-100 previamente diluído em meio RPMI 1640 completo foi adicionado aos poços correspondentes 30 min antes da adição da resazurina, atingindo concentração final de 1% (v/v).

Posteriormente, foram adicionados 20 µL de solução de resazurina 1 mM a cada poço, correspondendo a 10% do volume final da cultura (0,1mM). As placas foram incubadas por 4 a 6 h a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO_2 e protegidas da luz. Ao término da incubação, a redução da resazurina foi avaliada por leitura espectrofotométrica em leitor de microplacas nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm, conforme recomendado pelo fabricante da resazurina sódica (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA; R7017). A atividade metabólica relativa das culturas foi calculada de acordo com Rolón et al. (2006), conforme as equações apresentadas a seguir.

$$\boldsymbol{R}0 = \frac{A_{570}}{A_{600}} \quad \text{(equação 1)}$$

Em que A_{570} e A_{600} correspondem às médias das absorbâncias dos poços sem células, nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm, respectivamente.

$$\boldsymbol{A_{corrigida} = A_{570} - (A_{600}\, x\, R_0)} \text{ (equação 2)}$$

Em que $A_{corrigida}$ corresponde à absorbância corrigida de cada poço; A_{570} e A_{600} correspondem às absorbâncias obtidas nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm, respectivamente; e R_0 corresponde ao fator de correção determinado conforme a Equação 1.

$$\bar{A}_{corrigida} = \frac{A1_{corrigida} + A2_{corrigida}}{2}$$ (equação 3)

Em que $A_{corrigida}$ corresponde à média das absorbâncias corrigidas das duplicatas técnicas de cada condição experimental; $A1_{corrigida}$ e $A2_{corrigida}$ correspondem às absorbâncias corrigidas dos respectivos poços em duplicata.

$$\textbf{\textit{Atividade metabólica relativa}}\ (\%) = \frac{\bar{\boldsymbol{A}}_{\boldsymbol{corrigida\ (amostra)}}}{\bar{\boldsymbol{A}}_{\boldsymbol{corrigida\ (RPMI)}}}\ \boldsymbol{x\ 100}$$ (equação 4)

Em que $A_{corrigida(amostra)}$ corresponde à média das absorbâncias corrigidas das duplicatas de cada condição experimental e $A_{corrigida(RPMI)}$ corresponde à média das absorbâncias corrigidas das duplicatas do respectivo controle negativo, constituído por PBMCs cultivadas apenas em meio RPMI.

Os resultados foram expressos como porcentagem da atividade metabólica celular em relação ao respectivo controle negativo, considerado como 100%.

4.6.2 Ensaio de atividade metabólica com peptídeos livres

O ensaio utilizando os peptídeos em sua forma livre foi realizado conforme descrito na seção 4.6.1, mantendo-se as mesmas condições para isolamento e cultivo das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), preparo das culturas, incubação, adição da resazurina, leitura espectrofotométrica e cálculo da atividade metabólica relativa.

Os peptídeos sintéticos livres foram previamente diluídos em meio RPMI 1640 completo e adicionados às culturas nas concentrações finais de 20, 10 e 5 µg/mL. Poços contendo apenas PBMCs cultivadas em meio RPMI 1640 completo foram utilizados como controle negativo e como referência (100%) para o cálculo da atividade metabólica relativa. Como controle positivo de ativação celular, utilizou-se concanavalina A (ConA) proveniente de *Canavalia ensiformis* (*Jack bean*), tipo IV-S, liofilizada, estéril e adequada para cultura celular (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA; C2010) na concentração final de 5 µg/mL, enquanto poços tratados com Triton X-100 permaneceram como controle de morte celular.

4.6.3 Avaliação estatística

As análises estatísticas dos ensaios de atividade metabólica foram realizadas no software R (versão 4.6.1; R CORE TEAM, 2026).

Para o ensaio com os peptídeos conjugados à proteína carreadora KLH, foram estabelecidas a priori nove comparações por peptídeo, entre o grupo tratado com o peptídeo conjugado e o respectivo grupo tratado apenas com KLH em concentração equivalente (20 vs. 10 µg/mL; 10 vs. 5 µg/mL; e 5 vs. 2,5 µg/mL), avaliadas separadamente nos tempos de 48, 72 e 96 h de incubação, totalizando 27 comparações (três peptídeos × três concentrações × três tempos). Em todas as comparações, as observações foram pareadas por animal, de modo que cada comparação utilizou exclusivamente as medidas provenientes do mesmo indivíduo, isolando o efeito do peptídeo do efeito basal da proteína carreadora. Para cada uma das 27 comparações, calculou-se a diferença pareada entre os grupos peptídeo+KLH e KLH, e a normalidade de cada grupo foi avaliada individualmente pelo teste de Shapiro-Wilk (Shapiro; Wilk, 1965). Contrastes com distribuição normal ($p > 0,05$) foram comparados pelo teste t de Student pareado; contrastes que não atenderam ao pressuposto de normalidade ($p \leq 0,05$) foram comparados pelo teste de Wilcoxon para amostras pareadas (postos sinalizados). Os valores de p resultantes das 27 comparações foram ajustados pelo método de Holm (Holm, 1979), tratados como uma única família de hipóteses, controlando a taxa de erro tipo I acumulada no experimento.

Para o ensaio com os peptídeos em sua forma livre, o delineamento experimental envolveu dois fatores fixos (concentração e tempo de incubação), avaliados para cada peptídeo separadamente. Como a normalidade dos resíduos não foi atendida, optou-se pela análise de variância não paramétrica por *Aligned Rank Transform* (ART) (Wobbrock et al., 2011), com concentração, tempo de incubação e a interação entre esses fatores incluídos como efeitos fixos, e o animal como efeito aleatório de intercepto. Quando observado efeito principal ou de interação estatisticamente significativo ($p < 0,05$), foram realizadas comparações múltiplas pareadas pelo procedimento ART-C (Elkin et al., 2021), com os valores de p ajustados pelo método de Holm. O controle positivo (ConA, no ensaio com peptídeos livres; PMA, no ensaio com peptídeos conjugados ao KLH) foi apresentado nos gráficos apenas como referência visual da responsividade celular, não sendo incluído nas comparações estatísticas entre os grupos experimentais.

Em ambos os ensaios, foram consideradas estatisticamente significativas as comparações com p ajustado < 0,05, classificadas como não significativas (ns, p ≥ 0,05), significativas (*, p < 0,05), muito significativas (**, p < 0,01) ou extremamente significativas (***, p < 0,001).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SELEÇÃO *IN SILICO* DE EPÍTOPOS CANDIDATOS

A identificação de candidatos vacinais foi realizada por meio de uma abordagem de vacinologia reversa, utilizando o proteoma predito a partir do genoma de referência da linhagem T2Bo de *B. bovis* disponível no NCBI. A aplicação do *pipeline* bioinformático (Figura 2) permitiu a seleção de proteínas potencialmente acessíveis ao sistema imune do hospedeiro e, posteriormente, a identificação de epítopos com características favoráveis para futuras aplicações vacinais.

A aplicação dos critérios de seleção estabelecidos permitiu a identificação de nove proteínas de membrana plasmática de *B. bovis* com escores de antigenicidade superiores a 0,7 no VaxiJen. A análise imunoinformática dessas proteínas resultou na predição de 31 epítopos candidatos. A seleção desses candidatos foi baseada na integração de diferentes parâmetros biológicos, incluindo localização subcelular, antigenicidade, presença de peptídeo sinal, ancoragem por glicosilfosfatidilinositol (GPI), presença de regiões intrinsecamente desordenadas, topologia transmembrana e potencial de reconhecimento por células B e T. Nenhuma das nove proteínas selecionadas apresentou predição de ancoragem por GPI pelo PredGPI. O detalhamento das análises relacionadas à identificação das regiões intrinsecamente desordenadas, à topologia transmembrana e à predição dos epítopos de células B e T está apresentado no Apêndice A. Dessa forma, a estratégia empregada permitiu uma priorização hierárquica, na qual um conjunto inicial de proteínas codificadas pelo genoma foi progressivamente reduzido a proteínas de membrana plasmática com características antigênicas favoráveis e, posteriormente, a regiões específicas com potencial de reconhecimento imunológico.

A utilização combinada desses critérios permitiu priorizar proteínas e regiões com características compatíveis com maior acessibilidade e potencial de reconhecimento pelo sistema imune, direcionando a seleção dos candidatos para as etapas experimentais subsequentes. A caracterização *in silico* das proteínas selecionadas e dos epítopos candidatos é apresentada na Tabela 2, incluindo parâmetros de antigenicidade, alergenicidade, toxicidade, bem como propriedades físico-químicas e similaridade com proteínas de *Bos taurus*.

Tabela 2 – Caracterização *in silico* das proteínas de membrana plasmática e dos epítopos candidatos de *Babesia bovis* T2Bo.

Características das proteínas			Características físico-químicas dos epítopos									Similaridade com *Bos taurus*					
ID	VaxP	SigP		Sequência	VaxE	Alerg	Tox	Carga	PM (Da)	pI	Neg	Pos	Alif	Inst	GRAVY	QC	E-value	PI
XP_051623602,1	0,9720	0,5993	1.E1	AEDDSGSNGSSTKYY	1,2231	N.A.	N.T.	-2,1	1580,54	04,03	3	1	6,67	46,06	-1,560	73%	3,1	64,71%
			1.E2	FGFKRYTNLDRRTLL	1,6490	A.	N.T.	2,9	1900,21	10,90	1	4	78,00	33,50	-0,700	66%	1,7	61,54%
XP_001610297,1	0,8589	0,7208	2.E1	MVRYRKLSVALLLYT	0,8823	N.A.	N.T.	2,9	1826,27	10,28	0	3	149,33	-18,29	0,687	53%	1,2	87,50%
			2.E2	DETTAVQDTVPGTPESPNSS	0,8803	N.A.	N.T.	-4,1	2032,06	3,43	4	0	34,00	66,92	-1,0600	75%	2,5	61,11%
			2.E3	YQRYKQFVVKHNKTF	0,8722	N.A.	N.T.	4,1	1986,31	10,17	0	4	38,67	52,95	-1,280	60%	6,9	77,78%
			2.E4	GEMKEYVAFLIIP	0,9909	A.	N.T.	-1,1	1509,82	4,53	2	1	120,00	1,22	0,715	69%	0,42	80,00%
XP_001611131,1	0,8747	0,9039	3.E1	MALSQKFSTALLLYTTIL	0,6994	N.A.	N.T.	0,9	2014,45	8,34	0	1	141,11	32,98	1,0780	72%	5,4	69,23%
			3.E2	GYYQKYKQFVNKHNKTFTIVL	0,835	N.A.	N.T.	4,1	2620,05	9,88	0	4	64,76	54,70	-0,771	33%	11	85,71%
XP_051623085,1	0,8021	0,7771	4.E1	MDCMVGVIGILFFLGVS	0,0757	N.A.	N.T.	-1,1	1801,25	3,80	1	0	142,94	29,93	2,094	88%	1,2	60,00%
			4.E2	APEGEAKVDTSTKGVGGKFFGNK	1,4705	N.A.	N.T.	0,9	2324,58	8,47	3	4	33,91	6,35	-0,774	100%	0,48	66,67%
			4.E3	NKKAMIIAAVILVLL	1,2486	N.A.	N.T.	1,9	1610,12	10	0	2	214,67	37,960	1,953	73%	0,21	72,73%
			4.E4	WAHNGGGGGKEAWSA	0,7687	N.A.	N.T.	0,2	1484,55	6,75	1	1	20	26,670	-0,887	86%	0,84	100,00%
XP_001609243,1	0,8297	0,8736	5.E1	IAAFSFSVLGNVLKL	0,7404	A.	N.T.	0,9	1578,92	8,75	0	1	156	-7,6500	1,607	86%	1,2	64,29%
			5.E2	VADKVTDGAHPSCMGLTEPSPSHSLFDG	0,7699	N.A.	N.T.	-2,6	2856,13	4,64	4	1	55,71	68,200	-0,289	-	-	-
			5.E3	QDATTNADTPNDVTSSDATAIDD	0,8428	A.	N.T.	-6,1	2338,29	3,17	6	0	46,96	5,8600	-0,970	47%	3,7	72,73%
			5.E4	KKFEYRTSVPPYPQQYSVRENK	0,8109	A.	N.T.	2,9	2745,09	9,7	2	5	26,36	49,820	-1,727	86%	0,038	61,11%
			5.E5	QKWWRNKQLEKTRNNVKEYLKRAL	1,2117	N.A.	N.T.	5,9	3130,65	10,64	2	8	65	48,450	-1,829	83%	1,0	55,00%

Características das proteínas					Características físico-químicas dos epítopos												Similaridade com *Bos taurus*	
ID	**VaxP**	**SigP**		**Sequência**	**VaxE**	**Alerg**	**Tox**	**Carga**	**PM (Da)**	**pI**	**Neg**	**Pos**	**Alif**	**Inst**	**GRAVY**	**QC**	**E-value**	**PI**
XP_001608791,1	0,7658	0,6802	6.E1	TSTKGVGSKFFGNKK	0,6663	N.A.	N.T.	3,9	1585,82	10,48	0	4	19,33	8,1400	-0,900	73%	14	100,00%
			6.E2	FRNKIRNLFAKKAAE	0,3644	N.A.	N.T.	3,9	1806,14	11,1	1	5	72	35,910	-0,793	86%	1,7	72,73%
			6.E3	CSDNGSPDAKWSAGI	0,9110	N.A.	N.T.	-1,1	1507,59	4,21	2	1	39,33	17,920	-0,633	60%	9,7	61,54%
XP_001610365,2	0,7051	0,5495	7.E1	MYGTQTRRFCALSMLMK	0,1805	A.	N.T.	2,9	2037,5	10,05	0	3	51,76	42,610	0,006	41%	6,7	85,71%
			7.E2	PIVAPRRQSLSSSFGKFNTRLNSVQQPL	0,4024	N.A.	N.T.	3,9	3128,58	12,3	0	4	80	75,270	-0,468	78%	1,2	59,09%
			7.E3	SVVVHSFWRQDSIFNTRIELVGNDTDTG	1,209	A.	N.T.	-1,8	3193,48	4,66	4	2	83,21	23,110	-0,275	28%	12	70,00%
			7.E4	QEYLSAVQRYSTLLR	0,2308	N.A.	N.T.	0,9	1827,07	8,59	1	2	104	29,990	-0,467	86%	1,2	58,82%
XP_051623373,1	0,7094	0,5626	8.E1	SIVGLIGIFYFLGVS	0,4917	N.A.	N.T.	-0,1	1584,92	5,24	0	0	168,67	14,090	2,067	73%	0,10	61,11%
			8.E2	SPEGDATVDTSTKGVGSKFFGNKK	1,1357	A.	N.T.	0,9	2457,68	8,16	3	4	28,33	21,860	-0,896	95%	1,5	56,00%
			8.E3	GSKFFGNKKAMIIAGVIL	1,0581	N.A.	N.T.	2,9	1894,35	10,3	0	3	113,89	28,580	0,856	50%	15	66,67%
			8.E4	CSSNGSTEPAWSAGI	0,5112	A.	N.T.	-1,1	1466,54	4	1	0	39,33	45,010	-0,240	66%	9,7	80,00%
XP_001610035,1	0,8561	0,0561	9.E1	FTRESKRARATRRYGAFY	0,789	N.A.	N.T.	4,9	2236,52	11,45	1	6	16,67	74,570	-1,339	83%	0,008	84,62%
			9.E2	FIKRAIPITYPPESNPRV	0,9763	A.	N.T.	1,9	2098,48	9,99	1	3	86,67	53,360	-0,378	94%	0,48	55,00%
			9.E3	YHDKSDGNNQKSKE	1,3181	N.A.	N.T.	0,2	1649,69	6,75	3	3	0	0,5900	-2,800	100%	8,2	60,00%

ID: ID da proteína; VaxP: escore de antigenicidade da proteína obtido pelo VaxiJen v2.0; SigP: escore de predição de peptídeo sinal obtido pelo SignalP-5.0; Sequência: sequência do epítopo candidato; VaxE: escore de antigenicidade do epítopo obtido pelo VaxiJen v2.0; Alerg: classificação predita de alergenicidade pelo AllerTOP v2.0, onde N.A. significa provável não-alérgeno e A. significa provável alérgeno; Tox: classificação predita de toxicidade pelo ToxinPred, onde N.T. significa provável não-tóxico; Carga: carga elétrica líquida do epítopo; PM: peso molecular**;** pI: ponto isoelétrico; Neg: número de resíduos negativos; Pos: número de resíduos positivos; Alif: índice alifático; Instab: índice de instabilidade; GRAVY: Grand Average of Hydropathy; QC: cobertura da consulta (query coverage); E-value: valor esperado; PI: porcentagem de identidade. Para a similaridade com *Bos taurus*, os parâmetros foram obtidos por BLASTp.

Fonte: elaborada pela autora (2026)

Os resultados da caracterização *in silico* evidenciaram heterogeneidade entre os epítopos quanto aos parâmetros avaliados. As nove proteínas selecionadas apresentaram escores de antigenicidade entre 0,7051 e 0,9720 no VaxiJen. Para os 31 epítopos preditos, os escores de antigenicidade variaram de 0,0757 e 1,6490, evidenciando diferenças entre as sequências quanto ao potencial antigênico predito. Em relação à toxicidade, todos os epítopos foram classificados como provavelmente não tóxicos pelo *ToxinPred*. A predição de alergenicidade identificou oito epítopos como prováveis alérgenos, enquanto os demais foram classificados como prováveis não alérgenos. Na análise de similaridade com o proteoma de *Bos taurus*, foram observados diferentes níveis de identidade entre as sequências, incluindo epítopos com porcentagens de identidade elevadas, indicando que esse parâmetro não apresentou um padrão uniforme entre os candidatos. A heterogeneidade observada entre os candidatos reforça que a etapa de predição não produziu um conjunto homogêneo de epítopos, mas diferentes sequências com combinações distintas de características imunológicas e físico-químicas, tornando necessária a priorização de candidatos para as etapas experimentais subsequentes.

O proteoma predito a partir do genoma da linhagem T2Bo de *B. bovis* compreendia 3.959 proteínas codificadoras, e a aplicação sequencial dos critérios empregados no presente estudo restringiu esse universo a nove proteínas de membrana plasmática, correspondendo a uma redução de aproximadamente 99,8% do conjunto proteico inicial. Esse processo de seleção e redução ilustra uma das principais contribuições da vacinologia reversa: utilizar informações genômicas para identificar sistematicamente potenciais antígenos e direcionar a investigação experimental para um conjunto mais restrito de candidatos. A abordagem foi inicialmente proposta por Rappuoli (2001) e teve como marco sua aplicação ao desenvolvimento de candidatos vacinais contra *N. meningitidis* do grupo B, demonstrando que a informação genômica poderia ser utilizada para identificar novos antígenos sem depender exclusivamente da caracterização experimental prévia do patógeno (Pizza et al., 2000). Com o avanço da genômica, bioinformática e imunologia estrutural, essa abordagem foi ampliada para estratégias descritas como vacinologia reversa 2.0, nas quais informações provenientes da imunologia e da biologia estrutural passam a orientar a identificação e o desenho racional de antígenos e epítopos (Rappuoli *et al.*, 2016; Goodswen; Kennedy; Ellis, 2023).

No contexto de *B. bovis*, a aplicação da vacinologia reversa é particularmente relevante diante do número de proteínas codificadas pelo parasito e da necessidade de identificar novos alvos além daqueles tradicionalmente investigados. Estudos anteriores se concentraram principalmente em proteínas associadas à superfície dos merozoítos e à invasão eritrocitária, incluindo membros das famílias MSA, RAP e a proteína AMA-1 (Lau et al., 2010; Sivakumar et al., 2013; Matos et al., 2020; El-Alfy et al., 2023). Entretanto, a utilização de abordagens de prospecção baseadas no proteoma predito a partir do genoma de referência completo da linhagem T2Bo de *B. bovis* permite ampliar a busca para proteínas menos caracterizadas ou ainda não exploradas experimentalmente. Essa estratégia possibilitou direcionar as etapas experimentais subsequentes para um conjunto mais restrito de candidatos, incluindo proteínas além daquelas tradicionalmente investigadas.

A seleção inicial das proteínas de membrana plasmática foi baseada na localização subcelular, uma vez que proteínas expostas na superfície do parasito apresentam maior possibilidade de interação com componentes do sistema imune do hospedeiro e podem participar diretamente da interação parasito–hospedeiro. Em *B. bovis*, proteínas associadas à superfície dos merozoítos e à invasão eritrocitária constituem importantes alvos de investigação por sua participação no reconhecimento, na adesão e na internalização dos eritrócitos, além de sua exposição ao sistema imune (Mosqueda et al., 2002; Wilkowsky et al., 2003; Lau et al., 2010; Hidalgo-Ruiz et al., 2022). Por esse motivo, a localização na membrana plasmática foi utilizada como primeiro critério de priorização. Em seguida, a antigenicidade das proteínas foi avaliada pelo VaxiJen v2.0, adotando-se o escore de 0,7 como ponto de corte para priorizar proteínas com maior antigenicidade predita (Doytchinova; Flower, 2007).

A partir dessa triagem, foram considerados parâmetros adicionais relacionados às características estruturais e à exposição das regiões candidatas. A presença de peptídeo sinal e de ancoragem por GPI foi avaliada para caracterizar possíveis mecanismos de direcionamento e associação das proteínas à superfície celular (Almagro-Armenteros et al., 2019; Pierleoni; Martelli; Casadio, 2008). A topologia transmembrana foi analisada para identificar regiões extracelulares potencialmente mais acessíveis ao reconhecimento pelo sistema imune (Hallgren et al., 2022). As regiões intrinsecamente desordenadas também foram consideradas como critério de priorização, por corresponderem a segmentos proteicos sem uma conformação

tridimensional rigidamente definida e com maior flexibilidade estrutural, características que podem influenciar a acessibilidade de determinados segmentos ao reconhecimento molecular (Erdős; Pajkos; Dosztányi, 2021). Posteriormente, foram integradas as predições de epítopos de células B e T, priorizando regiões com potencial de reconhecimento imunológico (Jespersen et al., 2017; Andreatta; Nielsen, 2016; Nielsen et al., 2003). Os epítopos selecionados foram ainda avaliados quanto à antigenicidade, alergenicidade, toxicidade e propriedades físico-químicas, permitindo a priorização final com base na combinação de diferentes parâmetros (Doytchinova; Flower, 2007; Dimitrov et al., 2014; Gupta et al., 2014; Wilkins et al., 1999).

Dados de expressão gênica descritos por Ueti et al. (2020) foram utilizados para complementar a caracterização dos candidatos selecionados no presente estudo. Os autores compararam a expressão de genes de *B. bovis* entre os estágios sanguíneos e os cinetos (formas presentes no vetor), utilizando RNA-seq e análise de expressão diferencial, com três réplicas biológicas por estágio e critérios de FDR ≤ 5% e logFC ≥ 1. O cruzamento dos nove genes correspondentes às proteínas selecionadas no presente estudo com os dados disponibilizados pelos autores revelou que sete apresentaram expressão significativamente maior nos estágios sanguíneos: BBOV_II007790 (28,23 vezes), BBOV_IV012110 (4,10 vezes), BBOV_II000080 (41,44 vezes), BBOV_IV000770 (22,79 vezes), BBOV_I001390 (15,55 vezes), BBOV_IV004360 (2,23 vezes) e BBOV_III000070 (58,31 vezes).

Esses resultados mostram que a maioria dos genes correspondentes às proteínas selecionadas neste estudo apresentou maior expressão no estágio sanguíneo no conjunto de dados analisado por Ueti et al. (2020). Entre as nove proteínas selecionadas, a proteína XP_001609243.1 destacou-se por concentrar cinco dos epítopos candidatos identificados no presente estudo, abrangendo regiões preditas com potencial de reconhecimento por células B e T. Além das características obtidas na etapa de seleção *in silico*, o gene correspondente, BBOV_IV000770, apresentou aumento relativo de expressão de 22,79 vezes no estágio sanguíneo em relação aos cinetos no conjunto de dados analisado por Ueti et al. (2020). A combinação dessas evidências contribuiu para a priorização dessa proteína para as etapas subsequentes de validação molecular e imunológica.

Apesar da priorização baseada em múltiplos parâmetros *in silico*, a utilização de uma sequência de referência não permite, isoladamente, estabelecer a conservação dos candidatos na população de *B. bovis* circulante no hospedeiro.

