



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS
DA VIDA E DA NATUREZA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOCIÊNCIAS**

**DESENVOLVIMENTO DE UMA VACINA QUIMÉRICA CONTRA *Anaplasma
phagocytophilum*, *Ehrlichia canis* E *Babesia canis* EM CÃES**

ADRIELI BARBOZA DE SOUZA

Foz do Iguaçu, Estado do Paraná
2024

**DESENVOLVIMENTO DE UMA VACINA QUIMÉRICA CONTRA *Anaplasma
phagocytophilum*, *Ehrlichia canis* E *Babesia canis* EM CÃES**

ADRIELI BARBOZA DE SOUZA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Kelvinson Fernandes Viana
Coorientadora: Msc. Açucena Veleh Rivas

Foz do Iguaçu, Estado do Paraná
2024

ADRIELI BARBOZA DE SOUZA

DESENVOLVIMENTO DE UMA VACINA QUIMÉRICA CONTRA *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis* E *Babesia canis* EM CÃES

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Kelvinson Fernandes Viana
Orientador
UNILA

Dr. Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares
Examinador
UFOP

Dr. Flávio Luiz Tavares
Examinador
UNILA

Foz do Iguaçu, Estado do Paraná, 28 de Agosto de 2024.

Catálogo elaborado pelo Setor de Tratamento da Informação
Catálogo de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA - PTI

S729

Souza, Adrieli Barboza de.

Desenvolvimento de uma vacina quimérica contra *Anaplasma Phagocytophilum*, *Ehrlichia Canis* e *Babesia Canis* em cães / Adrieli Barboza de Souza. - Foz do Iguaçu, 2024.

90 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana. Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza. Programa de Pós-Graduação em Biociências. Foz do Iguaçu-PR, 2024.

Orientador: Kelvinson Fernandes Viana.

Coorientador: Açucena Veleh Rivas.

1. Proteína recombinante. 2. Bioinformática. 3. Hemoparasitoses. 4. Vacinologia reversa. 5. Proteína quimérica. I. Viana, Kelvinson Fernandes. II. Rivas, Açucena Veleh. III. Título.

CDU 636.09

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus e à minha família por todo o apoio, em especial aos meus pais e irmãos, que nunca mediram esforços para me ajudar a realizar esse sonho. Agradeço também às minhas amigas, que me deram apoio durante toda essa jornada.

Ao meu professor orientador, Dr. Kelvinson Fernandes Viana, pelos conhecimentos, orientação, por sempre acreditar na minha capacidade e trabalho, e pelas oportunidades oferecidas ao longo desses anos de pesquisa.

À Açucena, que além de amiga, "chefa" e colega de bancada, aceitou ser minha coorientadora. Sou grata por não medir esforços para me auxiliar em cada etapa, pela paciência e pela oportunidade diária de aprendizado.

Ao Angelo, por nunca medir esforços para me ajudar, pelas contribuições no trabalho e pela parceria.

A todos que direta ou indiretamente estiveram envolvidos nesse trabalho, muito obrigada!

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biociências (PPG-BC) da Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA) pelo amadurecimento acadêmico e conhecimento oferecido durante a realização do curso de mestrado.

Agradecimento ao apoio do(a) (CAPES) Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Código de Financiamento 001, bolsa DS (Programa Demanda Social).

DE SOUZA, Adrieli Barboza de Souza. 2024. **Desenvolvimento de uma vacina quimérica contra *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis* e *Babesia canis* em cães**. Orientadores: Kelvinson Fernandes Viana (orientador); Açucena Veleh Rivas (coorientadora). 90 f. Dissertação (Mestrado) - PPG-BC (Programa de Pós-Graduação em Biociências), UNILA (Universidade Federal da Integração Latino-Americana), Foz do Iguaçu.

RESUMO

Erliquiose, babesiose e anaplasmoses são doenças de distribuição mundial que afetam cães, conhecidas como hemoparasitoses caninas. No Brasil, essas doenças, transmitidas pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, apresentam importância veterinária e humana devido ao seu caráter endêmico e potencial zoonótico. As infecções podem causar sintomas graves e inespecíficos, dificultando o diagnóstico e o tratamento eficaz. Embora existam tratamentos disponíveis, a vacinação é considerada a medida preventiva mais eficiente, segura e econômica. Contudo, até o momento, não existe uma vacina quimérica recombinante contra essas hemoparasitoses caninas. Este estudo teve como objetivo desenvolver e avaliar a segurança e imunogenicidade de uma vacina recombinante contra *Ehrlichia canis*, *Babesia canis* e *Anaplasma phagocytophilum* em cães. A proteína quimérica recombinante foi construída utilizando peptídeos imunodominantes das proteínas TRP36, CBA e VirB10, selecionados por seu potencial imunogênico contra *E. canis*, *B. canis* e *A. phagocytophilum*, respectivamente, e por sua natureza conservada. Utilizando técnicas de bioinformática, foram preditos epítomos imunodominantes, resultando em uma quimera expressa em *Escherichia coli*. Para o estudo, os cães foram distribuídos em quatro grupos experimentais (n=4/grupo): Grupo Vacina (imunizado com proteína quimera com adjuvante saponina e hidróxido de alumínio), Grupo Proteína (imunizado com proteína quimera), Grupo Adjuvante (imunizado com adjuvante saponina e hidróxido de alumínio) e Grupo Controle. Os animais receberam três doses por via subcutânea, com intervalo de 21 dias. As diferentes formulações avaliadas não induziram alterações locais ou sistêmicas, demonstrando-se seguras para administração em animais. A análise da resposta imune humoral revelou que as formulações contendo a proteína quimera, especialmente quando combinada com adjuvantes, induziram níveis significativos de anticorpos IgG anti-proteína quimérica após o protocolo vacinal. Além disso, a avaliação dos níveis de IFN- γ no sobrenadante de culturas de células, utilizando o ensaio ELISA, indicou que a vacina foi capaz de induzir uma resposta imune celular do tipo Th-1 nos grupos Proteína e Vacina, essencial para combater infecções intracelulares. Este estudo fornece evidências de que a proteína quimérica desenvolvida a partir de peptídeos imunodominantes das proteínas VirB10, CBA e TRP36 de *A. phagocytophilum*, *B. canis* e *E. canis*, respectivamente, é imunogênica e segura. Além disso, sugere-se que esta proteína pode ser uma potencial candidata a vacina contra essas hemoparasitoses caninas, necessitando de otimização adicional para garantir a estabilidade em condições práticas.

Palavras-chave: Proteína recombinante; Bioinformática; Hemoparasitoses; Vacinologia reversa; Proteína quimérica.

DE SOUZA, Adrieli Barboza. 2024. *Desarrollo de una vacuna quimérica contra Anaplasma phagocytophilum, Ehrlichia canis y Babesia canis en perros*. Asesores: VIANA, Kelvinson Fernandes Viana (asesor); RIVAS, Açucena Veleh (co-asesora). 90 h. Disertación (Maestría) - PPG-BC (Programa de Postgrado en Biociencias), UNILA (Universidad Federal de la Integración Latinoamericana), Foz do Iguaçu.

RESUMEN

La ehrlichiosis, la babesiosis y la anaplasmosis son enfermedades a nivel mundial que afectan a los perros, conocidas como hemoparasitosis canina. En Brasil, estas enfermedades, transmitidas por la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*, son de importancia veterinaria y humana por su carácter endémico y potencial zoonótico. Las infecciones pueden causar síntomas graves e inespecíficos, lo que dificulta el diagnóstico y el tratamiento eficaz. Aunque existen tratamientos disponibles, la vacunación se considera la medida preventiva más eficaz, segura y económica. Sin embargo, hasta la fecha no existe ninguna vacuna quimérica recombinante contra estas hemoparasitosis caninas. Este estudio tuvo como objetivo desarrollar y evaluar la seguridad e inmunogenicidad de una vacuna recombinante contra *Ehrlichia canis*, *Babesia canis* y *Anaplasma phagocytophilum* en perros. La proteína quimérica recombinante se construyó utilizando péptidos inmunodominantes de las proteínas TRP36, CBA y VirB10, seleccionados por su potencial inmunogénico contra *E. canis*, *B. canis* y *A. phagocytophilum*, respectivamente, y por su naturaleza conservada. Mediante técnicas bioinformáticas se predijeron epítomos inmunodominantes, dando como resultado una quimera expresada en *Escherichia coli*. Para el estudio, los perros se distribuyeron en cuatro grupos experimentales ($n=4/\text{grupo}$): Grupo Vacuna (inmunizados con proteína quimera con saponina e hidróxido de aluminio adyuvante), Grupo Proteico (inmunizados con proteína quimera), Grupo Adyuvante (inmunizados con adyuvante saponina e hidróxido de aluminio) y Grupo de Control. Los animales recibieron tres dosis por vía subcutánea, con 21 días de diferencia. Las diferentes formulaciones evaluadas no indujeron cambios locales o sistémicos, demostrando ser seguras para su administración en animales. El análisis de la respuesta inmune humoral reveló que las formulaciones que contienen la proteína quimérica, especialmente cuando se combinan con adyuvantes, indujeron niveles significativos de anticuerpos IgG anti-proteína quimérica después del protocolo de la vacuna. Además, la evaluación de los niveles de IFN- γ en el sobrenadante de cultivos celulares, mediante el ensayo ELISA, indicó que la vacuna era capaz de inducir una respuesta inmune celular del tipo Th-1 en los grupos Proteína y Vacuna, esencial para combatir infecciones intracelulares. Este estudio proporciona evidencia de que la proteína quimérica desarrollada a partir de péptidos inmunodominantes de las proteínas VirB10, CBA y TRP36 de *A. phagocytophilum*, *B. canis* y *E. canis*, respectivamente, es inmunogénica y segura. Además, se sugiere que esta proteína puede ser una posible vacuna candidata contra estas hemoparasitosis caninas, lo que requiere una optimización adicional para garantizar la estabilidad en condiciones prácticas.

Palabras clave: Proteína recombinante; Bioinformática; Hemoparasitosis; Vacunología Reversa; Proteína Quimérica.

DE SOUZA, Adrieli Barboza. 2024. *Development of a Chimeric Vaccine Against Anaplasma phagocytophilum, Ehrlichia canis, and Babesia canis in Dogs*. Advisors: VIANA, Kelvinson Fernandes Viana (advisor); RIVAS, Açucena Veleh (co-advisor). 90 pages. *Dissertation (Master's) - PPG-BC (Postgraduate Program in Biosciences), UNILA (Federal University for Latin American Integration)*, Foz do Iguaçu.

ABSTRACT

Ehrlichiosis, babesiosis and anaplasmosis are diseases that affect dogs worldwide and are known as canine hemoparasitoses. In Brazil, these diseases, transmitted by the tick Rhipicephalus sanguineus, are of veterinary and human importance due to their endemic nature and zoonotic potential. Infections can cause severe and nonspecific symptoms, making diagnosis and effective treatment difficult. Although treatments are available, vaccination is considered the most efficient, safe and cost-effective preventive measure. However, to date, there is no recombinant chimeric vaccine against these canine hemoparasitoses. This study aimed to develop and evaluate the safety and immunogenicity of a recombinant vaccine against Ehrlichia canis, Babesia canis and Anaplasma phagocytophilum in dogs. The recombinant chimeric protein was constructed using immunodominant peptides from the TRP36, CBA and VirB10 proteins, selected for their immunogenic potential against E. canis, B. canis and A. phagocytophilum, respectively, and for their conserved nature. Using bioinformatics techniques, immunodominant epitopes were predicted, resulting in a chimera expressed in Escherichia coli. For the study, the dogs were distributed into four experimental groups (n=4/group): Vaccine Group (immunized with chimera protein with saponin and aluminum hydroxide adjuvant), Protein Group (immunized with chimera protein), Adjuvant Group (immunized with saponin and aluminum hydroxide adjuvant) and Control Group. The animals received three doses subcutaneously, with an interval of 21 days. The different formulations evaluated did not induce local or systemic alterations, proving to be safe for administration in animals. The analysis of the humoral immune response revealed that the formulations containing the chimeric protein, especially when combined with adjuvants, induced significant levels of anti-chimeric protein IgG antibodies after the vaccination protocol. Furthermore, the evaluation of IFN- γ levels in the cell culture supernatant, using the ELISA assay, indicated that the vaccine was able to induce a Th-1 cellular immune response in the Protein and Vaccine groups, essential to combat intracellular infections. This study provides evidence that the chimeric protein developed from immunodominant peptides of the VirB10, CBA and TRP36 proteins of A. phagocytophilum, B. canis and E. canis, respectively, is immunogenic and safe. Furthermore, it is suggested that this protein may be a potential vaccine candidate against these canine hemoparasitoses, requiring further optimization to ensure stability under practical conditions.

Keywords: Recombinant protein; Bioinformatics; Hemoparasitosis; Reverse vaccinology; Chimeric protein.i

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida da <i>Babesia canis</i>	17
Figura 2. Representação esquemática do ciclo de crescimento da <i>Ehrlichia</i> em uma célula infectada.....	18
Figura 3. Ciclo de vida intracelular de Anaplasmatidae.....	20
Figura 4. Os ramos humorais e celulares da resposta imune.....	22
Figura 5. Integração entre os Sistemas Imunológicos Inato e Adaptativo.....	23
Figura 6. Mecanismos de Captura e Apresentação de Antígenos.....	25
Figura 7. Representação de uma Resposta Imune após a vacinação.....	37
Figura 8. Pontuação prevista (eixo y) <i>versus</i> a posição da sequência (eixo x) para epítomos lineares de células B da proteína quimera construída, preditos utilizando o programa IEDB.....	50
Figura 9. Representação esquemática da sequência peptídica da quimera 4.....	51
Figura 10. Modelo 3D da proteína quimera 4 previsto pelo programa I-TASSER.....	51
Figura 11. Gel de análise da purificação da proteína quimérica utilizando coluna de níquel.....	53
Figura 12. Níveis séricos de ureia e creatinina de cães do grupo Controle, Adjuvante, Proteína e Vacina.....	55
Figura 13. Níveis séricos de fosfatase alcalina (FA) e alanina aminotransferase (ALT) em cães do grupo Controle, Adjuvante, Proteína e Vacina.....	55
Figura 14. Avaliação da resposta imune humoral anti-Quimera em soros de cães do grupo Controle, Adjuvante, Proteína e Vacina, 72 dias após a primeira dose vacinal (T4).....	57
Figura 15. Análise da atividade do perfil de citocinas (pg/mL) em sobrenadante da linfoproliferação liberada pelas células mononucleares tratadas com quimera e antígenos inespecíficos de <i>E. coli</i>	58

ÍNDICE DE DIAGRAMAS

Diagrama 1. Esquema do desenho experimental utilizado no ensaio pré-clínico vacinal contra <i>Anaplasma</i> spp., <i>Ehrlichia</i> spp. e <i>Babesia</i> spp.....	42
--	----

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Proteínas de membrana das espécies <i>Ehrlichia canis</i> , <i>Babesia canis</i> , <i>Anaplasma phagocytophilum</i> selecionadas para construção da proteína quimérica recombinante.....	34
---	----

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de aminoácidos das proteínas selecionadas de <i>Ehrlichia canis</i> , <i>Babesia canis</i> , <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	34
Tabela 2. Sequências peptídicas imunodominantes previstas, organizadas por posição variável de acordo com cada espécie, ligadas por um ligante flexível (GGSG), visando avaliar a estrutura 3D.....	37
Tabela 3. Peptídeos Imunogênicos de VirB10, TRP36 e CBA preditos pela Análise de Imunogenicidade de MHC Classe I na plataforma IEDB.....	47
Tabela 4. Sequências peptídicas selecionadas baseadas na imunogenicidade MHC I para construção da proteína quimera.....	49
Tabela 5. Fator B Normalizado das proteínas Quiméricas preditas pelo Servidor I-TASSER.....	51
Tabela 6. C-score dos 5 principais modelos gerados pelo servidor I-TASSER.....	52
Tabela 7. Concentração de proteína em mg/mL a 37 °C após 1 semana.....	53
Tabela 8. Leucograma e eritrograma de cães antes de se iniciar o protocolo vacinal (T0) para triagem dos animais.....	54
Tabela 9. Peptídeos e seus <i>ranks</i> de ligação a MHC de classe I.....	83
Tabela 10. Peptídeos e seus <i>ranks</i> de ligação a MHC de classe II.....	84
Tabela 11. Resultados do BepiPred com os epítomos lineares de células B preditos utilizado o programa IEDB.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	Tridimensional
APC	Células apresentadoras de antígeno
BCR	Receptor de célula B
CBA	Antígeno Babesiose Canina
CC	Cultura controle
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
I-TASSER	<i>Iterative Threading ASSEmbly Refinement</i>
IEDB	Análise de Banco de Dados de Epítomos Imunes
IFN- γ	Interferon gama
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
LTCs	Linfócitos T citotóxicos
MHC I	Complexo de histocompatibilidade principal de classe I
MHC II	Complexo de histocompatibilidade principal de classe II
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
Q	Proteína químera recombinante
SPA	Antígenos solúveis do parasita
T0	Antes de se iniciar o protocolo vacinal
T1	Primeira dose vacinal
T2	21 dias após o primeira dose
T3	43 dias após a primeira dose
T4	72 dias após a primeira dose
Th	Linfócitos T <i>helper</i>
Th1	Linfócitos T <i>helper</i> 1
Th2	Linfócitos T <i>helper</i> 2
TRP36	Proteína de repetição em tandem 36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Referencial Teórico	16
1.1.1 <i>Babesiose canina</i>	16
1.1.2 <i>Erliquiose canina</i>	18
1.1.3 <i>Anaplasmosse canina</i>	19
1.1.4 <i>Diagnóstico das Hemoparasitoses</i>	20
1.1.5 <i>Aspectos imunológicos e mecanismos de defesa contra microrganismos</i>	21
1.1.6 <i>Possíveis alvos para uso em vacinas de Hemoparasitoses</i>	26
1.1.7 <i>Vacina de proteína quimera multiepítipo recombinante</i>	28
1.1.8 <i>Adjuvante</i>	30
2 OBJETIVOS	33
2.1 Geral	33
2.2 Específicos	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 Desenvolvimento da proteína quimera	34
3.1.1 <i>Obtenção das sequências das proteínas</i>	34
3.1.2 <i>Análises de imunoinformática: Imunogenicidade e ligação MHC I e MHC II</i>	35
3.1.3 <i>Construção da quimera e Previsão de estrutura terciária</i>	36
3.1.4 <i>Determinação do perfil de antigenicidade, alergenicidade e solubilidade</i>	39
3.1.5 <i>Determinação de propriedades físico-químicas</i>	39
3.2 Expressão da proteína quimera	39
3.2.1 <i>Crescimento e expressão</i>	39
3.2.2 <i>Lise celular</i>	40
3.2.3 <i>Purificação</i>	40
3.3 Avaliação da estabilidade vacinal e análises bioquímicas	41
3.4 Animais e grupos experimentais	41
3.5. Obtenção de amostras de sangue e soro	43
3.6 Avaliação bioquímica e hematológica	43
3.7. Análise sorológica por ELISA antes e após a vacinação	43
3.8 Isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)	44
3.9 Dosagem de citocinas	45
3.10 Análises estatística	45
4 RESULTADOS	47
4.1 Predição de peptídeos imunogênicos	47
4.2 Construção da proteína quimera	50
4.2.1 <i>Predição de antigenicidade e alergenicidade da proteína quimérica</i>	52
4.2.2 <i>Caracterização Físicoquímica da Proteína Projetada</i>	52
4.3 Expressão do gene e purificação da proteína	52
4.4 <i>Avaliação da Estabilidade vacinal e Análises Bioquímicas</i>	53

4.5 Avaliação hematológica e bioquímica	53
4.5.1 Hemograma	53
4.5.2 Prova de função renal	54
4.5.3 Prova de função hepática	55
4.6 Avaliação clínico-patológica	56
4.7 Avaliação da resposta imune humoral	56
4.8 Avaliação de citocinas	57
5 DISCUSSÃO	59
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
APÊNDICE	81
Apêndice A – TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido)	81
Apêndice B – Tabela de peptídeos de ligação a MHC de classe I	83
Apêndice C – Peptídeos de ligação a MHC de classe II	84
Apêndice D -- Tabela de resultados do BepiPred com os epítomos lineares de células B preditos utilizado o programa IEDB	85
ANEXO	86
Anexo A – Sequência de DNA otimizada para <i>E. Coli</i> , de aminoácidos, do vetor e sequência final utilizadas pela empresa para sintetizar a proteína recombinante	86
Anexo B – Aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)	90

1 INTRODUÇÃO

As hemoparasitoses caninas são um grupo de doenças amplamente distribuídas, causadas por bactérias ou protozoários que parasitam células sanguíneas (Soares, 2006). Existem diversos agentes causadores das hemoparasitoses em cães, dentre os quais, no Brasil, destacam-se as espécies: *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. e *Babesia* spp., responsáveis por causar doenças de importância veterinária e humana, por seu caráter endêmico e potencial zoonótico (Dantas-Torres, 2008a; Day, 2011; Santos et al., 2013; De Albuquerque et al., 2021; Do Rosário et al., 2023). A ampla distribuição das hemoparasitoses tem, como um dos principais fatores, a alta incidência do carrapato vetor *Rhipicephalus sanguineus*, comumente conhecido como carrapato marrom (Dantas-Torres, 2008a; Maggi; Kramer, 2019; De La Fuente et al., 2023; Batista et al., 2023).

Após a infecção por esses patógenos, as manifestações clínicas incluem sintomas variados e inespecíficos que, se não tratados, podem levar à morte do animal (Boozer; Macintyre, 2003; Mylonakis; Harrus; Breitschwerdt, 2019). Os animais infectados podem apresentar sintomas como febre, perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia e anemia; além disso, alguns cães permanecem assintomáticos, dificultando o diagnóstico clínico e o direcionamento do tratamento correto (Dumler et al., 2001; Nair et al., 2016; Belitic et al., 2021). Ademais, os cães podem ser co-infectados com diferentes combinações de patógenos, o que pode agravar o quadro clínico do animal (De Tommasi et al., 2013; Quorollo et al., 2014; Silveira et al., 2015; Rocha et al., 2022).

Embora existam estratégias de tratamento disponíveis, a vacinação é a medida mais eficaz, segura e econômica de prevenir e controlar a propagação de doenças (Dantas-Torres; Figueredo, 2006; Dantas-Torres, 2008b; Decaro; Bounavoglia; Barrs, 2020). Entre as estratégias de desenvolvimento vacinal, está o uso de proteína quimérica recombinante (Jorge; Dellagostin, 2017; Cid; Bolívar, 2021). Através da sequência genômica e análises de bioinformática, pode-se prever os antígenos imunogênicos candidatos à vacina e expressá-los em um sistema de expressão heteróloga (Rappuoli, 2000; Goodswen; Kennedy; Ellis, 2023). Isto permite o aumento da probabilidade de uma resposta imune robusta e precisa, evitando efeitos colaterais indesejados, possibilitando uma produção segura, rápida e escalável (Soler; Houdebine, 2007; Yu et al., 2015; Chauhan; Khasa, 2023). Apesar de suas vantagens, até o momento, não existe uma vacina quimérica recombinante contra as hemoparasitoses caninas. Desta forma, o presente trabalho visa desenvolver e avaliar a segurança e imunogenicidade de uma vacina recombinante contra *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis* e *Babesia canis* em cães.