Dessa forma, as regiões gênicas correspondentes às proteínas selecionadas foram posteriormente avaliadas em isolados brasileiros, com o objetivo de verificar a conservação das regiões codificadoras dos epítopos candidatos.

5.2 CONSERVAÇÃO DOS GENES CODIFICADORES DAS PROTEÍNAS CANDIDATAS EM ISOLADOS BRASILEIROS

Considerando que a seleção dos candidatos vacinais foi realizada a partir da linhagem T2Bo de *B. bovis*, foi conduzida uma etapa de validação molecular para verificar se as regiões gênicas de interesse permanecem conservadas em isolados brasileiros. Foram desenhados 12 pares de *primers* direcionados a nove genes candidatos de *B. bovis*, abrangendo regiões codificadoras contendo os epítopos imunogênicos identificados na etapa de vacinologia reversa (Tabela 3).

Tabela 3 – *Primers* desenhados para amplificação das regiões codificadoras dos epítopos imunogênicos selecionados *in silico* nas proteínas candidatas de *Babesia bovis* linhagem T2Bo.

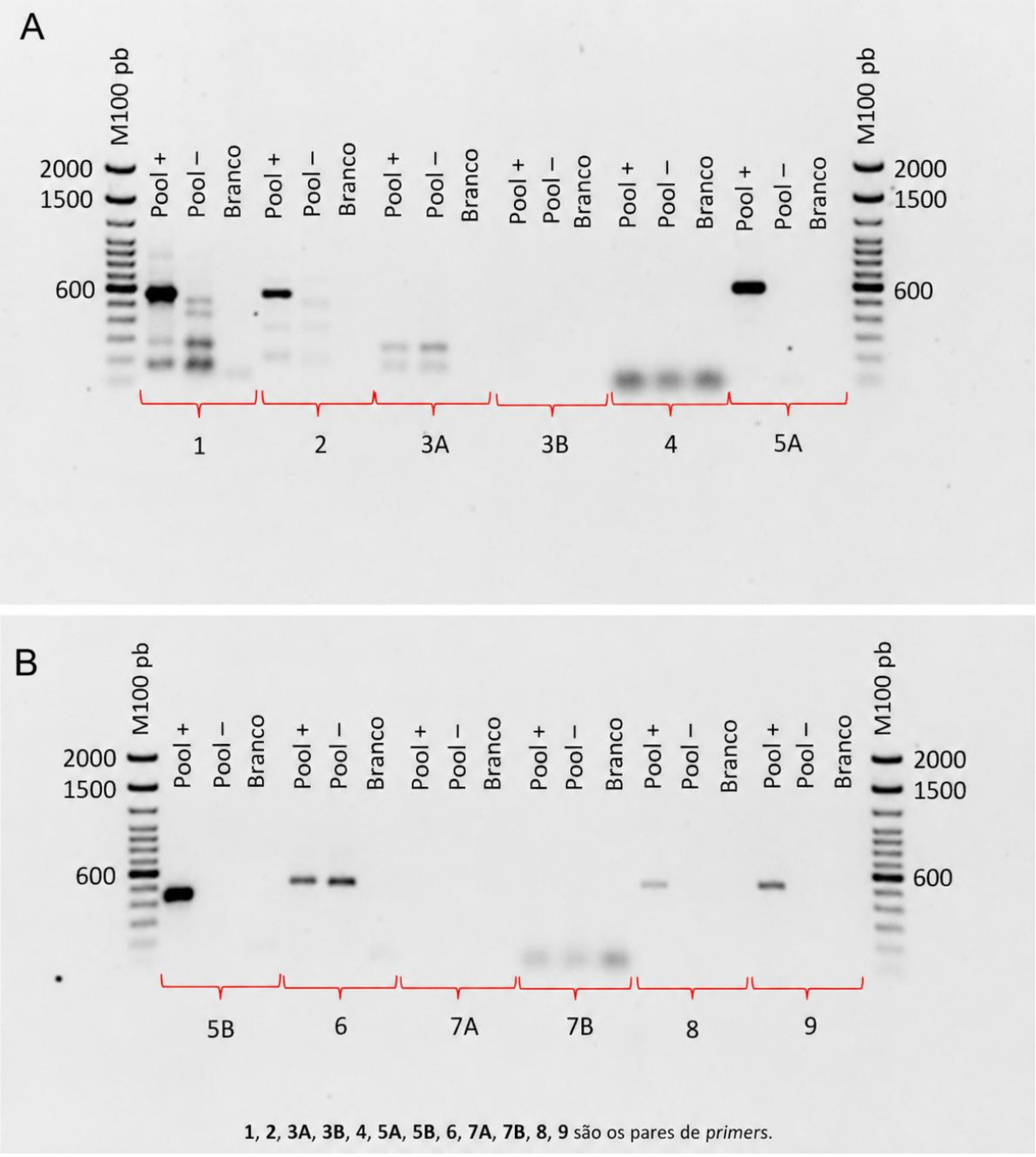
ID PAR	ID PROTEÍNA	ID GENE	*FORWARD*	*REVERSE*	*AMPLICON*
GN1	XP_051623602.1	BBOV_IV000215	caaattgaggtggtcgtgc	agcaatgtgggtagttgggt	561 pb
GN2	XP_001610297.1	BBOV_II007790	attggtgtccgcagtctctc	acagcatctccacattgcca	553 pb
GN3A	XP_001611131.1	BBOV_IV012110	aatgctgttgtacagaatccgt	agccattgccttctactgct	547 pb
GN3B	XP_001611131.1	BBOV_IV012110	accggtaaagttcgcagtgt	ggtgacctatgatgtcagtgca	508 pb
GN4	XP_051623085.1	BBOV_II000080	aacccctgagacaacagctg	gcacttgcagtattcggcag	588 pb
GN5A	XP_001609243.1	BBOV_IV000770	tcgagtggtggcactttgat	aacgtggtcggctacaacat	586 pb
GN5B	XP_001609243.1	BBOV_IV000770	atgttgtagccgaccacgtt	agctcacgcttgatgagacg	424 pb

ID PAR	ID PROTEÍNA	ID GENE	*FORWARD*	*REVERSE*	*AMPLICON*
GN6	XP_00160879 1.1	BBOV_I0 01390	tgcgatcactgat agaacaca	gctttattaaggtg cccttaggc	527 pb
GN7A	XP_00161036 5.2	BBOV_IV 004360	tccgtccgtaac cacgtttt	tgtgtatcgtgacg tagccg	588 pb
GN7B	XP_00161036 5.2	BBOV_IV 004360	cggctacgtcac gatacaca	tccgctggtattgt gtcgtt	302 pb
GN8	XP_05162337 3.1	BBOV_III 000070	tagagcactacc gcggataga	actccagtcaag ggatacaactg	501 pb
GN9	XP_00161003 5.1	BBOV_II0 05150	tgggggtactaa cctgtcga	tggaatgttgata cccgaccc	502 pb

Fonte: elaborada pela autora (2026).

A avaliação inicial dos 12 pares de *primers* desenhados para os nove genes candidatos de *B. bovis* revelou diferenças na eficiência e especificidade de amplificação (Figura 5). Amplificações compatíveis com o tamanho esperado foram observadas para os conjuntos GN2, GN5A, GN5B, GN8 e GN9. O par GN1 produziu uma banda correspondente ao tamanho previsto no *pool* positivo, porém acompanhada de bandas adicionais de diversos tamanhos, além de apresentar amplificação no *pool* negativo, sugerindo amplificação inespecífica. De forma semelhante, o par GN6 gerou produtos tanto nas amostras positivas quanto nas negativas. Já os pares GN3, GN4 e GN7 não produziram amplificações satisfatórias ou geraram produtos incompatíveis com os tamanhos esperados, sendo descartados das análises subsequentes.

Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir de DNA de *Babesia bovis*. (A) Produtos de amplificação dos genes GN1 a GN5A. (B) Produtos de amplificação dos genes GN5B a GN9. Os controles positivos (*Pool*+), negativo (*Pool*−) e branco estão indicados nos respectivos poços. M100 pb: marcador molecular de 100 pb (Promega Corporation, Madison, WI, EUA). Os números 1–9 correspondem aos conjuntos de *primers* dos tamanhos esperados dos *amplicons* estão apresentados na Tabela 3.



Fonte: elaborada pela autora (2026).

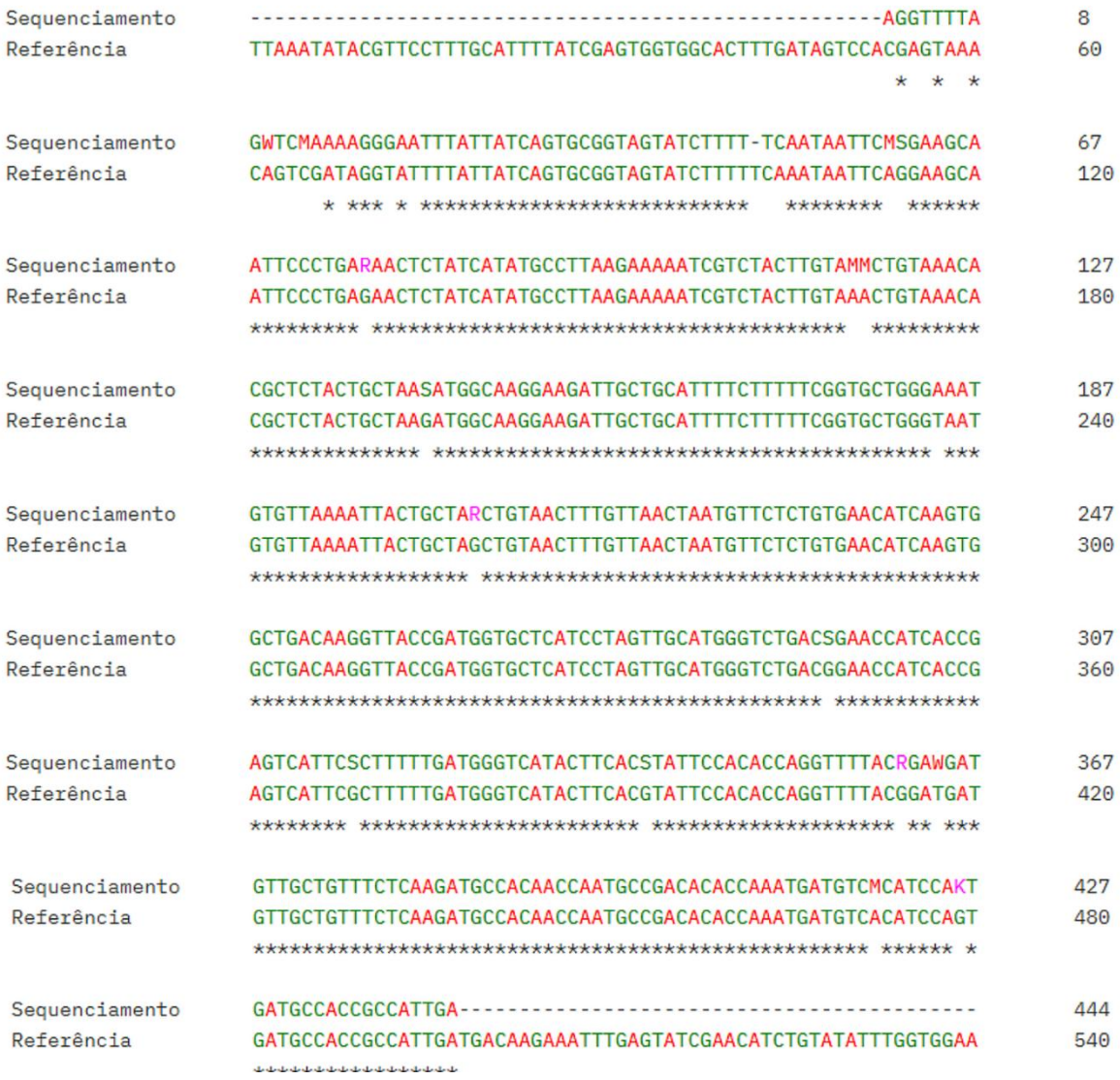
Na etapa seguinte, foram analisadas amostras individuais de animais previamente identificados como positivos para *B. bovis*. Os pares de *primers* GN5A e GN5B apresentaram o perfil de amplificação mais consistente e específico entre as amostras avaliadas e entre as repetições dos ensaios, sendo, por esse motivo, selecionados para o sequenciamento dos *amplicons*. Os demais pares de *primers* não apresentaram padrão de amplificação suficientemente consistente e específico para a obtenção de produtos adequados ao sequenciamento nas condições avaliadas. Dessa forma, a validação molecular por sequenciamento realizada neste estudo ficou restrita às regiões do gene BBOV_IV000770 abrangidas pelos pares GN5A e GN5B. A ausência de sequenciamento dos demais genes não permite inferir sobre a conservação de suas regiões correspondentes nos isolados brasileiros avaliados, nem justifica sua exclusão como candidatos para investigações futuras. Os produtos que apresentaram amplificação específica e tamanho compatível com o esperado foram submetidos ao sequenciamento pelo método de Sanger.

A qualidade das sequências obtidas foi inicialmente avaliada a partir dos respectivos eletroferogramas, considerando a definição dos picos, a presença de sobreposição entre sinais e a ocorrência de posições com bases ambíguas. As sequências consideradas adequadas foram então comparadas à sequência de referência da linhagem T2Bo de *B. bovis*. Entre os produtos analisados, apenas os *amplicons* obtidos com os pares GN5A e GN5B apresentaram concordância suficiente com a região correspondente da sequência de referência para confirmar sua identidade e prosseguir com a análise molecular. Os alinhamentos parciais das sequências obtidas para os *amplicons* GN5A e GN5B são apresentados nas Figuras 6 e 7, respectivamente.

Nos alinhamentos apresentados nas Figuras 6 e 7, observou-se predominância de identidades nucleotídicas entre as sequências obtidas e a sequência de referência do gene BBOV_IV000770, correspondente à proteína 5 (XP_001609243.1) da Tabela 2. No *amplicon* GN5A, a região analisada abrangeu segmentos do gene correspondentes aos epítopos 5.E1, 5.E2, 5.E3 e 5.E4, enquanto o *amplicon* GN5B contemplou a região correspondente ao epítopo 5.E5. Assim, os dois fragmentos sequenciados permitiram avaliar, em conjunto, as regiões codificadoras associadas aos cinco epítopos previamente selecionados na etapa de imunoinformática. A nomenclatura dos epítopos foi mantida conforme a identificação apresentada na

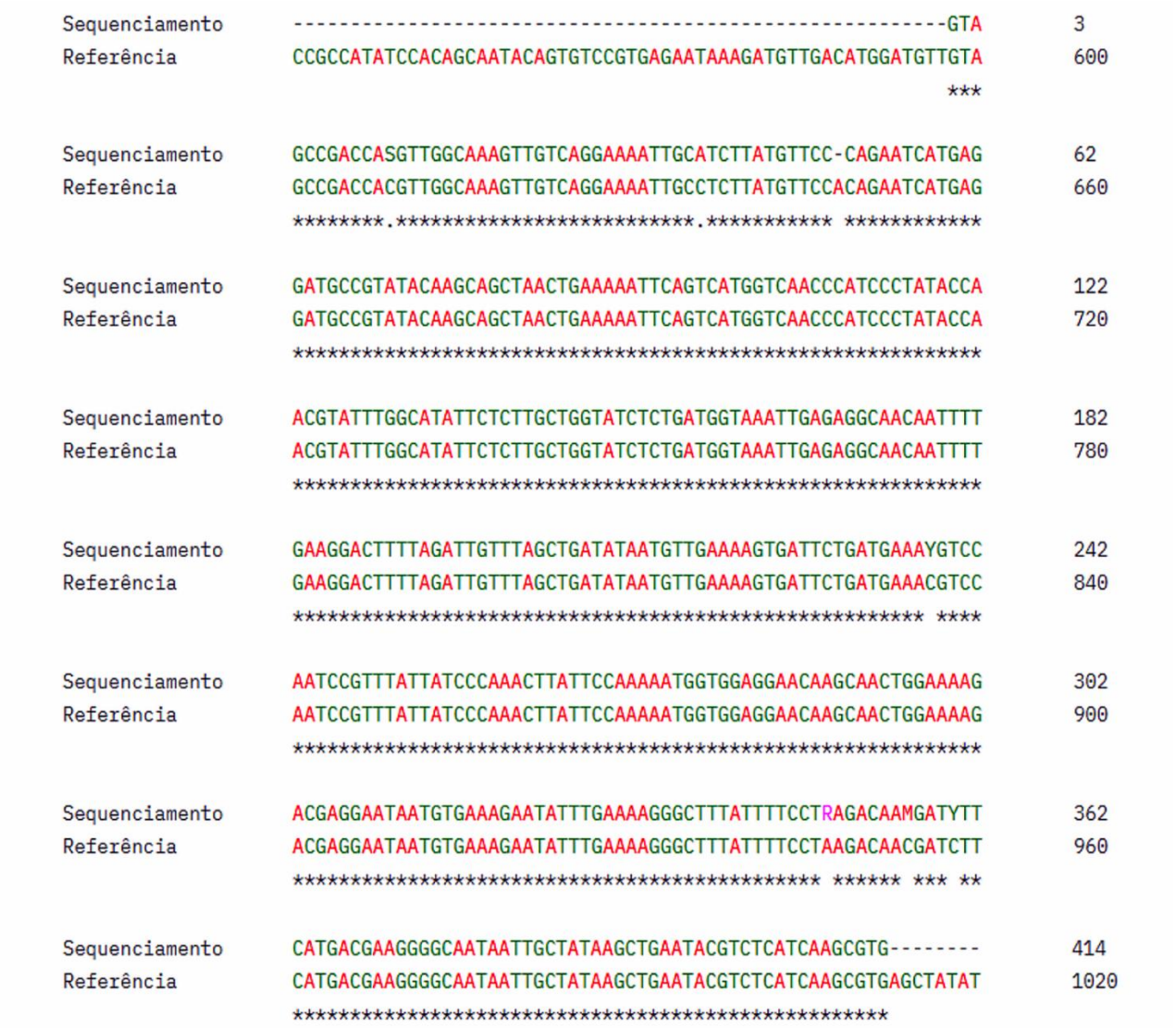
Tabela 2, permitindo relacionar diretamente os resultados da validação molecular aos candidatos previamente selecionados.

Figura 6 – Alinhamento parcial da sequência nucleotídica obtida por sequenciamento Sanger do amplicon GN5A com a sequência de referência do gene BBOV_IV000770 da linhagem T2Bo *Babesia bovis*. Os asteriscos indicam identidade entre os nucleotídeos das sequências alinhadas.



Fonte: elaborada pela autora (2026).

Figura 7 – Alinhamento parcial da sequência nucleotídica obtida por sequenciamento Sanger do amplicon GN5B com a sequência de referência do gene BBOV_IV000770 da linhagem T2Bo *Babesia bovis*. Os asteriscos indicam identidade entre os nucleotídeos das sequências alinhadas.



Fonte: elaborada pela autora (2026).

As posições em que foram identificadas bases ambíguas nas sequências obtidas estão representadas nas Figuras 6 e 7. Apesar dessas ambiguidades pontuais, os alinhamentos apresentaram ampla concordância com a sequência de referência nas regiões analisadas, sustentando a identidade dos fragmentos obtidos por PCR e sua correspondência ao gene BBOV_IV000770. As Figuras 6 e 7 apresentam, respectivamente, os alinhamentos dos *amplicons* GN5A e GN5B, nos quais os asteriscos indicam as posições de identidade entre as sequências alinhadas.

A concordância observada nas regiões analisadas fornece evidência experimental de conservação das sequências codificadoras dos cinco epítopos da proteína 5 nas duas amostras positivas avaliadas neste estudo. Esse resultado é relevante porque a seleção dos candidatos foi realizada a partir da sequência de referência da linhagem T2Bo de *B. bovis*. Entretanto, embora existam sequências de genes que codificam outros antígenos de *B. bovis* obtidas de isolados brasileiros de diferentes regiões e depositadas no *GenBank*, os registros identificados não correspondem ao gene *BBOV_IV000770*, impossibilitando a comparação direta dos epítopos aqui avaliados com essas sequências. Dessa forma, a conservação observada permanece restrita às amostras analisadas, não sendo possível extrapolá-la para a população de *B. bovis* no Brasil. A ampliação dessa avaliação dependerá do sequenciamento das regiões correspondentes ao gene *BBOV_IV000770* em amostras adicionais, provenientes de diferentes regiões geográficas. Futuramente, o sequenciamento do genoma de um isolado brasileiro, após o estabelecimento do cultivo *in vitro* do parasito, poderá ampliar a caracterização da diversidade genética nacional e permitir uma avaliação mais abrangente da conservação dos candidatos selecionados.

A conservação das regiões selecionadas constitui um critério relevante para a priorização de candidatos vacinais baseados em epítopos, uma vez que a ocorrência de variações nas sequências-alvo pode reduzir a correspondência entre diferentes variantes do parasito e, consequentemente, limitar sua aplicabilidade em populações mais heterogêneas. Essa questão é particularmente relevante em ensaios de proteção nos quais os animais são desafiados com linhagens heterólogas, uma vez que diferenças antigênicas entre a linhagem utilizada na imunização e a de desafio podem resultar em proteção reduzida ou insuficiente (Timms et al., 1988; Leroith et al., 2005). Nesse sentido, a utilização de uma sequência de referência para a seleção *in silico* deve ser acompanhada de validação experimental em amostras representativas da população-alvo. Essa necessidade já é considerada na própria estratégia adotada neste estudo, na qual as regiões codificadoras dos epítopos selecionados a partir da linhagem T2Bo de *B. bovis* foram posteriormente avaliadas em amostras brasileiras.

Entre as nove proteínas selecionadas na etapa de vacinologia reversa, a proteína 5 (XP_001609243.1), codificada pelo gene *BBOV_IV000770*, destacou-se

por reunir cinco dos epítopos candidatos identificados no presente estudo. Entretanto, essa proteína permanece classificada como não caracterizada na anotação disponível no NCBI, de modo que sua função molecular e eventual participação na interação parasito–hospedeiro ainda não estão estabelecidas. Assim, não é possível atribuir a conservação observada a uma função biológica específica. A priorização desse alvo decorreu dos critérios empregados na seleção *in silico*, da concentração de múltiplos epítopos candidatos em uma mesma proteína e da possibilidade de avaliar experimentalmente as regiões correspondentes. A análise molecular dos amplicons GN5A e GN5B permitiu investigar as regiões codificadoras dos cinco epítopos nas amostras brasileiras avaliadas, fornecendo evidência de conservação dessas regiões nos isolados analisados. A caracterização funcional da proteína e a ampliação da análise de conservação em amostras adicionais poderão esclarecer, futuramente, sua relevância biológica e seu potencial como alvo antigênico.

Considerando a conservação das regiões correspondentes aos cinco epítopos da proteína 5 nas amostras analisadas, foram priorizados para a primeira síntese química os epítopos 5.E2, 5.E3 e 5.E5, correspondentes aos peptídeos CNPGL-Bbovis-5E2, CNPGL-Bbovis-5E3 e CNPGL-Bbovis-5E5, respectivamente, com as alterações descritas na seção 4.4. As sequências são: VADKVTDGAHPSCMGLTEPSPSHSLFDG, QDATTNADTPNDVTSSDATAIDD e QKWWRNKQLEKTRNNVKEYLKRAL, respectivamente. A seleção desses três candidatos considerou, além da conservação das regiões gênicas confirmada experimentalmente, suas características físico-químicas, apresentadas na Tabela 2, bem como a necessidade de restringir inicialmente o número de candidatos a serem sintetizados, considerando os custos associados à síntese química e às etapas experimentais subsequentes. Assim, os epítopos 5.E2, 5.E3 e 5.E5 foram priorizados para síntese como peptídeos e posterior avaliação imunológica, enquanto os demais epítopos conservados da proteína permaneceram como candidatos para avaliações futuras.

5.3 ELISA

5.3.1 ELISA indireto utilizando peptídeos conjugados ao KLH

O ELISA indireto para avaliação da reatividade de IgG aos três peptídeos conjugados ao KLH foi padronizado pelo método de titulação *chessboard.* Foram avaliadas diferentes combinações de concentração antigênica e diluição sérica. Para

cada peptídeo, foram analisadas as respostas dos *pools* de soros positivo e negativo, em paralelo à avaliação do KLH isoladamente, permitindo comparar a reatividade de IgG observada para os conjugados com aquela atribuível à proteína carreadora. Os valores de absorbância bruta obtidos para os *pools* positivo e negativo nas diferentes condições avaliadas, incluindo os peptídeos conjugados ao KLH, o KLH isolado, controle sem antígeno e o controle sem soro estão apresentados no Apêndice B.

Em determinadas combinações de concentração antigênica e diluição sérica, foram observadas diferenças de reatividade entre os *pools* de soros positivo e negativo. Entretanto, esses padrões não se mostraram consistentes entre os ensaios realizados. Particularmente para o peptídeo CNPGL-Bbovis-5E2, as condições que apresentaram maior discriminação entre os *pools* em um ensaio não reproduziram o mesmo comportamento nas avaliações subsequentes.

Após a aplicação das correções descritas na metodologia, incluindo a subtração do branco da placa e das contribuições do antígeno e do soro isoladamente, a reatividade residual de IgG foi de baixa magnitude ou nula. Na comparação entre os peptídeos conjugados e o KLH isoladamente, utilizando as mesmas correções, não foi observada reatividade adicional consistente atribuível especificamente aos peptídeos. Para os três peptídeos avaliados, os valores residuais obtidos para os conjugados foram inferiores aos observados para o KLH isoladamente. Embora o KLH seja amplamente utilizado como proteína carreadora devido à sua elevada imunogenicidade, a reatividade observada nesse controle não permite, por si só, concluir que os soros analisados continham anticorpos específicos contra essa proteína. Em conjunto, esses resultados não forneceram evidências consistentes de reconhecimento de IgG atribuível aos peptídeos quando utilizados na forma conjugada.

Em conjunto, os resultados demonstraram que não foi possível identificar, para nenhum dos três peptídeos conjugados, uma condição experimental que apresentasse simultaneamente reatividade de IgG reprodutível e reatividade adicional atribuível especificamente ao peptídeo em relação ao KLH. A variabilidade observada entre os ensaios, associada à ausência de resposta residual superior àquela observada para a proteína carreadora, impossibilitou a definição de uma condição satisfatória para a continuidade das avaliações utilizando os peptídeos conjugados. Dessa forma, foi adotada uma nova estratégia experimental baseada na utilização dos peptídeos livres, sem a proteína carreadora.

5.3.2 ELISA indireto utilizando peptídeos livres

Após a ausência de uma condição experimental satisfatória para a avaliação da reatividade de IgG aos peptídeos utilizando os peptídeos conjugados ao KLH, a padronização do ELISA indireto foi realizada com os peptídeos livres. Para isso, foram utilizadas as placas Corning® Costar® 3590 High Binding e Nunc-Immuno™ MaxiSorp™, conforme o delineamento apresentado na Figura 4. Foram avaliadas cinco concentrações antigênicas, de 40 a 2,5 µg/mL, combinadas com sete diluições dos *pools* de soros positivo e negativo, de 1:50 a 1:3200. Os valores de absorbância bruta obtidos para os *pools* de soros positivo e negativo nas diferentes concentrações dos peptídeos livres, em ambas as placas, incluindo os controles sem antígeno e sem soro, estão apresentados no Apêndice C.

Na análise, ficou evidente que o *pool* de soros positivo apresentou elevado ruído de fundo (*background*), evidenciado pelos altos valores de absorbância observados mesmo na ausência de antígeno adsorvido na placa. Este ruído é dependente da quantidade de soro, uma vez que a absorbância diminuiu progressivamente com o aumento da diluição sérica. O *pool* de soros negativos também apresentou ligação inespecífica, porém em menor magnitude.

O elevado *background* observado nos ensaios pode estar relacionado à ligação de imunoglobulinas séricas a componentes do sistema de ELISA independentemente do reconhecimento específico dos peptídeos avaliados. Embora a etapa de bloqueio seja amplamente utilizada para reduzir a ligação inespecífica às superfícies da placa, sua contribuição para a redução da absorbância depende das características do ensaio. Carvalho et al. (2023), ao avaliarem um ELISA indireto para detecção de IgG bovina, não observaram diferenças significativas nos valores de absorbância entre condições com bloqueio por albumina sérica bovina (BSA), leite desnatado ou sem bloqueio. Além disso, Loeffler e Klaver (2017) descreveram que imunoglobulinas presentes no soro podem estabelecer ligações polivalentes, predominantemente de baixa afinidade, com diferentes componentes do ensaio, inclusive na presença de agentes bloqueadores. No presente estudo, a elevada absorbância nos poços sem antígeno adsorvido e sua redução progressiva com o aumento da diluição sérica são compatíveis com a contribuição de componentes séricos para o sinal de fundo. Entretanto, como o mecanismo responsável por essa reatividade não foi diretamente investigado, não é possível estabelecer sua origem específica. Assim, a ligação

polivalente de imunoglobulinas constitui uma hipótese para explicar parte do *background* observado, cuja magnitude limita a interpretação do reconhecimento sorológico dos peptídeos.

Após a subtração do branco da placa e das contribuições do peptídeo e do soro isoladamente, conforme descrito na metodologia, para o peptídeo CNPGL-Bbovis-5E2, os valores residuais foram próximos de zero ou negativos, não sendo observado um padrão consistente de reatividade de IgG associado à presença do peptídeo. Dessa forma, não foram obtidas evidências suficientes de reatividade humoral específica para justificar a inclusão do peptídeo CNPGL-Bbovis-5E2 na etapa de avaliação com amostras individuais.

Para o CNPGL-Bbovis-5E3, foram observadas respostas residuais no pool de soros positivos, em diferentes combinações de concentração antigênica e diluição sérica, porém de baixa magnitude. Na placa Corning® Costar® 3590 High Binding, os valores residuais permaneceram próximos de zero em grande parte das condições avaliadas. Na placa Nunc-Immuno™ MaxiSorp™, foram observadas respostas residuais relativamente maiores, particularmente nas diluições séricas de 1:100 e 1:200. Assim, a seleção da condição experimental não foi baseada exclusivamente na obtenção da maior magnitude de resposta, mas na identificação de uma condição que apresentasse maior razão entre as absorbâncias do pool positivo e pool negativo e que apresentasse reatividade residual detectável e, simultaneamente, permitisse minimizar a contribuição do fundo e do consumo de peptídeo e soro, favorecendo sua utilização na avaliação das amostras individuais.

Para o CNPGL-Bbovis-5E5, foram observadas respostas residuais de maior magnitude em comparação ao CNPGL-Bbovis-5E3, especialmente na placa Nunc-Immuno™ MaxiSorp™. Nessa placa, as maiores respostas foram observadas nas diluições séricas de 1:50 a 1:200, com valores residuais positivos em todas as concentrações antigênicas avaliadas nessa faixa de diluição. Embora também não tenha sido observada uma relação linear entre concentração antigênica e magnitude da resposta, o CNPGL-Bbovis-5E5 apresentou o perfil de reatividade no *pool* positivo mais evidente entre os três peptídeos avaliados. Assim como observado para o CNPGL-Bbovis-5E3, a seleção da condição para a avaliação das amostras individuais considerou conjuntamente a razão (*pool* postivo/*pool* negativo), a presença de reatividade residual detectável, a contribuição do fundo e a adequação da condição

para o uso racional de peptídeo e soro, e não apenas a maior magnitude de resposta observada.

Considerando conjuntamente a magnitude das respostas residuais, a comparação entre as placas e a necessidade de utilizar uma condição que permitisse detectar reatividade sem aumentar desnecessariamente o consumo de peptídeo e soro, foram selecionadas a concentração de 20 µg/mL e a diluição sérica de 1:200 para a avaliação das amostras individuais dos peptídeos CNPGL-Bbovis-5E3 e CNPGL-Bbovis-5E5.

Em conjunto, a padronização com os peptídeos livres demonstrou diferenças entre os candidatos quanto à magnitude e à consistência da reatividade residual de IgG após as correções. O CNPGL-Bbovis-5E2 não apresentou reatividade residual consistente, enquanto os CNPGL-Bbovis-5E3 e CNPGL-Bbovis-5E5 apresentaram reatividade detectável, sendo o CNPGL-Bbovis-5E5 aquele que apresentou maior magnitude de resposta nas condições avaliadas. Com base nesses resultados, os CNPGL-Bbovis-5E3 e CNPGL-Bbovis-5E5 foram selecionados para a etapa subsequente de avaliação da reatividade de IgG em amostras individuais.

A ausência de resposta residual consistente para o CNPGL-Bbovis-5E2, mesmo após as correções aplicadas, indicou que não havia evidência experimental suficiente de reatividade específica nas condições avaliadas para justificar sua progressão para a etapa de análise individual.

5.3.3 Avaliação da reatividade sorológica de amostras individuais

A avaliação da reatividade humoral de IgG aos peptídeos CNPGL-Bbovis-5E3 e CNPGL-Bbovis-5E5 foi realizada utilizando a concentração de 20 µg/mL de peptídeo e a diluição sérica de 1:200, selecionadas na etapa de padronização. As amostras foram analisadas em triplicata e as absorbâncias foram corrigidas pela subtração do fundo da placa. A reatividade das amostras individuais foi posteriormente expressa como porcentagem de positividade (PP), tendo como referência a resposta do *pool* de soros positivos submetido à diluição seriada.

Para cada peptídeo, foi construída uma curva de referência a partir das médias das absorbâncias corrigidas do *pool* positivo nas diferentes diluições séricas. A relação entre absorbância e porcentagem de positividade foi ajustada por regressão exponencial. As equações obtidas foram utilizadas para estimar a porcentagem de

positividade das amostras individuais a partir das respectivas médias das absorbâncias corrigidas.

As porcentagens de positividade obtidas para as amostras individuais apresentaram ampla variação entre os animais previamente classificados como positivos para *B. bovis* (Benavides; Sacco, 2007), indicando diferentes magnitudes de reatividade de IgG aos peptídeos avaliados. Para o CNPGL-Bbovis-5E3, foram observadas respostas desde valores próximos a 10% até valores superiores a 100%. Para o CNPGL-Bbovis-5E5, também foi observada heterogeneidade entre as amostras, com respostas variando desde valores próximos a 8–10% até valores superiores a 100% de positividade (Tabela 4). Para complementar a avaliação da reatividade humoral, foram determinados os *cut-offs* para os peptídeos CNPGL-Bbovis-5E3 e CNPGL-Bbovis-5E5 a partir das absorbâncias das amostras de referência negativas. As amostras com absorbância superior ao respectivo *cut-off* foram classificadas como reativas, enquanto aquelas com valores iguais ou inferiores foram classificadas como não reativas (Tabela 4).

Tabela 4 – Porcentagem de positividade e classificação das amostras individuais segundo o *cut-off* calculado para os peptídeos CNPGL-Bbovis-5E3 e CNPGL-Bbovis-5E5.

Diagnóstico	Animais	PP CNPGL-Bbovis-5E3	*Cut-off* CNPGL-Bbovis-5E3	PP CNPGL-Bbovis-5E5	*Cut-off* CNPGL-Bbovis-5E5
Positivo	903	10,926	Não reativo	10,083	Não reativo
Positivo	912	10,464	Não reativo	8,653	Não reativo
Positivo	916	11,646	Não reativo	7,340	Não reativo
Positivo	2258	86,195	Reativo	107,300	Reativo
Positivo	2276	74,167	Reativo	85,910	Reativo
Positivo	2279	16,500	Reativo	15,326	Reativo
Positivo	2418	300,220	Reativo	751,211	Reativo

Diagnóstico	Animais	PP CNPGL-Bbovis-5E3	*Cut-off* CNPGL-Bbovis-5E3	PP CNPGL-Bbovis-5E5	*Cut-off* CNPGL-Bbovis-5E5
Positivo	2517	20,673	Reativo	25,921	Reativo
Positivo	2572	20,957	Reativo	45,124	Reativo
Positivo	2690	37,971	Reativo	69,383	Reativo
Positivo	3127	71,026	Reativo	146,563	Reativo
Positivo	3824	12,469	Não reativo	12,130	Não reativo
Negativo	3800	11,514	Não reativo	10,025	Não reativo
Negativo	3817	10,488	Não reativo	7,844	Não reativo
Negativo	3903	12,413	Não reativo	10,901	Não reativo
Negativo	3925	11,077	Não reativo	9,656	Não reativo
Negativo	Pool -	11,646	Não reativo	9,300	Não reativo

PP: porcentagem de positividade.

Fonte: elaborada pela autora (2026).

A classificação segundo o *cut-off* foi realizada independentemente da porcentagem de positividade, permitindo avaliar, de forma complementar, a presença de reatividade acima do limite estabelecido a partir das amostras de referência negativas. Dos 12 animais previamente classificados como positivos para *B. bovis*, oito (66,7%) apresentaram reatividade aos peptídeos CNPGL-Bbovis-5E3 e CNPGL-Bbovis-5E5, enquanto quatro (33,3%) não apresentaram reatividade a nenhum dos dois candidatos (Tabela 4). O padrão de classificação foi idêntico para ambos os peptídeos, com as mesmas oito amostras classificadas como reativas e as mesmas quatro como não reativas. Entre as quatro amostras previamente classificadas como negativas, nenhuma apresentou reatividade aos peptídeos CNPGL-Bbovis-5E3 e CNPGL-Bbovis-5E5.

Considerando a classificação utilizada como referência, a sensibilidade estimada foi de 66,7% e a especificidade de 100,0%. Esses valores devem ser

interpretados com cautela devido ao reduzido número de amostras avaliadas, particularmente ao pequeno número de amostras negativas. Embora a reatividade sorológica observada para os peptídeos CNPGL-Bbovis-5E3 e CNPGL-Bbovis-5E5 indique a possibilidade de investigá-los como componentes antigênicos de ensaios imunodiagnósticos, os resultados obtidos ainda não permitem estabelecer sua adequação para essa finalidade. A sensibilidade observada, o número reduzido de amostras negativas e a utilização dessas amostras para a determinação dos pontos de corte limitam a interpretação do desempenho diagnóstico. Assim, a avaliação de sua possível aplicação em testes diagnósticos dependeria de estudos adicionais de validação, utilizando painéis maiores e independentes de amostras positivas e negativas, incluindo a investigação de possíveis reações cruzadas com outros hemoparasitos (WOAH, 2023).

A presença de animais previamente classificados como positivos que não apresentaram reatividade aos peptídeos era esperada, uma vez que a classificação como positivo para *B. bovis* não implica necessariamente o reconhecimento de todos os antígenos ou epítopos derivados do parasito. No estudo sobre a origem das amostras, Benavides e Sacco (2007) avaliaram a resposta de bovinos de *Bos taurus* após o desafio com *B. bovis* e demonstraram a existência de diferentes fenótipos de resposta à infecção, incluindo animais suscetíveis, intermediários e resistentes. A classificação dos animais resistentes, por exemplo, incluía a presença de *B. bovis* em esfregaços sanguíneos mesmo na ausência de sinais clínicos, evidenciando que a presença do parasito e a manifestação da doença não são necessariamente acompanhadas por respostas fenotípicas uniformes.

Nesse contexto, a ausência de reatividade aos CNPGL-Bbovis-5E3 e CNPGL-Bbovis-5E5 em quatro dos animais classificados como positivos não deve ser interpretada como ausência de resposta imunológica contra *B. bovis*, mas como ausência de reconhecimento detectável das sequências específicas avaliadas nas condições empregadas no ELISA. Resultados semelhantes foram observados em estudos de malária, nos quais a frequência de reconhecimento de proteínas recombinantes foi, em algumas situações, superior à observada para peptídeos sintéticos correspondentes, indicando que a resposta humoral contra um antígeno não necessariamente se distribui de forma uniforme entre seus diferentes epítopos (Rodolphi et al., 2024). CNPGL-Bbovis-5E3 e CNPGL-Bbovis-5E5 correspondem a regiões específicas de uma única proteína e representam, portanto, apenas uma

pequena fração do repertório antigênico do parasito. A resposta humoral desenvolvida durante a infecção pode variar entre os animais e ser direcionada a diferentes antígenos e epítopos, de modo que a ausência de reatividade a um determinado epítopo não exclui o reconhecimento de outras regiões antigênicas da mesma proteína ou de outros componentes de *B. bovis*.

A heterogeneidade observada entre os animais evidencia que o reconhecimento dos epítopos avaliados não ocorreu de forma uniforme entre os indivíduos expostos a *B. bovis*. No presente estudo, os epítopos CNPGL-Bbovis-5E3 e CNPGL-Bbovis-5E5 apresentaram um padrão coincidente de reconhecimento, com oito dos 12 animais classificados como positivos apresentando reatividade aos dois candidatos e quatro não apresentando reatividade a nenhum deles. Essa coincidência pode estar relacionada ao fato de os dois epítopos pertencerem à mesma proteína, de modo que indivíduos que desenvolveram resposta humoral contra essa proteína poderiam apresentar maior probabilidade de reconhecer mais de uma de suas regiões antigênicas. Entretanto, o reconhecimento observado não permite afirmar que os animais não reativos aos peptídeos não apresentavam resposta imunológica contra *B. bovis*, uma vez que os candidatos correspondem a apenas duas regiões específicas de uma única proteína e representam uma pequena fração do repertório antigênico do parasito. Dessa forma, a reatividade aos CNPGL-Bbovis-5E3 e CNPGL-Bbovis-5E5 deve ser interpretada como evidência de reconhecimento humoral dessas sequências específicas nas condições avaliadas, e não como medida direta da presença ou ausência de infecção.

5.4 ENSAIO DE ATIVIDADE METABÓLICA CELULAR POR REDUÇÃO DE RESAZURINA

5.4.1 Peptídeos conjugados com KLH

Após a avaliação da reatividade de IgG aos peptídeos, foi avaliado o efeito dos peptídeos sobre a atividade metabólica de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de bovinos previamente expostos a *B. bovis*, por infecção natural, detectada por PCR em tempo real. Essa abordagem permitiu complementar a caracterização experimental dos epítopos previamente selecionados por estratégias de vacinologia reversa, considerando que respostas humorais e celulares podem apresentar padrões distintos após a exposição a antígenos de *B. bovis* (Orinda et al., 1992; Jaramillo Ortiz et al., 2019). Especificamente, buscou-se investigar se a

exposição das PBMCs aos peptídeos selecionados, em diferentes concentrações e tempos de incubação, modificaria sua atividade metabólica em relação às culturas não estimuladas e, no caso dos peptídeos conjugados, aos controles contendo apenas KLH.

A atividade metabólica celular foi estimada pelo ensaio de redução da resazurina, que permite avaliar indiretamente o metabolismo celular por meio da conversão da resazurina em resorufina. Dessa forma, alterações na redução da resazurina podem refletir tanto aumento quanto diminuição da atividade metabólica da cultura, podendo estar associadas à ativação celular, proliferação ou redução da viabilidade celular. Entretanto, esses processos não podem ser distinguidos exclusivamente por esse ensaio (O'Brien et al., 2000; Lavogina et al., 2022; Vieira-da-Silva; Castanho, 2023).

Os peptídeos CNPGL-Bbovis-5E2, CNPGL-Bbovis-5E3 e CNPGL-Bbovis-5E5, derivados da proteína predita XP_001609243.1, correspondente ao gene BBOV_IV000770, e conjugados à KLH, foram utilizados para estimular as PBMCs. Como os peptídeos foram sintetizados conjugados ao KLH na proporção de 1:1, cada tratamento foi comparado ao respectivo grupo contendo apenas KLH em concentração equivalente como controle. Esse delineamento permitiu comparar a atividade metabólica observada na presença dos peptídeos conjugados com aquela observada na presença do KLH isolado, permitindo avaliar se eventuais diferenças estavam associadas à presença dos peptídeos.

O coquetel contendo PMA e ionomicina foi utilizado como controle positivo de ativação celular, enquanto o Triton X-100 foi utilizado como controle de morte celular. A inclusão do controle com Triton X-100 também forneceu uma condição de baixa atividade metabólica para a interpretação do ensaio, considerando que a resazurina pode ser reduzida por diferentes sistemas metabolicamente ativos, incluindo microrganismos.

Para os peptídeos CNPGL-Bbovis-5E2 (Figura 8) e CNPGL-Bbovis-5E5 (Figura 10), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados com os peptídeos conjugados e os respectivos controles contendo apenas KLH em nenhuma das concentrações ou tempos de incubação avaliados. Em todas as comparações, a concentração de KLH utilizada como controle correspondeu à metade da concentração nominal do peptídeo–KLH, considerando a proporção de 1:1 em massa utilizada na preparação dos conjugados. Dessa forma, a comparação

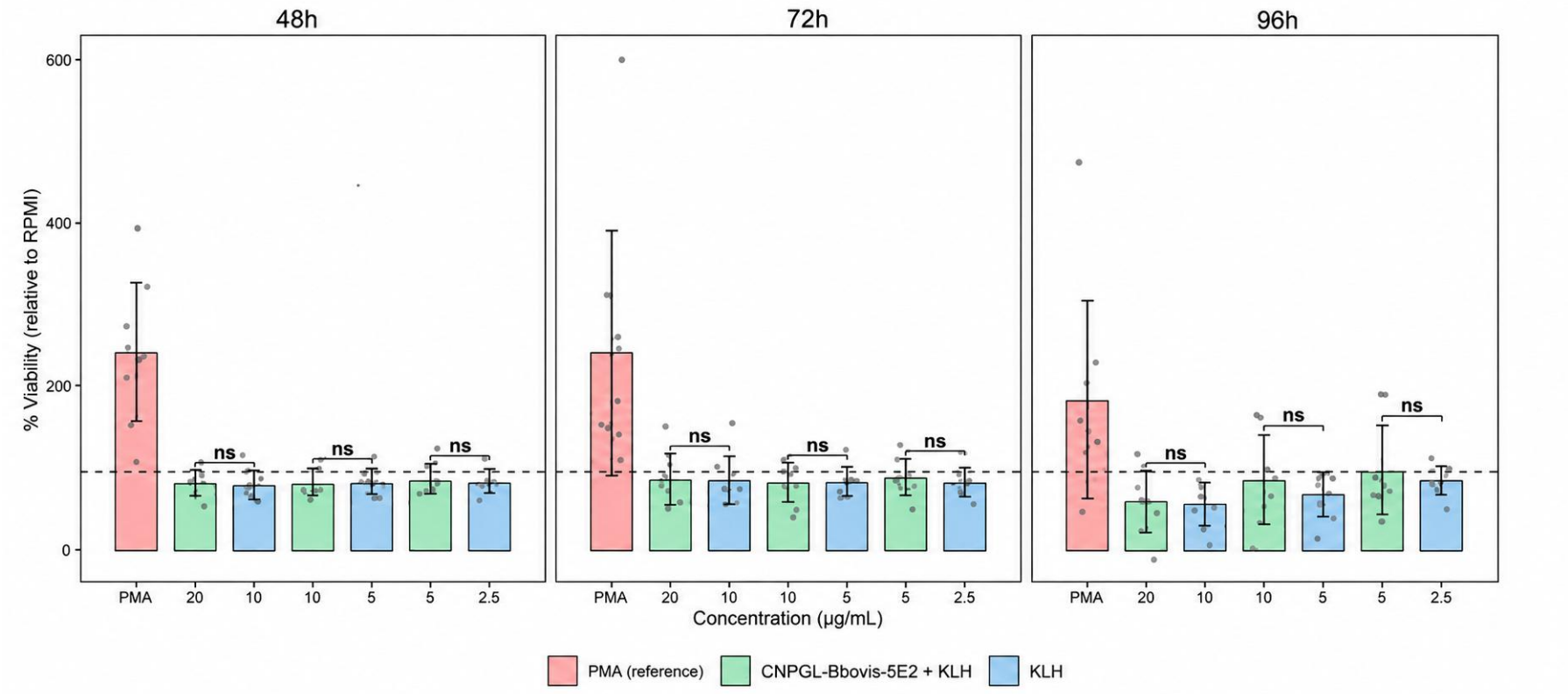
foi estabelecida com base na equivalência nominal de massa da proteína carreadora, e não na equivalência molar entre os componentes. Os perfis de atividade metabólica permaneceram semelhantes entre os tratamentos, não sendo detectadas diferenças na atividade metabólica das PBMCs entre os peptídeos CNPGL-Bbovis-5E2 e CNPGL-Bbovis-5E5 conjugados ao KLH e os respectivos controles contendo apenas KLH nas condições avaliadas.