1.1 Referencial Teórico

1.1.1 Babesiose canina

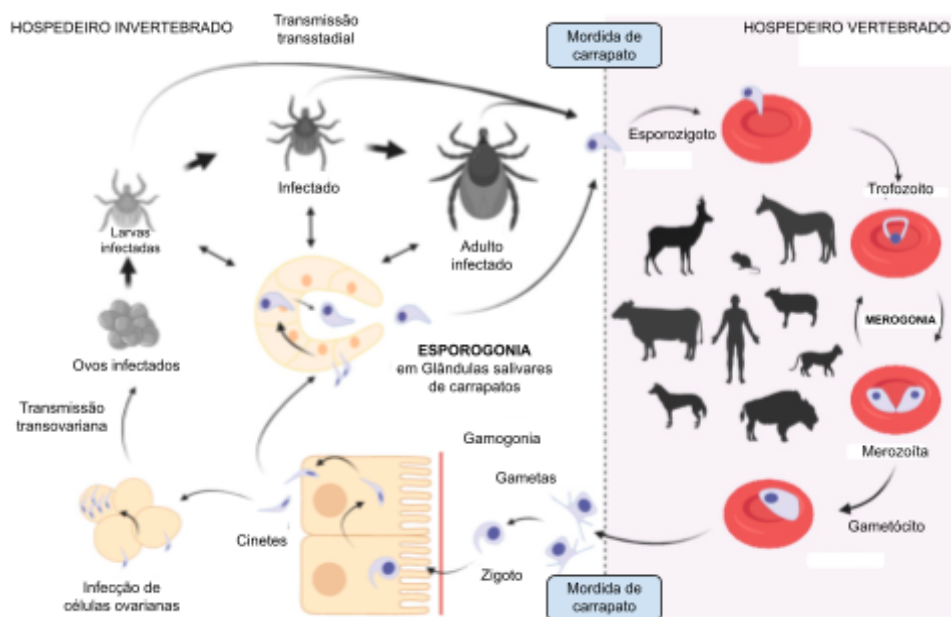
A babesiose é uma doença causada por protozoários parasitas que se alojam nos eritrócitos (hemácias), pertencentes ao Filo Apicomplexa, à Ordem Piroplasmida, à Família Babesiidae e ao gênero *Babesia* (Irwin, 2009). Considerada uma enfermidade emergente, que afeta tanto animais domésticos quanto silvestres, além de representar uma preocupação para a saúde humana (Schnittger et al., 2012; Panti-May; Rodríguez-Vivas, 2020). As espécies que mais comumente causam a babesiose canina são *B. canis* e *B. gibsoni* (Braga; De Souza, 2013). No Brasil, a espécie mais comum é a *B. canis* classificada em três subespécies: *B. canis canis*, *B. canis rossi* e *B. canis vogeli* (Panti-May; Rodríguez-Vivas, 2020; Zygnier et al., 2023).

A babesiose canina é considerada endêmica no território brasileiro, com a sua soroprevalência variando entre 35,7%–72,0%, de acordo com o método de diagnóstico utilizado, época do ano e amostra populacional utilizada (Dantas-Torres, 2006; Trapp et al., 2006; Vieira et al. 2013; Paulan et al., 2013; Maggi; Kramer, 2019). Um dos fatores associados a sua distribuição, é devido à alta incidência do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) em razão das condições ambientais favoráveis (Dantas-Torres, 2006; Van Wyk et al., 2023).

Esses protozoários são transmitidos naturalmente ao cão por meio da saliva de um carrapato infectado durante o repasto sanguíneo para alimentação (Bonnet; Nadal, 2021). Dessa forma, os esporozoítos presentes nas glândulas salivares do carrapato, são injetados na corrente sanguínea e se aderem à membrana das hemácias (eritrócitos), penetrando-a com o auxílio de um complexo apical especializado (Bonnet; Nadal, 2021). No interior, se diferenciam em trofozoítos e se dividem por fissão binária (reprodução assexuada) formando dois ou quatro merozoítos que saem do eritrócito, destruindo-os assim (Bonnet; Nadal, 2021). O ciclo de multiplicação dos merozoítos continua pela invasão de novos eritrócitos até a morte do hospedeiro ou até que o tratamento medicamentoso e/ou a resposta imune impeça a replicação do parasita (Schinittger et al., 2012). Determinados merozoítos, quando infectam novos eritrócitos, se diferenciam em gametócitos ou gamontes. O carrapato vetor se infecta durante o repasto sanguíneo sobre um hospedeiro vertebrado parasitado, onde, juntamente com o sangue, ingere hemácias parasitadas contendo os gametócitos (gametas femininos e masculinos) (Schinittger et al., 2012; Bonnet; Nadal, 2021). No lúmen do tubo digestivo do carrapato, ocorre a gametogonia (fusão dos gametas) formando os zigotos que evoluirão para oocistos, os quais se diferenciam em cineto. O cineto (esporocineto) infecta diferentes tecidos do vetor, incluindo os ovários (transmissão transovariana) e a glândula salivar. No

interior das células salivares, sofrerão a esporogonia, formando milhares de esporozoítos (unidades parasitárias do hospedeiro vertebrado) liberados na saliva (Figura 1) (Schinittger et al., 2012; Bonnet; Nadal, 2021). Além disso, os merozoítos que circulam no sangue podem ser transmitidos a um hospedeiro saudável diretamente por transfusão sanguínea (Solano-Gallego et al., 2016).

Figura 1. Ciclo de vida da *Babesia canis*.



Fonte: Adaptado de Bonnet; Nadal, 2021.

A apresentação clínica da babesiose em cães pode variar de doença subclínica até quadro clínico grave, onde o estado imunológico do cão é considerado o principal fator que determina o aparecimento de sinais clínicos (Milanovic et al., 2020; Zygner; Gojska-Zygner; Norbury, 2023). A infecção resulta em febre, letargia, anorexia, anemia regenerativa leve a grave devido a hemólise, bilirrubinemia, hemoglobinúria, membranas mucosas pálidas, fraqueza, icterícia, pigmentúria, trombocitopenia leve a grave, que pode culminar em óbito (Solano-Gallego et al., 2016; Baneth, 2018; Leisewitz et al., 2019; Bilic et al., 2023; Zygner; Zygner; Gojska-Zygner; Norbury, 2023).

O Dipropionato de Imidocarb (5 - 6,6 mg/kg por via subcutânea, repetindo com 14 dias) e o Aceturato de diminazeno (3,5 mg/kg, por via subcutânea) são medicamentos antiprotozoários amplamente utilizados. No entanto, às vezes os medicamentos são tóxicos para o animal, podendo apresentar efeitos adversos desde salivação excessiva, secreção ocular, diarreia, depressão e hipotensão (Irwin, 2009; Staroverov et al., 2021).

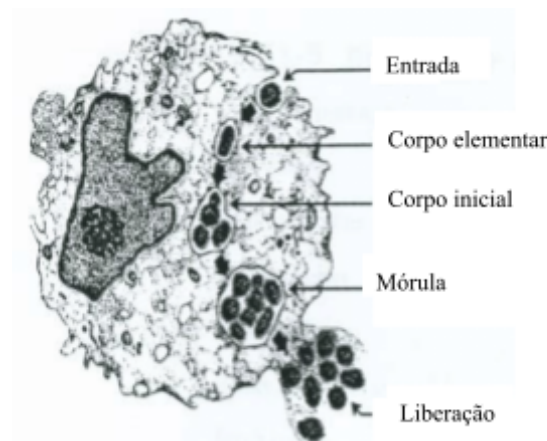
1.1.2 Erliquiose canina

A erliquiose é uma doença causada por bactérias intracelulares obrigatórias, pertencentes ao gênero *Ehrlichia*, ordem Rickettsiales, dentro da família Anaplasmataceae (Neave et al., 2022). O gênero *Ehrlichia* abriga seis espécies distintas, sendo elas: *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *E. muris*, *E. ruminantium* e *E. ewingii* (Ismail; McBride, 2017). Afeta cães, gatos, equinos, ruminantes e humanos, sendo assim, considerada uma zoonose (Saito; Walker, 2016). A erliquiose canina é causada principalmente pela espécie *E. canis*, porém, há relatos de infecção por *E. canis* em pacientes humanos com sinais clínicos de erliquiose humana (Perez et al., 2006).

A erliquiose é relatada em grande parte das regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo, sua distribuição está relacionada à presença do carrapato vetor, *Rhipicephalus sanguineus* (Chomel, 2011). É considerada endêmica no Brasil, onde a soroprevalência se mostra semelhante entre as regiões, por exemplo: Região Sul 43,45% (Zuchi et al., 2020), Região Centro-Oeste 59,1% (Paula et al., 2021) Região Norte 37,9% (Aguilar et al., 2007).

Esses microorganismos são parasitas intracelulares obrigatórios capazes de infectar células como monócitos e macrófagos (Thirumalapura; Walker, 2015). Apresenta três estágios distintos: corpos elementares (unidade bacteriana), corpos iniciais e mórulas (Gutiérrez et al., 2016). A infecção do hospedeiro vertebrado ocorre quando os carrapatos infectados se alimentam e inoculam os corpos elementares (forma madura infecciosa) presentes na sua secreção salivar (Vieira et al., 2011). Utilizam um mecanismo de fagocitose para entrar nas células do hospedeiro, onde se multiplicam por fissão binária. Durante a replicação, os corpos elementares se transformam em corpo inicial até a formação da mórula liberadas por lise ou por exocitose podendo iniciar um novo ciclo (**Figura 2**) (Thirumalapura; Walker, 2015; Zhang et al., 2023).

Figura 2. Representação esquemática do ciclo de crescimento da *Ehrlichia* em uma célula infectada.



Fonte: Adaptado de Forbes et al., 1998.

O período de incubação da *Ehrlichia* varia de 8 a 20 dias, seguido pela forma aguda (duração de 2 a 4 semanas), subclínica (meses a anos) ou crônica (Aziz et al., 2020). *E. canis* se replica em células do sistema imune do organismos que estão localizadas no linfonodo, baço e medula óssea; dado isso, na fase aguda, pode ser observado um aumento no volume dos órgãos (linfadenomegalia e esplenomegalia) (Saito; Walker, 2016). Pode ocorrer também destruição de hemácias e plaquetas, o que leva a anemia e trombocitopenia (Mylonakis; Harrus; Breitschwerdt, 2019). Além disso, pode apresentar febre, anorexia, depressão, secreção ocular, mucosas pálidas, tendências hemorrágicas ou sinais neurológicos (Ramakant; Verma; Diwakar, 2020). Durante a fase subclínica, nenhum sinal clínico é evidente, enquanto na fase crônica podem ocorrer sintomas semelhantes aos observados na fase aguda, mas com maior gravidade (Harrus; Waner, 2011). É frequente que cães se recuperem clinicamente de uma infecção aguda de forma natural; entretanto, durante esta fase, é recomendado o tratamento médico para acelerar a recuperação e evitar possíveis complicações clínicas graves ou óbito. Dentre os protocolos existentes para o tratamento da erliquiose canina, o antibiótico de eleição é doxiciclina (10 mg/kg) (Mylonakis; Harrus; Breitschwerdt, 2019). No entanto, a resistência do microrganismo a esse protocolo de tratamento, bem como os diversos efeitos colaterais para os animais, tornou-se uma preocupação (Do Rosário et al., 2019). Em situações severas, a resposta ao tratamento com antibióticos é limitada, e os cães frequentemente vêm a óbito por hemorragias intensas, debilitação severa ou infecções secundárias (Aziz et al., 2020).

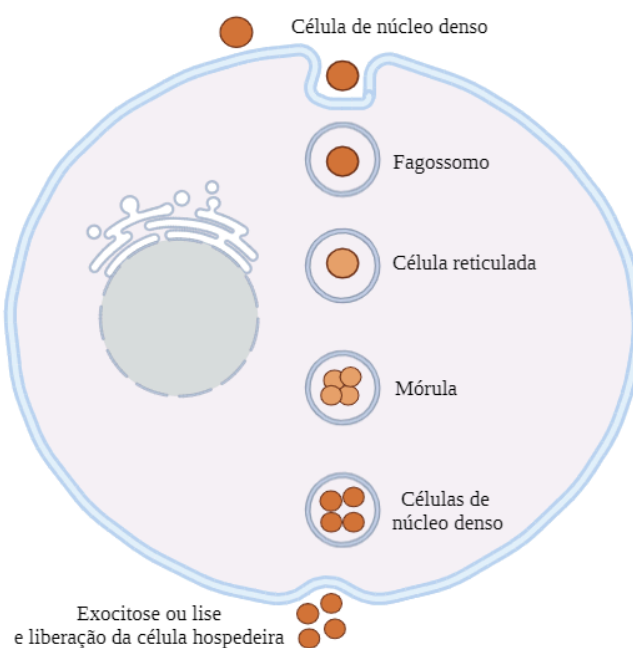
1.1.3 Anaplasmosse canina

A anaplasmosse é uma doença emergente amplamente disseminada, que afeta animais selvagens e domésticos, como ruminantes, equinos, cães e gatos (El Hamiani Khatat et al., 2021). A doença é causada por bactérias intracelulares obrigatórias pertencentes à família Anaplasmataceae, da ordem Rickettsiales, e engloba oito espécies de grande importância para a saúde veterinária e humana (Rar; Tkachev; Tikunova, 2020).

Anaplasma phagocytophilum é uma das principais bactérias responsáveis por causar anaplasmosse granulocítica canina e humana, sendo assim, considerada uma zoonose (El Hamiani Khatat et al., 2021). Estudos realizados mostraram que a soropositividade dos cães varia de 13,8 a 43,8%, o que alerta para o risco de infecção para humanos (Vieira et al., 2013; Do Amaral Falcão et al., 2014; Silveira et al., 2017; Mesquita et al., 2023).

A transmissão ocorre por meio de carrapatos *Ixodes* spp. e *Rhipicephalus sanguineus*, durante o repasto sanguíneo. Após a infecção, a bactéria pode parasitar plaquetas, monócitos, macrófagos e granulócitos, principalmente neutrófilos, por meio de endocitose. Dentro dessas células, a bactéria se replica formando mórulas (macrocolonias) que amadurecem e as células de núcleo denso, que são liberadas por exocitose ou lise da célula hospedeira (Figura 3) (Woldehiwet, 2010). Após um período de incubação de 1 a 2 semanas, os sinais clínicos mais frequentemente observados em cães incluem letargia, febre, anorexia, linfadenomegalia, hepatomegalia, esplenomegalia, trombocitopenia leve a grave e outras alterações no leucograma (Sainz et al., 2015; Silveira et al., 2015). Os fatores de risco para infecção por *A. phagocytophilum* em cães incluem a estação do ano, coinfeção com outros patógenos transmitidos por carrapatos. O tratamento pode ser realizado com doxiciclina (Carrade et al., 2009).

Figura 3. Ciclo de vida intracelular de Anaplasmataceae.



Fonte: Adaptado de Pruneau et al., 2014.

1.1.4 Diagnóstico das Hemoparasitoses

O diagnóstico precoce das hemoparasitoses permite o tratamento no início dos sintomas, reduzindo as taxas de mortalidade (Valente, 2014; Mesquita et al., 2023). No entanto, as infecções são geralmente difíceis de diagnosticar, pois as manifestações clínicas incluem sintomas variados e inespecíficos (Harrus; Waner, 2011; Nair et al., 2016; Khatat, 2022). Alguns cães podem nunca desenvolver sinais clínicos ou permanecer assintomáticos (Santos et al., 2011). Além disso, a

infecção com um ou mais agentes adicionais pode contribuir ou potencializar as manifestações observadas da doença (Filipovic et al., 2018). Com isso, exames laboratoriais são utilizados para obter um diagnóstico preciso dessas doenças, permitindo um manejo personalizado do paciente evitando o tratamento empírico (Silveira et al., 2015; Espino-Solís et al., 2023).

O diagnóstico pode ser realizado através do isolamento do parasita em cultura *in vitro*, da análise microscópica de esfregaços corados, ou da amplificação de sequências nucleotídicas específicas do parasita por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) (Harrus; Waner, 2011; Martínez-García et al., 2021; Poolsawat et al., 2023; Martinescu et al., 2023). Essas técnicas podem ser aplicadas em amostras de linfonodo ou medula óssea, sendo ideais para detectar o início da infecção (Dantas-Torres, 2006; Poolsawat et al., 2023; Martinescu et al., 2023). Embora ofereçam alta precisão, essas abordagens podem ser invasivas, exigir mais tempo e recursos, e, em casos de baixa parasitemia, podem resultar em falsos negativos (Mcbride et al., 2001; Solano-Gallego; Beneth, 2011; Rodríguez-Alarcón et al., 2020).

Análises sorológicas são frequentemente aplicadas para detectar a presença de anticorpos específicos no sangue, indicando se o organismo foi exposto a um determinado patógeno, sendo valiosos instrumentos de triagem e diagnóstico (Valente, 2014; Karasová et al., 2022). Entre os diferentes testes disponíveis, os mais utilizados são a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), teste imunocromatográfico e ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) (Nair et al., 2016; Lara et al., 2020; Karasová et al., 2022). No entanto, maioria dos testes sorológicos utilizam antígenos totais, o que pode resultar em reações cruzadas, levando a resultados falso-positivos, devido alguns patógenos apresentarem epítomos antigênicos em comum (Solano-Gallego; Beneth, 2011; Krause et al., 2015).

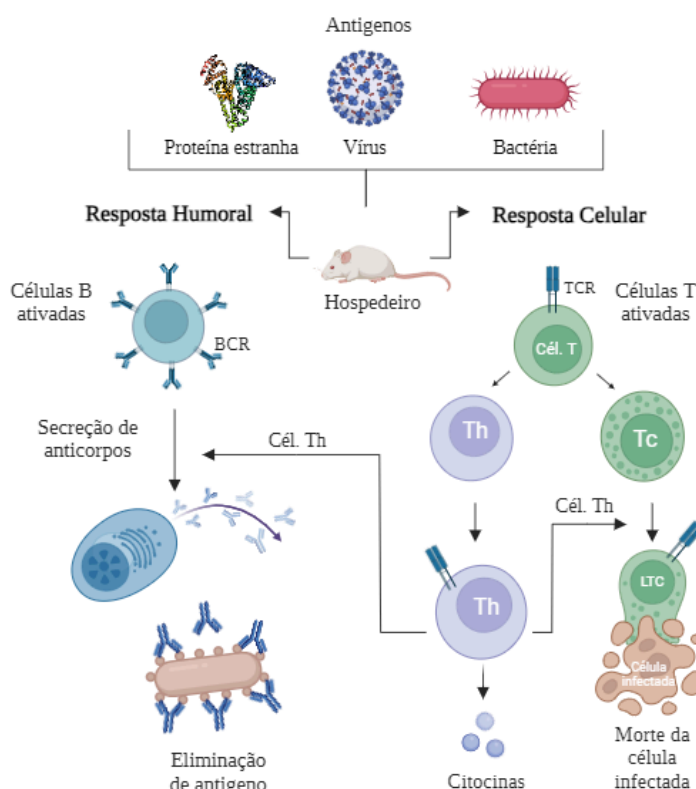
1.1.5 Aspectos imunológicos e mecanismos de defesa contra microrganismos

O sistema imune dos cães é responsável pela destruição de microrganismos através de mecanismos inatos e adaptativos para garantir a ausência de doenças (Pereira et al., 2019). Após uma infecção, a primeira linha de defesa inclui alguns mecanismos como febre, mediadores químicos e células fagocíticas, que combatem os patógenos poucas horas após a infecção de forma inespecífica e carecem de memória (Moser; Leo, 2010). Essa resposta é mediada por um conjunto de células que incluem células apresentadoras de antígeno (APC) como macrófagos e células dendríticas, que estabelecem a ligação entre a resposta imune inata e adaptativa. As APCs reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) compartilhados por vários microrganismos, através de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) (Storni et al., 2005).

Essas células após o reconhecimento, realizam a fagocitose, formando o fagolisossomo (fusão do fagossomo com lisossomo) e dentro dele, apresenta três mecanismos microbicidas: enzimas lisossomais, espécies reativas de oxigênio e o óxido nítrico, que irão destruir os microrganismos fagocitados em pequenos fragmentos antigênicos (Pereira et al., 2019).

Em casos em que a resposta imune inata não é suficiente, o sistema imune adaptativo é ativado (Moser; Leo, 2010). Essa resposta leva cerca de 7 dias para se desenvolver e conta com a atuação da resposta imune celular de linfócitos TCD4+ também conhecidas como T auxiliares ou T *helper* (Th) e TCD8+ ou citotóxicos (LTCs), além de linfócitos B responsáveis por secretar anticorpos. Essas células reconhecem o antígeno do patógeno e se proliferam para combater a infecção (Saalmüller, 2006). Em ambos os casos a resposta é estimulada pelo reconhecimento de uma parte pequena e específica do antígeno conhecido como epítipo, apresentado por APCs (Figura 4) (Pereira et al., 2019).

Figura 4. Os ramos humorais e celulares da resposta imune.



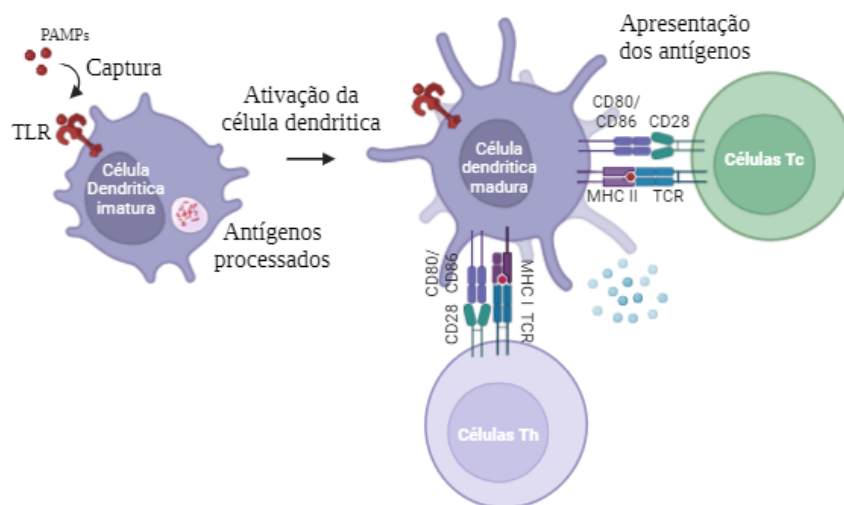
Fonte: Adaptado de Bárcena; Blanco, 2013.

Legenda: O ramo humoral é composto por linfócitos B, cujas moléculas efectoras são os anticorpos. O processo inicia-se com a ligação dos receptores de células B (BCRs) aos antígenos, levando à diferenciação em células secretoras de anticorpos, as células plasmáticas. O ramo celular envolve linfócitos T, onde células T auxiliares (Th) e células T citotóxicas (LTCs) são os principais executores. Inicia-se quando os linfócitos T reconhecem antígenos na superfície das células apresentadoras de antígenos (APCs). As células Th reconhecem antígenos ligados ao complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe II e produzem citocinas que ativam outros linfócitos (células B e T). Uma

vez ativadas pelas células Th, as células Tc diferenciam-se em LTCs capazes de eliminar células infectadas por patógenos.