De forma semelhante, a maioria das comparações realizadas para o peptídeo CNPGL-Bbovis-5E3 não apresentou diferenças significativas após a correção para múltiplas comparações. Apenas a condição correspondente ao peptídeo CNPGL-Bbovis-5E3 na concentração de 5 µg/mL, comparada ao grupo tratado com KLH na concentração de 2,5 µg/mL após 96 horas de incubação, permaneceu estatisticamente significativa após o ajuste pelo método de Holm (p ajustado = 0,0162), sendo observada atividade metabólica superior à do grupo tratado apenas com KLH (Figura 9). Embora a comparação tenha considerado a equivalência nominal de massa de KLH entre os tratamentos, a diferença observada não permite atribuir isoladamente o aumento da atividade metabólica à presença do peptídeo, uma vez que possíveis efeitos relacionados à composição e à conjugação com a proteína carreadora não podem ser completamente excluídos. Adicionalmente, outras comparações apresentaram valores de p inferiores a 0,05 antes da correção, mas essas diferenças não permaneceram significativas após o ajuste para múltiplas comparações.

Em conjunto, os resultados demonstraram que a atividade metabólica das PBMCs na presença dos peptídeos conjugados foi, de modo geral, semelhante à observada na presença do KLH isolado. Considerando que apenas uma das 27 comparações realizadas permaneceu estatisticamente significativa após a correção para múltiplas comparações, não foram identificadas evidências consistentes de que a presença dos peptídeos conjugados promovesse alterações na atividade metabólica das PBMCs em relação aos respectivos controles contendo KLH isolado. Dessa forma, nas condições experimentais avaliadas, os resultados não permitiram demonstrar um efeito metabólico específico e consistente associado aos peptídeos conjugados, tampouco estabelecer conclusões sobre sua capacidade de induzir proliferação celular ou sobre a ausência de citotoxicidade. Esse padrão sugeriu que a contribuição da proteína carreadora poderia dificultar a identificação de diferenças específicas associadas aos peptídeos. Diante desse cenário, foi realizado um

segundo ensaio empregando os peptídeos em sua forma livre, com o objetivo de minimizar a contribuição da proteína carreadora e avaliar de forma mais específica seus efeitos sobre a atividade metabólica das PBMCs.

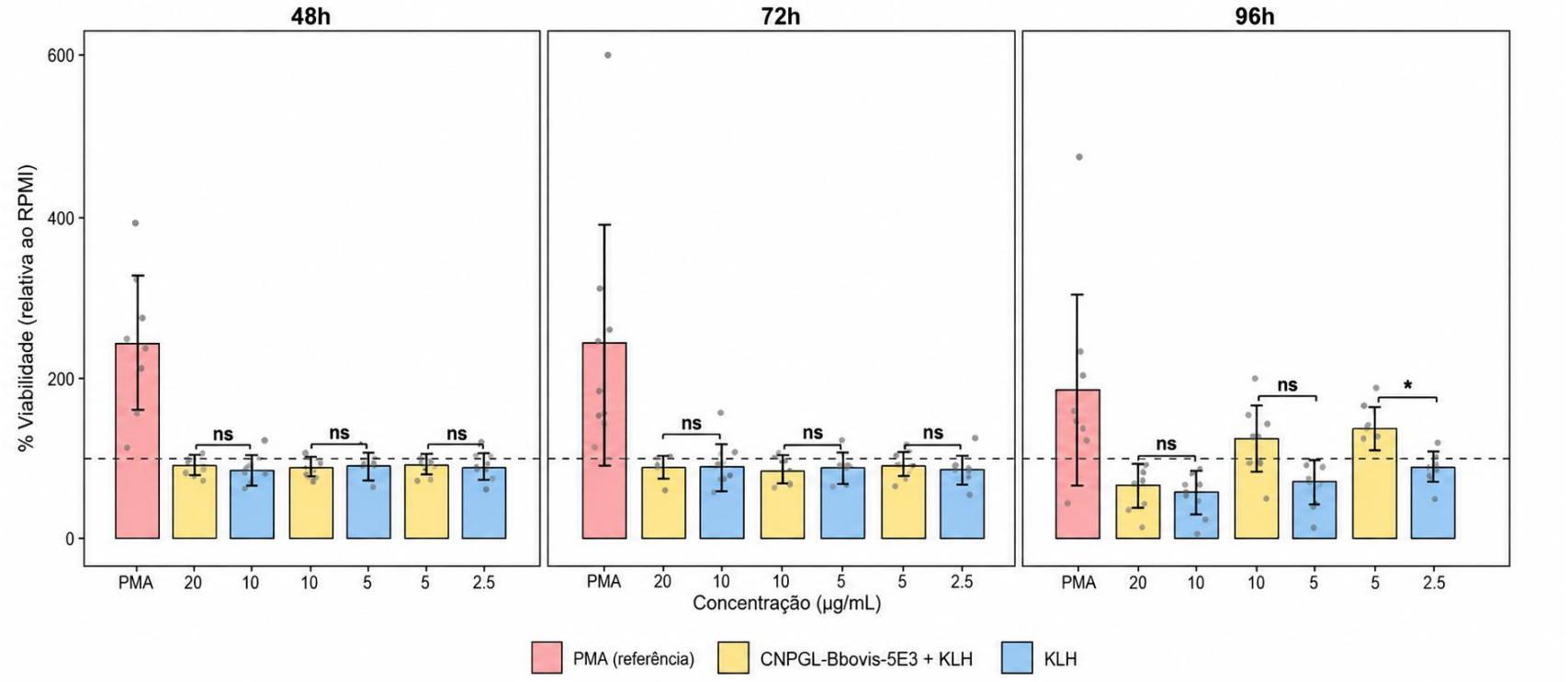
Figura 8 – Atividade metabólica relativa de PBMCs estimuladas com o peptídeo CNPGL-Bbovis-5E2 conjugado ao KLH e com KLH isolado, em diferentes concentrações (20, 10, 5 e 2,5 µg/mL) e tempos de incubação (48, 72 e 96 h). Resultados expressos em relação ao controle RPMI (100%, linha tracejada), média ± desvio-padrão (n = 9). PMA: controle positivo, apresentado apenas como referência visual e não incluído nas comparações estatísticas. Barras horizontais indicam comparações entre os grupos CNPGL-Bbovis-5E2 + KLH e KLH.



ns: não significativo.

Fonte: elaborada pela autora (2026)

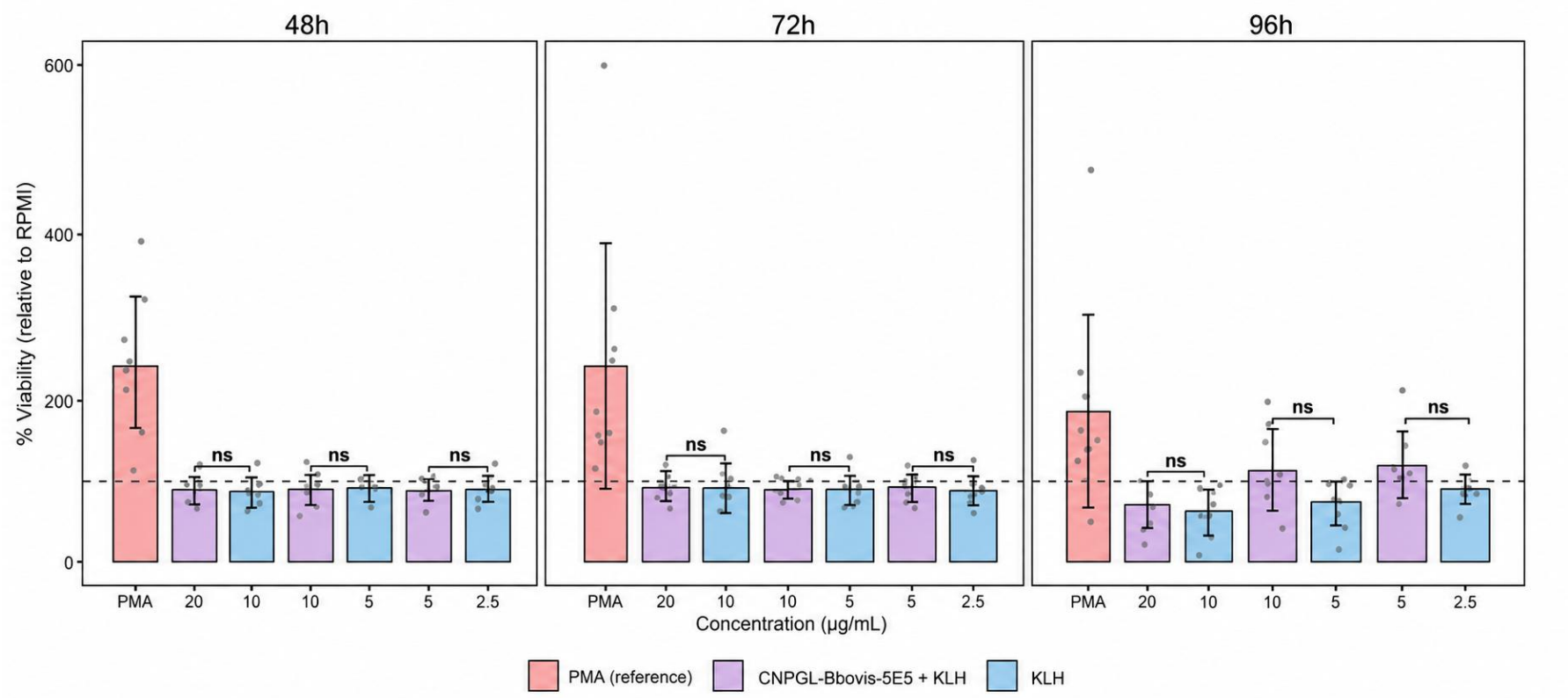
Figura 9 – Atividade metabólica relativa de PBMCs estimuladas com o peptídeo CNPGL-Bbovis-5E3 conjugado ao KLH e com KLH isolado, em diferentes concentrações (20, 10, 5 e 2,5 µg/mL) e tempos de incubação (48, 72 e 96 h). Resultados expressos em relação ao controle RPMI (100%, linha tracejada), média ± desvio-padrão (n = 9). PMA: controle positivo, apresentado apenas como referência visual e não incluído nas comparações estatísticas. Barras horizontais indicam comparações entre os grupos CNPGL-Bbovis-5E3 + KLH e KLH.



ns: não significativo; *: p ajustado < 0,05.

Fonte: elaborada pela autora (2026)

Figura 10 – Atividade metabólica relativa de PBMCs estimuladas com o peptídeo CNPGL-Bbovis-5E5 conjugado ao KLH e com KLH isolado, em diferentes concentrações (20, 10, 5 e 2,5 µg/mL) e tempos de incubação (48, 72 e 96 h). Resultados expressos em relação ao controle RPMI (100%, linha tracejada), média ± desvio-padrão (n = 9). PMA: controle positivo, apresentado apenas como referência visual e não incluído nas comparações estatísticas. Barras horizontais indicam comparações entre os grupos CNPGL-Bbovis-5E5 + KLH e KLH.



ns: não significativo.

Fonte: elaborada pela autora (2026)

5.4.2 Peptídeos livres

Nesse novo ensaio, foram avaliados os efeitos da concentração e do tempo de incubação sobre a atividade metabólica de PBMCs estimuladas com cada peptídeo em sua forma livre. A análise por *Aligned Rank Transform* (ART) demonstrou que os três peptídeos apresentaram perfis distintos de atividade metabólica das PBMCs em função da concentração e do tempo de incubação (Figura 11).

Para CNPGL-Bbovis-5E2, foi observado efeito significativo da concentração (F = 3,26; p = 0,0450), sem efeito significativo do tempo de incubação (p = 0,0771) ou da interação entre concentração e tempo (p = 0,6450). Entretanto, as comparações múltiplas realizadas pelo procedimento ART-C não identificaram diferenças significativas entre as concentrações após o ajuste pelo método de Holm. Assim, embora tenha sido identificado efeito global da concentração, não foi possível estabelecer, a partir das comparações pareadas ajustadas, quais concentrações diferiram entre si. Dessa forma, os resultados não permitem caracterizar uma relação dose-resposta específica para o CNPGL-Bbovis-5E2 nas condições avaliadas.

Para o CNPGL-Bbovis-5E3, foram observados efeitos significativos tanto da concentração (F = 6,26; p = 0,0033) quanto do tempo de incubação (F = 4,66; p = 0,0130), sem interação significativa entre esses fatores (p = 0,2220). As comparações pareadas evidenciaram diferenças associadas à concentração, com maior atividade metabólica nas concentrações de 20 µg/mL e 10 µg/mL em relação à concentração de 5 µg/mL (p = 0,0035 e p = 0,0266, respectivamente), enquanto não foi observada diferença estatisticamente significativa entre 20 e 10 µg/mL. Em relação ao tempo de incubação, verificou-se maior atividade metabólica após 96 horas quando comparado a 48 horas (p = 0,0114), não sendo observadas diferenças significativas entre 48 e 72 horas ou entre 72 e 96 horas. Esse resultado indica aumento da atividade metabólica no período de 96 horas em relação a 48 horas, sem evidência de diferenças estatisticamente significativas entre os intervalos intermediários avaliados.

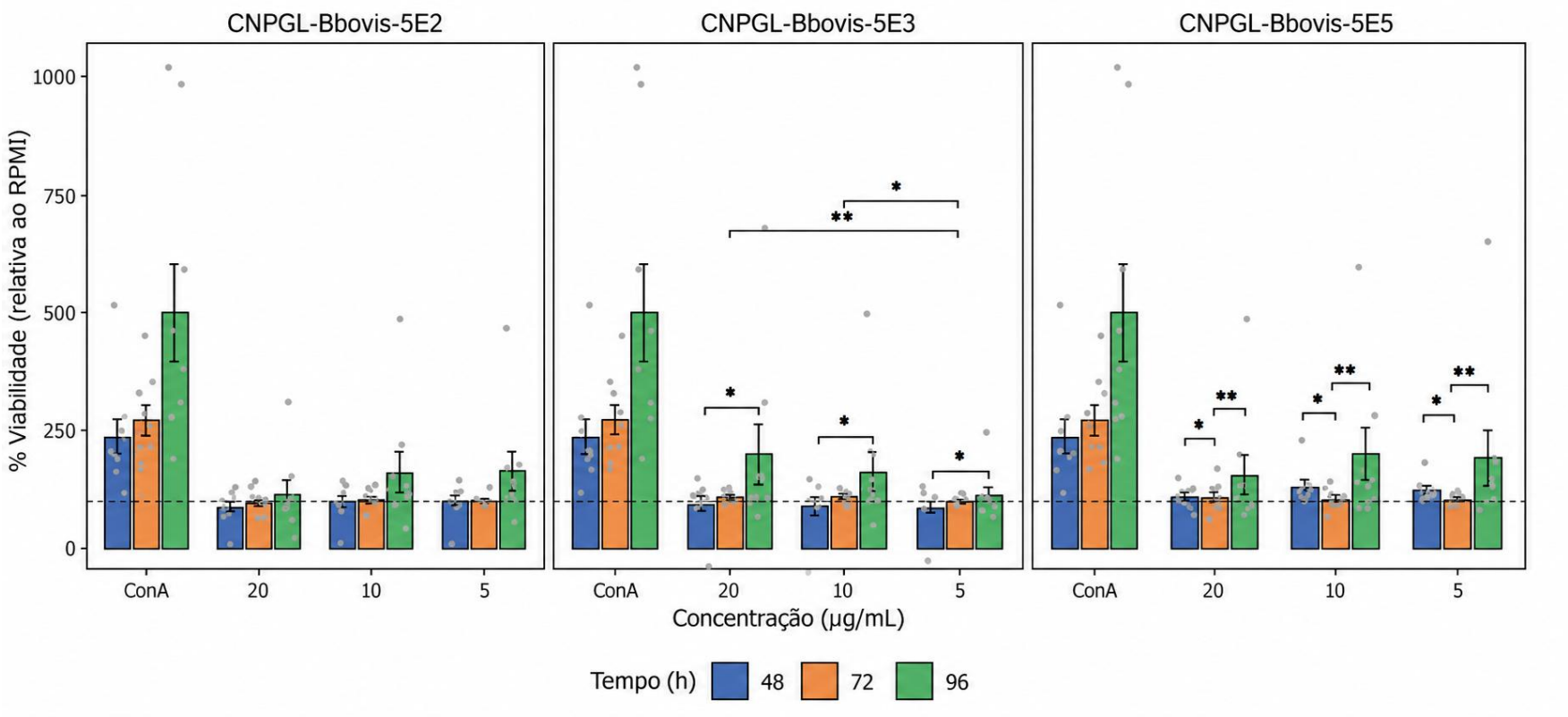
Para o peptídeo CNPGL-Bbovis-5E5, apenas o tempo de incubação influenciou significativamente a atividade metabólica das PBMCs (F = 6,50; p = 0,0027), não sendo observados efeitos significativos da concentração (p = 0,0863) ou da interação entre concentração e tempo (p = 0,5378). As comparações múltiplas evidenciaram diferenças significativas entre 48 e 72 horas (p = 0,0310) e entre 72 e 96 horas (p = 0,0025), enquanto não foi observada diferença entre 48 e 96 horas. Esses resultados indicam que, para CNPGL-Bbovis-5E5, as diferenças observadas na atividade

metabólica estiveram associadas ao tempo de incubação, enquanto a variação da concentração entre 5 e 20 µg/mL não produziu efeito estatisticamente detectável nas condições avaliadas.

De modo geral, não foram identificadas interações estatisticamente significativas entre concentração e tempo de incubação para nenhum dos peptídeos avaliados. Dessa forma, os efeitos principais desses fatores foram interpretados separadamente, uma vez que não houve evidência estatística de que o efeito da concentração sobre a atividade metabólica dependesse do tempo de incubação, ou vice-versa, nas condições experimentais estudadas. Entre os três candidatos, CNPGL-Bbovis-5E3 apresentou o perfil mais consistente de atividade metabólica, com efeitos significativos tanto da concentração quanto do tempo de incubação e diferenças identificadas nas comparações pareadas após o ajuste para múltiplas comparações. O peptídeo CNPGL-Bbovis-5E2 apresentou apenas efeito global da concentração, sem diferenças significativas entre as concentrações após o ajuste, enquanto o CNPGL-Bbovis-5E5 apresentou efeito significativo exclusivamente do tempo de incubação. Em conjunto, esses resultados demonstram que a utilização dos peptídeos em sua forma livre permitiu caracterizar diferenças nos perfis de atividade metabólica das PBMCs entre os três candidatos, em contraste com a baixa capacidade de discriminação observada entre os peptídeos conjugados ao KLH e os respectivos controles.

Apesar das diferenças observadas entre os candidatos, os resultados devem ser interpretados considerando que a redução da resazurina constitui uma medida indireta da atividade metabólica celular. Assim, as alterações detectadas não permitem determinar isoladamente se decorreram de ativação celular, proliferação, alterações metabólicas associadas ao estado funcional das células ou mudanças na viabilidade celular. Dessa forma, o maior efeito observado para o CNPGL-Bbovis-5E3 indica maior modulação da atividade metabólica nas condições avaliadas, mas não constitui, isoladamente, evidência de proliferação celular específica.

Figura 11 – Atividade metabólica relativa de PBMCs estimuladas com os peptídeos livres CNPGL-Bbovis-5E2, CNPGL-Bbovis-5E3 e CNPGL-Bbovis-5E5 em diferentes concentrações (20, 10 e 5 µg/mL) e diferentes tempos de incubação (48, 72 e 96 h). Resultados expressos em relação ao controle RPMI (100%, linha tracejada), média ± desvio-padrão (n = 9). ConA: controle positivo, apresentado apenas como referência visual e não incluído nas comparações estatísticas. Barras horizontais indicam comparações entre concentrações.



ns: não significativo; *: p ajustado < 0,05; **: p ajustado < 0,01.

Fonte: elaborada pela autora (2026)

5.4.3 Discussão integrada dos ensaios de atividade metabólica

Os resultados obtidos demonstraram que a forma de apresentação dos peptídeos influenciou diretamente a interpretação de seus efeitos sobre a atividade metabólica das PBMCs. No primeiro ensaio, os peptídeos foram avaliados conjugados à proteína carreadora KLH, tendo sido incluído o KLH isoladamente como controle para verificar a contribuição do carreador sobre a resposta celular. Essa comparação mostrou, de modo geral, perfis de atividade metabólica semelhantes entre os peptídeos conjugados e o KLH isolado, com baixa capacidade de discriminação entre os tratamentos. Para os peptídeos CNPGL-Bbovis-5E2 e CNPGL-Bbovis-5E5, não foram observadas diferenças significativas em relação aos respectivos controles após a correção para múltiplas comparações, enquanto para o peptídeo CNPGL-Bbovis-5E3, apenas uma comparação permaneceu significativa após o ajuste. Assim, os resultados não forneceram evidências consistentes de que a presença do peptídeo conjugado fosse, isoladamente, responsável pelas diferenças observadas na atividade metabólica das PBMCs.

Esse padrão deve ser interpretado considerando que o KLH não constitui necessariamente um componente biologicamente inerte em um sistema celular. Embora tenha sido utilizado como proteína carreadora na primeira síntese de peptídeos, em razão da intenção de empregá-los posteriormente em estudos de imunização para aumentar a resposta imunológica a peptídeos, há evidências experimentais de que o KLH pode interagir diretamente com células do sistema imune. Em células monocíticas humanas, por exemplo, foi demonstrado que o KLH é capaz de induzir ativação de NF-κB, envolvendo as vias de Syk e Erk, indicando que a molécula pode desencadear respostas celulares inatas independentemente do antígeno a ela conjugado (Yasuda; Ushio, 2016). Além disso, o KLH é capaz de induzir respostas imunes específicas contra o próprio carreador, o que reforça a ideia de que sua presença pode constituir uma fonte adicional de estimulação em sistemas que avaliam células imunocompetentes (Saghari et al., 2022).

No contexto do presente estudo, essa característica é particularmente relevante, pois as PBMCs foram estimuladas diretamente ex vivo. Portanto, uma redução da resazurina na presença de KLH não deve ser interpretada automaticamente como evidência de proliferação de linfócitos T específicos para peptídeos. O aumento da atividade metabólica poderia, pelo menos em parte, refletir a ativação de células presentes na fração de PBMCs, incluindo células

apresentadoras de antígeno, como monócitos, cuja atividade metabólica pode ser modificada após o contato com estímulos imunológicos (Yasuda; Ushio, 2016). Dessa forma, a semelhança entre os grupos contendo peptídeo-KLH e KLH isolado pode ter reduzido a capacidade do ensaio de discriminar um efeito específico associado aos peptídeos.

A conjugação também pode modificar a maneira pela qual o peptídeo é disponibilizado às células. Proteínas exógenas internalizadas por células apresentadoras de antígeno podem ser processadas em compartimentos endossomais, gerando peptídeos que são posteriormente apresentados por moléculas de MHC de classe II aos linfócitos T $CD4^+$ (Roche; Furuta, 2015). Quando um pequeno peptídeo é covalentemente ligado a uma proteína de grande massa molecular, como o KLH, a célula passa a internalizar e processar uma estrutura distinta daquela formada pelo peptídeo livre. Consequentemente, é possível que a conjugação seja capaz de modificar a eficiência e a cinética de processamento e de apresentação do epítopo. Essa possibilidade é consistente com estudos que demonstram que diferentes estratégias de conjugação de um mesmo peptídeo ao KLH podem modificar tanto a magnitude quanto o perfil da resposta imune celular induzida (Kirkley; Goldstein; Naylor, 2001).

Assim, no presente experimento, a resposta observada para os conjugados pode representar a contribuição combinada do KLH e do peptídeo, além das alterações provocadas pela própria conjugação sobre a disponibilidade do epítopo. É importante, entretanto, que essa interpretação seja apresentada como uma hipótese mecanística plausível, e não como um mecanismo demonstrado no modelo bovino utilizado neste estudo. Os experimentos realizados não permitiram determinar diretamente quais populações celulares responderam ao KLH nem avaliar o processamento ou a apresentação dos peptídeos conjugados.

Diante dessa limitação, a repetição do ensaio com os peptídeos em sua forma livre constituiu uma estratégia importante para reduzir a contribuição do carreador e permitir uma avaliação mais específica dos candidatos. Nessa condição, os três peptídeos apresentaram perfis distintos de modulação da atividade metabólica das PBMCs. O peptídeo CNPGL-Bbovis-5E2 apresentou efeito global da concentração, mas as comparações pareadas não permaneceram significativas após o ajuste para múltiplas comparações, não sendo possível estabelecer uma relação dose-resposta específica. O peptídeo CNPGL-Bbovis-5E5 apresentou efeito significativo do tempo

de incubação, mas não da concentração, indicando que suas alterações na atividade metabólica estiveram associadas principalmente ao período de exposição.