As células T específicas do antígeno não reconhecem diretamente os antígenos nativos, mas sim o complexo molecular formado por uma molécula do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) e um epítipo peptídico pelo receptor de célula T (TCR) para que ocorra sua ativação (Mesquita Júnior et al., 2010). O MHC apresenta duas classes: MHC I e MHC II. O MHC de classe I são glicoproteínas expressas na superfície de quase todas as células nucleadas, sendo sua principal função, a apresentação dos peptídeos antigênicos presentes no citosol de células infectadas ao linfócito TCD8+. Já o MHC de classe II sendo glicoproteínas expressa em células APC (macrófagos, células dendríticas e linfócitos B), responsáveis por apresentar antígenos extracelulares captados via endocitose, que interagem com as células TCD4+ levando à sua maturação em células T *helper* 1 (Th1) (favorece uma resposta imune celular) e T *helper* 2 (Th2) (favorece uma resposta imune humoral) (Figura 5) (Karch; Burkhard, 2016).

Figura 5. Integração entre os Sistemas Imunológicos Inato e Adaptativo.



Fonte: Adaptado de Bárcena; Blanco, 2013.

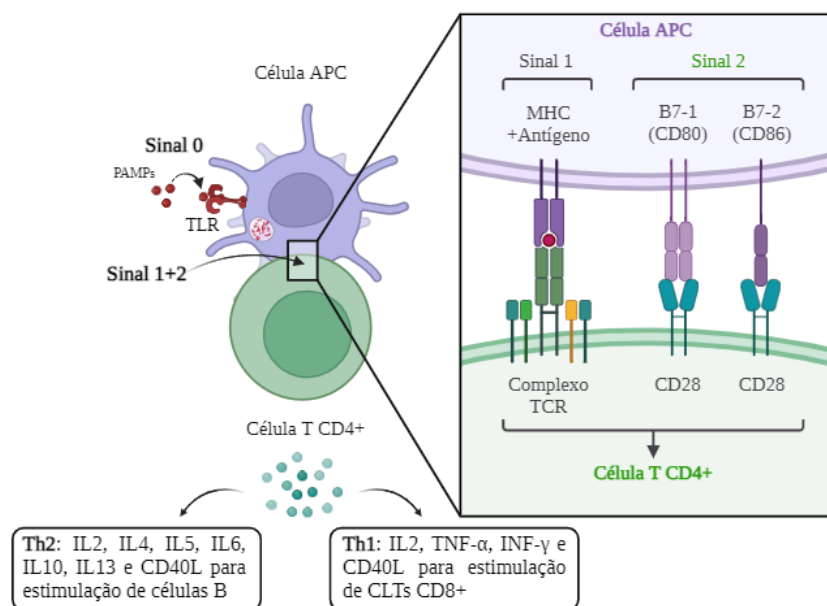
Legenda: A presença de PAMPs na superfície dos patógenos desencadeia a captura e o processamento de antígenos por subconjuntos específicos de APCs, DCs, promovendo a ativação dos marcadores de maturação das DCs. As DCs maduras apresentam antígenos derivados de patógenos às células Th e Tc virgens por meio das moléculas MHC de classe II e classe I, respectivamente. A liberação de citocinas pelas DCs estimula a diferenciação em células efectoras B e T, resultando na produção de anticorpos e na ativação das respostas de LTCs.

Para que um peptídeo seja ligado e apresentado pela molécula do MHC, o antígeno precisa ser processado pela célula. No local da infecção existem células dendríticas que capturam

antígenos, entram nos vasos linfáticos e migram em direção ao linfonodo mais próximo ou baço para apresentar estes componentes para os linfócitos T e B (Pereira et al., 2019).

Para que ocorra a ativação dos linfócitos TCD4+, deve ocorrer a formação de três sinais (Storni et al., 2005). O primeiro sinal é fornecido pelo antígeno que será captado pela APC, processado e ligado ao MHC II, que apresenta o complexo peptídeo-MHC II ao TCR, fornecendo o sinal 1. O linfócito T passa a expressar o receptor CD40 L que se liga ao CD40 presente na célula dendrítica, levando ao estímulo para célula dendrítica produzir mais B7 (molécula co-estimuladora), que irá se ligar ao CD28, que é chamado de segundo sinal. O terceiro sinal estimulará a secreção de citocinas guiando a diferenciação dos linfócitos específicos ativados no padrão Th1 ou Th2 (Storni et al., 2005).

Quando ocorre a produção de Interleucina 12 (IL-12) pela célula dendrítica, ela se liga ao linfócito TCD4+ e induz sua diferenciação para o perfil Th1. O processo de ativação do linfócito T depende de três sinais distintos (Storni et al., 2005). O sinal 0 é representado pela presença de sinais de perigo, tanto endógenos, como proteínas de choque térmico e metabólitos de hialuronano, quanto exógenos, como patógenos ou adjuvantes. Esses sinais ativam a resposta imune inata, preparando as APCs para processar e expor os epítomos. O sinal 1 ocorre quando a célula dendrítica apresenta o antígeno processado na superfície através das moléculas do MHC II, que é reconhecido pelo TCR presente nos linfócitos TCD4+. O sinal 2, que é a coestimulação, resultante da interação entre moléculas como o CD40L presente na célula T e o CD40 na célula dendrítica. Após receber os três sinais, o linfócito TCD4+ se desliga da célula apresentadora de antígenos, prolifera e dá origem a células Th1 ativas (Storni et al., 2005). Estas células Th1 maduras migram para o local da infecção, onde interagem com os macrófagos. A ligação entre o TCR das células Th1 e o complexo MHC II nos macrófagos, juntamente com a interação do CD40L com o CD40 do macrófago, estimula a produção de Interferon-gama (IFN- γ), uma citocina pró-inflamatória. O IFN- γ ativa os macrófagos, aumentando sua capacidade de produzir agentes microbicidas, e também pode estimular a diferenciação e proliferação das células TCD8+ e dos linfócitos B, intensificando a resposta imune contra patógenos intracelulares. No entanto, caso haja produção de citocina IL-4, isso induz à diferenciação para o perfil Th2. As células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, que auxiliam na promoção da diferenciação das células B em células plasmáticas, responsáveis pela produção de anticorpos, e na troca de isotipos nos linfócitos B (Figura 6) (Storni et al., 2005).

Figura 6. Mecanismos de Captura e Apresentação de Antígenos.

Fonte: Storni et al., 2005.

Legenda: Uma visão esquemática dos principais eventos e sinalizações durante a captura de antígenos pelas APCs e subsequente apresentação de epítomos digeridos nas moléculas do MHC. A imunidade é acionada principalmente por sinais de perigo endógenos (por exemplo, proteínas de choque térmico, danos no DNA e RNA, IL-1b, CD40L, metabólitos de hialuronano) ou exógenos (por exemplo, patógenos ou adjuvantes) (Sinal 0). Esses sinais, geralmente mediados por receptores *Toll-like* (TLR), desencadeiam a defesa pela imunidade inata e são seguidos pela ativação da imunidade adaptativa através da apresentação de antígenos (Sinal 1) e coestimulação concomitante (Sinal 2) de células TCD4+. A ativação subsequente das células TCD4+ resulta na liberação de citocinas e quimiocinas, que podem afetar diretamente a viabilidade e replicação de patógenos vivos. Além disso, as células TCD4+ podem ativar células T citotóxicas CD8 positivas ou células B produtoras de anticorpos. A ativação secundária de outras células T e B é auxiliada pela coestimulação de CD40 em células TCD4+.

Algumas bactérias conseguem impedir a formação do fagolisossomo. Com isso, precisamos ter a atuação dos linfócitos TCD8+. Antígenos exógenos entram nas DC por endocitose onde no citosol podem ser clivados pelo proteassoma (via citosólica). Essas proteínas clivadas (ou seja, peptídeos) são transportadas para o retículo endoplasmático (ER), que após processamento adicional são carregadas no MHC I. Peptídeos derivados das vias vacuolar ou citosólica após a ligação ao MHC I são apresentados na superfície DC para células T CD8+ virgens em um processo chamado apresentação cruzada para produzir linfócitos T citotóxicos. A TCD8+ quando ativadas, passam pelo processo de expansão clonal, migram e encontram células infectadas, liberam perforinas e granzimas que perfuram e levam a apoptose das células infectadas (Moser; Leo, 2010).

As células B têm a capacidade de reconhecer a maioria dos antígenos sem a necessidade de processamento prévio através de seu receptor de linfócito B (BCR) (resposta independente T)

(Pereira et al., 2019). Por esse motivo, os epítomos de células B geralmente estão localizados em regiões altamente acessíveis e expostas na superfície do antígeno. No caso de antígenos protéicos, os epitopos de células B podem assumir duas formas principais: lineares (ou contínuos) e conformacionais (ou descontínuos). Os epítomos lineares são constituídos por pequenas sequências contínuas de resíduos de aminoácidos do antígeno. Já os epítomos conformacionais são compostos por resíduos de aminoácidos que fazem parte de sequências descontínuas, mas que são trazidas juntas pelo dobramento da proteína na sua forma nativa (Assis, 2013).

Esses linfócitos B são produzidos na medula óssea, saem maduros, porém virgens (*naive*), caem para a corrente sanguínea e migram para órgãos linfóides secundários como o linfonodo, guiados pelas quimiocinas. Quando os antígenos do microorganismo entram nos vasos linfáticos ou sanguíneos, são drenados para os linfonodos mais próximos ou para o baço para que os linfócitos B reconheçam o antígeno. Esse reconhecimento ocorre quando o antígeno no linfonodo se liga às imunoglobulinas de superfície (IgM) específicas para esse peptídeo, servindo de receptor de célula B. Além disso, o linfonodo apresenta macrófagos e células dendríticas que podem levar os antígenos até os linfócitos B. Esses linfócitos B reconhecem os peptídeos pelo BCR pela região variável, endocitam, processam e apresentam esse epítipo pelo MHC II. Isso gera sinais para ativação, proliferação e diferenciação dos linfócitos e plasmócitos, que são as células que secretam os anticorpos. Moléculas de anticorpos solúveis podem detectar e ligar-se especificamente ao seu antígeno alvo, promovendo sua neutralização e opsonização por fagócitos (macrófagos e neutrófilos) (Schijns et al., 2020).

Apesar de muitas dessas células efectoras terem uma vida curta, sendo eliminadas dentro de 10 a 14 dias após a infecção, algumas delas persistem como células de memória (tanto células B quanto T), conferindo proteção contra infecções futuras pelo mesmo microorganismo, que em um segundo reconhecimento do mesmo epítipo irão montar uma resposta imune mais rápida e robusta (Storni et al., 2005; Palgen et al., 2021).

1.1.6 Possíveis alvos para uso em vacinas de Hemoparasitoses

Erliquiose canina e Anaplasmose canina são doenças de importância veterinária, no entanto, atualmente não existe vacina comercial para prevenção dessas doenças (Dantas-Torres; Otranto, 2016). Muitos obstáculos impedem o desenvolvimento de vacinas, incluindo a compreensão da variabilidade genética e antigênica, a identificação dos antígenos imunoprotetores, o estabelecimento de modelos animais que reproduzam fielmente as respostas imunológicas dos hospedeiros, e a compreensão das interações moleculares entre hospedeiro e patógeno envolvidas

na evasão imunológica ou que podem ser bloqueadas pela resposta imune do hospedeiro (Mcbride; Walker, 2010).

Alguns estudos anteriores com *E. canis* demonstraram que vacinas inativadas e atenuadas foram capazes de provocar uma resposta humoral, mas apenas proteção clínica parcial foi alcançada em cães desafiados com a cepa virulenta de *E. canis* (Mahan; Kelly; Mahan, 2005; Rudoler et al., 2012; Rudoler et al., 2015). Proteínas da superfície dos parasitas recebem atenção especial no desenvolvimento de vacinas, constituindo a principal interface de parasita hospedeiro facilmente acessíveis ao sistema imunológico do hospedeiro (Castelão et al., 2012; Thirumalapura; Walker, 2015; Goodswen; Kennedy; Ellis, 2023). *E. canis* expressa glicoproteínas imunorreativas com regiões de repetição em série (proteína de repetição em tandem; TRP) em seu genoma (Doyle et al., 2006; McBride et al., 2011). Por exemplo, a glicoproteína de membrana de 36 kDa (TRP36) de *E. canis* é uma das principais proteínas imunorreativas, associadas a interação parasita-hospedeiro, ou seja, adesão e internalização, evasão imune durante a infecção (Doyle et al., 2006; Aguiar et al. 2016; Zwei Garth et al., 2014). A TRP36 contém um importante epítipo de células B na região de repetição em tandem sendo um dos alvos primários da resposta de anticorpos do hospedeiro durante a infecção (Doyle et al., 2005; Doyle et al., 2006; Cárdenas et al., 2007; Da Costa et al., 2019). A TRP36 já foi avaliada em teste de diagnósticos, demonstrando alta sensibilidade e especificidade, com estudos indicando seu potencial para uso em vacinas (Cárdenas et al., 2007; Aguiar et al. 2016; Medeiros et al., 2020; PoolSawat et al., 2023).

O T4SS (Sistema de secreção Tipo 4) é um complexo multiproteico conservado entre cepas, que forma canais de membrana necessários para entrega de proteínas que possibilitam a colonização e sobrevivência de bactérias nas células hospedeiras (Al-Khedery et al., 2014). Várias das proteínas são susceptíveis de serem expostas à superfície sendo alvos de respostas imunes neutralizantes e protetoras, portanto, bons candidatos a vacinas (Lopez et al., 2007). Dentre as proteínas imunogênicas está a proteína VirB10, que está envolvida na formação e estabilidade do T4SS, contribuindo para a montagem do complexo de secreção (Morse et al., 2012). Alguns estudos utilizando a VirB10 em vacinas contra *Anaplasma phagocytophilum*, observaram um aumento de IFN- γ e uma forte resposta humoral e celular em bovinos e murinos (Lopez et al., 2007; Castelão et al., 2012; Crosby et al., 2018). Sugere que esta proteína pode ser uma potencial candidata a vacina contra esta e possivelmente outras bactérias patogênicas com T4SS devido a sua natureza conservada e papel na patogênese (Al-Khedery et al., 2012; Crosby et al., 2018).

Na Europa, estão disponíveis duas vacinas produzidas comercialmente contra a babesiose canina contendo antígenos de sobrenadantes de culturas *in vitro* do parasita (antígenos solúveis do parasita; SPA) e o adjuvante saponina (Day, 2011) A Pirodod (Merial) utiliza SPA de *Babesia canis*

européia e a Nobirovac Piro (*Intervet-Schering Plough*) produzida por isolado europeu de *B. canis* e um isolado sul-africano de *B. rossi*, sendo essa, a única vacina licenciada no Brasil pelo MAPA (Ministério da Agricultura e Pecuária) (Schetters Et Al., 1995; Schetters et al., 2001; Dantas-Torres, 2008a). O efeito protetor dessas vacinas está relacionado ao surgimento de manifestações clínicas, em vez de interferir diretamente no ciclo de vida do parasita no organismo do cão (Schetters et al., 1996; Schetters et al., 2007).

No entanto, um estudo de Moubri et al., 2018 utilizando várias técnicas, descobriram um antígeno de *B. canis* de 39 kDa que está presente em sobrenadante da cultura. O gene que codifica a proteína, denominado Antígeno Babesiose Canina (CBA), pode ser descoberto no genoma de *B. canis* através da resolução de parte da sequência de aminoácidos do antígeno de 39 kDa. Uma vacina baseada na proteína CBA recombinante foi expressa e utilizada para fins de vacinação, onde protegeu os cães contra o desafio com *B. canis*, refletindo numa redução significativa da carga parasitária e na ausência de sinais clínicos (Rathinasamy et al., 2019). A sequência de aminoácidos tem um sítio de ancoragem glicosilfosfatidilinositol (GPI) previsto, o que dá suporte à hipótese de que se trata de uma proteína de membrana de merozoítos, constituindo bons candidatos para vacina contra babesiose (Carcy et al., 2006; Moubri et al., 2018).

1.1.7 Vacina de proteína químera multiepítopo recombinante

As vacinas veterinárias desempenham um papel crucial na saúde e bem-estar dos animais, contribuindo para fornecer proteção contra infecções ou prevenção de sinais clínicos, além de controlar ou eliminar a disseminação de zoonoses (Palgen et al., 2021; Nooraei et l., 2023). Isso ocorre pois, o sistema imunológico reconhece os antígenos vacinais como algo estranho, processa-os e gera a memória imunológica para responder de forma rápida contra infecções naturais subsequentes, podendo neutralizar o alvo antes que ele possa entrar nas células ou/e destruindo as células infectadas antes que o microrganismo possa crescer e causar danos (Clem, 2011).

A produção dessas vacinas envolve diversas abordagens. Historicamente, formas vivas atenuadas ou inativadas de patógenos microbianos (vírus, bactérias, etc.) têm sido usados para indução de respostas imunes que protegem o hospedeiro contra possíveis infecções (Karch; Burkhard, 2016). No entanto, apresenta algumas desvantagens, incluindo riscos associados a má inativação química em larga escala de patógenos e ao potencial de reversão à virulência no caso de cepas atenuadas (Arnon; Ben-Yedida, 2003; Cox, 2012). Além disso, essas formulações vacinais podem conter várias proteínas, porém, nem todas são eficazes para gerar uma resposta protetora. Os epítomos reconhecidos pelos componentes do sistema imune são geralmente encontrados em apenas

uma ou algumas proteínas presentes na superfície do organismo patogênico. Essas proteínas adicionais podem induzir respostas alergênicas e/ou reações adversas, enfatizando a necessidade de excluí-las das formulações vacinais (Soler; Houdebine, 2007).

Devido ao avanço de técnicas biotecnológicas, uma possível alternativa que surgiu, foram as vacinas de subunidade recombinante (Jorge; Dellagostin, 2017). São vacinas projetadas para incluir a parte antigênica dos patógenos que podem ter a capacidade de provocar uma resposta imune protetora sem os efeitos colaterais causados por outras partes do organismo patogênico (Li et al., 2014). Para tal finalidade, é possível utilizar a técnica de DNA recombinante, que envolve a identificação e seleção da sequência de peptídeo ou proteína de interesse (Francis, 2018). Esses genes que codificam as sequências são isolados ou sintetizados e clonados, ou seja, inseridos em um vetor de expressão, seguido de transformação e expressão proteica em hospedeiros heterólogos (bactérias, fungos, células de inseto ou de mamíferos), que em seguida é purificada para uso (Bárcena; Blanco, 2013; Ma et al., 2019). Pela facilidade de manuseio, alto rendimento, crescimento rápido e cultivo simples e de baixo custo, a bactéria *Escherichia coli* é um dos sistemas de expressão mais empregados na produção de proteínas recombinantes (Chauhan; Khasa, 2023).

Para isso, é necessário o conhecimento da biologia de antígenos altamente conservados envolvidos na patogênese e dos mecanismos imunológicos (Zhang et al., 2008). A capacidade de sequenciar todo o genoma juntamente com ferramentas de bioinformática disponíveis online e de forma gratuita, trouxe a possibilidade de triagem *in silico* dos antígenos protetores, conhecida como vacinologia reversa (Rappuoli, 2001; Doytchinova; Flower, 2007). Envolve o uso de ferramentas computacionais e bancos de dados para prever imunogenicidade, antigenicidade e epítomos para células TCD8+, TCD4+ e linfócitos B de forma rápida e eficaz (Chauhan; Khasa, 2023). Além disso, é possível prever propriedades físico-químicas, estrutura tridimensional (3D), estabilidade e propriedades de ligação dos epítomos previstos (Chauhan; Khasa, 2023).

No entanto, uma das limitações com as vacinas de subunidade é que muitas vezes elas provocam apenas proteção específica para determinada cepa, portanto, para evocar proteção total contra uma doença causada por várias cepas relacionadas ou a combinações de imunógenos de diferentes microrganismos podem ser necessárias (Hansson; Nygren, 2000). Para superar essa limitação, pode-se utilizar proteínas quiméricas recombinantes, que são formadas pela fusão de peptídeos imunodominantes de diferentes cepas ou microrganismos, expressos em uma única proteína (Yu et al., 2015; Chauhan; Khasa, 2023). Esses peptídeos são conectados por peptídeos ligantes, curtos oligopeptídeos como glicina e serina, que facilitam a formação de conformações específicas e melhoram a solubilidade, resistência proteolítica e estabilidade da proteína (Patel et al., 2022). Além da resposta imune direcionada e eficaz, eliminando a necessidade de várias doses,

as vantagens do uso de uma proteína quimera recombinante incluem maior estabilidade, segurança, pois não se tem a exposição aos agentes infecciosos, produção em larga escala rápida e reprodutível (Chauhan; Khasa, 2023).

1.1.8 Adjuvante

Novas gerações de vacinas, particularmente aquelas baseadas em proteínas recombinantes purificadas, embora ofereçam vantagens em termos de segurança e precisão no direcionamento da resposta imune, tendem a ser menos imunogênicas do que as vacinas tradicionais (Lima et al., 2004). Isso ocorre pois, a pureza dos antígenos da subunidade e a ausência dos componentes imunomoduladores auto adjuvantes associados a vacinas atenuadas ou mortas que geralmente resultam em imunogenicidade mais fraca (Wang et al., 2021; Laera; Hogenesch; O'hagan, 2023). Frequentemente, essas formulações de vacinas requerem um adjuvante (Karch; Burkhard, 2016).

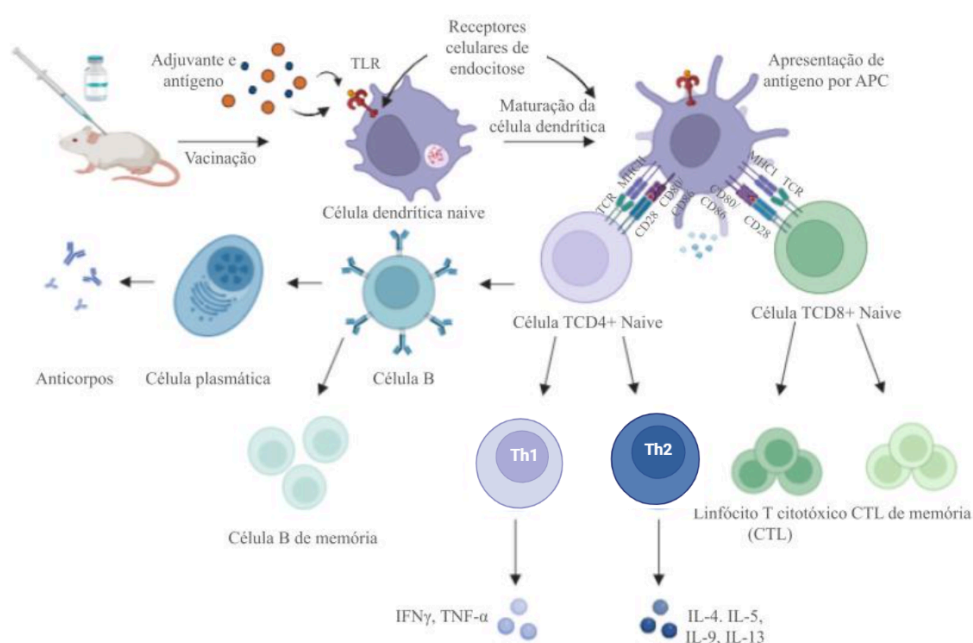
A palavra adjuvante deriva de *adjuvare*, do latim “ajudar” ou “auxiliar” (Nooraei et al., 2023). Um adjuvante imunológico é o termo utilizado para descrever substâncias que quando misturadas com antígenos imunogênicos, age geralmente para acelerar, prolongar ou aumentar a qualidade das respostas imunes específicas aos antígenos da vacina (Vogel, 2000; He; Zou; Hu, 2015; Facciola et al., 2022). Além disso, podem permitir reduzir a quantidade de antígeno ou a frequência de imunização necessária para fornecer imunidade protetora (Coffman; Sher; Seder, 2010; Vitoriano-Souza et al., 2012). Isso pode estar relacionado a liberação vagarosa do antígeno, aumento da captação por células APC, propiciando um aumento de entrega aos linfócitos para ativação da resposta imune adaptativa (Figura 7) (Vogel, 2000; Schijns et al., 2020).

O hidróxido de alumínio é um dos produtos químicos mais utilizados como adjuvante devido ao seu custo relativamente baixo e excelente segurança (He; Zou; Hu, 2015). A dose ideal de adjuvante é normalmente determinada empiricamente num ensaio piloto, mas existem orientações úteis disponíveis na literatura (Lindblad; Duroux, 2017). Sabe-se que a adsorção de antígenos a adjuvantes de alumínio aumenta a resposta imune, facilitando a fagocitose e retardando a difusão de antígenos do local da injeção, o que dá tempo para que as células inflamatórias se acumulem prolongando a interação entre APCs e antígeno (conhecido como “efeito depósito”) (Aimanianda et al., 2009; He; Zou; Hu, 2015). Os adjuvantes à base de hidróxido de alumínio também podem facilitar a diferenciação de monócitos inflamatórios em células dendríticas. Além disso, os monócitos inflamatórios recrutados pelo hidróxido de alumínio expressam níveis mais elevados de MHC II devido à capacidade melhorada de absorver antígenos. Após processamento do antígeno, as células DCs podem migrar eficientemente para linfonodos de drenagem e estimulam as células T

CD4⁺ a uma resposta TH2 que leva principalmente a produção de anticorpos (Sokolovska; Hem; Hogenesch, 2007; He; Zou; Hu, 2015). Uma das limitações dos adjuvantes de alumínio é a falha em induzir uma resposta imune mediada por células (Koll; Fierens; Lambrecht, 2012). A adição de outras moléculas imunoestimulantes às vacinas pode potencialmente superar essa limitação. O objetivo de tais adjuvantes de combinação é desenvolver a “mistura perfeita” para atingir o tipo desejado e a magnitude de uma resposta imune (Hogenesch, 2013).

A melhora da imunogenicidade em antígenos utilizados para vacina tem sido obtida com o uso do adjuvante saponina (Marciani, 2018). As saponinas são glicosídeos naturais de esteróides e triterpenos que podem ser extraídos da casca da *Quillaja saponaria*, utilizadas há muitos anos em diversas vacinas veterinárias (Sing et al., 2003; Rajput et al., 2007; Sun; Xie; Ye, 2009; Nooraei et al., 2023). Partes da saponina podem interagir com as membranas celulares, o que facilita a endocitose e a desestabilização de endossomos-lisossomos, levando ao processamento de antígenos pela via citosólica por APCs (principalmente DCs e macrófagos) e apresentação pelo MHC I para células TCD8⁺ virgens para produzir linfócitos T citotóxicos (Zhang et al., 2021; Marciani, 2018). Além disso, podem interagir com receptores de células T pela entrega de um sinal co-estimulatório, levando a célula dendrítica a produzir IL-12, que quando se liga ao receptor de célula T, leva a diferenciação de Th1 que produz IFN- γ e induzir a secreção de anticorpos, o que as tornam ideais para uso em vacinas de subunidades e vacinas dirigidas contra patógenos intracelulares (Fleck et al., 2019; Zhang et al., 2021).

Figura 7. Representação de uma Resposta Imune após a vacinação.



Fonte: Adaptado de Fan et al., 2022.

Legenda: Durante a resposta imune adaptativa, os antígenos combinados com adjuvantes são capturados e apresentados por células dendríticas virgens, resultando na formação de células apresentadoras de antígenos maduras (células dendríticas maduras). Estas células são reconhecidas pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I e classe II, ligando-se aos receptores de células T em células virgens CD8+ e CD4+, respectivamente. As células CD4+ virgens estimulam a produção de subpopulações de células TCD4+, como Th1 ou Th2, que são responsáveis pela secreção de diferentes citocinas e pela indução de imunidade celular e humoral, respectivamente.

1.2 Justificativa

Erliquiose, babesiose e anaplasiose apresentam uma ampla distribuição mundial e estão entre as principais doenças que acometem cães. São consideradas zoonoses, que se não tratadas precocemente, podem levar à morte do animal. A transmissão simultânea ou sequencial desses patógenos é frequente, pois apresentam um vetor em comum, sendo esse o carrapato.

Embora apresentem tratamento, são doenças difíceis de serem diagnosticadas devido aos sintomas clínicos semelhantes, inespecíficos e a possível ausência de sinais clínicos. Estratégias vacinais para prevenção são cada vez mais promissoras para evitar desfechos negativos, sendo uma abordagem econômica para o controle e prevenção de doenças infecciosas. Sendo assim, é de fundamental importância o desenvolvimento de estratégias inovadoras em imunobiológicos contra estas hemoparasitoses, que tanto impactam na saúde canina.

1.3 Pergunta norteadora

A vacina quimérica contra *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia canis* e *Ehrlichia canis* em cães será segura e capaz de induzir uma resposta imune robusta, tanto humoral quanto celular?

1.4 Hipótese

A vacina quimérica contra *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia canis* e *Ehrlichia canis* em cães é segura e capaz de induzir uma resposta imune robusta, tanto humoral quanto celular.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Desenvolver e avaliar a segurança e imunogenicidade de uma vacina recombinante contra *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia canis* e *Ehrlichia canis* em cães.

2.2 Específicos

- Predizer e mapear os peptídeos mais imunogênicos nas proteínas imunodominantes Virb10, CBA e TRP36 de *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia canis* e *Ehrlichia canis*, respectivamente, utilizando ferramentas de bioinformática;
- Construir uma proteína quimera utilizando os principais peptídeos mais imunogênicos identificados por meio de ferramentas de bioinformática;
- Desenvolver e administrar por via subcutânea uma vacina recombinante utilizando peptídeos imunogênicos de *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia canis* e *Ehrlichia canis* em uma proteína quimera;
- Avaliar a inocuidade e toxicidade do protocolo vacinal, observando os exames clínicos; e
- Avaliar a resposta humoral e resposta celular pós imunização.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenvolvimento da proteína quimera

3.1.1 Obtenção das sequências das proteínas

Foram selecionadas as proteínas imunodominantes TRP36, CBA e Virb10 das espécies *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia canis* e *Ehrlichia canis*, respectivamente (Quadro 1). A sequência de aminoácidos da proteína TRP36 (número de acesso ABA39257) (Medeiros et al., 2020) e ViB10 (número de acesso WP_064670091.1) (Crosby et al., 2018) foram recuperadas do GenBank, no National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) no formato FASTA (Tabela 1). A sequência de CBA foi retirada do artigo de referência de Moubri et al., 2018 e transformada para o formato FASTA.

Quadro 1 - Proteínas de membrana das espécies *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Anaplasma phagocytophilum* selecionadas para construção da proteína quimérica recombinante.

Agentes	Proteína de Membrana	Referência	Número de acesso do GenBank
<i>Ehrlichia canis</i>	TRP36	Medeiros et al., 2020	ABA39257.1
<i>Babesia canis</i>	CBA	Moubri et al., 2018	-
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> .	VirB10	Crosby et al., 2018	WP_064670091.1

Fonte: Autora, 2024.

Tabela 1. Sequência de aminoácidos das proteínas selecionadas de *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*.

Espécie	Proteína	Sequência
<i>Ehrlichia canis</i>	TRP36 Id: ABA39257.1	>ABA39257.1 immunodominant surface protein gp36 [<i>Ehrlichia canis</i>] MLFILMGYCMHLTTEITNIDFAH DFHIHQGERFGVSSGDLELDIANH PGHGYHILFKNNGHVISDLHGK AEDFNFMKDHSLNVSFLIDPMA PFHELDVNNHPNFFISMHAYQDGC DNCVHGNPSRPAIVNQAQVLLPSG VTEDSVSAPATEDSVSAPATEDSVS APATEDSVSAPATEDSVSAPATEDS VSAPATEDSVSAPATEDSVSAPATE DSVSAPATEDSVSAPATEDSVSAPA TEDSVSAPATEDSVSAPATEDSVSA PATEDSVSAPATEDSVSAPATEDSV SAPATEDSVSAPATAATGSTTSYNH

<i>Babesia canis</i>	CBA	NTELEFLDSGILNMLY >canine babesia antigen [<i>Babesia canis</i>] MMLLFALSTLVTFACDGENITILL SNVEFHTPVSSVKLLKEYSSNQES MAVIMMLTEMPNTSGKLTGKVVH VANDNVKCADLALAYQELKKAG KVTWSPTDDNDKVVPHGIWFIE GVYETDKMFEVYKTLTDPEDPSE VTRLTTVSGASGSAQSQPAGTTDG VSGSAASASGSSGSTTSHSTTATTS STSTVSTSSSGASTSSSTDQASMLT TQTSYSAGSSVHKSAVVAPTQSTT PDNAESGAKQSKAAVQEPKNVLM ILTKCDLKAEVTEEQIRSQGNPESN GSSSEPTAASPKLTAAASGFTAAIT PLFMVPLMFFA
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	VirB10 Id: WP_064670091.1	>WP_064670091.1 TrbI/VirB10 family protein [<i>Anaplasma phagocytophilum</i>] MADEIRGSSSGENIEDNVNVVGVA KSKKLFVIIIVLIATGLMYFFFFN KESSEDEEDTQVTHVIEEKEVEKL RKDAGKPAQETAPRIMTPPPRLPE LPPLVMPTVPDIPVVTKLLKPPVEE EIVEEYNIQEVSPMNISSPEHEEIS LPLPYKTITAEQPSFLGYDKEKRG APMIAFGGGGEVAGGESGDGSVG GKEDARFTAQGLEGTQSPSVRATR VGDRYIILQGNMIDAVLETAINSD ISGVLRAVVS RDVYASSGDTVLP KGSRLIGSYFFDSAGNNVRVDVN WSRVILPHGVDVQIASSGTDELGR NGISGVVDNKGVSILTSTIFLAGISF GTAYVTDKIPSLKSETVKVEAPTD GKDGGKTTSTSLSTKIVSDAIKDFS ESMKEIVNKYSNRTPTVYVDQGT VMKVFEVNQDVVEPRDAVR

Fonte: Autora, 2024.

3.1.2 Análises de imunoinformática: Imunogenicidade e ligação MHC I e MHC II

As sequências de aminoácidos das proteínas: Virb10, TRP36 e CBA (Tabela 1), foram utilizadas para a predição de sequências peptídicas mais imunogênicas, identificadas utilizando o Recurso de Análise de Banco de Dados de Epítomos Imunes (IEDB) (<https://www.iedb.org/>). Essas ferramentas fazem previsões sobre a capacidade relativa de um complexo peptídeo/MHC de provocar uma resposta imune. Para isso, usa propriedades de aminoácidos, bem como sua posição dentro do peptídeo, para prever a imunogenicidade de um complexo MHC de peptídeo de classe I (pMHC), ou seja, a capacidade relativa de um determinado conjunto de peptídeos ligados a um complexo MHC de ser reconhecido por uma célula T (Calis et al., 2013; Ferri et al., 2017). Os scores positivos e mais altos indicam que são mais prováveis de serem reconhecidos por células T

CD8+ e induzir resposta imune. Todos os peptídeos imunogênicos, serão provavelmente bons ligantes à moléculas MHC de classe I, mas o contrário não é verdadeiro. Por esse motivo, adotamos a análise de imunogenicidade de MHC de classe I, para selecionar as sequências peptídicas para construção da proteína quimera. Selecionamos as sequências com escore acima de 0,30000.

Após a construção da proteína quimera, também analisamos a probabilidade de ligação desses peptídeos a moléculas de MHC de classe I e MHC de classe II. Os linfócitos T citotóxicos, também conhecidas como células T CD8 +, desempenham um papel importante no controle de infecções por organismos intracelulares por meio de sua atividade citotóxica. A ligação epítomos específicos para o MHC-I foram previstos usando o programa IEDB com o método IEDB recomendado 2020.09 (NetMHCpan EL 4.1) e especificado se a ligação a alelos de todos os comprimentos de DLA-8803401, DLA-8850101 e DLA-8850801. Além disso, a predição de epítomos de linfócitos T auxiliares, ou células T CD4 +, também é importante porque essas células são responsáveis por induzir uma resposta eficiente de anticorpos ou resposta de células T CD8 +. Assim, a previsão de ligação MHC classe II foi realizada com o método IEDB recomendado 2023.05 (NetMHCIIpan versão 4.1), selecionando o conjunto completo de referências HLA (Sistema de Antígenos Leucocitários Humanos).

Além disso, foi realizada a predição de epítomos lineares de células B da proteína quimera construída, a fim de prever as regiões que serão reconhecidas como epítomos no contexto de uma resposta de células B. Para isso, foi utilizado o programa IEDB, com o método recomendado pelo IEDB “*Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0*”. Os eptomos de célula B são classificados em lineares e conformacionais. Epítomos lineares são peptídeos curtos que são compostos de aminoácidos sequenciais no antígeno.

3.1.3 Construção da quimera e Previsão de estrutura terciária

Após a identificação dos epítomos imunodominantes e seleção dos mais promissores para a composição da vacina multiepítomo, estes foram ligados por meio de ligante GGSG (glicina-glicina-serina-glicina) flexível, contendo quatro réplicas deste aminoácido entre cada sequência.

As sequências selecionadas foram organizadas variando a posição de acordo com cada espécie, pois a posição dessas sequências podem influenciar a estrutura tridimensional (3D) final. Foram obtidas 7 proteínas (Tabela 2), nas quais passaram por avaliação no servidor online *Iterative Threading ASSEmbly Refinement* (I-TASSER) disponível em (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) para prever a estrutura 3D e selecionar a proteína que fosse mais estável (Zhang, 2008). O programa analisa a estabilidade da estrutura

através do Fator B normalizado, onde resíduos com valores superiores a 0 são menos estáveis em estruturas experimentais. O programa também gera até cinco modelos que correspondem aos cinco maiores agrupamentos de estrutura. A qualidade dos modelos previstos é analisada através do C-score, sendo pontuação de confiança para estimar a qualidade dos modelos previstos pelo I-TASSER. Um C-score de valor mais alto significa um modelo com alta confiança e vice-versa. Normalmente está na faixa de -5 a 2, onde um C-score de valor mais alto, significa um modelo com confiança e vice-versa. A estrutura modelada com maior pontuação de confiança atribuída (C-score) foi selecionada.

Tabela 2. Sequências peptídicas imunodominantes previstas, organizadas por posição variável de acordo com cada espécie, ligadas por um ligante flexível (GGSG), visando avaliar a estrutura 3D.

Nome	Ordem	Sequência peptídica
Quimera 1	1. <i>E.canis</i> (TRP36)	MLFILMGYCMLHLTTEITNIDFA
	2. <i>B. canis</i> (CBA) - Grande	HDFHIHQGERFGVSSGDLELDIA
	3. <i>B. canis</i> (CBA) - Pequena	NHPGHGYHILFKNNGHVISDLH
	4. <i>Anaplasma</i> (Virb10) - 3° sequência	GVGGSGTDDNDKVVPHGIWFIE
	5. <i>Anaplasma</i> (Virb10) - 2° sequência	GVYETDKMFEVYKTLTDPEDPS EVTRLTTVSGASGGSGAASGFTA AITPLFMVPLMFFAGGSGMADEI RGSSSGENIEDNVNVVGVAKSK KLFVIIIVLIATGLMYFFFFFNKE SSEDEEDTQVTHVIEEKEVGGSG PPEHEEISLPLPYKTITAEQPSFLG YDKEKRGAPMIAFGGGGEVAGG ESGDGSVGGKEDARFTAWQGLE G
Quimera 2	1. <i>E.canis</i> (TRP36)	MLFILMGYCMLHLTTEITNIDFA
	2. <i>B. canis</i> (CBA) - Grande	HDFHIHQGERFGVSSGDLELDIA
	3. <i>B. canis</i> (CBA) - Pequena	NHPGHGYHILFKNNGHVISDLH
	4. <i>Anaplasma</i> (Virb10) - 2° sequência	GVGGSGTDDNDKVVPHGIWFIE
	5. <i>Anaplasma</i> (Virb10) - 3° sequência	GVYETDKMFEVYKTLTDPEDPS EVTRLTTVSGASGGSGAASGFTA AITPLFMVPLMFFAGGSGPPEHE EISLPLPYKTITAEQPSFLGYDKE KRGAPMIAFGGGGEVAGGESGD GSVGGKEDARFTAWQGLEGGG SGMADEIRGSSSGENIEDNVNV VGVAKSKKLFVIIIVLIATGLMY YFFFFNKESEDEEDTQVTHVIE EKEV
Quimera 3	1. <i>B. canis</i> (CBA) - Grande	TDDNDKVVPHGIWFIEGVYETD
	2. <i>B. canis</i> (CBA) - Pequena	KMFEVYKTLTDPEDPSEVTRLTT
	3. <i>Anaplasma</i> (Virb10) - 2° sequência	VSGASGGSGAASGFTAAITPLFM VPLMFFAGGSGPPEHEEISLPLPY
	4. <i>Anaplasma</i> (Virb10) - 3° sequência	KTITAEQPSFLGYDKEKRGAPMI AFGGGGEVAGGESGDGSVGGKE
	5. <i>E.canis</i> (TRP36)	DARFTAWQGLEGGGSGMADEIR GSSSGENIEDNVNVVGVAKSKK LFVIIIVLIATGLMYFFFFFNKES SEDEEDTQVTHVIEEKEVGGSG

		MLFILMGYCMHLTTEITNIDFA HDFHIIHQGERFGVSSGDLELDIA NHPGHGYHILFKNNGHVISDLH GV
Quimera 4	1. <i>Anaplasma</i> (Virb10) - 2° sequência 2. <i>Anaplasma</i> (Virb10) - 3° sequência 3. <i>B. canis</i> (CBA) - Pequena 4. <i>B. canis</i> (CBA) - Grande 5. <i>E.canis</i> (TRP36)	PPEHEEISLPLPYKTITAEQPSFLG YDKEKRGAPMIAFGGGGEVAGG ESGDGSVGGKEDARFTAWQGLE GGGSGMADEIRGSSSGENIEDN VNVVGVAKSKLFIIVVLIATG LMYYFFFFNKESSEDEEDTQVT HVIEEKEVGGSGAASGFTAAITP LFMVPLMFFAGGSGTDDNDKV VPHGIWFIEGVYETDKMFEVYK TLTDPEDPSEVTRLTTVSGASGG SGMLFILMGYCMHLTTEITNID FAHDFHIIHQGERFGVSSGDLELD IANHPGHGYHILFKNNGHVISDL HGV
Quimera 5	1. <i>Anaplasma</i> (Virb10) - 2° sequência 2. <i>Anaplasma</i> (Virb10) - 3° sequência 3. <i>E.canis</i> (TRP36) 4. <i>B. canis</i> (CBA) - Pequena 5. <i>B. canis</i> (CBA) - Grande	PPEHEEISLPLPYKTITAEQPSFLG YDKEKRGAPMIAFGGGGEVAGG ESGDGSVGGKEDARFTAWQGLE GGGSGMADEIRGSSSGENIEDN VNVVGVAKSKLFIIVVLIATG LMYYFFFFNKESSEDEEDTQVT HVIEEKEVGGSGMLFILMGYCM LHLTTEITNIDFAHDFHIIHQGERF GVSSGDLELDIANHPGHGYHILF KNNGHVISDLHGVGGSGAASGF TAAITPLFMVPLMFFAGGSGTDD NDKVVPHGIWFIEGVYETDKMF EVYKTLTDPEDPSEVTRLTTVSG AS
Quimera 6	1. <i>B. canis</i> (CBA) - Pequena 2. <i>B. canis</i> (CBA) - Grande 3. <i>E.canis</i> (TRP36) 4. <i>Anaplasma</i> (Virb10) - 2° sequência 5. <i>Anaplasma</i> (Virb10) - 3° sequência	AASGFTAAITPLFMVPLMFFAGG SGTDDNDKVVPHGIWFIEGVYE TDKMFEVYKTLTDPEDPSEVTR LTTVSGASGGSGMLFILMGYCM LHLTTEITNIDFAHDFHIIHQGERF GVSSGDLELDIANHPGHGYHILF KNNGHVISDLHGVGGSGPPEHE EISLPLPYKTITAEQPSFLGYDKE KRGAPMIAFGGGGEVAGGESGD GSVGGKEDARFTAWQGLEGGG SGMADEIRGSSSGENIEDNVNV VGVAKSKLFIIVVLIATGLMY YFFFFNKESSEDEEDTQVTHVIE EKEV
Quimera 7	1. <i>E.canis</i> (TRP36) 2. <i>Anaplasma</i> (Virb10) - 2° sequência 3. <i>Anaplasma</i> (Virb10) - 3° sequência 4. <i>B. canis</i> (CBA) - Pequena 5. <i>B. canis</i> (CBA) - Grande	MLFILMGYCMHLTTEITNIDFA HDFHIIHQGERFGVSSGDLELDIA NHPGHGYHILFKNNGHVISDLH GVGGSGPPEHEEISLPLPYKTITA EQPSFLGYDKEKRGAPMIAFGG GGEVAGGESGDGSVGGKEDARF TAWQGLEGGSGMADEIRGSSS GENIEDNVNVVGVAKSKLFIIV VLIATGLMYFFFFNKESSEDE EDTQVTHVIEEKEVGGSGAASG

FTAAITPLFMVPLMFFAGGSGTD
DNDKVVPHGIWFIEGVYETDKM
FEVYKTLDPEDPSEVTRLTTVS
GAS

Fonte: Autora, 2024.

3.1.4 Determinação do perfil de antigenicidade, alergenicidade e solubilidade

ANTIGENpro ([//scratch.proteomics.ics.uci.edu/](http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/)) (Magnan et al., 2010) previu a antigenicidade da vacina multiepitopo, enquanto AllerTOP v2.0 ([//www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/](http://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/)) (Dimitrov; Flower; Doytchinova, 2013) é empregado para analisar a natureza alérgica da construção da vacina projetada. A ferramenta online SOLpro foi utilizada para o cálculo da solubilidade do hospedeiro *Escherichia coli* (*E. coli*) ([//scratch.proteomics.ics.uci.edu/](http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/)) (Cheng et al., 2005).

3.1.5 Determinação de propriedades físico-químicas

O servidor ExPASy-ProtParam ([//web.expasy.org/protparam/](http://web.expasy.org/protparam/)) foi empregado para calcular as propriedades físico-químicas da proteína quimera projetada. Esta ferramenta calcula vários parâmetros como peso molecular, ponto isoelétrico (pI) (Cheng et al., 2005).

3.2 Expressão da proteína quimera

Após a obtenção da construção quimérica, o gene foi sintetizado pela empresa FastBio (Vila Velha - ES, Brasil). Posteriormente, a expressão e purificação da proteína foram realizadas pela empresa Scienco Biotech (Lages-SC, Brasil), seguindo o protocolo do fabricante. A sequência de DNA otimizada para *E. Coli*, de aminoácidos, do vetor e sequência final estão presentes no anexo A.