O peptídeo CNPGL-Bbovis-5E3 apresentou o perfil mais consistente entre os três candidatos, uma vez que foram identificados efeitos significativos tanto da concentração quanto do tempo de incubação. As comparações pareadas demonstraram maior atividade metabólica nas concentrações de 20 e 10 µg/mL em relação a 5 µg/mL, enquanto, em relação ao tempo, a atividade metabólica foi maior após 96 horas quando comparada a 48 horas. Não foi observada interação estatisticamente significativa entre concentração e tempo de incubação, permitindo interpretar separadamente os efeitos principais desses fatores nas condições avaliadas.

A identificação desse padrão é particularmente relevante quando considerada em conjunto com os resultados obtidos no ELISA. Entre os três candidatos avaliados, os peptídeos CNPGL-Bbovis-5E3 e CNPGL-Bbovis-5E5 apresentaram reconhecimento sorológico por IgG em parte dos animais positivos para *B. bovis*, enquanto o peptídeo CNPGL-Bbovis-5E2 não apresentou reatividade residual consistente. Por essa razão, apenas CNPGL-Bbovis-5E3 e CNPGL-Bbovis-5E5 foram posteriormente avaliados utilizando amostras individuais. Dessa forma, CNPGL-Bbovis-5E3 foi o único dos três candidatos que reuniu, nas condições experimentais avaliadas, evidências de reconhecimento humoral e um perfil consistente de modulação da atividade metabólica associado tanto à concentração quanto ao tempo de incubação. Esse conjunto de resultados permite destacá-lo como o candidato mais promissor entre os três peptídeos avaliados neste estudo.

Essa priorização, entretanto, deve ser interpretada dentro dos limites do modelo experimental empregado. As PBMCs utilizadas foram obtidas de animais previamente expostos à infecção natural por *B. bovis*, de modo que o desenho experimental buscou explorar a possibilidade de que a exposição prévia ao parasito tivesse estabelecido populações celulares capazes de responder novamente ao estímulo antigênico. Em uma resposta de memória, linfócitos T específicos podem ser reativados após o reencontro com seus antígenos, especialmente quando peptídeos são apresentados por moléculas de MHC. Entretanto, a fração de PBMCs contém diferentes populações celulares, e o ensaio empregado não permite determinar quais delas contribuíram para o sinal observado.

Essa questão é particularmente importante porque a redução da resazurina constitui uma medida indireta da atividade metabólica celular. A conversão da resazurina em resorufina pode ser influenciada por alterações associadas à ativação celular, metabolismo, proliferação e viabilidade, sem permitir a distinção entre esses processos (O'Brien et al., 2000; Lavogina et al., 2022; Vieira-da-Silva; Castanho, 2023). Portanto, embora o maior efeito observado para o peptídeo CNPGL-Bbovis-5E3 seja compatível com uma maior modulação da atividade metabólica das PBMCs, ele não constitui, isoladamente, demonstração de proliferação de linfócitos T específicos (Uzarski et al., 2017). Essa cautela é especialmente necessária porque monócitos ativados ou outras células presentes na cultura também podem contribuir para a redução da resazurina.

A utilização do período de 96 horas teve como finalidade permitir tempo suficiente para que respostas celulares decorrentes do reconhecimento antigênico pudessem se estabelecer e, potencialmente, resultar em expansão celular. Ainda assim, o delineamento experimental não permite demonstrar diretamente que o aumento observado tenha resultado da divisão de linfócitos antígeno-específicos. A avaliação direta da proliferação por métodos baseados na diluição de corantes fluorescentes, como CFSE ou CellTrace, associada à citometria de fluxo e a marcadores fenotípicos, como CD3, CD4 e CD8, permitiria caracterizar as populações celulares em proliferação e avaliar sua associação com os linfócitos T. Da mesma forma, a avaliação da produção de citocinas, como IFN-γ, IL-2 e TNF-α, poderia fornecer evidências complementares de ativação funcional específica após o estímulo antigênico. A aplicação dessas estratégias em bovinos, contudo, pode ser limitada pela disponibilidade de reagentes e painéis espécie-específicos, constituindo uma perspectiva para estudos posteriores.

Outro aspecto importante para a interpretação dos resultados é a origem dos três peptídeos avaliados. A seleção não foi realizada de maneira aleatória entre as nove proteínas inicialmente priorizadas. A proteína XP_001609243.1, correspondente ao gene BBOV_IV000770, destacou-se por concentrar cinco dos epítopos candidatos identificados na etapa de vacinologia reversa. As regiões correspondentes aos cinco epítopos foram avaliadas conjuntamente pelos amplicons GN5A e GN5B e apresentaram elevada conservação nas amostras brasileiras analisadas. Essa evidência de conservação, associada à concentração de múltiplos candidatos em uma

mesma proteína, fundamentou a priorização dessa proteína para a caracterização experimental.

A partir dos cinco epítopos conservados, foram selecionados para a primeira síntese química os epítopos 5.E2, 5.E3 e 5.E5, correspondentes aos peptídeos sintéticos CNPGL-Bbovis-5E2, CNPGL-Bbovis-5E3 e CNPGL-Bbovis-5E5, respectivamente. A escolha considerou não apenas a conservação das regiões gênicas, mas também as características físico-químicas dos candidatos e a necessidade de restringir inicialmente o número de epítopos submetidos à síntese e aos ensaios experimentais subsequentes, em razão dos custos envolvidos. Assim, a avaliação de três peptídeos derivados da mesma proteína constituiu uma estratégia de aprofundamento da caracterização de uma proteína que havia se destacado durante a etapa de priorização, permitindo comparar diferentes regiões antigênicas dentro de um mesmo alvo molecular.

É importante destacar, contudo, que a escolha desses três peptídeos não implica que os demais candidatos tenham sido descartados. Os epítopos 5.E1 e 5.E4, também pertencentes à proteína XP_001609243.1 e incluídos na avaliação de conservação genética, não foram submetidos às etapas experimentais de síntese e caracterização realizadas neste estudo. Dessa forma, permanecem como candidatos a serem avaliados em estudos futuros. Essa distinção é relevante porque os resultados obtidos para os peptídeos CNPGL-Bbovis-5E2, CNPGL-Bbovis-5E3 e CNPGL-Bbovis-5E5 não permitem extrapolar o desempenho observado para os demais epítopos da proteína.

Além disso, embora a proteína XP_001609243.1 tenha apresentado cinco regiões candidatas e elevada conservação nas amostras analisadas, essa evidência molecular foi obtida a partir de um número restrito de isolados brasileiros, não permitindo afirmar que essas regiões sejam universalmente conservadas em *B. bovis*. Da mesma maneira, o reconhecimento sorológico observado para CNPGL-Bbovis-5E3 e CNPGL-Bbovis-5E5 ocorreu em parte dos animais avaliados e apresentou heterogeneidade entre as amostras, o que é compatível com a possibilidade de respostas imunes individuais direcionadas a diferentes regiões antigênicas do parasito.

Em conjunto, os resultados obtidos estabelecem uma sequência de priorização experimental na qual a conservação genética, o reconhecimento sorológico e a atividade metabólica das PBMCs foram considerados de maneira integrada. Dentre

os três candidatos efetivamente avaliados, CNPGL-Bbovis-5E3 apresentou a evidência experimental mais consistente, reunindo reconhecimento por IgG e modulação da atividade metabólica associada à concentração e ao tempo de incubação. Entretanto, a atividade metabólica medida pela redução da resazurina deve ser interpretada como um indicador funcional indireto e não como demonstração isolada de proliferação ou imunogenicidade celular específica. Estudos adicionais, utilizando abordagens capazes de identificar as populações celulares responsivas, medir diretamente a proliferação e caracterizar a produção de citocinas, serão necessários para determinar se a resposta observada para CNPGL-Bbovis-5E3 corresponde efetivamente à ativação de células de memória específicas. Da mesma forma, estudos de imunogenicidade *in vivo* e proteção serão necessários para determinar seu real potencial como candidato vacinal.

6 CONCLUSÃO

A análise *in silico* do proteoma predito a partir do genoma da linhagem T2Bo de *B. bovis* permitiu priorizar nove proteínas de membrana plasmática com potencial antigênico e identificar 31 epítopos candidatos, selecionados pela integração de parâmetros de localização subcelular, acessibilidade, antigenicidade e potencial de reconhecimento imunológico. A proteína 5 (XP_001609243.1) destacou-se por concentrar cinco dos epítopos selecionados, sendo priorizada para as etapas subsequentes de validação experimental.

A avaliação molecular demonstrou amplificação consistente das regiões do gene BBOV_IV000770 pelos pares de primers GN5A e GN5B. O sequenciamento e o alinhamento à sequência de referência T2Bo evidenciaram elevada similaridade e conservação das regiões codificadoras correspondentes aos cinco epítopos avaliados nos isolados brasileiros analisados.

Na avaliação da resposta humoral, os peptídeos sintéticos CNPGL-Bbovis-5E3 e CNPGL-Bbovis-5E5 apresentaram reatividade de IgG em parte dos soros de animais previamente classificados como positivos para *B. bovis*, com heterogeneidade na magnitude das respostas entre os animais. O peptídeo CNPGL-Bbovis-5E2 não apresentou reatividade residual suficientemente consistente para prosseguir à avaliação com amostras individuais.

Na avaliação da resposta celular por meio da atividade metabólica das PBMCs, os peptídeos conjugados ao KLH apresentaram, de modo geral, perfis semelhantes aos observados para o KLH isolado, o que motivou a avaliação dos peptídeos em sua forma livre. Nessa condição, os três candidatos apresentaram perfis distintos: o CNPGL-Bbovis-5E2 apresentou efeito global da concentração, sem diferenças significativas entre as concentrações após as comparações pareadas; o CNPGL-Bbovis-5E3 apresentou efeitos significativos da concentração e do tempo de incubação; e o CNPGL-Bbovis-5E5 apresentou efeito significativo exclusivamente do tempo de incubação. Não foram identificadas interações estatisticamente significativas entre concentração e tempo de incubação para nenhum dos peptídeos, permitindo a interpretação separada dos efeitos principais desses fatores nas condições avaliadas. Em conjunto, os resultados demonstraram que a utilização dos peptídeos em sua forma livre permitiu caracterizar diferenças nos perfis de atividade metabólica das PBMCs entre os três candidatos, destacando-se o CNPGL-Bbovis-

5E3 por apresentar o perfil mais consistente, com efeitos significativos tanto da concentração quanto do tempo de incubação.

Em conjunto, os resultados permitiram priorizar o CNPGL-Bbovis-5E3 entre os três candidatos avaliados, por apresentar simultaneamente reatividade de IgG em parte dos soros de animais positivos para *B. bovis* e o perfil mais consistente de modulação da atividade metabólica das PBMCs, com efeitos associados à concentração e ao tempo de incubação. Essa priorização constitui uma etapa inicial de caracterização experimental, sendo necessários estudos adicionais para determinar a natureza das respostas celulares observadas, bem como avaliar a imunogenicidade e a capacidade de indução de proteção dos candidatos.

REFERÊNCIAS

ABBAS, R. Z. et al. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: the state of play. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 203, n. 1-2, p. 6–20, 2014. DOI: https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.006.

ALLRED, D. R.; HINES, S. A.; AHRIENS, K. P. Isolate-specific parasite antigens of the *Babesia bovis*-infected erythrocyte surface. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 60, n. 1, p. 121–132, 1993. DOI: https://doi.org/10.1016/0166-6851(93)90035-V.

ALLRED, D. R. et al. The ves multigene family of B. bovis encodes components of rapid antigenic variation at the infected erythrocyte surface. **Molecular Cell**, v. 5, n. 1, p. 153–162, 2000. DOI: https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80411-6.

ALMAGRO-ARMENTEROS, J. J. et al. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 420–423, 2019. DOI: https://doi.org/10.1038/s41587-019-0036-z.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990. DOI: https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2.

ALVAREZ, J. A.; ROJAS, C.; FIGUEROA, J. V. An overview of current knowledge on in vitro Babesia cultivation for production of live attenuated vaccines for bovine babesiosis in Mexico. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, art. 364, 2020. DOI: https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00364.

ÁLVAREZ, J. A.; FIGUEROA, J. V.; UETI, M. W.; ROJAS-MARTÍNEZ, C. Establishment of Babesia bovis in vitro culture using medium free of animal products. **Pathogens**, v. 10, n. 6, art. 770, 2021. DOI: https://doi.org/10.3390/pathogens10060770.

ANDRADE, R. G.; OLIVEIRA, S. J. de M.; HOTT, M. C.; MAGALHAES JUNIOR, W. C. P. de; CARVALHO, G. R.; ROCHA, D. T. da. Evolução recente da produção e da produtividade leiteira no Brasil. Embrapa Gado de Leite, 2023.

ANDREATTA, M.; NIELSEN, M. Gapped sequence alignment using artificial neural networks: application to the MHC class I system. **Bioinformatics**, v. 32, n. 4, p. 511–517, 2016.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES. Brasil bate recorde nas exportações de carne bovina em 2024. São Paulo: ABIEC, 2025. Disponível em: https://abiec.com.br/brasil-bate-recorde-nas-exportacoes-de-carne-bovina-em-2024/. Acesso em: 1 set. 2026.

BACANELLI, G. M.; RAMOS, C. A. N.; ARAÚJO, F. R. Molecular diagnosis of Anaplasma marginale in cattle: quantitative evaluation of a real-time PCR (Polymerase Chain Reaction) based on msp5 gene. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 1, p. 29–33, 2014. DOI: https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014000100005.

BENAVIDES, M. V.; SACCO, A. M. S. Differential Bos taurus cattle response to *Babesia bovis* infection. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 150, n. 1-2, p. 54–64, 2007. DOI: https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.08.022.

BISCOLA, P. H. N.; MALAFAIA, G. C. Anuário Cicarne da cadeia produtiva da carne bovina: 2024–2025. Campo Grande: EMBRAPA Gado de Corte, 2025. Disponível em: https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1174114/anuario-cicarne-da-cadeia-produtiva-da-carne-bovina-2024---2025. Acesso em: 19 maio 2026.

BOCK, R. et al. Babesiosis of cattle. **Parasitology**, v. 129, n. S1, p. S247–S269, 2004. DOI: https://doi.org/10.1017/S0031182004005190.

BROWN, W. C.; NORIMINE, J.; KNOWLES, D. P.; GOFF, W. L. Immune control of *Babesia bovis* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n. 1-2, p. 75–87, 2006. DOI: https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.041.

BULING, A.; CRIADO-FORNELIO, A.; ASENZO, G.; BENITEZ, D.; BARBA-CARRETERO, J. C.; FLORIN-CHRISTENSEN, M. A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*. **Veterinary Parasitology**, v. 147, n. 1–2, p. 16–25, 2007. DOI: https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.03.031.

CALLOW, L. L.; MELLORS, L. T. A new vaccine for Babesia argentina infection prepared in splenectomised calves. **Australian Veterinary Journal**, v. 42, n. 12, p. 464–465, 1966.

CARVALHO, T. B. de. Do pasto ao prato: uma análise da eficiência nos elos produtivo, industrial e comercial. São Paulo: Tecnocarne; Food Connection, 2026. E-book. Disponível em: PDF interno do evento Tecnocarne. Acesso em: 19 maio 2026.

CARVALHO, W. A.; HONÓRIO, N. T. de B. S.; CARVALHO, C. V. de; DOMINGUES, R.; PRATA, M. C. de A.; GASPAR, E. B. A necessidade da etapa de bloqueio em ensaios de ELISA. Bagé: Embrapa Pecuária Sul, 2023. 9 p. (**Embrapa Pecuária Sul. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 55**). Disponível em: https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1159839. Acesso em: 9 out. 2026.

CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA. PIB-Agro/CEPEA: desempenho do 4º trimestre reverte tendência de queda anual, e PIB do agronegócio avança 1,81% em 2024. Piracicaba: CEPEA/ESALQ/USP, 2025. Disponível em: https://cepea.org.br/br/releases/pib-agro-cepea-desempenho-do-4-trimestre-reverte-tendencia-de-queda-anual-e-pib-do-agronegocio-avanca-1-81-em-2024.aspx. Acesso em: 1 set. 2026.

CHAGAS, R. S. Principais doenças infecciosas reprodutivas em bovinos: uma revisão. 2024. 29 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Medicina Veterinária) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia, Campus Jaru, Jaru, 2024.

CORREIA, B. E. et al. Proof of principle for epitope-focused **vaccine** design. Nature, v. 507, n. 7491, p. 201–206, 2014. DOI: https://doi.org/10.1038/nature12966.

CROWTHER, J. R. The ELISA guidebook. Totowa, NJ: Humana Press, 2009.

DE VOS, A. J.; DALGLIESH, R. J.; MCGREGOR, W. Effect of imidocarb dipropionate prophylaxis on the infectivity and immunogenicity of a *Babesia bovis* vaccine in cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 63, n. 6, p. 174–178, 1986.

DE WAAL, D. T.; COMBRINK, M. P. Live vaccines against bovine babesiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n. 1-2, p. 88–96, 2006.

DIMITROV, I. et al. AllerTOP v.2—a server for in silico prediction of allergens. **Journal of Molecular Modeling**, v. 20, n. 6, art. 2278, 2014. DOI: https://doi.org/10.1007/s00894-014-2278-5.

DOYCHTINOVA, I. A.; FLOWER, D. R. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens and subunit vaccines. **BMC Bioinformatics**, v. 8, art. 4, 2007. DOI: https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-4.

EL-ALFY, E.-S. et al. Genetic diversity of merozoite surface antigens in global *Babesia bovis* populations. **Genes**, v. 14, n. 10, art. 1936, 2023. DOI: https://doi.org/10.3390/genes14101936.

ELKIN, L. A.; KAY, M.; HIGGINS, J. J.; WOBBROCK, J. O. An aligned rank transform procedure for multifactor contrast tests. In: ANNUAL ACM SYMPOSIUM ON USER INTERFACE SOFTWARE AND TECHNOLOGY, 34., 2021, Virtual Event. Proceedings [...]. New York: ACM, 2021. p. 754–768. DOI: https://doi.org/10.1145/3472749.3474784.

ERDŐS, G.; PAJKOS, M.; DOSZTÁNYI, Z. IUPred3: prediction of protein disorder enhanced with unambiguous experimental annotation and visualization of evolutionary conservation. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. W1, p. W297–W303, 2021. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gkab408.

FARIAS, N. A. R. Diagnóstico e controle da Tristeza Parasitária Bovina. Guaíba, RS: Editora Agropecuária, 1995. 80 p.

FARIAS, N. A. Tristeza parasitária bovina. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; LEMOS, R. A. A.; MÉNDEZ, M. C. (eds.). Doenças de ruminantes e equinos. São Paulo: Varela Editora, 2001. p. 35–42.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Live animals (Global, National - Annual) – FAOSTAT. Rome: FAO, 2025. Disponível em: https://data.fao.org/catalog/iso/f6a1fca8-3c0d-46a3-9aeb-3e81bbfd38c8. Acesso em: 1 set. 2026.

FREY, A.; DI CANZIO, J.; ZURAKOWSKI, D. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. **Journal of Immunological Methods**, v. 221, n. 1-2, p. 35–41, 1998. DOI: https://doi.org/10.1016/S0022-1759(98)00170-7.

GASTEIGER, E. et al. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. In: WALKER, J. M. (ed.). The Proteomics Protocols Handbook. Totowa, NJ: Humana Press, 2003. p. 571–607.

GOFF, W. L. et al. The age-related immunity in cattle to *Babesia bovis* infection involves the rapid induction of interleukin-12, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase mRNA expression in the spleen. **Parasite Immunology**, v. 23, n. 9, p. 463–471, 2001. DOI: https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2001.00402.x.

GOFF, W. L.; JOHNSON, W. C.; CLUFF, C. W. *Babesia bovis* immunity: interaction of immune responses and parasite biology. **Veterinary Parasitology**, v. 101, p. 229–241, 2001.

GOODSWEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. A guide to in silico vaccine discovery for eukaryotic pathogens. Briefings in **Bioinformatics**, v. 14, n. 6, p. 753–774, 2012. DOI: https://doi.org/10.1093/bib/bbs036.

GOODSWEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. A guide to current methodology and usage of reverse vaccinology towards in silico vaccine discovery. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 47, n. 2, art. fuad004, 2023. DOI: https://doi.org/10.1093/femsre/fuad004.

GRISI, L. et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 150–156, 2014. DOI: https://doi.org/10.1590/S1984-29612014042.

GUIMARÃES, A. M. et al. Soroprevalência e fatores de risco para *Babesia bovis* em rebanhos leiteiros na região sul de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 4, p. 826–832, 2011.

GUPTA, S. et al. Peptide toxicity prediction. In: PHADTARE, S. et al. (eds.). **Methods in Molecular Biology**. New York: Springer, 2015. v. 1268, p. 143–157. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2285-7_7.

HALLGREN, J. et al. DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks. bioRxiv, [S. l.], 2022. DOI: https://doi.org/10.1101/2022.04.08.487609.

HARRIS, J. R.; MARKL, J. Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. **Micron**, v. 30, n. 6, p. 597–623, 1999.

HE, L. et al. qPCR-melting curve analysis in molecular diagnostics. **Clinica Chimica Acta**, v. 581, art. 120753, 2026. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cca.2025.120753.

HIDALGO-RUIZ, M. et al. *Babesia bovis* AMA-1, MSA-2c and RAP-1 contain conserved B and T-cell epitopes, which generate neutralizing antibodies and a long-lasting Th1 immune response in vaccinated cattle. **Vaccine**, v. 40, n. 8, p. 1108–1115, 2022. DOI: https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.01.023.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2024 registra recorde no abate de bovinos, frangos e suínos. Rio de Janeiro: IBGE, 2025. Disponível em: https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/42898-2024-registra-recorde-no-abate-de-bovinos-frangos-e-suinos. Acesso em: 1 set. 2026.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Anuário Estatístico do Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, 2025. Disponível em: https://anuario.ibge.gov.br/. Acesso em: 19 maio 2026.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa da Pecuária Municipal 2024. Rio de Janeiro: IBGE, 2025. Disponível em: https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html. Acesso em: 1 set. 2026.

JARAMILLO ORTIZ, J. M. et al. Immunisation of cattle against *Babesia bovis* combining a multi-epitope modified vaccinia Ankara virus and a recombinant protein induce strong Th1 cell responses but fails to trigger neutralising antibodies required for protection. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 6, art. 101270, 2019. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101270.

JESPERSEN, M. C.; PETERS, B.; NIELSEN, M.; MARCATILI, P. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. W1, p. W24–W29, 2017. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gkx346.

JIANG, Z.; KANG, X.; SONG, Y.; ZHOU, X.; YUE, M. Identification and evaluation of novel antigen candidates against Salmonella Pullorum infection using reverse vaccinology. **Vaccines**, v. 11, n. 4, art. 865, 2023. DOI: https://doi.org/10.3390/vaccines11040865.

JONSSON, N. N. The productivity effects of cattle tick (Boophilus microplus) infestation on cattle, with particular reference to Bos indicus cattle and their crosses. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 137, n. 1-2, p. 1–10, 2006.

JONSSON, N. N.; BOCK, R. E.; JORGENSEN, W. K. Productivity and health effects of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infections on cattle. Animal Production **Science**, v. 48, n. 10, p. 1399–1404, 2008.

KIRKLEY, J. E.; GOLDSTEIN, A. L.; NAYLOR, P. H. Effect of peptide-carrier coupling on peptide-specific immune responses. **Immunobiology**, v. 203, n. 4, p. 601–615, 2001. DOI: https://doi.org/10.1016/S0171-2985(01)80010-3.

KOCAN, K. M. et al. The natural history of Anaplasma marginale. **Veterinary Parasitology**, v. 167, n. 2, p. 95–107, 2010.

KUTTLER, K. L.; JOHNSON, L. W. Atividade quimioprofilática de imidocarb, diminazeno e oxitetraciclina contra *Babesia bovis* e B. bigemina. **Veterinary Parasitology**, v. 21, n. 2, p. 107–118, 1986. DOI: https://doi.org/10.1016/0304-4017(86)90151-2.