3.2.1 Crescimento e expressão

Foi selecionada uma colônia da placa ou 200 µl de uma alíquota da bactéria transformada com o gene (*E. Coli* BL21 (DE3) SlyD) e incubado num pré-inóculo de 30 mL de meio LB (Luria Bertani) suplementado com 30 µl de ampicilina (solução estoque a 100 mg/ml) e 30 µl de Cloranfenicol (solução estoque a 30 mg/ml) deixado sob agitação (120 rpm) *overnight* a 37°C. No dia seguinte, foi retirado 100 µl do meio LB sem bactéria para usar como branco e posteriormente incubado 15 mL do crescimento em 1000 mL de meio LB (2 L totais) suplementados com 500 µl de

ampicilina e 1000 µl de cloranfenicol. O crescimento foi monitorado até atingir a OD₆₀₀ de 0,6 - 0,8; e foi induzido com 0,5 mM de IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida) (de uma solução estoque a 1M pegar 500 µl por litro de meio) e deixar por 2,5 h sob agitação a 37°C.

O crescimento foi centrifugado a 8000 rpm por 20 min a 4°C em falcon de 50 ml, o sobrenadante descartado e adicionado mais 50 ml do meio e centrifugado. O procedimento foi repetido até centrifugar todo o meio. Cada pellet foi lavado com 12,5 mL de tampão PBS e centrifugado a 8000 rpm 10 min a 4°C. A lavagem foi repetida.

3.2.2 Lise celular

Os pellets formados foram ressuspensos com 12,5 mL de tampão. Posteriormente as soluções formadas foram unidas em um falcon e transferidas para um becker com gelo para sonicar. A sonicação foi realizada utilizando a ponta macro em potência de 70% e 2 pulsos com 10 ciclos de 1 min com intervalo de 1 min. Após o procedimento, o falcon foi centrifugado a 8.000 rpm por 45 min a 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi transferido para um falcon e o pellet descartado.

3.2.3 Purificação

A coluna de 1 mL armazenada em álcool 20% foi limpa, retirando o álcool, e lavando com 50 mL de água ultrapura. A coluna foi equilibrada com 10 mL de tampão A (50 mM de Tris-base pH 8,0 e 300 mM de NaCl) e o sobrenadante passado. O *flow-through* foi coletado. Posteriormente a coluna foi lavada com 20 mL do tampão B (20 mM de imidazol) e o lavado coletado. A proteína foi eluída com 3 mL de tampão C (1 M de imidazol) e transferido o eluído para um falcon novo. Mais 5 mL de tampão C foi passado na coluna para limpar e coletar o *Flow-through* (Eluído 2). Em seguida, foram passados 50 mL de água ultrapura, 50 mL de água ultrapura, e as colunas foram armazenadas com 15 mL de etanol a 20% a 4°C.

Para obter a concentração certa da proteína foi utilizado o coeficiente de extinção molar, onde uma absorbância de 0,719 equivale a 1 mg/mL de proteína. A proteína foi diluída e nos 5 mL de proteína eluída foram adicionados 15 mL de tampão A, ficando com uma concentração final de imidazol de 250 mM. Após a diluição, a proteína foi medida no nanodrop e foi realizado mais um gel. Como conservantes foram adicionados 1 mM de EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*) e 0,005% de Thymersal.

3.3 Avaliação da estabilidade vacinal e análises bioquímicas

Um frasco de vacina foi formulado contendo 20 µg de proteína químera associado a 100 µg de saponina P.A (Dinâmica Química) e 50 µg de hidróxido de alumínio/dose. Uma amostra foi retirada e o pH foi determinado, sendo ajustado para um pH 7. Foi incubada a 37°C por 7 dias para simular condições adversas e acelerar os processos de degradação, por meio do teste de estabilidade acelerada. Após uma semana, a quantidade de proteína e o pH foram analisados para avaliar possíveis mudanças ou degradações ocorridas durante o período de incubação.

3.4 Animais e grupos experimentais

Foram incluídos no estudo 16 cães (com ou sem raça definida) com idade acima de 1 ano de ambos os sexos. Os cães foram obtidos de tutores, com preenchimento do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A). Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da UNILA, protocolo 001/2018 (Anexo B). Os animais eram clinicamente saudáveis, e essa condição foi confirmada por meio de análises bioquímicas e hematológicas. Além disso, foram testados para a ausência de infecções utilizando diversos métodos, e a detecção dessas infecções foi um critério de exclusão do estudo. Realizou-se a triagem sorológica com testes de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) indireto para leishmaniose visceral canina (ELISA/S7, Biogene), babesiose canina (IMUNOTESTE® *Babesia canis*, Imunodot diagnóstico), anaplasmosse canina (Teste SNAP 4Dx Plus, IDEXX) e erliquiose canina (IMUNOTESTE® *Ehrlichia* PR, Imunodot diagnóstico). Também foram realizados testes de RIFI para leishmaniose visceral canina (IMUNOTESTE® *Leishmania chagasi*, Imunodot diagnóstico). A avaliação molecular foi conduzida por meio da técnica de PCR em tempo real *in house*, enviada para um laboratório terceirizado para execução. Ademais, todos os animais faziam uso de coleiras antipulgas e carrapatos.

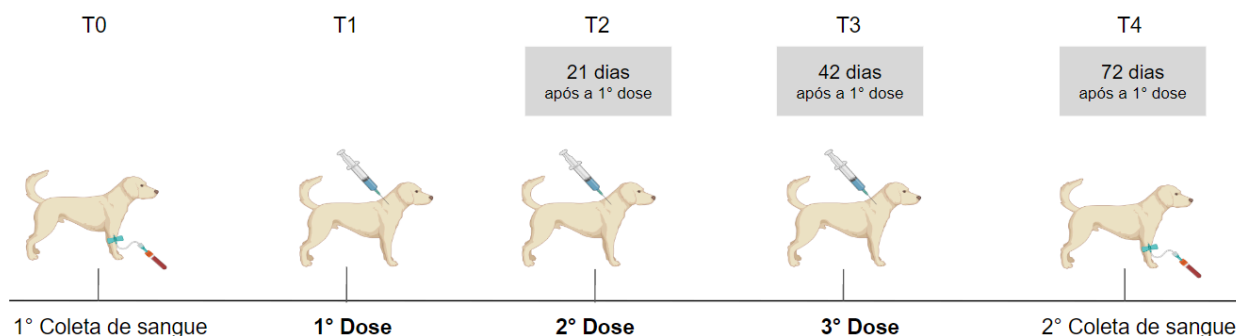
Para o estudo proposto, os cães foram distribuídos em 4 grupos experimentais (n=4/grupo), dentre os quais:

- i. **Grupo imunizado com proteína químera com adjuvante saponina e hidróxido de alumínio (Vacina):** receberam 20 µg de proteína químera associado a 100 µg de saponina P.A por dose e 50 µg de hidróxido de alumínio diluído em 388 µL de PBS 1x estéril.
- ii. **Grupo imunizado com proteína químera (Proteína):** receberam 20 µg de proteína químera/dose, diluído em 988 µL de PBS 1x estéril.

iii. **Grupo imunizado com adjuvante saponina e hidróxido de alumínio (Adjuvante):** receberam 100 µg de saponina P.A/dose e 50 µg de hidróxido de alumínio diluído em 400 µL de PBS 1x estéril.

i. **Grupo controle (Controle):** receberam 1 mL de Tampão de fosfato (PBS) 1x estéril.

Diagrama 1. Esquema do desenho experimental utilizado no ensaio pré-clínico vacinal contra *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. e *Babesia* spp.



Fonte: Autora, 2024.

Legenda: Foram avaliados os grupos: Saponina e hidróxido de alumínio (Adjuvante), Proteína quimera (Proteína), Proteína quimera + saponina e hidróxido de alumínio (Vacina), Controle (Controle). T0= Antes da primeira imunização; T1 = primeira dose vacinal, T2= 21 dias após o primeira dose, T3= 42 dias após a primeira dose e T4= 72 dias após a primeira dose. Os diferentes inóculos foram administrados por via subcutânea, em três doses com intervalo de 21 dias.

Os animais receberam três doses por via subcutânea, com intervalo de 21 dias. Os estudos de segurança do animal alvo foram projetados seguindo diretrizes da Cooperação Internacional sobre Harmonização de Requisitos Técnicos para o Registro de Produtos Medicinais Veterinários (VICH) Tópico GL-44 (Estudos de Segurança de Animais Alvo para Vacinas Veterinárias Vivas e Inativadas), sendo normas amplamente adotadas pelo MAPA do Brasil. Para isso, durante um período de 15 dias após cada dose de cada intervenção vacinal, os animais passaram por avaliação clínica (avaliações relacionadas à inocuidade e toxicidade). Todos os animais foram avaliados quanto ao surgimento de alterações no local do inóculo vacinal, como formação de edemas, pústulas, fistulas, úlceras, dor, ou seja, alterações inflamatórias gerais. Além desta análise no local do inóculo, foi realizada uma análise clínica geral do animal, buscando avaliar alterações sistêmicas e comportamentais, apatia, falta de apetite e sinais neurológicos.

Amostras de sangue foram coletadas antes de se iniciar o protocolo vacinal (T0) para triagem dos animais realizando análises laboratoriais (hematologia, bioquímica, sorologia e PCR). Bem como 72 dias do primeiro inóculo (T4) para avaliar imunogenicidade vacinal com testes sorológicos, linfoproliferação, dosagem de citocinas (Diagrama 1).

3.5. Obtenção de amostras de sangue e soro

Amostras de sangue foram coletadas em seringas descartáveis estéreis de 10 mL, através de punção jugular. Para a triagem dos animais, do volume total de 5 mL de sangue coletado, 50µL de sangue foram transferidos para um tubo eppendorf (Hamburgo, Alemanha) com EDTA, destinado à realização do hemograma completo (leucograma, eritrograma e contagem de plaquetas), enquanto 10µL de sangue foram destinados a confecção dos esfregaços sanguíneos em lâminas. O restante do volume de sangue coletado foi imediatamente centrifugado a 400 xg por 15 minutos para obtenção das amostras de soro. Parte da amostra de soro (50µL) foi imediatamente destinada a dosagem de enzimas para análise da função hepática e renal, sendo o restante (cerca de 200µL) foi acondicionado em freezer -80°C até o momento do uso para a realização do teste sorológico destinado a análise dos níveis de IgG total anti-hemoparasitoses caninas. Para avaliação da eficácia vacinal, foram coletados 15 mL de sangue, no qual 10 mL foram destinados para obtenção de PBMC e o restante foi centrifugado por 400 xg por 15 min para obtenção de amostras de soro.

3.6 Avaliação bioquímica e hematológica

Para a avaliação do perfil hematológico, foi utilizado o aparelho automático Celltac para VET (MEK-6550J/K – Nihon Kohden) para análise hematológica (leucograma e eritrograma). O leucograma foi determinado pelo aparelho hematológico em número de leucócitos/mm³. A contagem diferencial de células foi realizada em esfregaços sanguíneos corados com Panótico Rápido InstantProv (Newprov®) e avaliada por microscopia óptica em objetiva de imersão. Desta forma, foi determinada a contagem diferencial de leucócitos, e obtido o número absoluto de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos, por meio da contagem de 100 leucócitos/lâmina.

As avaliações bioquímicas consistiram nas seguintes análises: prova de função renal a partir da dosagem de ureia e creatinina; provas de função hepática, compreendendo a dosagem das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA). Para estas análises, utilizou-se o sistema bioquímico semiautomático (BIO PLUS; Bio-200) e empregados Kits comerciais da Gold Analisa Diagnóstica, seguindo o método descrito pelo fabricante.

3.7. Análise sorológica por ELISA antes e após a vacinação

Soros dos 16 cães vacinados foram analisados por ELISA indireto *in house* para resposta humoral do tipo IgG antes e após a vacinação. As microplacas de 96 poços (Corning) foram

sensibilizadas com 0,3 µg de proteína químera /poço e incubadas *overnight* (18 horas) a temperatura de 4 °C. Depois disso, o excesso de antígeno foi removido da placa através de três lavagens com solução salina tamponada mais 0,05% Tween 20 (PBS-T). Posteriormente, foi realizado um bloqueio de ligações inespecíficas com 100 µl de solução com 5% Soro Fetal Bovino (SFB) e PBS-T)/poço e mantidas em temperatura ambiente (TA) por 1 hora e lavadas novamente três vezes com PBS-T. As amostras de soro do T0 (triagem) foram diluídas 1/100 em PBS-T. Os soros dos 16 cães, todos com o protocolo vacinal completo (T3), foram submetidos a uma diluição seriada em PBS-T. As diluições foram feitas sucessivamente nas proporções de 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 e 1:3200. O PBS-T foi distribuído em 50 µL em todos os poços das placas, exceto para diluição inicial de 1/100, onde o volume de meio diluente foi de 99 µL. Então a diluição seriada foi realizada transferindo 50 µL entre cada diluição, iniciando no 1/100 e descartando os 50 uL excedente na diluição 1:3.200. Após a diluição, foram transferidas para a placa sensibilizada e mantidas por 30 min a 37 °C, lavadas três vezes com PBS-T. Em seguida, os anticorpos IgG anti-cão (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) conjugados foram adicionados na diluição 1/10.000 e mantidos por 30 min a 37 °C, lavados três vezes e adicionados a Solução Cromogênica de Tetrametilbenzidina (TMB) (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) diluído em PBS 1X na proporção de 1:1, por 10 min a 37 °C. A reação foi interrompida com 35 µl de solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 1M e as leituras foram realizadas no comprimento de onda de 450 nm. Em todas as placas, foram utilizados soros-controle de cães verdadeiros negativos e verdadeiros positivos, para o estabelecimento do ponto de corte (*cutoff*) da análise de positividade da reação. Os controles negativos foram testados em duplicata, e o ponto de corte foi determinado a partir da média da densidade óptica (DO) dos controles negativos, acrescida de dois desvios-padrão. Esse valor foi utilizado como referência para distinguir amostras detectáveis de não detectáveis, sendo considerado detectável todo resultado que excedesse o ponto de corte estabelecido.

3.8 Isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)

Amostras de sangue (10 mL cada) dos 14 cães foram coletadas em tubos heparinizados destinados à obtenção de células mononucleares de sangue periférico (PBMC), conforme descrito anteriormente (Viana et al., 2018). O volume de sangue total coletado foi colocado em uma mistura de Ficoll-Hypaque (Sigma Chemical Co.; densidade: 1,119 g/mL) e Ficoll-Hypaque (Sigma Chemical Co.; densidade: 1,077 g/mL) na proporção de 1:3 (Ficoll/sangue) em tubos de fundo cônico de poliestireno estéreis (Falcon, Corning, EUA). Todas as amostras foram centrifugadas a 700× por 40 min a 22 °C. O anel de PBMC foi coletado na interface Ficoll-Hypaque e transferido

para outro tubo com 40 mL de Falcon estéril $1 \times$ PBS contendo 10% de FBS. Este tubo foi centrifugado duas vezes a $400\times$ por 10 min a 4 °C. Depois que o sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio de cultura celular RPMI 1640. As células foram contadas em uma câmara de hemocitômetro Neubauer para determinar o número PBMC por mililitro.

Após contagem das células na câmara de Neubauer, a quantidade de PBMC plaqueadas foi de 1×10^6 células/poço em placas de 24 poços (NUNC, Inc. Thermo Fisher Scientific, EUA), em 2 mL de RPMI/SFB 10%/37°C/5% CO₂. As culturas foram mantidas por 5 dias estimuladas com 10 µg de Proteína Quimera ou 10 µg de antígeno inespecífico de proteínas de *Escherichia coli*. Dessa forma, podemos determinar se houve uma resposta específica e, em caso afirmativo, sua significância. Após esse período, os sobrenadantes foram cuidadosamente recolhidos e armazenados a -80 °C para posterior dosagem de citocinas.

3.9 Dosagem de citocinas

Foram determinados os níveis de IFN- γ e IL-10 por meio de ensaios imunoenzimáticos (ELISA), utilizando o sobrenadante da linfoproliferação liberada pelas células mononucleares tratadas com quimera e antígenos inespecíficos. As placas foram revestidas com mAb (anticorpo monoclonal) anti-IFN- γ e anti-IL-10 em PBS, pH 7,4, e incubadas a 4°C durante a noite. Depois de bloquear os poços utilizando tampão contendo PBS mais 0,05% (v/v) de Tween 20 e 0,1% (p/v) de albumina sérica bovina (BSA), foram adicionados sobrenadantes a cada poço. Adicionou-se mAb marcado com biotina em tampão de incubação a cada poço e utilizou-se estreptavidina-HRP como enzima. A reação foi desenvolvida utilizando substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina e interrompida com solução de H₂SO₄ 2,5 M. As placas foram lavadas após cada etapa de incubação usando PBS mais 0,05% (v/v) de Tween 20. Os níveis mínimos de sensibilidade foram 58 pg/mL para IFN- γ e 12 pg/mL para IL-10. Todas as experiências foram realizadas utilizando placas de 96 poços (COSTAR, Corning Inc., EUA) e de acordo com as instruções da R&D Systems. A leitura foi realizada em leitor automático de microplacas (EL800; Biotek, Winooski, VT, EUA) no comprimento de onda de 450 nm.

3.10 Análises estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism 5.0 (Prism Software, Irvine, CA, USA). Depois de demonstrada a normalidade dos dados usando o teste

Lilliefors, foi realizada análise de variância (ANOVA *one-way*) seguido do teste de Tukey para determinar as diferenças específicas entre os grupos. Em todas as análises estatísticas as diferenças foram consideradas significativas quando o valor de P foi menor que 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 Predição de peptídeos imunogênicos

Utilizando a ferramenta de imunogenicidade de MHC de classe I da plataforma de predição de epítomos do IEDB, selecionamos os peptídeos mais imunogênicos das proteínas: Virb10, TRP36 e CBA para construção da proteína quimera baseados na análise de imunogenicidade de MHC de classe I (Tabela 3).

Tabela 3. Peptídeos Imunogênicos de VirB10, TRP36 e CBA preditos pela Análise de Imunogenicidade de MHC Classe I na plataforma IEDB.

Espécie	Peptídeo	Comprimento	Pontuação
<i>E. canis</i>	MLFILMGYCMHLTTEI TNIDFAHDFHIIHQGERF GVSSGDLELDIANHPGH GYHILFKNNGHVISDLH GV	70	1,33748
	KAEDFNFMKDHSLNV SFLIDPMAFHELDVNN HPNFFISMHAYQDGCND CVHGNPSRPAIVNQAQV LLP	70	-0,01426
	DSVSAPATEDSVSAPATE DSVSAPATAATGSTTSY NHNTELEFLDSGILNML Y	53	-0,07684
	SGVTEDSVSAPATEDSV SAPATEDSVSAPATEDSV SAPATEDSVSAPATEDSV SAPATEDSVSAPATEDS	70	-0,26924
	VSAPATEDSVSAPATEDS VSAPATEDSVSAPATEDS VSAPATEDSVSAPATEDS VSAPATEDSVSAPATE	70	-0,3603
<i>B. canis</i>	TDDNDKVVPHGIFWIEG VYETDKMFEVYKTLTD PEDPSEVTRLTTVSGAS	50	0,76582
	AASGFTAAITPLFMVPL MFFA	21	0,3177
	MMLLFALSTLVTFACD GENTILLSNVEFHTPVSS VKLLKEYSSNQESMA	50	-0,46033

	AVQEPKNVLMILTKCDL KAEVTEEQIRSQGNPES NGSSSEPTAASPKLTT	50	-1,07393
	VIMMLTEMPNTSGKLTD GKVHVANDNVKCADL ALAYQELKKAGKVTSW SP	50	-1,25105
	GSAQSQPAGTTDGVSGS AASASGSSGSTTSHSTT ATTSTSTVSTSSSGA	50	-2,01471
	STSSSTDQASMLTTQTS YSAGSSVHKSAVVAPTQ STTPDNAESGAKQSKA	50	-2,16443
<i>A. phagocytophilum</i>	DSAGNNVRVDVNWSRV ILPHGVVDVQIASSGTDE LGRNGISGVVDNKVSGI LTSTIFLAGISFGTAYVT DK	70	1,07098
	PPEHEEISLPLPYKTITAE QPSFLGYDKEKRGAPMI AFGGGGEVAGGESGDG SVGGKEDARFTAWQGL EG	70	0,79529
	MADEIRGSSSGENIEDN VNVVGVAKSKKLFVII VLIATGLMYFFFFNKE SSEDEEDTQVTHVIEEK EV	70	0,7837
	TQSPSVRATRVGDTRYII LQGNMIDAVLETAINSDI SGVLRVVSRDVYASSG DTVLPKGSRLIGSYFF	70	0,41499
	NQDVVFPRDAVR	12	0,32056
	EKLKRDAGKPAQETAPR IMTPPPRLPELPPLVMPT VPDIPVVTKLLKPPVEE EIVEEYNIQEVSPMNIS	70	0,18318
	IPSLKSETVKVEAPTDG KDGKKTSTSLSTKIVS DAIKDFSESMKEIVNKY SNRTPTVYVDQGTVMK VFV	70	-2,00242

Fonte: Autora, 2024.

Foram selecionadas as sequências com escore positivo e mais altos. Ao todo, foram cinco sequências mais imunogênicas: uma sequência para *E. canis*, duas sequências para *B. canis* e duas para *A. phagocytophilum* (Tabela 4).

Tabela 4. Sequências peptídicas selecionadas baseadas na imunogenicidade MHC I para construção da proteína químera.

Espécie	Sequências mais imunogênicas	Tamanho	Score	Nome
<i>Ehrlichia canis</i>	MLFILMGYCMHL TTEITNIDFAHDFHI HQGERFGVSSGDL ELDIANHPGHGYH ILFKNNGHVISDLH GV	70	1,33748	<i>E. canis</i>
<i>Babesia canis</i>	TDDNDKVVPHGI WFIEGVYETDKMF EVYKTLTDPEDPSE VTRLTTVSGAS	50	0,76582	<i>B. canis</i> (CBA) - grande
	AASGFTAAITPLFM VPLMFFA	21	0,3177	<i>B. canis</i> (CBA) - pequena
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	PPEHEEISLPLPYK TITAEQPSFLGYDK EKRGA PMIAFGGG GEVAGGESGDGSV GGKEDARFTAWQ GLEG	70	0,79529	<i>Anaplasma</i> (Virb10) - 3º sequência
	MADEIRGSSSGENI EDNVNVVGVAKS KKLFVIIIVLIATG LMYYFFFFNKESS EDEEDTQVTHVIE EKEV	70	0,7837	<i>Anaplasma</i> (Virb10) - 4º sequência

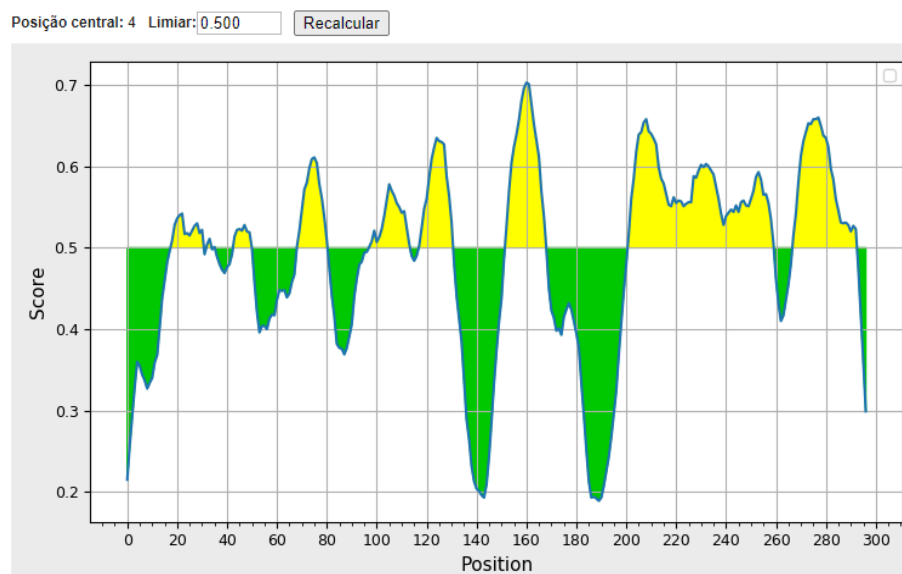
Fonte: Autora, 2024.

Após a construção da proteína, foi analisada a probabilidade de ligação desses peptídeos a moléculas de MHC de classe I (Apêndice B) e MHC de classe II (Apêndice C). Na tabela presente no Apêndice B, a coluna que antecede o rank de ligação a T CD8+ corresponde à sequência do peptídeo avaliado, que se ligaria à molécula de MHC de classe I, já que a sua fenda suporta somente de 8 a 11 aminoácidos. Já na tabela presente no Apêndice C, o MHC de classe II suporta de 12 a 16 aminoácidos. Para análise de predição de ligação de peptídeos a moléculas de MHC I ou II, um

valor pequeno de rank indica alta afinidade (IEDB recomenda: MHC I $\leq 1,0$ e MHC II $\leq 10,0$). Ao todo, foram obtidos 36 peptídeos para MHC I com rank $\leq 1,0$ e 636 peptídeos para MHC II com rank $\leq 10,0$. Devido ao tamanho do arquivo, não foi possível incluir a tabela completa para os peptídeos do MHC I e MHC II, sendo disponibilizados apenas os 10 primeiros peptídeos preditos.

A página de resultados do BepiPred contém um gráfico da pontuação prevista (eixo y) versus a posição da sequência (eixo x). O limite padrão é a pontuação de 0,5, e então a posição dos resíduos que tem uma pontuação acima se apresentam em amarelo, ou abaixo, em verde (Figura 8). Fornece também uma tabela que lista a pontuação de resíduo prevista para cada posição e uma coluna de atribuição que indica uma posição de epítipo prevista com um “E”, com os segmentos de sequência contínua onde a pontuação está acima do limite. Essa pontuação é uma medida da probabilidade de um resíduo ser parte de um epítipo. Ao todo foram identificados 168 resíduos (Apêndice D). Devido ao tamanho do arquivo, não foi possível incluir a tabela completa para os epítopos lineares de célula B, sendo disponibilizados apenas os 20 primeiros peptídeos preditos.

Figura 8. Pontuação prevista (eixo y) versus a posição da sequência (eixo x) para epítopos lineares de células B da proteína quimera construída, preditos utilizando o programa IEDB.



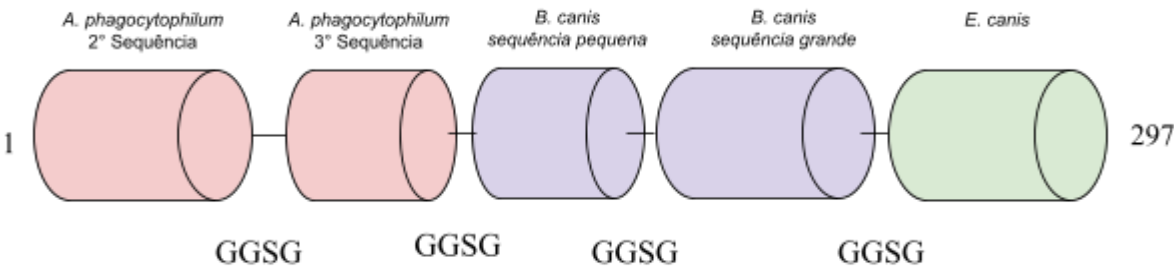
Fonte: IEDB, 2023.

4.2 Construção da proteína quimera

As sequências mais imunogênicas foram unidas por ligantes GGSG e foram rearranjadas de acordo com a espécie e submetidas a análise pelo servidor do I-TASSER para prever a estrutura 3D de cada proteína. Analisando o Fator B e o C-score informados pelo programa, que indicam a estabilidade da estrutura e a confiança para estimar a qualidade dos modelos previstos, respectivamente, a quimera 4 (Figura 9) contendo a sequência de *Anaplasma (Virb10)* - 2°

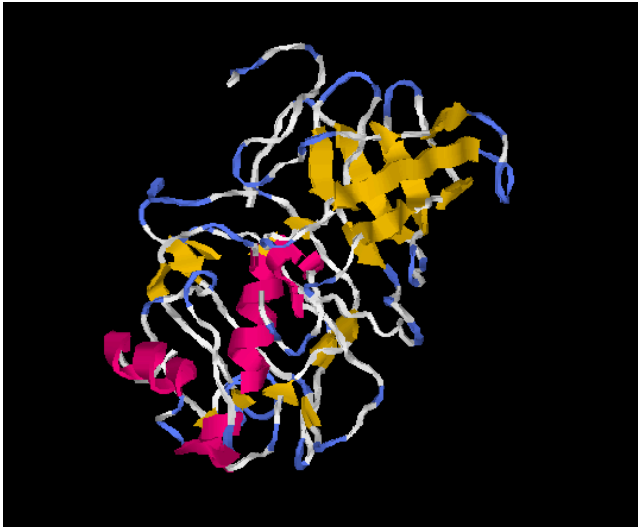
sequência; *Anaplasma* (Virb10) - 3° sequência; *B. canis* (CBA) - Pequena; *B. canis* (CBA) - Grande; *E. canis* (TRP36) se mostrou melhor para uso (Figura 10). Apesar da quimera 3 apresentar um Fator B normalizado com a menor quantidade de resíduos superiores a zero (Tabela 5), com 84 resíduos, a quimera 4 apresentou 85 resíduos superiores a zero e um maior C-score (-3,98), indicando maior estabilidade na estrutura e maior confiabilidade no modelo, quando comparamos com as demais quimeras analisadas (Tabela 6).

Figura 9. Representação esquemática da sequência peptídica da quimera 4.



Fonte: Autora, 2024.

Figura 10. Modelo 3D da proteína quimera 4 previsto pelo programa I-TASSER.



Fonte: IEDB, 2023.

Tabela 5. Fator B Normalizado das proteínas Quiméricas preditas pelo Servidor I-TASSER

Quimera 1	Quimera 2	Quimera 3	Quimera 4	Quimera 5	Quimera 6	Quimera 7
111	94	84	85	91	103	92

Fonte: J Yang, R Yan, A Roy, D Xu, J Poisson, Y Zhang (2015); A Roy, A Kucukural, Y Zhang (2010); Y Zhang (2008).

Tabela 6. C-score dos 5 principais modelos gerados pelo servidor I-TASSER.

Modelos	Quimera 1	Quimera 2	Quimera 3	Quimera 4	Quimera 5	Quimera 6	Quimera 7
1	-4,76	-5	-5	-3,98	-4,77	-4,02	-4,48
2	-5	-4,43	-5	-3,98	-4,73	-5	-4,89
3	-5	-4,96	-4,86	-5	-5	-5	-5
4	-4,81	-5	-5	-5	-5	-4,76	-5
5	-4,43	-5	-5	-5	-5	-4,44	-5

Fonte: J Yang, R Yan, A Roy, D Xu, J Poisson, Y Zhang (2015); A Roy, A Kucukural, Y Zhang (2010); Y Zhang (2008).

4.2.1 Predição de antigenicidade e alergenidade da proteína quimérica

A pontuação de antigenicidade para a vacina proteína foi de 0,768964, conforme previsto pelo servidor ANTIGENpro. A construção final da proteína foi prevista como não alergênica pelo AllerTOP v2.0. A previsão da solubilidade utilizando o servidor SOLpro ilustrou que a construção da proteína é solúvel com uma probabilidade de 0.695496.

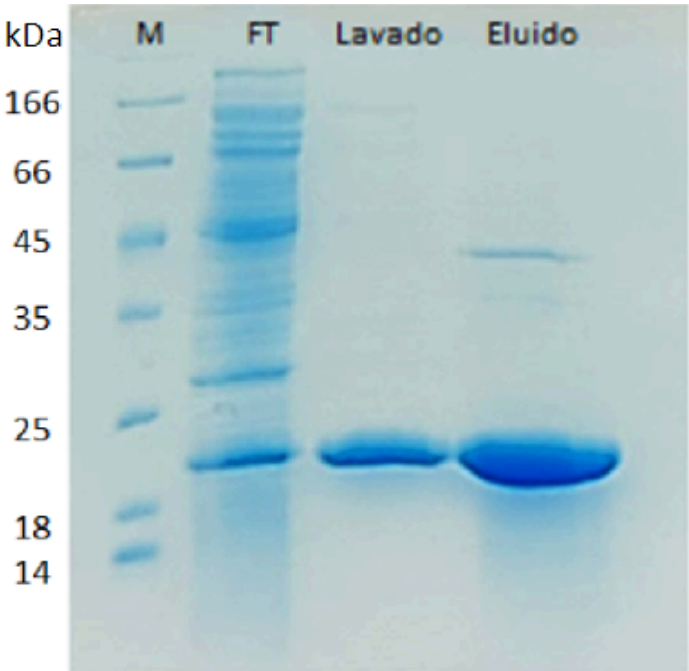
4.2.2 Caracterização Físicoquímica da Proteína Projetada

A proteína multiepitopo construída contém 297 aminoácidos e um peso molecular de ~31,87 kDa. O pI estimado foi 4,59, o que aponta a natureza ácida da proteína multiepitópica.

4.3 Expressão do gene e purificação da proteína

Na análise de eletroforese da proteína expressa em *E. coli*, observamos que na fração solúvel (S), há uma banda de aproximadamente 20 kDa, enquanto na fração insolúvel, observamos uma banda maior, em torno de 45 kDa (Figura 11).

Figura 11. Gel de análise da purificação da proteína quimérica utilizando coluna de níquel.



Fonte: Scienco Biotech, 2024.

Legenda: Da direita para a esquerda, linha 1, Marcador de massa molecular, linha 2 Fração total, linha 3 lavado e linha 4 eluído.

4.4 Avaliação da Estabilidade vacinal e Análises Bioquímicas

Após 7 dias a 37°C, a vacina permaneceu com o pH 7. No entanto, ao realizar a dosagem da proteína foi observado que houve perda de 70%, diminuindo de 20 µg para 6 µg de proteína por dose (Tabela 7).

Tabela 7. Concentração de proteína em mg/mL a 37 °C após 1 semana.		
Doses	Após o preparo	Após 7 dias a 37°C
Por dose	20 µg	6 µg

Fonte: Autora, 2024.

4.5 Avaliação hematológica e bioquímica

4.5.1 Hemograma

A análise do hemograma (leucograma e eritrograma) foi incluída nesse estudo para identificar possíveis infecções e avaliação da saúde geral, permitindo realizar a triagem e seleção de cães saudáveis. Os valores absolutos (média±desvio padrão) das populações de global de leucócitos, segmentados, eosinófilos, linfócitos e monócitos, bem como plaquetas, hemácia, hemoglobina e

hematócrito encontram-se na Tabela 8. Não foi observado qualquer alteração hematológica significativa.

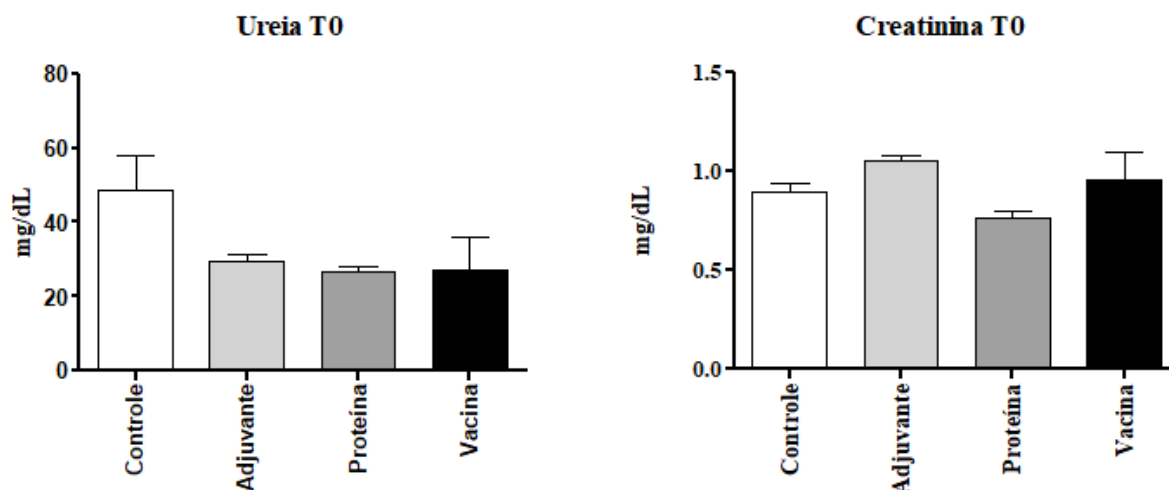
Tabela 8. Leucograma e eritrograma de cães antes de se iniciar o protocolo vacinal (T0) para triagem dos animais.

Hemograma						
Observação série vermelha						
Parâmetros	Idade	Média	Desvio padrão	Valor mínimo	Valor máximo	Valores de referência
Global de Leucócitos (mm³)	1 a 8 anos	9.708	2.876	5.100	13.100	6.000 - 17.000
	8 anos	8.967	1.266	7.600	10.100	6.000 - 16.000
Segmentados (células/μL)	1 a 8 anos	5.399	1.434	2.040	6.875	3.000 a 11.500
	8 anos	5.193	1.634	3.312	6.252	3.000 a 11.800
Eosinófilos (células/μL)	1 a 8 anos	1.183	930	204	3.072	100 a 1.250
	8 anos	468	303	228	808	60 a 1.300
Linfócitos típicos (células/μL)	1 a 8 anos	2.473	1.245	1.071	5.109	1.000 a 4.800
	8 anos	3.065	1.979	1.216	5.152	1.500 a 5.000
Monócitos (células/μL)	1 a 8 anos	311	146	96	575	100 a 1.250
	8 anos	148,6	55,07	92	202	60 a 1.300
Observação série branca						
Parâmetros	Parâmetros	Média	Desvio padrão	Valor mínimo	Valor máximo	Valores de referência
Plaquetas (mm³)	Plaquetas (mm³)	268.063	79.64	153.000	477.000	200.000 - 500.00
Eritrograma						
Parâmetros	Idade	Média	Desvio padrão	Valor mínimo	Valor máximo	Valores de referência
Hemácias (milhões/mm³)	1 a 8 anos	8,13	0,75	6,69	9,27	5,5 a 8,5
	8 anos	8,57	1,049	7,47	9,56	5,7 a 7,4
Hemoglobina (g/dL)	1 a 8 anos	18,3	1,49	15,3	21,3	12 a 18
	8 anos	19,25	0,42	17,5	18,1	14 a 18
Hematócrito (%)	1 a 8 anos	54,15	5,93	45	61	37 a 55
	8 anos	59,33	4,41	54	64	38 a 47

4.5.2 Prova de função renal

Para a avaliação da função renal foram realizadas dosagens de ureia e creatinina no soro dos cães dos diferentes grupos, que foram avaliados antes da aplicação do protocolo vacinal (T0) (Figura 12). Nenhuma alteração significativa foi observada para os níveis de ureia e creatinina para todos os grupos avaliados.

Figura 12. Níveis séricos de ureia e creatinina de cães do grupo Controle, Adjuvante, Proteína e Vacina.



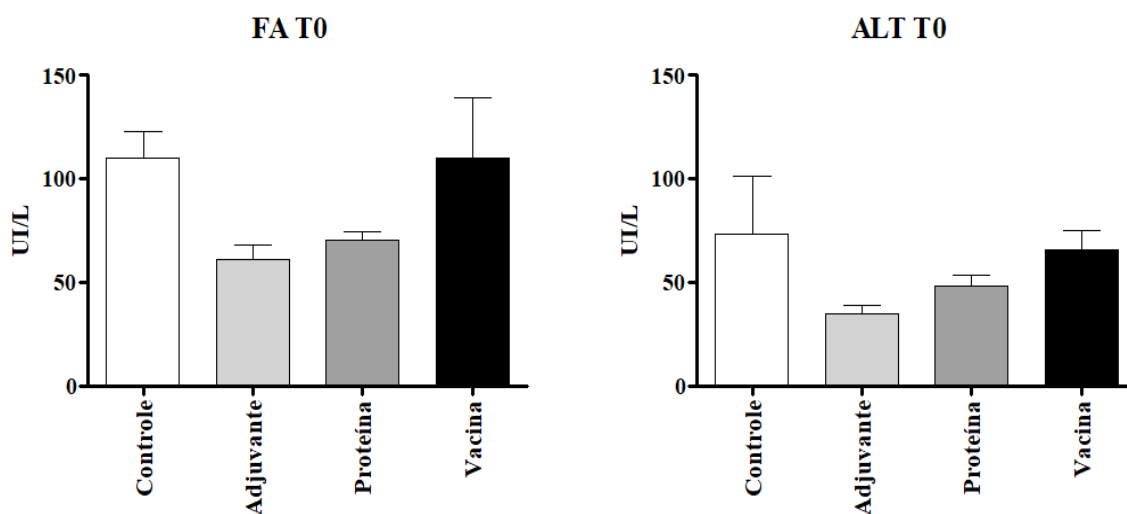
Fonte: Autora, 2024.

Legenda: Os resultados estão expressos como média de ureia e creatinina em mg/dL. Valores de referência para cães: Ureia (mg/dL) = 10.0 a 60.0 mg/dL, creatinina = (mg/dL) 0,5 a 1,4.

4.5.3 Prova de função hepática

A avaliação da função hepática foi realizada a fim de verificar possível comprometimento hepático nos cães que podem ser causados por infecções, medicamentos, tumores, traumas, intoxicação e entre outros. Dentre as principais enzimas hepáticas, foi avaliada a transaminase: fosfatase alcalina (FA) e alanina aminotransferase (ALT) (Figura 13). Os resultados demonstraram que os cães não apresentavam alterações das enzimas avaliadas.

Figura 13. Níveis séricos de fosfatase alcalina (FA) e alanina aminotransferase (ALT) em cães do grupo Controle, Adjuvante, Proteína e Vacina.



Fonte: Autora, 2024.

Legenda: Os resultados estão expressos como média de FA e ALT em UI/L. Valores de referência para cães: FA = 20 a 150 UI/L e ALT = 10.0 a 88.0 UI/L.

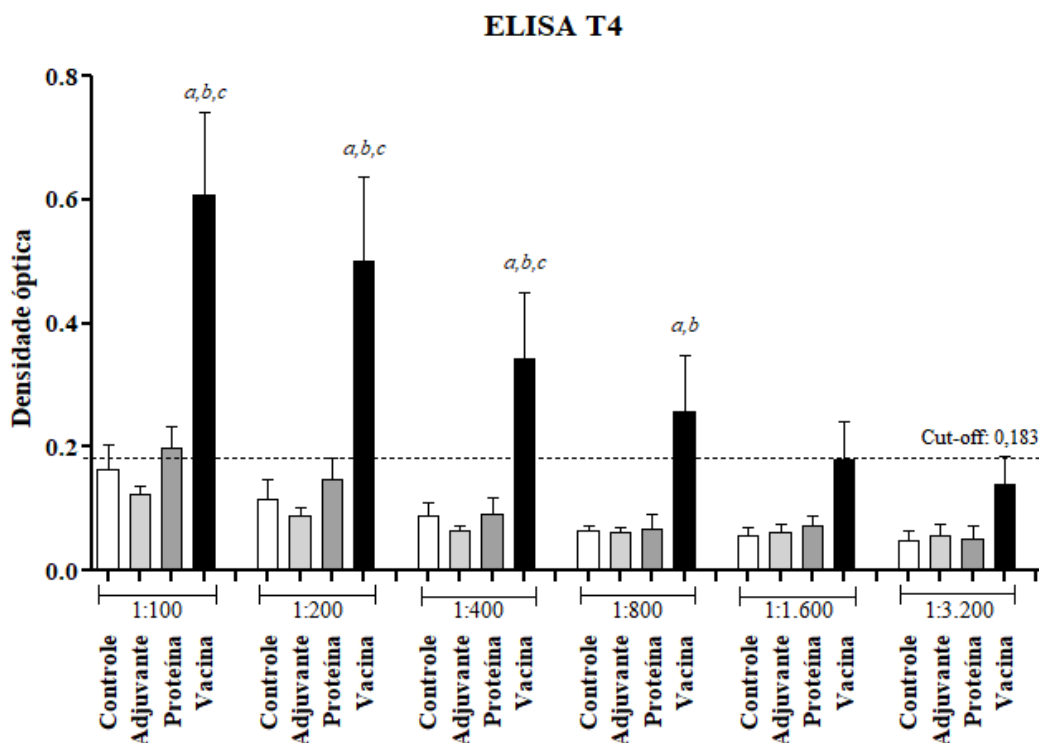
4.6 Avaliação clínico-patológica

As avaliações clínicas foram realizadas nos primeiros 15 dias após cada dose vacinal, seguindo as diretrizes de padrões internacionais (VICH Tópico GL-44) para vacinas veterinárias vivas e inativadas, buscando avaliar alterações relacionadas à inocuidade e toxicidade das formulações. Em nenhum dos tempos após cada dose vacinal foram verificadas alterações como edemas locais. Além disso, não foi verificada qualquer alteração clínica (alteração neurológica/comportamental) ou referente à perda de apetite ou ingestão de água em todos os grupos.

4.7 Avaliação da resposta imune humoral

A avaliação da resposta humoral foi realizada em amostras de soro dos cães dos diferentes grupos experimentais, considerando os tempos antes da primeira dose vacinal (T0) para triagem dos animais e 72 dias após a primeira dose (T4). No T0, todos os cães foram não detectáveis em análise sorológica de IgG anti-proteína quimera. A Figura 14 mostra que, no T4, o grupo vacina e proteína foram detectadas a presença de anticorpos na diluição 1:100 ($p= 0.0011$), enquanto apenas o grupo vacina foi detectada em diluições adicionais: 1:200 ($p= 0.0032$), 1:400 ($p= 0.0111$) e 1:800 ($p= 0.0251$). Os grupos nas diluições 1:1.600 e 3.200 não foram detectáveis e não tiveram diferença estatística.

Figura 14. Avaliação da resposta imune humoral anti-Quimera em soros de cães do grupo Controle, Adjuvante, Proteína e Vacina, 72 dias após a primeira dose vacinal (T4).