LARSEN, J.; LUND, O.; NIELSEN, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. Immunome Research, v. 2, n. 1, art. 2, 2006. DOI: https://doi.org/10.1186/1745-7580-2-2.

LAU, A. O. T. et al. Genotypic diversity of merozoite surface antigen 1 of *Babesia bovis* within an endemic population. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 172, n. 2, p. 107–112, 2010. DOI: https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.03.017.

LAVOGINA, D. et al. Revisiting the resazurin-based sensing of cellular viability: widening the application horizon. **Biosensors**, v. 12, n. 4, art. 196, 2022. DOI: https://doi.org/10.3390/bios12040196.

LEROITH, T. et al. Sequence variation and immunologic cross-reactivity among Babesia bovis merozoite surface antigen 1 proteins from vaccine strains and vaccine breakthrough isolates. **Infection and Immunity**, Washington, DC, v. 73, n. 9, p. 5388–5394, 2005. DOI: https://doi.org/10.1128/IAI.73.9.5388-5394.2005.

LOEFFLER, D. A.; KLAVER, A. C. Polyvalent immunoglobulin binding is an obstacle to accurate measurement of specific antibodies with ELISA despite inclusion of blocking agents. **International Immunopharmacology**, v. 52, p. 227–229, 2017. DOI: https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.09.016.

LU, Y. Y.; NOBLE, W. S.; KEICH, U. A BLAST from the past: revisiting blastp's E-value. **Bioinformatics**, v. 40, n. 12, art. btae729, 2024. DOI: https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btae729.

MAHONEY, D. F.; ROSS, D. R. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. **Australian Veterinary Journal**, v. 48, n. 5, p. 292–298, 1972.

MATOS, C. A. et al. Genetic diversity of *Babesia bovis* studied longitudinally under natural transmission conditions in calves in the state of Rio de Janeiro, Brazil.

Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 29, n. 4, e021220, 2020. DOI: https://doi.org/10.1590/S1984-29612020089.

MOSQUEDA, J.; MCELWAIN, T. F.; PALMER, G. H. *Babesia bovis* merozoite surface antigen 2 proteins are expressed on the merozoite and sporozoite surface, and specific antibodies inhibit attachment and invasion of erythrocytes. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 11, p. 6448–6455, 2002. DOI: https://doi.org/10.1128/IAI.70.11.6448-6455.2002.

MOSQUEDA, J.; OLVERA-RAMÍREZ, A.; AGUILAR-TIPACAMÚ, G.; CANTÓ, G. J. Current advances in detection and treatment of babesiosis. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 10, p. 1504–1518, 2012. DOI: https://doi.org/10.2174/092986712799828355.

NCBI RESOURCE COORDINATORS. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D7–D19, 2015. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gkv1290.

NIELSEN, M. et al. Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations. **Protein Science**, v. 12, n. 5, p. 1007–1017, 2003. DOI: https://doi.org/10.1110/ps.0235303.

NOGUEIRA, B. C. F. et al. Evidence of the efficiency of reverse vaccinology against bovine parasites: a systematic review. **Acta Tropica**, v. 260, art. 107478, 2024. DOI: https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2024.107478.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421–5426, 2000. DOI: https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01678.x.

O'CONNOR, R. M.; LONG, J. A.; ALLRED, D. R. Cytoadherence of *Babesia bovis*-infected erythrocytes to bovine brain capillary endothelial cells provides an in vitro model for sequestration. **Infection and Immunity**, Washington, DC, v. 67, n. 8, p. 3921–3928, 1999. DOI: https://doi.org/10.1128/IAI.67.8.3921-3928.1999.

OLIVEIRA, P. A. et al. Babesiose cerebral em bezerros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 5, p. 832–834, 2018.

PARVIZPOUR, S. et al. Epitope-based vaccine design: a comprehensive overview of bioinformatics approaches. **Drug Discovery Today**, v. 25, n. 6, p. 1034–1042, 2020. DOI: https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.03.006.

PARVIZPOUR, S. et al. Reverse vaccinology and epitope design concepts for vaccine development. **Vaccines**, v. 8, n. 3, art. 414, 2020. DOI: https://doi.org/10.3390/vaccines8030414.

PATARROYO, J.; PRATES, A. A.; TAVARES, C. A.; MAFRA, C.; VARGAS, M. I. Exoantigens of an attenuated strain of *Babesia bovis* used as a vaccine against bovine babesiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 59, n. 3-4, p. 189–199, 1995. DOI: https://doi.org/10.1016/0304-4017(94)00756-3.

PIERLEONI, A.; MARTELLI, P.; CASADIO, R. PredGPI: a GPI-anchor predictor. **BMC Bioinformatics**, v. 9, art. 392, 2008. DOI: https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-392.

PIZZA, M. et al. Identification of **vaccine** candidates against serogroup B Meningococcus by whole-genome sequencing. Science, v. 287, n. 5459, p. 1816–1820, 2000. DOI: https://doi.org/10.1126/science.287.5459.1816.

RAMOS, C. A. N. et al. Genetic conservation of potentially immunogenic proteins among Brazilian isolates of *Babesia bovis*. **Veterinary Parasitology**, v. 187, n. 3-4, p. 548–552, 2012. DOI: https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.01.020.

RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology, a genome-based approach to **vaccine** development. Vaccine, v. 19, n. 17-19, p. 2688–2691, 2001.

RAPPUOLI, R.; BOTTOMLEY, M. J.; D'ORO, U.; FINCO, O.; DE GREGORIO, E. Reverse vaccinology 2.0: human immunology instructs vaccine antigen design. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 213, n. 4, p. 469–481, 2016. DOI: https://doi.org/10.1084/jem.20151018.

RECK, J. et al. A 50-year-old question: Can imidocarb chemoprophylaxis prevent clinical bovine babesiosis while allowing protective immunity? **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 338, art. 110329, 2024. DOI: https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2024.110329.

ROCHE, P. A.; FURUTA, K. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 4, p. 203–216, 2015. DOI: https://doi.org/10.1038/nri3818.

RODRIGUES, D. S.; LEITE, R. C. Economic impact of Rhipicephalus (Boophilus) microplus: estimate of decreased milk production on a dairy farm. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, p. 1570–1572, 2013.

RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I.; JONSSON, N. N.; BHUSHAN, C. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. **Parasitology** Research, Berlin, v. 117, p. 3–29, 2018. DOI: https://doi.org/10.1007/s00436-017-5677-6.

RODOLPHI, C. M.; SOARES, I. F.; MATOS, A. da S.; RODRIGUES-DA-SILVA, R. N.; FERREIRA, M. U.; PRATT-RICCIO, L. R.; TOTINO, P. R. R.; SCOPEL, K. K. G.; LIMA-JUNIOR, J. da C. Dynamics of IgM and IgG antibody response profile against linear B-cell epitopes from exoerythrocytic (CelTOS and TRAP) and erythrocytic (CyRPA) phases of *Plasmodium vivax*: follow-up study. **Antibodies**, v. 13, n. 3, art. 69, 2024. DOI: https://doi.org/10.3390/antib13030069

ROLÓN, M.; VEGA, C.; ESCARIO, J. A.; GÓMEZ-BARRIO, A. Development of resazurin microtiter assay for drug sensitivity testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology** Research, v. 99, n. 2, p. 103–107, 2006.

SACCO, S.; KESSLER, R. H.; MADRUGA, C. R. Cepas atenuadas de *Babesia bovis* e Babesia bigemina e de Anaplasma centrale como imunógenos no controle da Tristeza parasitária bovina. Ciência Rural, v. 31, n. 5, p. 849–855, 2001. DOI: https://doi.org/10.1590/S0103-84782001000500018.

SAGHARI, M. et al. Characterization of KLH-driven immune responses in clinical studies: a systematic review. **Frontiers in Drug Discovery**, v. 2, 2022. DOI: https://doi.org/10.3389/fddsv.2022.992087.

SALES, D. P. et al. Biology of the non-parasitic phase of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* in the Amazon biome. **Parasites & Vectors**, v. 17, art. 89, 2024.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3. ed. Cold Spring Harbor: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2001.

SANTOS, J. H. M. et al. Exploring the landscape of *Babesia bovis* vaccines: progress, challenges, and opportunities. **Parasites & Vectors**, v. 16, art. 274, 2023. DOI: https://doi.org/10.1186/s13071-023-05885-z.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, v. 52, n. 3-4, p. 591–611, 1965.

SILVA, T. F. et al. Tristeza parasitária bovina: revisão. **Research, Society and Development**, Vargem Grande Paulista, v. 10, n. 1, e15410111631, 2021. DOI: https://doi.org/10.33448/rsd-v10i1.11631.

SIVAKUMAR, T. et al. Genetic diversity of merozoite surface antigens in *Babesia bovis* detected from Sri Lankan cattle. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 19, p. 134–140, 2013. DOI: https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.07.001.

SONDGEROTH, K. S. et al. Loss of neurovirulence is associated with reduction of cerebral capillary sequestration during acute Babesia bovis infection. **Parasites & Vectors**, v. 6, art. 181, 2013. DOI: https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-181.

SOUZA, F. A. L. et al. Dynamics of natural infection by *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in dairy cattle from an enzootic instability area in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, n. 1, p. 3–7, 2018. DOI: https://doi.org/10.1590/S1984-29612018000100003.

SUAREZ, C. E.; NOH, S. Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 1-2, p. 109–125, 2011.

TODOROVIC, R. A.; LOPEZ, L. A.; LOPEZ, A. G.; GONZALEZ, E. F. Bovine babesiosis and anaplasmosis: control by premunition and chemoprophylaxis. Experimental **Parasitology**, v. 37, n. 1, p. 92–104, 1975.

TIMMS, P.; BARRY, D. N.; GILL, A. C.; SHARP, P. J.; DE VOS, A. J. Failure of a recombinant *Babesia bovis* antigen to protect cattle against heterologous strain challenge. **Research in Veterinary Science**, v. 45, n. 2, p. 267–269, 1988. DOI: https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)30947-0.

TRUEMAN, K. F.; BLIGHT, G. W. The effect of age on resistance of cattle *to Babesia bovis.* **Australian Veterinary Journal**, v. 54, n. 7, p. 301–305, 1978.

UETI, M. W. et al. Transcriptome dataset of *Babesia bovis* life stages within vertebrate and invertebrate hosts. **Data in Brief**, v. 33, art. 106533, 2020. DOI: https://doi.org/10.1016/j.dib.2020.106533.

UNTERGASSER, A. et al. Primer3—new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 15, art. e115, 2012. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gks596.

VIAL, H. J.; GORENFLOT, A. Quimioterapia contra babesiose. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n. 1-2, p. 147–160, 2006. DOI: https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.048.

VIEIRA-DA-SILVA, A.; CASTANHO, M. A. R. B. Resazurin reduction-based assays revisited: guidelines for accurate reporting of relative differences on metabolic status. Molecules, v. 28, n. 5, art. 2283, 2023. DOI: https://doi.org/10.3390/molecules28052283.

WILKOWSKY, S. E. et al. *Babesia bovis* merozoite surface protein-2c (MSA-2c) contains highly immunogenic, conserved B-cell epitopes that elicit neutralization-sensitive antibodies in cattle. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 127, n. 2, p. 133–141, 2003. DOI: https://doi.org/10.1016/S0166-6851(02)00329-8.

WOBBROCK, J. O.; FINDLATER, L.; GERGLE, D.; HIGGINS, J. J. The aligned rank transform for nonparametric factorial analyses using only ANOVA procedures. In: PROCEEDINGS OF THE SIGCHI CONFERENCE ON HUMAN FACTORS IN COMPUTING SYSTEMS. Vancouver: ACM, 2011. p. 143–146. DOI: https://doi.org/10.1145/1978942.1978963.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (WOAH). Validation of diagnostic assays for infectious diseases of terrestrial animals. In: **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. Cap. 1.1.6. Paris: WOAH, 2023. Disponível em: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.06_VALIDATVAL.pdf.

YU, C.-S.; CHEN, Y.-C.; LU, C.-H.; HWANG, J.-K. Prediction of protein subcellular localization. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 64, n. 3, p. 643–651, 2006. DOI: https://doi.org/10.1002/prot.21018.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Resultados do pipeline de predição de epítopos B e T e seleção dos candidatos de *Babesia bovis* linhagem T2Bo.

ID proteína	Apresentação	Sequência
XP_051623602.1	Epitopo B dtu	MVITTQLIPWLIISMFKAAYAEDDSGSNGSSTKYYILIGAGIFVIAAIVVLVYLDWNDHLKSLDDKKWIIYVLFVLCGFAGLIIFTWLVFGFKRYTNLDRRTLLTYFLIR AAHDPPQFGGCMRDW
	Epitopo B iedb	MVITTQLIPWLIISMFKAAYAEDDSGSNGSSTKYYILIGAGIFVIAAIVVLVYLDWNDHLKSLDDKKWIIYVLFVLCGFAGLIIFTWLVFGFKRYTNLDRRTLLTYFLIR AAHDPPQFGGCMRDW
	BoLA-D18.4	MVITTQLIPWLIISMFKAAYAEDDSGSNGSSTKYYILIGAGIFVIAAIVVLVYLDWNDHLKSLDDKKWIIYVLFVLCGFAGLIIFTWLVFGFKRYTNLDRRTLLTYFLIR AAHDPPQFGGCMRDW
	BoLA-HD6	MVITTQLIPWLIISMFKAAYAEDDSGSNGSSTKYYILIGAGIFVIAAIVVLVYLDWNDHLKSLDDKKWIIYVLFVLCGFAGLIIFTWLVFGFKRYTNLDRRTLLTYFLIR AAHDPPQFGGCMRDW
	BoLA-JSP.1	MVITTQLIPWLIISMFKAAYAEDDSGSNGSSTKYYILIGAGIFVIAAIVVLVYLDWNDHLKSLDDKKWIIYVLFVLCGFAGLIIFTWLVFGFKRYTNLDRRTLLTYFLIR AAHDPPQFGGCMRDW
	BoLA-T2a	MVITTQLIPWLIISMFKAAYAEDDSGSNGSSTKYYILIGAGIFVIAAIVVLVYLDWNDHLKSLDDKKWIIYVLFVLCGFAGLIIFTWLVFGFKRYTNLDRRTLLTYFLIR AAHDPPQFGGCMRDW
	BoLA-T2b	MVITTQLIPWLIISMFKAAYAEDDSGSNGSSTKYYILIGAGIFVIAAIVVLVYLDWNDHLKSLDDKKWIIYVLFVLCGFAGLIIFTWLVFGFKRYTNLDRRTLLTYFLIR AAHDPPQFGGCMRDW
	BoLA-T2C	MVITTQLIPWLIISMFKAAYAEDDSGSNGSSTKYYILIGAGIFVIAAIVVLVYLDWNDHLKSLDDKKWIIYVLFVLCGFAGLIIFTWLVFGFKRYTNLDRRTLLTYFLIR AAHDPPQFGGCMRDW
	Exposto	MVITTQLIPWLIISMFKAAYAEDDSGSNGSSTKYYILIGAGIFVIAAIVVLVYLDWNDHLKSLDDKKWIIYVLFVLCGFAGLIIFTWLVFGFKRYTNLDRRTLLTYFLIR AAHDPPQFGGCMRDW
	Coil	MVITTQLIPWLIISMFKAAYAEDDSGSNGSSTKYYILIGAGIFVIAAIVVLVYLDWNDHLKSLDDKKWIIYVLFVLCGFAGLIIFTWLVFGFKRYTNLDRRTLLTYFLIR AAHDPPQFGGCMRDW
	deepTMHMM	MVITTQLIPWLIISMFKAAYAEDDSGSNGSSTKYYILIGAGIFVIAAIVVLVYLDWNDHLKSLDDKKWIIYVLFVLCGFAGLIIFTWLVFGFKRYTNLDRRTLLTYFLIR AAHDPPQFGGCMRDW
	IUPRed	MVITTQLIPWLIISMFKAAYAEDDSGSNGSSTKYYILIGAGIFVIAAIVVLVYLDWNDHLKSLDDKKWIIYVLFVLCGFAGLIIFTWLVFGFKRYTNLDRRTLLTYFLIR AAHDPPQFGGCMRDW
XP_001610297.1	Epitopo B dtu	MVRYRKLSVALLLYTTILCITEVFYDVTADETTAVQDTVPGTPESPNSSTTADLDRPEDIEESTSRTAESQGFYQRYKQFVVKHNKTFTIVLGVLSGLLLVGALVA CCVKGGEMKEYVAFLIIPIVFWMGLFGYMVYKLYGNKVMAFFKNKKAAVVKSTVDSTG
	Epitopo B iedb	MVRYRKLSVALLLYTTILCITEVFYDVTADETTAVQDTVPGTPESPNSSTTADLDRPEDIEESTSRTAESQGFYQRYKQFVVKHNKTFTIVLG VLSGLLLVGALVACCVKGGEMKEYVAFLIIPIVFWMGLFGYMVYKLYGNKVMAFFKNKKAAVVKSTVDSTG
	BoLA-D18.4	MVRYRKLSVALLLYTTILCITEVFYDVTADETTAVQDTVPGTPESPNSSTTADLDRPEDIEESTSRTAESQGFYQRYKQFVVKHNKTFTIVLGVLSGLLLVGALVA CCVKGGEMKEYVAFLIIPIVFWMGLFGYMVYKLYGNKVMAFFKNKKAAVVKSTVDSTG
	BoLA-HD6	MVRYRKLSVALLLYTTILCITEVFYDVTADETTAVQDTVPGTPESPNSSTTADLDRPEDIEESTSRTAESQGFYQRYKQFVVKHNKTFTIVLGVLSGLLLVGALVA CCVKGGEMKEYVAFLIIPIVFWMGLFGYMVYKLYGNKVMAFFKNKKAAVVKSTVDSTG
	BoLA-JSP.1	MVRYRKLSVALLLYTTILCITEVFYDVTADETTAVQDTVPGTPESPNSSTTADLDRPEDIEESTSRTAESQGFYQRYKQFVVKHNKTFTIVLGVLSGLLLVGALVA CCVKGGEMKEYVAFLIIPIVFWMGLFGYMVYKLYGNKVMAFFKNKKAAVVKSTVDSTG
	BoLA-T2a	MVRYRKLSVALLLYTTILCITEVFYDVTADETTAVQDTVPGTPESPNSSTTADLDRPEDIEESTSRTAESQGFYQRYKQFVVKHNKTFTIVLGVLSGLLLVGALVA CCVKGGEMKEYVAFLIIPIVFWMGLFGYMVYKLYGNKVMAFFKNKKAAVVKSTVDSTG

ID proteína	Apresentação	Sequência
XP_001611131.1	BoLA-T2b	MVRYRKLSVALLLYTTILCITEVFYDVTADETTAVQDTVPGTPESPNSSTTADLDRPEDIEESTSRTAESQGFYQRYKQFVVKHNKTFTIVLG VLSGLLLVGALVACCVKGGEMKEYVAFLIIPIVFWMGLFGYMVYKLYGNKVMAFFKNKKAAVVKSTVDSTG
	BoLA-T2C	MVRYRKLSVALLLYTTILCITEVFYDVTADETTAVQDTVPGTPESPNSSTTADLDRPEDIEESTSRTAESQGFYQRYKQFVVKHNKTFTIVLGVLSGLLLVGALVA CCVKGGEMKEYVAFLIIPIVFWMGLFGYMVYKLYGNKVMAFFKNKKAAVVKSTVDSTG
	Exposto	MVRYRKLSVALLLYTTILCITEVFYDVTADETTAVQDTVPGTPESPNSSTTADLDRPEDIEESTSRTAESQGFYQRYKQFVVKHNKTFTIVLG VLSGLLLVGALVACCVKGGEMKEYVAFLIIPIVFWMGLFGYMVYKLYGNKVMAFFKNKKAAVVKSTVDSTG
	Coil	MVRYRKLSVALLLYTTILCITEVFYDVTADETTAVQDTVPGTPESPNSSTTADLDRPEDIEESTSRTAESQGFYQRYKQFVVKHNKTFTIVLG VLSGLLLVGALVACCVKGGEMKEYVAFLIIPIVFWMGLFGYMVYKLYGNKVMAFFKNKKAAVVKSTVDSTG
	deepTMHMM	MVRYRKLSVALLLYTTILCITEVFYDVTADETTAVQDTVPGTPESPNSSTTADLDRPEDIEESTSRTAESQGFYQRYKQFVVKHNKTFTIVLGVLSGLLLVGALVA CCVKGGEMKEYVAFLIIPIVFWMGLFGYMVYKLYGNKVMAFFKNKKAAVVKSTVDSTG
	IUPRed	MVRYRKLSVALLLYTTILCITEVFYDVTADETTAVQDTVPGTPESPNSSTTADLDRPEDIEESTSRTAESQGFYQRYKQFVVKHNKTFTIVLGVLSGLLLVGALVA CCVKGGEMKEYVAFLIIPIVFWMGLFGYMVYKLYGNKVMAFFKNKKAAVVKSTVDSTG
XP_001611131.1	Epitopo B dtu	MALSQKFSTALLLYTTILWISQVTYDVSANELAEVQNTVPGSAESNEQTAAGDLDSSYIRTQDSTSSTGDSLGYYQKYKQFVNKHNKTFTIVLGVLSAIFLVGVII AIAFYCFQENGKDGANYVSIVIIPIVFWLALFGYMVYKLYGSEILAYFKSKKAPVVKSTVDTSG
	Epitopo B iedb	MALSQKFSTALLLYTTILWISQVTYDVSANELAEVQNTVPGSAESNEQTAAGDLDSSYIRTQDSTSSTGDSLGYYQKYKQFVNKHNKTFTIVLGVLSAIFLVGVII AIAFYCFQENGKDGANYVSIVIIPIVFWLALFGYMVYKLYGSEILAYFKSKKAPVVKSTVDTSG
	BoLA-D18.4	MALSQKFSTALLLYTTILWISQVTYDVSANELAEVQNTVPGSAESNEQTAAGDLDSSYIRTQDSTSSTGDSLGYYQKYKQFVNKHNKTFTIVLGVLSAIFLVGVII AIAFYCFQENGKDGANYVSIVIIPIVFWLALFGYMVYKLYGSEILAYFKSKKAPVVKSTVDTSG
	BoLA-HD6	MALSQKFSTALLLYTTILWISQVTYDVSANELAEVQNTVPGSAESNEQTAAGDLDSSYIRTQDSTSSTGDSLGYYQKYKQFVNKHNKTFTIVLGVLSAIFLVGVII AIAFYCFQENGKDGANYVSIVIIPIVFWLALFGYMVYKLYGSEILAYFKSKKAPVVKSTVDTSG
	BoLA-JSP.1	MALSQKFSTALLLYTTILWISQVTYDVSANELAEVQNTVPGSAESNEQTAAGDLDSSYIRTQDSTSSTGDSLGYYQKYKQFVNKHNKTFTIVLGVLSAIFLVGVII AIAFYCFQENGKDGANYVSIVIIPIVFWLALFGYMVYKLYGSEILAYFKSKKAPVVKSTVDTSG
	BoLA-T2a	MALSQKFSTALLLYTTILWISQVTYDVSANELAEVQNTVPGSAESNEQTAAGDLDSSYIRTQDSTSSTGDSLGYYQKYKQFVNKHNKTFTIVLGVLSAIFLVGVII AIAFYCFQENGKDGANYVSIVIIPIVFWLALFGYMVYKLYGSEILAYFKSKKAPVVKSTVDTSG
	BoLA-T2b	MALSQKFSTALLLYTTILWISQVTYDVSANELAEVQNTVPGSAESNEQTAAGDLDSSYIRTQDSTSSTGDSLGYYQKYKQFVNKHNKTFTIVLGVLSAIFLVGVII AIAFYCFQENGKDGANYVSIVIIPIVFWLALFGYMVYKLYGSEILAYFKSKKAPVVKSTVDTSG
	BoLA-T2C	MALSQKFSTALLLYTTILWISQVTYDVSANELAEVQNTVPGSAESNEQTAAGDLDSSYIRTQDSTSSTGDSLGYYQKYKQFVNKHNKTFTIVLGVLSAIFLVGVII AIAFYCFQENGKDGANYVSIVIIPIVFWLALFGYMVYKLYGSEILAYFKSKKAPVVKSTVDTSG
	Exposto	MALSQKFSTALLLYTTILWISQVTYDVSANELAEVQNTVPGSAESNEQTAAGDLDSSYIRTQDSTSSTGDSLGYYQKYKQFVNKHNKTFTIVLGVLSAIFLVGVII AIAFYCFQENGKDGANYVSIVIIPIVFWLALFGYMVYKLYGSEILAYFKSKKAPVVKSTVDTSG
	Coil	MALSQKFSTALLLYTTILWISQVTYDVSANELAEVQNTVPGSAESNEQTAAGDLDSSYIRTQDSTSSTGDSLGYYQKYKQFVNKHNKTFTIVLGVLSAIFLVGVII AIAFYCFQENGKDGANYVSIVIIPIVFWLALFGYMVYKLYGSEILAYFKSKKAPVVKSTVDTSG
	deepTMHMM	MALSQKFSTALLLYTTILWISQVTYDVSANELAEVQNTVPGSAESNEQTAAGDLDSSYIRTQDSTSSTGDSLGYYQKYKQFVNKHNKTFTIVLGVLSAIFLVGVII AIAFYCFQENGKDGANYVSIVIIPIVFWLALFGYMVYKLYGSEILAYFKSKKAPVVKSTVDTSG
	IUPRed	MALSQKFSTALLLYTTILWISQVTYDVSANELAEVQNTVPGSAESNEQTAAGDLDSSYIRTQDSTSSTGDSLGYYQKYKQFVNKHNKTFTIVLGVLSAIFLVGVII AIAFYCFQENGKDGANYVSIVIIPIVFWLALFGYMVYKLYGSEILAYFKSKKAPVVKSTVDTSG
XP_051623085.1	Epitopo B dtu	MDCMVGVIGILFFLGVSANAPEGEAKVDTSTKGVGGKFFGNKKAMIIAAVILVLLIVVGVSIGMWAHNGGGGGKEAWSAGIVIGVLAIGGILCYIFRNKIRNLFAK KAAEEVVTS
	Epitopo B iedb	MDCMVGVIGILFFLGVSANAPEGEAKVDTSTKGVGGKFFGNKKAMIIAAVILVLLIVVGVSIGMWAHNGGGGGKEAWSAGIVIGVLAIGGILCYIFRNKIRNLFAK KAAEEVVTS

ID proteína	Apresentação	Sequência
	BoLA-D18.4	MDCMVGVIGILFFLGVSANAPEGEAKVDTSTKGVGGKFFGNKKAMIIAAVILVLLIVVGVSIGMWAHNGGGGGKEAWSAGIVIGVLAIGGILCYIFRNKIRNLFAK KAAEEVVTS
	BoLA-HD6	MDCMVGVIGILFFLGVSANAPEGEAKVDTSTKGVGGKFFGNKKAMIIAAVILVLLIVVGVSIGMWAHNGGGGGKEAWSAGIVIGVLAIGGILCYIFRNKIRNLFAK KAAEEVVTS
	BoLA-JSP.1	MDCMVGVIGILFFLGVSANAPEGEAKVDTSTKGVGGKFFGNKKAMIIAAVILVLLIVVGVSIGMWAHNGGGGGKEAWSAGIVIGVLAIGGILCYIFRNKIRNLFAK KAAEEVVTS
	BoLA-T2a	MDCMVGVIGILFFLGVSANAPEGEAKVDTSTKGVGGKFFGNKKAMIIAAVILVLLIVVGVSIGMWAHNGGGGGKEAWSAGIVIGVLAIGGILCYIFRNKIRNLFAK KAAEEVVTS
	BoLA-T2b	MDCMVGVIGILFFLGVSANAPEGEAKVDTSTKGVGGKFFGNKKAMIIAAVILVLLIVVGVSIGMWAHNGGGGGKEAWSAGIVIGVLAIGGILCYIFRNKIRNLFAK KAAEEVVTS
	BoLA-T2C	MDCMVGVIGILFFLGVSANAPEGEAKVDTSTKGVGGKFFGNKKAMIIAAVILVLLIVVGVSIGMWAHNGGGGGKEAWSAGIVIGVLAIGGILCYIFRNKIRNLFAK KAAEEVVTS
	Exposto	MDCMVGVIGILFFLGVSANAPEGEAKVDTSTKGVGGKFFGNKKAMIIAAVILVLLIVVGVSIGMWAHNGGGGGKEAWSAGIVIGVLAIGGILCYIFRNKIRNLFAK KAAEEVVTS
	Coil	MDCMVGVIGILFFLGVSANAPEGEAKVDTSTKGVGGKFFGNKKAMIIAAVILVLLIVVGVSIGMWAHNGGGGGKEAWSAGIVIGVLAIGGILCYIFRNKIRNLFAK KAAEEVVTS
	deepTMHMM	MDCMVGVIGILFFLGVSANAPEGEAKVDTSTKGVGGKFFGNKKAMIIAAVILVLLIVVGVSIGMWAHNGGGGGKEAWSAGIVIGVLAIGGILCYIFRNKIRNLFAK KAAEEVVTS
	IUPRed	MDCMVGVIGILFFLGVSANAPEGEAKVDTSTKGVGGKFFGNKKAMIIAAVILVLLIVVGVSIGMWAHNGGGGGKEAWSAGIVIGVLAIGGILCYIFRNKIRNLFAK KAAEEVVTS
XP_001609243.1	Epitopo B dtu	MARKIAAFSFSVLGNVLKLLLAVTLLTNVLCEHQVADKVTDGAHPSCMGLTEPSPSHSLFDGSYFTYSTPGFTDDVAVSQDATTNADTPNDVTSSDATAIDDKK FEYRTSVYLVEPPYPQQYSVRENKDVDMDVVADHVGKVVRKIASYVPQNHEDAVYKQLTEKFSHGQPIPIPTYLAYSLAGISDGKLRGNNFEGLLDCLADIMLK SDSDETSNPFIIPNLFQKWWRNKQLEKTRNNVKEYLKRALFS
	Epitopo B iedb	MARKIAAFSFSVLGNVLKLLLAVTLLTNVLCEHQVADKVTDGAHPSCMGLTEPSPSHSLFDGSYFTYSTPGFTDDVAVSQDATTNADTPNDVTSSDATAIDDKK FEYRTSVYLVEPPYPQQYSVRENKDVDMDVVADHVGKVVRKIASYVPQNHEDAVYKQLTEKFSHGQPIPIPTYLAYSLAGISDGKLRGNNFEGLLDCLADIMLK SDSDETSNPFIIPNLFQKWWRNKQLEKTRNNVKEYLKRALFS
	BoLA-D18.4	MARKIAAFSFSVLGNVLKLLLAVTLLTNVLCEHQVADKVTDGAHPSCMGLTEPSPSHSLFDGSYFTYSTPGFTDDVAVSQDATTNADTPNDVTSSDATAIDDYL VEKKFEYRTSVPPYPQQYSVRENKDVDMDVVADHVGKVVRKIASYVPQNHEDAVYKQLTEKFSHGQPIPIPTYLAYSLAGISDGKLRGNNFEGLLDCLADIMLK SDSDETSNPFIIPNLFQKWWRNKQLEKTRNNVKEYLKRALFS
	BoLA-HD6	MARKIAAFSFSVLGNVLKLLLAVTLLTNVLCEHQVADKVTDGAHPSCMGLTEPSPSHSLFDGSYFTYSTPGFTDDVAVSQDATTNADTPNDVTSSDATAIDDKK FEYRTSVYLVEPPYPQQYSVRENKDVDMDVVADHVGKVVRKIASYVPQNHEDAVYKQLTEKFSHGQPIPIPTYLAYSLAGISDGKLRGNNFEGLLDCLADIMLK SDSDETSNPFIIPNLFQKWWRNKQLEKTRNNVKEYLKRALFS
	BoLA-JSP.1	MARKIAAFSFSVLGNVLKLLLAVTLLTNVLCEHQVADKVTDGAHPSCMGLTEPSPSHSLFDGSYFTYSTPGFTDDVAVSQDATTNADTPNDVTSSDATAIDDKK FEYRTSVYLVEPPYPQQYSVRENKDVDMDVVADHVGKVVRKIASYVPQNHEDAVYKQLTEKFSHGQPIPIPTYLAYSLAGISDGKLRGNNFEGLLDCLADIMLK SDSDETSNPFIIPNLFQKWWRNKQLEKTRNNVKEYLKRALFS
	BoLA-T2a	MARKIAAFSFSVLGNVLKLLLAVTLLTNVLCEHQVADKVTDGAHPSCMGLTEPSPSHSLFDGSYFTYSTPGFTDDVAVSQDATTNADTPNDVTSSDATAIDDKK FEYRTSVYLVEPPYPQQYSVRENKDVDMDVVADHVGKVVRKIASYVPQNHEDAVYKQLTEKFSHGQPIPIPTYLAYSLAGISDGKLRGNNFEGLLDCLADIMLK SDSDETSNPFIIPNLFQKWWRNKQLEKTRNNVKEYLKRALFS
	BoLA-T2b	MARKIAAFSFSVLGNVLKLLLAVTLLTNVLCEHQVADKVTDGAHPSCMGLTEPSPSHSLFDGSYFTYSTPGFTDDVAVSQDATTNADTPNDVTSSDATAIDDKK FEYRTSVYLVEPPYPQQYSVRENKDVDMDVVADHVGKVVRKIASYVPQNHEDAVYKQLTEKFSHGQPIPIPTYLAYSLAGISDGKLRGNNFEGLLDCLADIMLK SDSDETSNPFIIPNLFQKWWRNKQLEKTRNNVKEYLKRALFS

ID proteína	Apresentação	Sequência
XP_001609537.1	BoLA-T2C	MARKIAAFSFSVLGNVLKLLLAVTLLTNVLCEHQVADKVTDGAHPSCMGLTEPSPSHSLFDGSYFTYSTPGFTDDVAVSQDATTNADTPNDVTSSDATAIDDKK FEYRTSVYLVEPPYPQQYSVRENKDVDMDVVADHVGKVVRKIASYVPQNHEDAVYKQLTEKFSHGQPIPIPTYLAYSLAGISDGKLRGNNFEGLLDCLADIMLK SDSDETSNPFIIPNLFQKWWRNKQLEKTRNNVKEYLKRALFS
	Exposto	MARKIAAFSFSVLGNVLKLLLAVTLLTNVLCEHQVADKVTDGAHPSCMGLTEPSPSHSLFDGSYFTYSTPGFTDDVAVSQDATTNADTPNDVTSSDATAIDDKK FEYRTSVYLVEPPYPQQYSVRENKDVDMDVVADHVGKVVRKIASYVPQNHEDAVYKQLTEKFSHGQPIPIPTYLAYSLAGISDGKLRGNNFEGLLDCLADIMLK SDSDETSNPFIIPNLFQKWWRNKQLEKTRNNVKEYLKRALFS
	Coil	MARKIAAFSFSVLGNVLKLLLAVTLLTNVLCEHQVADKVTDGAHPSCMGLTEPSPSHSLFDGSYFTYSTPGFTDDVAVSQDATTNADTPNDVTSSDATAIDDKK FEYRTSVYLVEPPYPQQYSVRENKDVDMDVVADHVGKVVRKIASYVPQNHEDAVYKQLTEKFSHGQPIPIPTYLAYSLAGISDGKLRGNNFEGLLDCLADIMLK SDSDETSNPFIIPNLFQKWWRNKQLEKTRNNVKEYLKRALFS
	deepTMHMM	MARKIAAFSFSVLGNVLKLLLAVTLLTNVLCEHQVADKVTDGAHPSCMGLTEPSPSHSLFDGSYFTYSTPGFTDDVAVSQDATTNADTPNDVTSSDATAIDDKK FEYRTSVYLVEPPYPQQYSVRENKDVDMDVVADHVGKVVRKIASYVPQNHEDAVYKQLTEKFSHGQPIPIPTYLAYSLAGISDGKLRGNNFEGLLDCLADIMLK SDSDETSNPFIIPNLFQKWWRNKQLEKTRNNVKEYLKRALFS
	IUPRed	MARKIAAFSFSVLGNVLKLLLAVTLLTNVLCEHQVADKVTDGAHPSCMGLTEPSPSHSLFDGSYFTYSTPGFTDDVAVSQDATTNADTPNDVTSSDATAIDDKK FEYRTSVYLVEPPYPQQYSVRENKDVDMDVVADHVGKVVRKIASYVPQNHEDAVYKQLTEKFSHGQPIPIPTYLAYSLAGISDGKLRGNNFEGLLDCLADIMLK SDSDETSNPFIIPNLFQKWWRNKQLEKTRNNVKEYLKRALFS
	Epitopo B dtu	MDCMVGVIGILFFLGVSANAPEGEAKVDTSTKGVGGKFFGNKKAMIIAAVILVLLIVVGVSIGMWAHNGGGGGKEAWSAGIVIGVLAIGGILCYIFRNKIRNLFAK KAAEEVVTS
	Epitopo B iedb	MDCMVGVIGILFFLGVSANAPEGEAKVDTSTKGVGGKFFGNKKAMIIAAVILVLLIVVGVSIGMWAHNGGGGGKEAWSAGIVIGVLAIGGILCYIFRNKIRNLFAK KAAEEVVTS
	BoLA-D18.4	MD**C**MVGVIGILFFLGVSANAPEGEAKVDTSTKGVGGKFFGNKKAMIIAAVILVLLIVVGVSIGMWAHNGGGGGKEAWSAGIVIGVLAIGGILCYIFRNKIRNLFAK KAAEEVVTS
	BoLA-HD6	MDCMVGVIGILFFLGVSANAPEGEAKVDTSTKGVGGKFFGNKKAMIIAAVILVLLIVVGVSIGMWAHNGGGGGKEAWSAGIVIGVLAIGGILCYIFRNKIRNLFAK KAAEEVVTS
	BoLA-JSP.1	MDCMVGVIGILFFLGVSANAPEGEAKVDTSTKGVGGKFFGNKKAMIIAAVILVLLIVVGVSIGMWAHNGGGGGKEAWSAGIVIGVLAIGGILCYIFRNKIRNLFAK KAAEEVVTS
	BoLA-T2a	MDCMVGVIGILFFLGVSANAPEGEAKVDTSTKGVGGKFFGNKKAMIIAAVILVLLIVVGVSIGMWAHNGGGGGKEAWSAGIVIGVLAIGGILCYIFRNKIRNLFAK KAAEEVVTS
	BoLA-T2b	MDCMVGVIGILFFLGVSANAPEGEAKVDTSTKGVGGKFFGNKKAMIIAAVILVLLIVVGVSIGMWAHNGGGGGKEAWSAGIVIGVLAIGGILCYIFRNKIRNLFAK KAAEEVVTS
	BoLA-T2C	MDCMVGVIGILFFLGVSANAPEGEAKVDTSTKGVGGKFFGNKKAMIIAAVILVLLIVVGVSIGMWAHNGGGGGKEAWSAGIVIGVLAIGGILCYIFRNKIRNLFAK KAAEEVVTS
	Exposto	MDCMVGVIGILFFLGVSANAPEGEAKVDTSTKGVGGKFFGNKKAMIIAAVILVLLIVVGVSIGMWAHNGGGGGKEAWSAGIVIGVLAIGGILCYIFRNKIRNLFAK KAAEEVVTS
	Coil	MDCMVGVIGILFFLGVSANAPEGEAKVDTSTKGVGGKFFGNKKAMIIAAVILVLLIVVGVSIGMWAHNGGGGGKEAWSAGIVIGVLAIGGILCYIFRNKIRNLFAK KAAEEVVTS
	deepTMHMM	MDCMVGVIGILFFLGVSANAPEGEAKVDTSTKGVGGKFFGNKKAMIIAAVILVLLIVVGVSIGMWAHNGGGGGKEAWSAGIVIGVLAIGGILCYIFRNKIRNLFAK KAAEEVVTS
	IUPRed	MDCMVGVIGILFFLGVSANAPEGEAKVDTSTKGVGGKFFGNKKAMIIAAVILVLLIVVGVSIGMWAHNGGGGGKEAWSAGIVIGVLAIGGILCYIFRNKIRNLFAK KAAEEVVTS

ID proteína	Apresentação	Sequência
XP_001608791.1	Epitopo B dtu	MDCFVGLIGIFYFLGVSANSPEGEAKVDTSTKGVGSKFFGNKKAMIIAGVILVLVIVICVSIWKCSDNGSPDAKWSAGIVIGVLAIGGILCYIFRNKIRNLFAKKAAE EVVTS
	Epitopo B iedb	MDCFVGLIGIFYFLGVSANSPEGEAKVDTSTKGVGSKFFGNKKAMIIAGVILVLVIVICVSIWKCSDNGSPDAKWSAGIVIGVLAIGGILCYIFRNKIRNLFAKKAAE EVVTS
	BoLA-D18.4	MDCFVGLIGIFYFLGVSANSPEGEAKVDTSTKGVGSKFFGNKKAMIIAGVILVLVIVICVSIWKCSDNGSPDAKWSAGIVIGVLAIGGILCYIFRNKIRNLFAKKAAE EVVTS
	BoLA-HD6	MDCFVGLIGIFYFLGVSANSPEGEAKVDTSTKGVGSKFFGNKKAMIIAGVILVLVIVICVSIWKCSDNGSPDAKWSAGIVIGVLAIGGILCYIFRNKIRNLFAKKAAE EVVTS
	BoLA-JSP.1	MDCFVGLIGIFYFLGVSANSPEGEAKVDTSTKGVGSKFFGNKKAMIIAGVILVLVIVICVSIWKCSDNGSPDAKWSAGIVIGVLAIGGILCYIFRNKIRNLFAKKAAE EVVTS
	BoLA-T2a	MDCFVGLIGIFYFLGVSANSPEGEAKVDTSTKGVGSKFFGNKKAMIIAGVILVLVIVICVSIWKCSDNGSPDAKWSAGIVIGVLAIGGILCYIFRNKIRNLFAKKAAE EVVTS
	BoLA-T2b	MDCFVGLIGIFYFLGVSANSPEGEAKVDTSTKGVGSKFFGNKKAMIIAGVILVLVIVICVSIWKCSDNGSPDAKWSAGIVIGVLAIGGILCYIFRNKIRNLFAKKAAE EVVTS
	BoLA-T2C	MDCFVGLIGIFYFLGVSANSPEGEAKVDTSTKGVGSKFFGNKKAMIIAGVILVLVIVICVSIWKCSDNGSPDAKWSAGIVIGVLAIGGILCYIFRNKIRNLFAKKAAE EVVTS
	Exposto	MDCFVGLIGIFYFLGVSANSPEGEAKVDTSTKGVGSKFFGNKKAMIIAGVILVLVIVICVSIWKCSDNGSPDAKWSAGIVIGVLAIGGILCYIFRNKIRNLFAKKAAE EVVTS
	Coil	MDCFVGLIGIFYFLGVSANSPEGEAKVDTSTKGVGSKFFGNKKAMIIAGVILVLVIVICVSIWKCSDNGSPDAKWSAGIVIGVLAIGGILCYIFRNKIRNLFAKKAAE EVVTS
	deepTMHMM	MDCFVGLIGIFYFLGVSANSPEGEAKVDTSTKGVGSKFFGNKKAMIIAGVILVLVIVICVSIWKCSDNGSPDAKWSAGIVIGVLAIGGILCYIFRNKIRNLFAKKAAE EVVTS
	IUPRed	MDCFVGLIGIFYFLGVSANSPEGEAKVDTSTKGVGSKFFGNKKAMIIAGVILVLVIVICVSIWKCSDNGSPDAKWSAGIVIGVLAIGGILCYIFRNKIRNLFAKKAAE EVVTS
XP_001610365.2	Epitopo B dtu	MYGTQTRRFCALSMLMKLLLALLPAILLLAPPAVPIVAPRRQSLSSSFGKFNTRLNSVQQPLCSVPSSRLRNETISVVVHSFWRQDSIFNTRIELVGNDTDTGLQ IKRKIEAITGVPICLQKLYASDGPPPNDAMVPLEDSDRIGYFPSLIRLRHDTHGKEIHIQLKLPVPLLYRTTYDPGKYQEYLSAVQRYSTLLRKAKDSRSNPKLML DPLSVMEENVMDNATADDSILGGTKLDSVTNIGYNDTIPADSYSYKSRFITPNRRIYLNFFEDLPEPMGSAKLLYWLNRQLPIDWNEHLKIAFFCYLIRETCDNEE WVKQLLLYSPPLFIISKFKPVRLALLTLFHMLPLNWLPRAITTIFPAHIAQLME
	Epitopo B iedb	MYGTQTRRFCALSMLMKLLLALLPAILLLAPPAVPIVAPRRQSLSSSFGKFNTRLNSVQQPLCSVPSSRLRNETISVVVHSFWRQDSIFNTRIELVGNDTDTGLQ IKRKIEAITGVPICLQKLYASDGPPPNDAMVPLEDSDRIGYFPSLIRLRHDTHGKEIHIQLKLPVPLLYRTTYDPGKYQEYLSAVQRYSTLLRKAKDSRSNPKLML DPLSVMEENVMDNATADDSILGGTKLDSVTNIGYNDTIPADSYSYKSRFITPNRRIYLNFFEDLPEPMGSAKLLYWLNRQLPIDWNEHLKIAFFCYLIRETCDNEE WVKQLLLYSPPLFIISKFKPVRLALLTLFHMLPLNWLPRAITTIFPAHIAQLME
	BoLA-D18.4	MYGTQTRRFCALSMLMKLLLALLPAILLLAPPAVPIVAPRRQSLSSSFGKFNTRLNSVQQPLCSVPSSRLRNETISVVVHSFWRQDSIFNTRIELVGNDTDTGLQ IKRKIEAITGVPICLQKLYASDGPPPNDAMVPLEDSDRIGYFPSLIRLRHDTHGKEIHIQLKLPVPLLYRTTYDPGKYQEYLSAVQRYSTLLRKAKDSRSNPKLML DPLSVMEENVMDNATADDSILGGTKLDSVTNIGYNDTIPADSYSYKSRFITPNRRIYLNFFEDLPEPMGSAKLLYWLNRQLPIDWNEHLKIAFFCYLIRETCDNEE WVKQLLLYSPPLFIISKFKPVRLALLTLFHMLPLNWLPRAITTIFPAHIAQLME
	BoLA-HD6	MYGTQTRRFCALSMLMKLLLALLPAILLLAPPAVPIVAPRRQSLSSSFGKFNTRLNSVQQPLCSVPSSRLRNETISVVVHSFWRQDSIFNTRIELVGNDTDTGLQ IKRKIEAITGVPICLQKLYASDGPPPNDAMVPLEDSDRIGYFPSLIRLRHDTHGKEIHIQLKLPVPLLYRTTYDPGKYQEYLSAVQRYSTLLRKAKDSRSNPKLML DPLSVMEENVMDNATADDSILGGTKLDSVTNIGYNDTIPADSYSYKSRFITPNRRIYLNFFEDLPEPMGSAKLLYWLNRQLPIDWNEHLKIAFFCYLIRETCDNEE WVKQLLLYSPPLFIISKFKPVRLALLTLFHMLPLNWLPRAITTIFPAHIAQLME