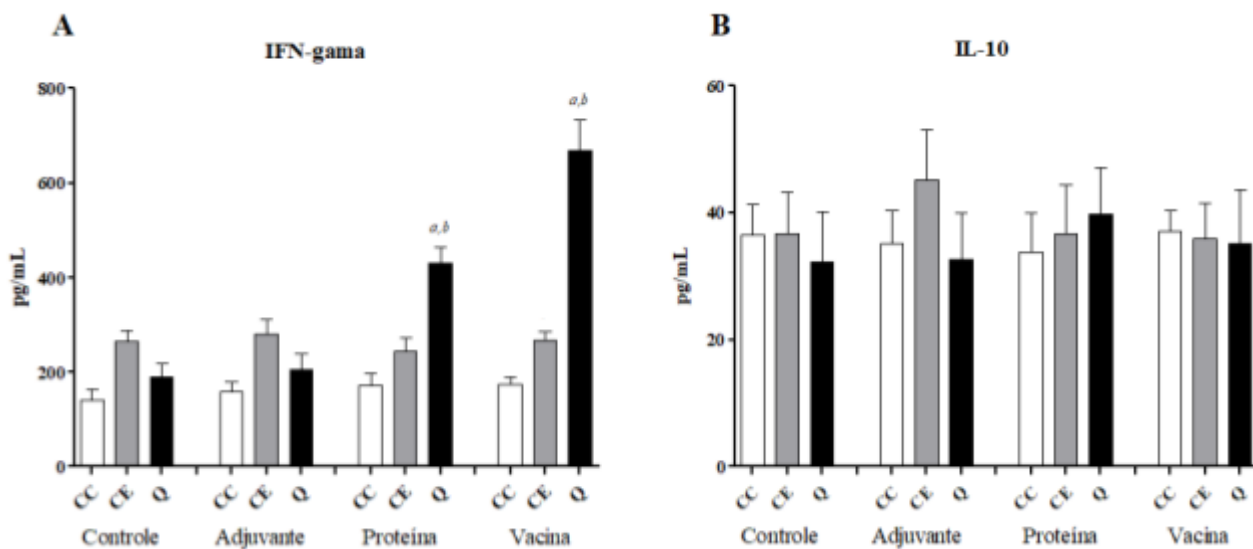
Fonte: Autora, 2024.

Legenda: Os resultados estão expressos como média. As letras “a”, “b” e “c” indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as absorbâncias em relação aos grupos controle, adjuvante e proteína, respectivamente. O “cut off” = 0,183 está representado no gráfico pela linha tracejada entre os grupos.

4.8 Avaliação de citocinas

A análise do perfil de citocinas revelou níveis elevados ($p < 0,05$) das citocinas pró-inflamatória IFN- γ do grupo vacina ($p < 0,0001$) e o grupo proteína ($p = 0,0007$) estimulados com a proteína quimera recombinante (Q) comparadas com a cultura controle (CC) e cultura estimulada (CE) (Figura 15A). No entanto, não houve diferença estatística na análise da citocina anti-inflamatória IL-10 (Figura 15B).

Figura 15. Análise da atividade do perfil de citocinas (pg/mL) em sobrenadante da linfoproliferação liberada pelas células mononucleares tratadas com quimera e antígenos inespecíficos de *E. coli*.



Fonte: Autora, 2024.

Legenda: (A) IFN- γ . (B) IL-10. O eixo x representa os grupos avaliados, entre os quais: Controle (CC), Cultura estimulada com *E. coli* (CE) e Quimera (Q). As letras “a” e “b” indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação a CC e CE respectivamente.

5 DISCUSSÃO

A vacinação é reconhecida como o método mais eficaz para fornecer proteção e controle contra patógenos (Rawat et al., 2023). No entanto, os métodos tradicionais de desenvolvimento de vacinas, como as vacinas vivas atenuadas ou os antígenos inativados, enfrentam desafios significativos, ressaltando a necessidade de avançar para vacinas mais eficientes, inócuas e menos dispendiosas (Soria-Guerra et al., 2015).

O progresso na genômica e uma melhor compreensão dos mecanismos de infecção resultaram na descoberta de novos antígenos, impulsionando estudos na busca por candidatos vacinais (Parvizpour et al., 2020). A abordagem conhecida como vacinologia reversa possibilita a identificação de potenciais alvos, utilizando imunoinformática, para projetar e desenvolver vacinas recombinantes em um curto período de tempo, contendo apenas os antígenos essenciais para obter imunidade protetora (Dalsass et al., 2019). Essas vacinas, que podem ser multivalentes, oferecem rentabilidade, segurança e estabilidade, representando uma alternativa viável aos métodos convencionais (Mugunthan; Mani Chandra, 2021).

Neste estudo, desenvolvemos e avaliamos uma vacina composta por uma proteína quimérica recombinante, formada por peptídeos imunodominantes preditos das proteínas TRP36, CBA e VirB10, contra *Ehrlichia canis*, *Babesia canis* e *Anaplasma phagocytophilum* em cães. Essas proteínas foram selecionadas por seu potencial como candidatas a vacinas eficazes contra as hemoparasitoses, pois desempenham um papel vital na infecção e por sua natureza conservada (Carcy et al., 2006; Crosby et al., 2018; Da Costa et al., 2019). Os epítomos imunodominantes preditos foram selecionados e fundidos com a ajuda de ligantes adequados. É fundamental que os componentes da vacina sejam imunogênicos e antigênicos, sem desencadear reações tóxicas ou alérgicas (Thakut et al., 2012; Ul Qamar et al., 2021). A construção da vacina foi prevista como de natureza antigênica e não alérgica, portanto, potencialmente segura para uso. O peso molecular foi de ~31 kDa e o pI teórico foi de 4,560, o que significa a natureza ácida da construção da vacina. A estrutura terciária foi selecionada com base no maior score. A previsão de epítomos de células B contínuos na construção da vacina mostra que ela tem o potencial de induzir uma resposta imune humoral. Além disso, a análise indicou que a proteína quimérica produzida contém peptídeos que têm uma alta probabilidade de se ligar eficientemente às moléculas de MHC I e II, um passo crucial no processo de apresentação antigênica e ativação do sistema imunológico (Karch; Burkhard, 2016; Sing; Mishra, 2016).

Na análise do gel da quimera expressa em *E. coli*, observamos que a proteína apresentou uma porção maior na fração solúvel e outra menor na porção insolúvel. Apesar de todas as

sequências imunodominantes estarem presentes, a proteína não parece estar na forma de uma químera intacta na fração solúvel, sugerindo que ela pode estar quebrada em fragmentos menores, sem sabermos quais peptídeos estão em cada uma das porções. Com isso, é possível que haja alguma instabilidade na estrutura da proteína, levando à sua fragmentação. Dentre as possibilidades de modificações para aumento da integridade está a extensão do terminal C com um péptido poli-histidina (Schumacher et al., 2018). Além disso, foi conduzido uma análise de estabilidade, submetendo doses da vacina a 37°C por 7 dias, simulando o equivalente a 6 meses de armazenamento em temperatura de geladeira. Esse procedimento acelera o processo de degradação, permitindo avaliar de forma rápida a estabilidade da vacina e obter informações essenciais sobre a formulação mais rapidamente (Clénet, 2018; Campa et al., 2021). Durante o período de incubação, observou-se uma perda de aproximadamente 70% da proteína quimérica desenvolvida nesse estudo, evidenciando a necessidade de incluir estabilizantes na formulação. Dados internos do nosso grupo de pesquisa mostram que antígenos solúveis de *Leishmania amazonensis*, apresentam uma perda de aproximadamente 15%, sendo essa maior instabilidade uma característica da proteína recombinante desenvolvida. Esses resultados ressaltam a importância crítica de otimizar o processo de expressão, para evitar a degradação e garantir a integridade da proteína quimérica, bem como a necessidade urgente de incorporar estabilizadores na formulação (excipientes). Morefield e colaboradores (2014) desenvolveram uma nova vacina incorporando antígeno protéico de fusão recombinante, visando a infecção por *Streptococcus pyogenes*, onde a incorporação dos estabilizadores sacarose e manitol aumentou significativamente a estabilidade do antígeno, devido a habilidades de atuar como osmólitos estabilizadores.

As aplicações do presente estudo foram realizadas conforme um protocolo de imunização inicial, seguido de doses de reforço, visando garantir uma resposta imune eficaz e de longa duração (Bobbala; Hook, 2016; Palgen et al., 2021). Esta estratégia de vacinação demonstrou aprimorar e expandir as respostas imunológicas protetoras contra diversos patógenos como *Anaplasma marginale*, *Ehrlichia ruminantium* e *Ehrlichia muris* (Nyika et al., 2002; Palacios; Croquet-Valdes et al., 2011; Echaide; Mattion, 2014). Após as aplicações, durante um período de 15 dias após cada dose, avaliações clínicas foram realizadas, a fim de avaliar a segurança e toxicidade das formulações. Não foram observadas alterações nos locais de inoculação em nenhum dos momentos subsequentes à aplicação da dose. Além disso, não foram registradas quaisquer alterações clínicas, como lesões ulceradas, alterações neurológicas ou comportamentais, perda de apetite ou ingestão de água em nenhum dos grupos avaliados. Giunchetti et al. (2007) e Mathias, et al. (2018), também não observaram alterações significativas ao utilizarem 1 mg e 50 µg de saponina, respectivamente, em suas formulações com antígeno de *Leishmania braziliensis*. Contudo, a saponina têm a

capacidade de induzir hemólise e provocar uma reação inflamatória intensa no local da aplicação, com manifestações como edema e formação de nódulos locais, conforme relatado em estudos com cães (Giunchetti et al., 2007; Roatt et al., 2012). Apesar dessas reações locais, não houve evidências de efeitos sistêmicos adversos que desaconselhassem o uso da saponina como adjuvante vacinal (Giunchetti et al., 2007; Roatt et al., 2012).

Alguns estudos têm destacado o papel da imunidade humoral na defesa do hospedeiro contra *Ehrlichia* spp, *Anaplasma* spp. e *Babesia* spp, demonstrando seu papel protetor durante a infecção (Winslow et al., 2000; Yager et al. 2005; Bitsaktsis et al., 2007; Brown, 2012; Moubri et al., 2018). Isso se deve à capacidade dos anticorpos produzidos pelos linfócitos B de neutralizarem diretamente os patógenos, impedindo-os de invadir células hospedeiras ou se disseminarem pelo corpo. Além disso, os anticorpos atuam como opsoninas, marcando os patógenos para a fagocitose por células do sistema imunológico, como macrófagos e neutrófilos, e ativando o sistema complemento, o que intensifica a resposta imunológica e leva à destruição dos invasores (Casadeval, 2018). Para avaliar a resposta imune humoral, analisamos anticorpos IgG anti-proteína quimera, realizando diluição seriada dos soros para medir os níveis de resposta à vacinação. Observamos que o grupo vacina (proteína+adjuvantes) e proteína tiveram anticorpos detectáveis na diluição 1:100 ($p= 0.0011$), enquanto apenas o grupo vacina foi possível detectar anticorpos em diluições adicionais: 1:200 ($p= 0.0032$), 1:400 ($p= 0.0111$) e 1:800 ($p= 0.0251$). O fato de os anticorpos ainda serem detectáveis até uma diluição de 1:400 sugere que, mesmo em concentrações mais baixas do soro, há uma quantidade significativa de anticorpos presentes. Isso indica que a proteína é capaz de estimular uma resposta imune humoral. No entanto, observamos que a resposta humoral é mais robusta quando o adjuvante é adicionado juntamente com a quimera. As vacinas de subunidade podem apresentar baixa imunogenicidade devido à quantidade limitada de epítomos presentes (Laera; Hogenesch; O'hagan, 2023). Isso ressalta a importância do adjuvante na potencialização da resposta imune induzida pela vacina.

A presença de uma resposta significativa para interferon gama é um importante marcador da resposta imune celular (Thakur; Pedersen; Jungersen, 2012). A resposta Th1 é caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e IL-12, sendo uma resposta fundamental para combater infecções causadas por microrganismos intracelulares, devido seu papel na ativação de macrófagos e células T citotóxicas; além de auxiliar na produção de anticorpos protetores, promovendo a destruição de células infectadas e controlando a disseminação do patógeno (Crocquet-Valdes et al., 2011). Estudos anteriores demonstraram que, durante os estágios iniciais da infecção por *A. phagocytophilum*, camundongos deficientes em IFN- γ apresentaram uma carga bacteriana significativamente mais elevada em comparação com camundongos imunocompetentes.

(Akkouyunlu; Fikrig, 2000; Birkner et al., 2008; Pedra et al., 2008). Além disso, o IFN- γ reduziu a frequência de células infectadas por *E. canis in vitro*, indicando que o IFN- γ medeia a resistência a nível celular em *E. canis* (Tajima; Wada, 2013). Nossos dados indicaram que houve diferença estatística nos níveis de interferon gama entre os cães do grupo vacina ($p < 0.0001$) e o grupo proteína ($p = 0.0007$) estimulados com a proteína químera recombinante (Q) quando comparado à cultura controle (CC), o que sugere que a vacina estimulou uma resposta imune do tipo Th1 nos cães vacinados. O estudo conduzido por Thirumalapura e colaboradores (2013) investigou o uso da proteína P29 de *E. muris*, ortólogo de *E. chaffeensis* TRP47 e *E. canis* TRP36, como uma vacina de subunidade contra erliquiose em camundongos, onde a imunização com a proteína recombinante P29 resultou em proteção significativa contra infecções por *Ehrlichia muris* em camundongos. Essa proteção foi associada à indução de fortes respostas de anticorpos, juntamente com a diferenciação de células T CD4⁺ em células efectoras/de memória Th1 produtoras de IFN- γ .

Não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de IL-10 entre os cães do grupo controle, adjuvante, proteína e vacina estimulados com a proteína químera, quando comparados a cultura controle. A falta de aumento significativo nos níveis de IL-10 sugere que não houve uma resposta imune anti-inflamatória pronunciada nos cães vacinados. A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, que atua durante infecções limitando a resposta imune aos patógenos, amortecendo as respostas inflamatórias, incluindo IFN- γ , consequentemente prevenindo danos aos tecidos (Saraiva; Margarida, 2010). Se os níveis de IL-10 permanecerem baixos ou não aumentarem significativamente após a vacinação, isso pode permitir que a resposta imune pró-inflamatória se desenvolva de maneira robusta, promovendo uma resposta imune eficaz contra a vacina. O estudo de Crosby e colaboradores (2018) observaram que camundongos vacinados com apenas com rVirB10 foram protegidos, evidenciado pela redução significativa na carga de *A. phagocytophilum*. Tal proteção foi associada a níveis aumentados de células TCD4⁺ e IFN- γ + induzidos por VirB10, uma vez que camundongos imunizados com rVirB9-1, rVirB9-2, apresentaram níveis elevados de IL-10 e não tiveram reduções significativas em suas cargas de *A. phagocytophilum*.

Além da avaliação da imunogenicidade e segurança, a eficácia das vacinas veterinárias é comumente evidenciada pela sua habilidade em proteger animais vivos contra o desafio de um agente infeccioso virulento, conhecido como desafio experimental (Chapat et al., 2017). Neste estudo, não foi possível realizar tal desafio, visto que os cães utilizados no estudo pertencem a tutores. A infecção experimental é complexa, dispendiosa e onerosa; além disso, expor os cães ao agente infeccioso envolve questões éticas e de segurança (Decaro; Elia; Buonovaglia, 2020). A exposição demanda um ambiente controlado, como um canil, para monitorar sua saúde e bem-estar

diariamente, além da necessidade de realizar o tratamento do animal (Decaro; Elia; Buonovaglia, 2020).

Neste estudo, foi demonstrado que o uso da proteína quimera, desenvolvida utilizando antígenos imunodominante para *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis* e *Babesia canis*, foi capaz de gerar uma resposta imune humoral e celular, sendo capaz de gerar uma produção de citocinas pró-inflamatória como IFN- γ . Além disso, destacam o potencial das vacinas baseadas em antígenos recombinantes para induzir respostas imunes contra esses patógenos intracelulares, fornecendo dados para o desenvolvimento de estratégias de vacinação mais eficazes contra doenças transmitidas por carrapatos em cães.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A proteína quimera desenvolvida a partir de peptídeos imunodominantes das proteínas Virb10, CBA e TRP36 de *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia canis* e *Ehrlichia canis*, respectivamente, se mostrou imunogênica. No entanto, terá que passar por processos de otimização para que sua expressão ocorra apenas na fração solúvel.

Para assegurar a estabilidade da proteína após a sua formulação será necessária a inclusão de excipientes.

As diferentes formulações avaliadas não induziram alterações locais ou sistêmicas, demonstrando-se seguras para a administração em animais.

A proteína desenvolvida foi capaz de gerar resposta imune celular e humoral, tendo a necessidade do uso de adjuvantes para potencializar sua atuação.

A eficácia da vacina quimérica apresentada poderá ser confirmada através de estudos realizando o teste de desafio experimental.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, Daniel M. et al. 2007. *Prevalence of Ehrlichia canis (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in dogs and Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil*. **Journal of Medical Entomology**, v. 44, n. 1, p. 126-132. Disponível em: <[https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2007\)44\[126\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2007)44[126]2.0.co;2)>. Acesso em: 28 dez. 2023.
- AGUIAR, Daniel M. et al. 2016. *Detection of genotype-specific Ehrlichia canis exposure in Brazilian dogs by TRP36 peptide ELISA*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 1, p. 142-145. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.10.003>>. Acesso em: 14 nov. 2023.
- AIMANIANDA, Vishukumar et al. 2009. *Novel cellular and molecular mechanisms of induction of immune responses by aluminum adjuvants*. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 30, n. 6, p. 287-295. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.03.005>>. Acesso em: 2 abr. 2023.
- AKKOYUNLU, Mustafa; FIKRIG, Erol. 2000. *Gamma interferon dominates the murine cytokine response to the agent of human granulocytic ehrlichiosis and helps to control the degree of early rickettsemia*. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 4, p. 1827-1833. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/iai.68.4.1827-1833.2000>>. Acesso em: 10 abr. 2024.
- AL-KHEDERY, Basima et al. 2012. *Structure of the type IV secretion system in different strains of Anaplasma phagocytophilum*. **BMC Genomics**, v. 13, p. 1-15. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-678>>. Acesso em: 13 mar. 2024.
- ARNON, Ruth; BEN-YEDIDIA, Tamar. 2003. *Old and new vaccine approaches*. **International Immunopharmacology**, v. 3, n. 8, p. 1195-1204. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S1567-5769\(03\)00016-X](https://doi.org/10.1016/S1567-5769(03)00016-X)>. Acesso em: 17 dez. 2023.
- ASSIS, Luciana Moura de. 2013. **Predição de epitopos de célula B em proteínas de Leishmania infantum: uma análise in silico**. Orientadores: Edgar Marcelino de Carvalho Filho; Márcia Almeida de Melo. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Medicina e Saúde, Faculdade de Medicina da Bahia, UFBA (Universidade Federal da Bahia), Bahia. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufba.br/ri/handle/ri/13148>>. Acesso em 25 fev. 2024.
- AZIZ, Muhammad Umair et al. 2020. *Ehrlichiosis in dogs: A comprehensive review about the pathogen and its vectors with emphasis on south and east Asian countries*. **Veterinary Sciences**, v. 10, n. 1, p. 21. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/vetsci10010021>>. Acesso em: 28 dez. 2023.
- BANETH, Gad. 2018. *Antiprotozoal treatment of canine babesiosis*. **Veterinary Parasitology**, v. 254, p. 58-63. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.03.001>>. Acesso em: 27 dez. 2023.
- BÁRCENA, J.; BLANCO, E. 2013. **Projeto de novas vacinas baseadas em partículas semelhantes a vírus ou víriões quiméricos**. In: MATEU, M. (eds) Estrutura e Física dos Vírus. Bioquímica Subcelular, vol 68. Springer, Dordrecht, p. 631-665. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6552-8_21>. Acesso em: 19 dez. 2023.
- BATISTA, Thais Fernandes et al. 2023. *Dogs naturally infected by Rangelia vitalii, Babesia canis vogeli, and Ehrlichia canis in São Paulo, Brazil*. **Journal of Veterinary Research and Animal**

Science, v. 60, p. e200761-e200761. Disponível em: <<https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2023.200761>>. Acesso em: 22 fev. 2024.

BELETIĆ, Anđelo et al. *Systemic inflammatory response syndrome in dogs naturally infected with Babesia canis: Association with the parasite load and host factors*. **Veterinary Parasitology**, v. 291, p. 109366, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109366>>. Acesso em: 22 fev 2022.

BILIĆ, Petra et al. 2023. *Serum and urine profiling by high-throughput TMT-based proteomics for the investigation of renal dysfunction in canine babesiosis*. **Journal of Proteomics**, v. 270, p. 104735. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jprote.2022.104735>>. Acesso em: 22 fev. 2024.

BIRKNER, Katharina et al. 2008. *The elimination of Anaplasma phagocytophilum requires CD4+ T cells, but is independent of Th1 cytokines and a wide spectrum of effector mechanisms*. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 12, p. 3395-3410. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/eji.200838615>>. Acesso em: 22 abr. 2024.

BITSAKTSIS, Constantine et al. 2007. *T-Cell-independent humoral immunity is sufficient for protection against fatal intracellular ehrlichia infection*. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 10, p. 4933-4941. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/IAI.00705-07>>. Acesso em: 1 abr. 2024.

BOBBALA, Sharan; HOOK, Sarah. 2016. *Is there an optimal formulation and delivery strategy for subunit vaccines?* **Pharmaceutical Research**, v. 33, p. 2078-2097. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11095-016-1979-0>>. Acesso em: 30 mar. 2024.

BONNET, Sarah I.; NADAL, Clémence. *Experimental infection of ticks: An essential tool for the analysis of Babesia species biology and transmission*. **Pathogens**, v. 10, n. 11, p. 1403, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/pathogens10111403>>. Acesso em 1 jan. 2024.

BOOZER, A. Lindsay; MACINTIRE, Douglass K. 2003. *Canine babesiosis*. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 33, n. 4, p. 885-904. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s0195-5616\(03\)00039-1](https://doi.org/10.1016/s0195-5616(03)00039-1)>. Acesso em: 21 fev. 2022.

BRAGA, Juliana Fortes Vilarinho; SILVA, Silvana Maria Medeiros de Sousa. 2013. *Babesiose canina: uma visão geral da doença*. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 12, n. 2, p. 204-213. Disponível em: <<https://www.revistas.udesc.br/index.php/agroveterinaria/article/view/5215>>. Acesso em: 14 maio. 2024.

BROWN, Wendy C. 2012. *Adaptive immunity to Anaplasma pathogens and immune dysregulation: implications for bacterial persistence*. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 35, n. 3, p. 241-252. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2011.12.002>>. Acesso em: 10 abr. 2024.

CALIS, JJA et al. 2013. *As propriedades do MHC classe I apresentaram peptídeos que aumentam a imunogenicidade*. **PloS Computational Biology**, v. 8, n. 1, p. 361. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003266>>. Acesso em: 9 jul. 2023.

CARCY, Bernard et al. 2006. *Genetic basis for GPI-anchor merozoite surface antigen polymorphism of Babesia and resulting antigenic diversity*. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n. 1-2, p. 33-49. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.038>>. Acesso em: 16 nov. 2023.

CÁRDENAS, Ana Maria et al. 2007. *Enzyme-linked immunosorbent assay with conserved immunoreactive glycoproteins gp36 and gp19 has enhanced sensitivity and provides species-specific immunodiagnosis of Ehrlichia canis infection*. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 2, p. 123-128. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/CVI.00361-06>>. Acesso em: 16 dez. 2023.