ID proteína	Apresentação	Sequência
	BoLA-JSP.1	MYGTQTRRFCALSMLMKLLLALLPAILLLAPPAVPIVAPRRQSLSSSFGKFNTRLNSVQQPLCSVPSSRLRNETISVVVHSFWRQDSIFNTRIELVGNDTDTGLQ IKRKIEAITGVPICLQKLYASDGPPPNDAMVPLEDSDRIGYFPSLIRLRHDTHGKEIHIQLKLPVPLLYRTTYDPGKYQEYLSAVQRYSTLLRKAKDSRSNPKLML DPLSVMEENVMDNATADDSILGGTKLDSVTNIGYNDTIPADSYSYKSRFITPNRRIYLNFFEDLPEPMGSAKLLYWLNRQLPIDWNEHLKIAFFCYLIRETCDNEE WVKQLLLYSPPLFIISKFKPVRLALLTLFHMLPLNWLPRAITTIFPAHIAQLME
	BoLA-T2a	MYGTQTRRFCALSMLMKLLLALLPAILLLAPPAVPIVAPRRQSLSSSFGKFNTRLNSVQQPLCSVPSSRLRNETISVVVHSFWRQDSIFNTRIELVGNDTDTGLQ IKRKIEAITGVPICLQKLYASDGPPPNDAMVPLEDSDRIGYFPSLIRLRHDTHGKEIHIQLKLPVPLLYRTTYDPGKYQEYLSAVQRYSTLLRKAKDSRSNPKLML DPLSVMEENVMDNATADDSILGGTKLDSVTNIGYNDTIPADSYSYKSRFITPNRRIYLNFFEDLPEPMGSAKLLYWLNRQLPIDWNEHLKIAFFCYLIRETCDNEE WVKQLLLYSPPLFIISKFKPVRLALLTLFHMLPLNWLPRAITTIFPAHIAQLME
	BoLA-T2b	MYGTQTRRFCALSMLMKLLLALLPAILLLAPPAVPIVAPRRQSLSSSFGKFNTRLNSVQQPLCSVPSSRLRNETISVVVHSFWRQDSIFNTRIELVGNDTDTGLQ IKRKIEAITGVPICLQKLYASDGPPPNDAMVPLEDSDRIGYFPSLIRLRHDTHGKEIHIQLKLPVPLLYRTTYDPGKYQEYLSAVQRYSTLLRKAKDSRSNPKLML DPLSVMEENVMDNATADDSILGGTKLDSVTNIGYNDTIPADSYSYKSRFITPNRRIYLNFFEDLPEPMGSAKLLYWLNRQLPIDWNEHLKIAFFCYLIRETCDNEE WVKQLLLYSPPLFIISKFKPVRLALLTLFHMLPLNWLPRAITTIFPAHIAQLME
	BoLA-T2C	MYGTQTRRFCALSMLMKLLLALLPAILLLAPPAVPIVAPRRQSLSSSFGKFNTRLNSVQQPLCSVPSSRLRNETISVVVHSFWRQDSIFNTRIELVGNDTDTGLQ IKRKIEAITGVPICLQKLYASDGPPPNDAMVPLEDSDRIGYFPSLIRLRHDTHGKEIHIQLKLPVPLLYRTTYDPGKYQEYLSAVQRYSTLLRKAKDSRSNPKLML DPLSVMEENVMDNATADDSILGGTKLDSVTNIGYNDTIPADSYSYKSRFITPNRRIYLNFFEDLPEPMGSAKLLYWLNRQLPIDWNEHLKIAFFCYLIRETCDNEE WVKQLLLYSPPLFIISKFKPVRLALLTLFHMLPLNWLPRAITTIFPAHIAQLME
	Exposto	MYGTQTRRFCALSMLMKLLLALLPAILLLAPPAVPIVAPRRQSLSSSFGKFNTRLNSVQQPLCSVPSSRLRNETISVVVHSFWRQDSIFNTRIELVGNDTDTGLQ IKRKIEAITGVPICLQKLYASDGPPPNDAMVPLEDSDRIGYFPSLIRLRHDTHGKEIHIQLKLPVPLLYRTTYDPGKYQEYLSAVQRYSTLLRKAKDSRSNPKLML DPLSVMEENVMDNATADDSILGGTKLDSVTNIGYNDTIPADSYSYKSRFITPNRRIYLNFFEDLPEPMGSAKLLYWLNRQLPIDWNEHLKIAFFCYLIRETCDNEE WVKQLLLYSPPLFIISKFKPVRLALLTLFHMLPLNWLPRAITTIFPAHIAQLME
	Coil	MYGTQTRRFCALSMLMKLLLALLPAILLLAPPAVPIVAPRRQSLSSSFGKFNTRLNSVQQPLCSVPSSRLRNETISVVVHSFWRQDSIFNTRIELVGNDTDTGLQ IKRKIEAITGVPICLQKLYASDGPPPNDAMVPLEDSDRIGYFPSLIRLRHDTHGKEIHIQLKLPVPLLYRTTYDPGKYQEYLSAVQRYSTLLRKAKDSRSNPKLML DPLSVMEENVMDNATADDSILGGTKLDSVTNIGYNDTIPADSYSYKSRFITPNRRIYLNFFEDLPEPMGSAKLLYWLNRQLPIDWNEHLKIAFFCYLIRETCDNEE WVKQLLLYSPPLFIISKFKPVRLALLTLFHMLPLNWLPRAITTIFPAHIAQLME
	deepTMHMM	MYGTQTRRFCALSMLMKLLLALLPAILLLAPPAVPIVAPRRQSLSSSFGKFNTRLNSVQQPLCSVPSSRLRNETISVVVHSFWRQDSIFNTRIELVGNDTDTGLQ IKRKIEAITGVPICLQKLYASDGPPPNDAMVPLEDSDRIGYFPSLIRLRHDTHGKEIHIQLKLPVPLLYRTTYDPGKYQEYLSAVQRYSTLLRKAKDSRSNPKLML DPLSVMEENVMDNATADDSILGGTKLDSVTNIGYNDTIPADSYSYKSRFITPNRRIYLNFFEDLPEPMGSAKLLYWLNRQLPIDWNEHLKIAFFCYLIRETCDNEE WVKQLLLYSPPLFIISKFKPVRLALLTLFHMLPLNWLPRAITTIFPAHIAQLME
	IUPRed	MYGTQTRRFCALSMLMKLLLALLPAILLLAPPAVPIVAPRRQSLSSSFGKFNTRLNSVQQPLCSVPSSRLRNETISVVVHSFWRQDSIFNTRIELVGNDTDTGLQ IKRKIEAITGVPICLQKLYASDGPPPNDAMVPLEDSDRIGYFPSLIRLRHDTHGKEIHIQLKLPVPLLYRTTYDPGKYQEYLSAVQRYSTLLRKAKDSRSNPKLML DPLSVMEENVMDNATADDSILGGTKLDSVTNIGYNDTIPADSYSYKSRFITPNRRIYLNFFEDLPEPMGSAKLLYWLNRQLPIDWNEHLKIAFFCYLIRETCDNEE WVKQLLLYSPPLFIISKFKPVRLALLTLFHMLPLNWLPRAITTIFPAHIAQLME
XP_001610035.1	Epitopo B dtu	MGLWGYGFTRESKRARATRRYGAFYLCSMFLLPSFIWYCFGNPAVTGWFIKRAIPITYPPESNPRVISRIYHDKSDGNNQKSKE
	Epitopo B iedb	MGLWGYGFTRESKRARATRRYGAFYLCSMFLLPSFIWYCFGNPAVTGWFIKRAIPITYPPESNPRVISRIYHDKSDGNNQKSKE
	BoLA-D18.4	MGLWGYGFTRESKRARATRRYGAFYLCSMFLLPSFIWYCFGNPAVTGWFIKRAIPITYPPESNPRVISRIYHDKSDGNNQKSKE
	BoLA-HD6	MGLWGYGFTRESKRARATRRYGAFYLCSMFLLPSFIWYCFGNPAVTGWFIKRAIPITYPPESNPRVISRIYHDKSDGNNQKSKE
	BoLA-JSP.1	MGLWGYGFTRESKRARATRRYGAFYLCSMFLLPSFIWYCFGNPAVTGWFIKRAIPITYPPESNPRVISRIYHDKSDGNNQKSKE
	BoLA-T2a	MGLWGYGFTRESKRARATRRYGAFYLCSMFLLPSFIWYCFGNPAVTGWFIKRAIPITYPPESNPRVISRIYHDKSDGNNQKSKE
	BoLA-T2b	MGLWGYGFTRESKRARATRRYGAFYLCSMFLLPSFIWYCFGNPAVTGWFIKRAIPITYPPESNPRVISRIYHDKSDGNNQKSKE

ID proteína	Apresentação	Sequência
	BoLA-T2C	MGLWGYGFTRESKRARATRRYGAFYLCSMFLLPSFIWYCFGNPAVTGWFIKRAIPITYPPESNPRVISRIYHDKSDGNNQKSKE
	Exposto	MGLWGYGFTRESKRARATRRYGAFYLCSMFLLPSFIWYCFGNPAVTGWFIKRAIPITYPPESNPRVISRIYHDKSDGNNQKSKE
	Coil	MGLWGYGFTRESKRARATRRYGAFYLCSMFLLPSFIWYCFGNPAVTGWFIKRAIPITYPPESNPRVISRIYHDKSDGNNQKSKE
	deepTMHMM	MGLWGYGFTRESKRARATRRYGAFYLCSMFLLPSFIWYCFGNPAVTGWFIKRAIPITYPPESNPRVISRIYHDKSDGNNQKSKE
	IUPRed	MGLWGYGFTRESKRARATRRYGAFYLCSMFLLPSFIWYCFGNPAVTGWFIKRAIPITYPPESNPRVISRIYHDKSDGNNQKSKE

ID: identificador da proteína; Epítopo B DTU: regiões preditas pelo BepiPred 2.0; Epítopo B IEDB: regiões preditas pela Immune Epitope Database (IEDB); BoLA-D18.4: BoLA-HD6: BoLA-JSP.1: BoLA-T2a: BoLA-T2b e BoLA-T2C: regiões com potencial de ligação a moléculas BoLA de classe I preditas pelo NetMHC 4.0; Exposto: regiões classificadas como extracelulares pela análise de topologia; Coil: regiões classificadas como coil; deepTMHMM: predição da topologia transmembrana; IUPred3: regiões intrinsecamente desordenadas. Sublinhado: regiões identificadas nas respectivas análises.
Fonte: Elaborada pela autora (2026).

APÊNDICE B – Valores de absorbância bruta obtidos na padronização do ELISA indireto utilizando os peptídeos CNPGL-Bbovis-5E2, CNPGL-Bbovis-5E3 e CNPGL-Bbovis-5E5 conjugados ao KLH.

Antígeno/ Diluição Sérica	Absorbância bruta															
	Pool positivo								Pool negativo							
	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	0	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	0
CNPGL-Bbovis-5E2 + KLH 40 ug/mL	0,936	0,665	0,781	0,575	0,461	0,388	0,3	0,203	0,795	0,641	0,659	0,573	0,464	0,414	0,321	0,196
CNPGL-Bbovis-5E2 + KLH 20 ug/mL	0,954	0,877	0,916	0,656	0,493	0,419	0,304	0,194	0,807	0,554	0,644	0,548	0,427	0,403	0,341	0,203
CNPGL-Bbovis-5E2 + KLH 10 ug/mL	0,673	0,725	0,719	0,61	0,461	0,351	0,279	0,161	0,769	0,493	0,577	0,375	0,384	0,345	0,313	0,178
CNPGL-Bbovis-5E2 + KLH 5 ug/mL	0,704	0,716	0,759	0,549	0,438	0,354	0,282	0,148	0,672	0,547	0,468	0,457	0,316	0,28	0,238	0,164
CNPGL-Bbovis-5E2 + KLH 2,5 ug/mL	0,997	0,787	0,888	0,562	0,456	0,325	0,24	0,128	0,601	0,279	0,353	0,345	0,254	0,221	0,193	0,139
CNPGL-Bbovis-5E3 + KLH 40 ug/mL	0,802	0,765	0,68	0,509	0,422	0,292	0,208	0,115	0,324	0,484	0,278	0,291	0,197	0,2	0,138	0,137
CNPGL-Bbovis-5E3 + KLH 20 ug/mL	0,903	0,799	0,745	0,598	0,404	0,317	0,225	0,111	0,444	0,44	0,275	0,315	0,191	0,194	0,147	0,123
CNPGL-Bbovis-5E3 + KLH 10 ug/mL	0,992	0,827	0,75	0,569	0,402	0,216	0,146	0,106	0,362	0,363	0,256	0,291	0,212	0,172	0,111	0,124
CNPGL-Bbovis-5E3 + KLH 5 ug/mL	0,856	0,848	0,796	0,531	0,4	0,35	0,157	0,109	0,34	0,291	0,273	0,264	0,141	0,145	0,105	0,086
CNPGL-Bbovis-5E3 + KLH 2,5 ug/mL	0,909	0,869	0,599	0,444	0,161	0,288	0,218	0,084	0,288	0,286	0,165	0,23	0,135	0,156	0,117	0,096
CNPGL-Bbovis-5E5 + KLH 40 ug/mL	1,212	1,05	0,911	0,757	0,461	0,419	0,341	0,102	0,506	0,426	0,202	0,321	0,178	0,204	0,155	0,096
CNPGL-Bbovis-5E5 + KLH 20 ug/mL	1,231	1,064	0,926	0,749	0,61	0,426	0,314	0,112	0,535	0,449	0,326	0,284	0,231	0,173	0,144	0,088
CNPGL-Bbovis-5E5 + KLH 10 ug/mL	1,237	0,902	0,918	0,705	0,536	0,408	0,287	0,275	0,469	0,373	0,32	0,245	0,2	0,163	0,128	0,1
CNPGL-Bbovis-5E5 + KLH 5 ug/mL	1,212	1,048	0,709	0,639	0,523	0,4	0,257	0,099	0,457	0,137	0,28	0,235	0,197	0,163	0,137	0,099

CNPGL-Bbovis-5E5 + KLH 2,5 ug/mL	1,12	0,869	0,875	0,661	0,539	0,34	0,295	0,083	0,445	0,367	0,281	0,215	0,19	0,155	0,117	0,084
KLH 40 ug/mL	0,970	0,729	0,546	0,533	0,430	0,308	0,213	0,107	0,710	0,391	0,411	0,266	0,197	0,152	0,141	0,107
KLH 20 ug/mL	0,922	0,761	0,640	0,467	0,363	0,235	0,193	0,106	0,800	0,457	0,435	0,234	0,193	0,156	0,139	0,106
KLH 10 ug/mL	0,886	0,750	0,573	0,449	0,371	0,270	0,197	0,101	0,670	0,510	0,388	0,268	0,208	0,165	0,141	0,112
KLH 5 ug/mL	0,886	0,781	0,551	0,451	0,353	0,271	0,205	0,107	0,680	0,478	0,399	0,257	0,225	0,155	0,135	0,119
KLH 2,5 ug/mL	0,915	0,688	0,574	0,405	0,357	0,267	0,207	0,103	0,608	0,435	0,392	0,229	0,257	0,179	0,149	0,107
Sem antígeno	1,024	0,901	0,808	0,603	0,434	0,344	0,212	0,094	0,376	0,332	0,203	0,219	0,155	0,136	0,111	0,113

Fonte: elaborada pela autora (2026).

APÊNDICE C – Valores de absorbância bruta obtidos na padronização do ELISA indireto utilizando os peptídeos livres CNPGL-Bbovis-5E2, CNPGL-Bbovis-5E3 e CNPGL-Bbovis-5E5 em placas Corning® Costar® 3590 High Binding e Nunc-Immuno™ MaxiSorp™.

Antígeno/ Diluição Sérica	Placa	Absorbância bruta															
		Pool positivo								Pool negativo							
		1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	0	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	0
CNPGL-Bbovis-5E2 40 ug/mL	Corning 3590	0,295	0,252	0,192	0,156	0,114	0,098	0,086	0,08	0,138	0,113	0,098	0,082	0,083	0,074	0,075	0,071
CNPGL-Bbovis-5E2 40 ug/mL	Nunc MaxiSorp	0,394	0,278	0,221	0,156	0,14	0,106	0,087	0,098	0,145	0,115	0,087	0,075	0,066	0,071	0,072	0,077
CNPGL-Bbovis-5E2 20 ug/mL	Corning 3590	0,369	0,288	0,212	0,161	0,125	0,108	0,091	0,075	0,187	0,138	0,117	0,09	0,078	0,076	0,078	0,074
CNPGL-Bbovis-5E2 20 ug/mL	Nunc MaxiSorp	0,421	0,275	0,229	0,162	0,134	0,102	0,097	0,073	0,181	0,118	0,106	0,07	0,063	0,074	0,073	0,07
CNPGL-Bbovis-5E2 10 ug/mL	Corning 3590	0,443	0,291	0,223	0,176	0,134	0,111	0,097	0,076	0,188	0,166	0,135	0,106	0,091	0,086	0,084	0,078
CNPGL-Bbovis-5E2 10 ug/mL	Nunc MaxiSorp	0,459	0,273	0,244	0,158	0,131	0,106	0,09	0,075	0,18	0,15	0,111	0,095	0,077	0,085	0,081	0,08
CNPGL-Bbovis-5E2 5 ug/mL	Corning 3590	0,33	0,397	0,248	0,19	0,129	0,111	0,095	0,078	0,19	0,156	0,139	0,137	0,093	0,085	0,083	0,081
CNPGL-Bbovis-5E2 5 ug/mL	Nunc MaxiSorp	0,507	0,314	0,253	0,17	0,145	0,106	0,091	0,077	0,194	0,171	0,126	0,093	0,09	0,081	0,078	0,077
CNPGL-Bbovis-5E2 2,5 ug/mL	Corning 3590	0,549	0,376	0,287	0,199	0,137	0,114	0,098	0,075	0,202	0,156	0,134	0,119	0,095	0,086	0,086	0,084
CNPGL-Bbovis-5E2 2,5 ug/mL	Nunc MaxiSorp	0,601	0,754	0,268	0,189	0,139	0,119	0,095	0,076	0,204	0,152	0,132	0,092	0,093	0,085	0,081	0,085
CNPGL-Bbovis-5E3 40 ug/mL	Corning 3590	0,547	0,45	0,357	0,251	0,184	0,15	0,127	0,071	0,223	0,155	0,148	0,117	0,099	0,087	0,082	0,075
CNPGL-Bbovis-5E3 40 ug/mL	Nunc MaxiSorp	0,705	0,549	0,395	0,303	0,216	0,177	0,139	0,087	0,219	0,174	0,148	0,134	0,114	0,103	0,097	0,09
CNPGL-Bbovis-5E3 20 ug/mL	Corning 3590	0,571	0,437	0,36	0,261	0,183	0,141	0,115	0,077	0,197	0,155	0,131	0,111	0,093	0,087	0,079	0,074
CNPGL-Bbovis-5E3 20 ug/mL	Nunc MaxiSorp	0,697	0,539	0,381	0,288	0,211	0,161	0,138	0,097	0,204	0,174	0,138	0,124	0,111	0,127	0,095	0,089
CNPGL-Bbovis-5E3 10 ug/mL	Corning 3590	0,577	0,422	0,345	0,246	0,176	0,143	0,113	0,08	0,178	0,15	0,13	0,123	0,092	0,082	0,078	0,07
CNPGL-Bbovis-5E3 10 ug/mL	Nunc MaxiSorp	0,682	0,531	0,377	0,276	0,208	0,159	0,133	0,085	0,198	0,165	0,137	0,122	0,106	0,106	0,088	0,094

CNPGL-Bbovis-5E3 5 ug/mL	Corning 3590	0,563	0,427	0,344	0,258	0,185	0,141	0,109	0,063	0,177	0,148	0,127	0,121	0,098	0,081	0,077	0,071
CNPGL-Bbovis-5E3 5 ug/mL	Nunc MaxiSorp	0,7	0,524	0,374	0,273	0,205	0,15	0,13	0,084	0,194	0,174	0,136	0,128	0,104	0,102	0,082	0,077
CNPGL-Bbovis-5E3 2,5 ug/mL	Corning 3590	0,56	0,385	0,348	0,234	0,178	0,123	0,103	0,07	0,177	0,151	0,129	0,117	0,098	0,095	0,081	0,075
CNPGL-Bbovis-5E3 2,5 ug/mL	Nunc MaxiSorp	0,691	0,508	0,363	0,255	0,195	0,15	0,125	0,083	0,205	0,159	0,152	0,12	0,103	0,095	0,091	0,086
CNPGL-Bbovis-5E5 40 ug/mL	Corning 3590	0,547	0,45	0,357	0,251	0,184	0,15	0,127	0,071	0,223	0,155	0,148	0,117	0,099	0,087	0,082	0,075
CNPGL-Bbovis-5E5 40 ug/mL	Nunc MaxiSorp	0,705	0,549	0,395	0,303	0,216	0,177	0,139	0,087	0,219	0,174	0,148	0,134	0,114	0,103	0,097	0,09
CNPGL-Bbovis-5E5 20 ug/mL	Corning 3590	0,571	0,437	0,36	0,261	0,183	0,141	0,115	0,077	0,197	0,155	0,131	0,111	0,093	0,087	0,079	0,074
CNPGL-Bbovis-5E5 20 ug/mL	Nunc MaxiSorp	0,697	0,539	0,381	0,288	0,211	0,161	0,138	0,097	0,204	0,174	0,138	0,124	0,111	0,127	0,095	0,089
CNPGL-Bbovis-5E5 10 ug/mL	Corning 3590	0,577	0,422	0,345	0,246	0,176	0,143	0,113	0,08	0,178	0,15	0,13	0,123	0,092	0,082	0,078	0,07
CNPGL-Bbovis-5E5 10 ug/mL	Nunc MaxiSorp	0,682	0,531	0,377	0,276	0,208	0,159	0,133	0,085	0,198	0,165	0,137	0,122	0,106	0,106	0,088	0,094
CNPGL-Bbovis-5E5 5 ug/mL	Corning 3590	0,563	0,427	0,344	0,258	0,185	0,141	0,109	0,063	0,177	0,148	0,127	0,121	0,098	0,081	0,077	0,071
CNPGL-Bbovis-5E5 5 ug/mL	Nunc MaxiSorp	0,7	0,524	0,374	0,273	0,205	0,15	0,13	0,084	0,194	0,174	0,136	0,128	0,104	0,102	0,082	0,077
CNPGL-Bbovis-5E5 2,5 ug/mL	Corning 3590	0,56	0,385	0,348	0,234	0,178	0,123	0,103	0,07	0,177	0,151	0,129	0,117	0,098	0,095	0,081	0,075
CNPGL-Bbovis-5E5 2,5 ug/mL	Nunc MaxiSorp	0,691	0,508	0,363	0,255	0,195	0,15	0,125	0,083	0,205	0,159	0,152	0,12	0,103	0,095	0,091	0,086
Sem antígeno	Corning 3590	0,598	0,469	0,355	0,259	0,181	0,138	0,119	0,082	0,227	0,184	0,160	0,133	0,123	0,207	0,094	0,085
Sem antígeno	Nunc MaxiSorp	0,762	0,533	0,374	0,269	0,220	0,152	0,133	0,084	0,232	0,183	0,147	0,122	0,108	0,087	0,092	0,085

Fonte: elaborada pela autora (2026).

DECLARAÇÃO DE USO DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL

Declaro que, durante a elaboração desta dissertação, utilizei a(s) seguinte(s) ferramenta(s) de inteligência artificial:

Ferramenta(s), modelo/versão e desenvolvedor:
ChatGPT, GPT-5.6 Luna, OpenAI; Consensus, Consensus; Claude, Claude.ai, Anthropic.

Período ou data de utilização:
18/03/2026 a 10/09/2026

(X) **Revisão linguística:** correção gramatical e ortográfica e aprimoramento da clareza, coesão e estilo do texto.

(X) **Apoio à redação:** elaboração de rascunhos, reformulação de trechos ou sugestões de organização e desenvolvimento do texto.

(X) **Análise de dados:** apoio ao processamento, à organização, à exploração ou à interpretação preliminar dos dados.

(X) **Programação e análise computacional:** geração, revisão ou depuração de códigos, scripts ou fórmulas.
(X) **Visualização de dados ou geração de imagens:** apoio à elaboração ou ao refinamento de figuras, gráficos, diagramas ou ilustrações.
(X) **Apoio metodológico:** apresentação de sugestões ou alternativas relacionadas ao delineamento, aos procedimentos ou às abordagens de pesquisa.

(X) **Levantamento e organização de informações:** identificação de termos de busca, organização de conteúdo ou síntese preliminar de materiais fornecidos pelo(a) discente.
( ) Outros usos (especificar):

_____

( ) NÃO UTILIZEI FERRAMENTAS DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL NA ELABORAÇÃO DESTE RELATÓRIO.
Declaro que as ferramentas de inteligência artificial foram utilizadas exclusivamente para as finalidades indicadas acima. Todo o conteúdo produzido ou modificado com esse auxílio foi criticamente revisado e validado por mim. Assumo integral responsabilidade pela autoria intelectual do relatório, pela exatidão das informações apresentadas, pela análise e interpretação dos dados e pela verificação das referências bibliográficas e demais fontes citadas. Declaro, ainda, que o uso da(s) ferramenta(s) observou os princípios éticos, as normas institucionais e as boas práticas de integridade científica, não envolvendo fabricação, falsificação ou manipulação inadequada de dados, plágio, inserção de referências inexistentes, manipulação indevida de imagens ou qualquer outra prática que possa comprometer a confiabilidade e a integridade do trabalho. Declaro também que não foram inseridos, em ferramentas não autorizadas, dados pessoais, sigilosos, sensíveis ou informações protegidas por confidencialidade.

Por fim, declaro que as informações acima são completas e verdadeiras.

gov.br
Documento assinado digitalmente
NICOLE TAFNES DE BRITO SILVA HONORIO
Data: 10/09/2026 14:06:17-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br