CARRADE, D. D. et al. 2009. *Canine granulocytic anaplasmosis: a review*. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, n. 6, p. 1129-1141. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0384.x>>. Acesso em: 3 jan. 2024.

CAMPA, Cristiana et al. 2021. *Use of stability modeling to support accelerated vaccine development and supply*. **Vaccines**, v. 9, n. 10, p. 1114. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/vaccines9101114>>. Acesso em 05 set. 2024.

CASADEVALL, Arturo. 2018. *Antibody-based vaccine strategies against intracellular pathogens*. **Current opinion in immunology**, v. 53, p. 74-80. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.04.011>>. Acesso em: 05 set. 2024.

CASTELÃO, Ana Beatriz Canevari et al. 2012. Caracterização da imunogenicidade das proteínas recombinantes Virb9, Virb10 e fator termo instável de Elongação de Peptídeos de *Anaplasma marginale* em camundongos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 49, n. 5, p. 377-385. Disponível em: <<https://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/51731>>. Acesso em: 26 dez. 2023.

CHAPAT, Ludivine et al. 2017. *Multivariate analysis of the immune response to a vaccine as an alternative to the repetition of animal challenge studies for vaccines with demonstrated efficacy*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 189, p. 58-65. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2017.06.001>>. Acesso em: 18 abr. 2024.

CHAUHAN, Shivani; KHASA, Yogender Pal. 2023. *Challenges and Opportunities in the Process Development of Chimeric Vaccines*. **Vaccines**, v. 11, n. 12, p. 1828. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/vaccines11121828>>. Acesso em: 17 dez. 2023.

CHENG, Jianlin et al. 2005. *SCRATCH: a protein structure and structural feature prediction server*. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. suppl_2, p. W72-W76. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/nar/gki396>>. Acesso em: 30 mar. 2024.

CHOMEL, Bruno. 2011. *Tick-borne infections in dogs—an emerging infectious threat*. **Veterinary Parasitology**, v. 179, n. 4, p. 294-301. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.03.040>>. Acesso em 28 dez. 2023.

CID, Raquel; BOLÍVAR, Jorge. 2021. *Platforms for production of protein-based vaccines: From classical to next-generation strategies*. **Biomolecules**, v. 11, n. 8, p. 1072. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/biom11081072>>. Acesso em: 21 fev 2023.

CLEM, Angela S. 2011. *Fundamentals of vaccine immunology*. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 3, n. 1, p. 73. Disponível em: <<https://doi.org/10.4103/0974-777X.77299>>. Acesso em: 24 dez. 2023.

CLÉNET, Didier. 2018. *Accurate prediction of vaccine stability under real storage conditions and during temperature excursions*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 125, p. 76-84. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.01.005>>. Acesso em: 05 set. 2024.

COX, Manon MJ. 2012. *Recombinant protein vaccines produced in insect cells*. **Vaccine**, v. 30, n. 10, p. 1759-1766. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vacina.2012.01.016>>. Acesso em: 16 dez. 2023.

CROCQUET-VALDES, Patricia A. et al. 2011. *Immunization with Ehrlichia P28 outer membrane proteins confers protection in a mouse model of ehrlichiosis*. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, n. 12, p. 2018-2025. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/CVI.05292-11>>. Acesso em: 28 mar. 2024.

CROSBY, Francy L. et al. 2018. *VirB10 vaccination for protection against Anaplasma phagocytophilum*. **BMC Microbiology**, v. 18, p. 1-12. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12866-018-1346-x>>. Acesso em: 26 dez. 2023.

DA COSTA, Renata Lins et al. 2019. *Molecular characterization of Ehrlichia canis from naturally infected dogs from the state of Rio de Janeiro*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 1-12. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s42770-018-0020-7>>. Acesso em: 28 dez. 2024.

DALSASS, Mattia et al. 2019. *Comparison of open-source reverse vaccinology programs for bacterial vaccine antigen discovery*. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 431583. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00113>>. Acesso em: 30 mar. 2024.

DANTAS-TORRES, F. 2008. *Canine vector-borne diseases in Brazil*. **Parasites & Vectors**, v. 1, n. 1, p. 1-17. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1756-3305-1-25>>. Acesso em: 05 maio. 2022. **a**

DANTAS-TORRES, Filipe; FIGUEREDO, Luciana Aguiar. 2006. *Canine babesiosis: a Brazilian perspective*. **Veterinary Parasitology**, v. 141, n. 3-4, p. 197-203. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.07.030>>. Acesso em: 16 nov 2022.

DANTAS-TORRES, Filipe; OTRANTO, Domenico. 2016. *Best practices for preventing vector-borne diseases in dogs and humans*. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 1, p. 43-55. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.09.004>>. Acesso em: 26 dez. 2024.

DANTAS-TORRES, Filipe. 2008. *The brown dog tick, Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae): from taxonomy to control*. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 3-4, p. 173-185. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.030>>. Acesso em: 28 dez. 2022. **b**

DAY, Michael J. 2011. *The immunopathology of canine vector-borne diseases*. **Parasites & Vectors**, v. 4, p. 1-13. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-48>>. Acesso em: 26 dez. 2023.

DE ALBUQUERQUE, Felipe Arnaud Sampaio Alencar et al. 2021. *Clinical variations observed among the main hemoparasitosis caused by Rhipicephalus sanguineus in dogs*. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, p. e351101220680-e351101220680. Disponível em: <<https://doi.org/10.33448/rsd-v10i12.20680>>. Acesso em: 22 de fev. 2022.

DE LA FUENTE, J. et al. 2023. *Perception of Ticks and Tick-Borne Diseases Worldwide*. **Pathogens** 2023, 12, 1258. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/pathogens12101258>>. Acesso em: 28 dez. 2023.

DE TOMMASI, Anna Sara et al. 2013. *Are vector-borne pathogen co-infections complicating the clinical presentation in dogs?*. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 1, p. 1-5. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-97>>. Acesso em: 21 jun 2022.

DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C. B. V. R.; BARRS, V. R. 2020. *Canine parvovirus vaccination and immunisation failures: Are we far from disease eradication?*. **Veterinary microbiology**, v. 247, p. 108760, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108760>>. Acesso em: 23 ago. 2022.

DECARO, N.; ELIA, G.; BUONAVOGLIA, C. 2020. *Challenge studies for registration of canine core vaccines: is it time to update the European Pharmacopeia?*. **Veterinary Microbiology**, v. 244, p. 108659. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108659>>. Acesso em: 18 abr. 2024.

DIMITROV, Ivan; FLOWER, Darren R.; DOYTCHINOVA, Irini. *AllerTOP-a server for in silico prediction of allergens*. **BMC bioinformatics**. BioMed Central, 2013. p. 1-9. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-S6-S4>>. Acesso em: 30 mar. 2023.

DO AMARAL FALCÃO, Bethânia et al. 2014. Ocorrência de reagentes positivos para agentes da Anaplasmose Granulocítica por testes imunoenzimáticos de animais sentinelas em Campos dos Goytacazes, RJ. **Revista Científica da Faculdade de Medicina de Campos**, v. 9, n. 2, p. 35-41. Disponível em: <<https://doi.org/10.29184/1980-7813.rcfmc.49.vol.9.n2.2014>>. Acesso em: 10 mar. 2024.

DO ROSÁRIO, Carla Janaina Rebouças Marques et al. 2019. *Anti-Ehrlichia properties of the essential oil of Ageratum conyzoides L. and its interaction with doxycycline*. **AMB Express**, v. 9, p. 1-9. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13568-019-0780-y>>. Acesso em 6 mar. 2024.

DO ROSÁRIO, Carla Janaina Rebouças Marques et al. 2023. *Association of polar fraction of Ageratum conyzoides from the Brazilian Amazon with doxycycline against infection of macrophages with Ehrlichia canis*. **South African Journal of Botany**, v. 155, p. 90-97. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.02.017>>. Acesso 6 mar. 2024.

DOYLE, C. Kuyler et al. 2005. *Molecular characterization of E. canis gp36 and E. chaffeensis gp47 tandem repeats among isolates from different geographic locations*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1063, n. 1, p. 433-435. Disponível em: <<https://doi.org/10.1196/anais.1355.079>>. Acesso em: 26 dez. 2023.

DOYLE, C. Kuyler et al. 2006. *Differentially expressed and secreted major immunoreactive protein orthologs of Ehrlichia canis and E. chaffeensis elicit early antibody responses to epitopes on*

glycosylated tandem repeats. *Infection and immunity*, v. 74, n. 1, p. 711-720. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/IAI.74.1.711-720.2006>>. Acesso em: 26 dez. 2023.

DOYTCHINOVA, Irini A.; FLOWER, Darren R. 2007. *VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines*. *BMC bioinformatics*, v. 8, n. 1, p. 1-7. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-4>>. Acesso em: 20 dez.

DUMLER, J. Stephen et al. 2001. *Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophilum*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 51, n. 6, p. 2145-2165. Disponível em: <<https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2145>>. Acesso em: 21 jun. 2022.

EL HAMIANI KHATAT, Sarah et al. 2021. *Epidemiological and clinicopathological features of Anaplasma phagocytophilum infection in dogs: A systematic review*. *Frontiers in veterinary science*, v. 8, p. 686644. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fvets.2021.686644>>. Acesso em: 2 jan. 2024.

ESPINO-SOLÍS, Gerardo Pavel et al. 2023. *Clinical and pathological factors associated with Ehrlichia canis in companion dogs*. *The Journal of Infection in Developing Countries*, v. 17, n. 11, p. 1598-1605. Disponível em: <<https://doi.org/10.3855/jidc.17961>>. Acesso em 1 jan. 2024.

FAN, Jingyi et al. 2022. *Advances in infectious disease vaccine adjuvants*. *Vaccines*, v. 10, n. 7, p. 1120. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/vaccines10071120>>. Acesso em: 30 abr. 2024.

FILIPOVIĆ, Milica M. Kovačević et al. 2018. *Molecular and serological prevalence of Anaplasma phagocytophilum, A. platys, Ehrlichia canis, E. chaffeenses, E. ewingii, Borrelia burgdorferi, Babesia canis, B. gibsoni and B. vogeli among clinically healthy outdoor dogs in Serbia*. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, v. 14, p. 117-122. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2018.10.001>>. Acesso em: 5 jan. 2024.

FLECK, Juliane Deise et al. *Saponins from Quillaja saponaria and Quillaja brasiliensis: particular chemical characteristics and biological activities*. *Molecules*, v. 24, n. 1, p. 171. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*. 10. ed. Miss. Mosby, St. Louis, 1998. p. 751-765. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/molecules24010171>>. Acesso em: 3 fev. 2023.

FORBES, B. A.; SAHM, D. F.; WEISSFELD, A. S. **Obligate intracellular and non-culturable bacterial agents**. In: BAILEY, W. R.; SCOTT, E. G. (Ed.). *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*. 10. ed. Miss. Mosby, St. Louis, 1998. p. 751-765.

FRANCIS, Michael James. 2018. *Recent advances in vaccine technologies*. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, v. 48, n. 2, p. 231-241. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2017.10.002>>. Acesso em: 24 dez. 2023.

GOODSWEN, Stephen J.; KENNEDY, Paul J.; ELLIS, John T. *A guide to current methodology and usage of reverse vaccinology towards in silico vaccine discovery*. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 47, n. 2, p. fuad004, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/femsre/fuad004>>. Acesso em: 21 fev. 2024.

- GIUNCHETTI, Rodolfo Cordeiro et al. 2007. *Immunogenicity of a killed Leishmania vaccine with saponin adjuvant in dogs*. **Vaccine**, v. 25, n. 44, p. 7674-7686. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.08.009>>. Acesso em 05 set. 2024.
- GUTIÉRREZ, Clara Nancy et al. 2016. Ehrlichiosis canina. **Saber**, v. 28, n. 4, p. 641-665. Disponível em: <https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1315-01622016000400002&lng=en&nrm=iso&tlng=es>. Acesso em 1 jan.2024.
- HANSSON, Marianne; NYGREN, Per-A.° ke; STA° HL, Stefan. 2000. *Design and production of recombinant subunit vaccines*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 32, n. 2, p. 95-107, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1042/BA20000034>>. Acesso em: 16 dez. 2023.
- HARRUS, Shimon; WANER, Trevor. 2011. *Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (Ehrlichia canis): an overview*. **The Veterinary Journal**, v. 187, n. 3, p. 292-296. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.02.001>>. Acesso em: 28 dez. 2023.
- HE, Peng; ZOU, Yening; HU, Zhongyu. 2015. *Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism*. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 11, n. 2, p. 477-488. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/21645515.2014.1004026>>. Acesso em: 4 abr. 2023.
- HOGENESCH, Harm. 2013. *Mechanism of immunopotentiality and safety of aluminum adjuvants*. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 406. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00406>>. Acesso em: 2 abr. 2023.
- IRWIN, Peter J. 2009. *Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control*. **Parasites & Vectors**, v. 2, n. 1, p. 1-9. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-S1-S4>>. Acesso em: 28 dez. 2023.
- ISMAIL, Nahed; MCBRIDE, Jere W. 2017. *Tick-borne emerging infections: ehrlichiosis and anaplasmosis*. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 37, n. 2, p. 317-340. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cll.2017.01.006>>. Acesso em: 1 jan. 2024.
- JORGE, Sérgio; DELLAGOSTIN, Odir Antônio. 2017. *The development of veterinary vaccines: a review of traditional methods and modern biotechnology approaches*. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, n. 1, p. 6-13. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biori.2017.10.001>>. Acesso em: 24 dez. 2022.
- KARASOVÁ, Martina et al. 2022. *The etiology, incidence, pathogenesis, diagnostics, and treatment of canine babesiosis caused by Babesia gibsoni infection*. **Animals**, v. 12, n. 6, p. 739. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ani12060739>>. Acesso em: 11 abr. 2024.
- KARCH, Christopher P.; BURKHARD, Peter. 2016. *Vaccine technologies: From whole organisms to rationally designed protein assemblies*. **Biochemical Pharmacology**, v. 120, p. 1-14. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.05.001>>. Acesso em: 16 dez. 2023.
- KHATAT, S. El Hamiani et al. 2022. *Anaplasma spp in dogs: Is there a danger for humans?*. **Revue Vétérinaire Clinique**, v. 57, n. 1, p. 1-15. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.anicom.2021.10.001>>. Acesso em: 2 jan. 2024.

KOOL, Mirjam; FIERENS, Kaat; LAMBRECHT, Bart N. 2012. *Alum adjuvant: some of the tricks of the oldest adjuvant*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, n. 7, p. 927-934. Disponível em: <<https://doi.org/10.1099/jmm.0.038943-0>>. Acesso em: 16 dez. 2023.

RAUSE, Luis Eduardo Barcellos et al. 2015. Parasitologic, Serological and Molecular Diagnostic of *Ehrlichia canis* and *Babesia canis* in a Veterinary Hospital in Southern Brazil. **Revista Acadêmica de Agricultura e Ciências Veterinárias**, v. 2, n. 5, p. 337-341. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/284284846_p-ISSN_2348-8883_Parasitologic_Serological_and_Molecular_Diagnostic_of_Ehrlichia_canis_and_Babesia_canis_in_a_Veterinary_Hospital_in_Southern_Brazil>. Acesso em: 12 maio 2022.

LAERA, Donatello; HOGENESCH, Harm; O'HAGAN, Derek T. *Aluminum Adjuvants—'Back to the Future'*. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 7, p. 1884, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/farmacêutica15071884>>. Acesso em: 14 dez. 2023.

LARA, Bianca et al. 2020. *Serologic and molecular diagnosis of Anaplasma platys and Ehrlichia canis infection in dogs in an endemic region*. **Pathogens**, v. 9, n. 6, p. 488. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/pathogens9060488>>. Acesso em: 1 jan. 2024.

LEISEWITZ, Andrew L. et al. 2019. *A clinical and pathological description of 320 cases of naturally acquired Babesia rossi infection in dogs*. **Veterinary Parasitology**, v. 271, p. 22-30. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.06.005>>. Acesso em: 28 dez. 2023.

LI, Weidang et al. 2014. *Peptide vaccine: progress and challenges*. **Vaccines**, v. 2, n. 3, p. 515-536. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/vaccines2030515>>. Acesso em: 18 jan. 2023.

LIMA, Karla M. et al. 2004. *Vaccine adjuvant: it makes the difference*. **Vaccine**, v. 22, n. 19, p. 2374-2379. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2003.12.030>>. Acesso em: 30 jan. 2023.

LINDBLAD, Erik B.; DUROUX, L. 2017. *Mineral adjuvants*. In: *Immunopotentiators in modern vaccines*. **Academic Press**. p. 347-375. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804019-5.00018-9>>. Acesso em: 16 dez. 2023.

LOPEZ, Job E. et al. 2007. *Immunogenicity of Anaplasma marginale type IV secretion system proteins in a protective outer membrane vaccine*. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 5, p. 2333-2342. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/IAI.00061-07>>. Acesso em: 26 dez. 2023.

MA, Jie et al. 2019. *A review of fish vaccine development strategies: Conventional methods and modern biotechnological approaches*. **Microorganisms**, v. 7, n. 11, p. 569. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/microorganisms7110569>>. Acesso em: 24 dez. 2023.

MAGGI, Ricardo G.; KRÄMER, Friederike. 2019. *A review on the occurrence of companion vector-borne diseases in pet animals in Latin America*. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 1-37, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13071-019-3407-x>>. Acesso em: 28 dez. 2023.

MAGNAN, Christophe N. et al. *High-throughput prediction of protein antigenicity using protein microarray data*. **Bioinformatics**, v. 26, n. 23, p. 2936-2943, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq551>>. Acesso em: 30 mar. 2024.

MAHAN, Sunita; KELLY, P. J.; MAHAN, S. M. 2005. *A preliminary study to evaluate the immune responses induced by immunization of dogs with inactivated Ehrlichia canis organisms. Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v. 72, n. 2, p. 119-128. Disponível em: <<https://doi.org/10.4102/ojvr.v72i2.207>>. Acesso em: 1 jan. 2024.

MARCIANI, Dante J. 2018. *Elucidating the mechanisms of action of saponin-derived adjuvants. Trends in Pharmacological Sciences*, v. 39, n. 6, p. 573-585. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.03.005>>. Acesso em: 17 jan. 2018.

MARTINESCU, Gabriela-Victoria et al. 2023. *Strategies for the Diagnosis of Granulocytic Anaplasmosis in Two Naturally Infected Dogs. Animals*, v. 14, n. 1, p. 49. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ani140100499>>. Acesso em: 2 jan. 2024.

MARTÍNEZ-GARCÍA, Grecia et al. 2021. *Challenges in tick-borne pathogen detection: the case for Babesia spp. identification in the tick vector. Pathogens*, v. 10, n. 2, p. 92. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/pathogens10020092>>. Acesso em: 11 abr. 2024.

MATHIAS, Fernando Augusto Siqueira. 2018. **A contribuição de sistemas de associação de adjuvantes no aumento da eficácia vacinal de dois novos imunobiológicos contra a infecção experimental por Leishmania infantum em camundongos Balb/c.** Orientadores: Alexandre Barbosa Reis; Paula Melo de Abreu Vieira (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Imunobiologia de Protozoários, UFOP, (Universidade Federal de Ouro Preto), Minas Gerais. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufop.br/handle/123456789/10566>>. Acesso em: 06 set. 2024.

MCBRIDE, Jere W. et al. 2001. *Immunodiagnosis of Ehrlichia canis infection with recombinant proteins. Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, n. 1, p. 315-322. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/JCM.39.1.315-322.2001>>. Acesso em: 6 mar. 2024.

MCBRIDE, Jere W.; WALKER, David H. 2010. *Progress and obstacles in vaccine development for the ehrlichioses. Expert Review of Vaccines*, v. 9, n. 9, p. 1071-1082. Disponível em: <<https://doi.org/10.1586/erv.10.93>>. Acesso em: 1 jan. 2024.

MCBRIDE, Jere W.; WALKER, David H. 2011. *Molecular and cellular pathobiology of Ehrlichia infection: targets for new therapeutics and immunomodulation strategies. Expert Reviews in Molecular Medicine*, v. 13, p. e3. Disponível em: <<<https://doi.org/10.1017/S1462399410001730>>>. Acesso em: 26 dez. 2024.

MEDEIROS, Miguel Ângelo da Silva et al. 2020. Expression and antigenic analysis of the recombinant TRP36 protein from Ehrlichia canis São Paulo strain for serologic tests. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1984-29612020051>>. Acesso em: 26 dez. 2024.

MESQUITA JÚNIOR, Danilo et al. 2010. Sistema imunitário-parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, p. 552-580. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0482-50042010000500008>>. Acesso em: 25 fev. 2024.

MESQUITA, Cristiane Aparecida Moreira et al. 2023. *Dogs (Canis familiaris) as sentinels for determining the risk of occurrence of Rickettsia spp. and Anaplasma phagocytophilum in previously*

undiagnosed areas. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, v. 46, p. 100930. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2023.100930>>. Acesso em: 10 mar. 2024.

MILANOVIĆ, Zorana et al. 2020. *Evidence of acute phase reaction in asymptomatic dogs naturally infected with Babesia canis*. *Veterinary Parasitology*, v. 282, p. 109140. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109140>>. Acesso em: 27 dez. 2023.

MOREFIELD, Garry et al. 2014. *Development of a recombinant fusion protein vaccine formulation to protect against Streptococcus pyogenes*. *Vaccine*, v. 32, n. 30, p. 3810-3815. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.04.092>>. Acesso em: 30 mar. 2024.

MOUBRI, K. et al. 2018. *Discovery of a recombinant Babesia canis supernatant antigen that protects dogs against virulent challenge infection*. *Veterinary Parasitology*, v. 249, p. 21-29. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.11.002>>. Acesso em: 10 jan. 2023.

MORSE, Kaitlyn et al. 2012. *Breadth of the CD4+ T cell response to Anaplasma marginale VirB9-1, VirB9-2 and VirB10 and MHC class II DR and DQ restriction elements*. *Immunogenetics*, v. 64, p. 507-523. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00251-012-0606-4>>. Acesso em: 26 dez. 2023.

MOSER, Muriel; LEO, Oberdan. 2010. *Key concepts in immunology*. *Vaccine*, v. 28, p. C2-C13. Disponível em: <10.1016/j.vacina.2010.07.022>. Acesso em: 25 fev. 2024.

MOUBRI, K. et al. 2018. *Discovery of a recombinant Babesia canis supernatant antigen that protects dogs against virulent challenge infection*. *Veterinary Parasitology*, v. 249, p. 21-29. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.11.002>>. Acesso em: 10 jan. 2023.

MUGUNTHAN, Susithra Priyadarshni; MANI CHANDRA, Harish. 2021. *A computational reverse vaccinology approach for the design and development of multi-epitopic vaccine against avian pathogen Mycoplasma gallisepticum*. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 8, p. 721061. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fvets.2021.721061>>. Acesso em: 30 mar. 2024.

MYLONAKIS, Mathios E.; HARRUS, Shimon; BREITSCHWERDT, Edward B. *An update on the treatment of canine monocytic ehrlichiosis (Ehrlichia canis)*. *The Veterinary Journal*, v. 246, p. 45-53, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.01.015>>. Acesso em: 28 dez. 2022.

NAIR, Arathy DS et al. 2016. *Comparative experimental infection study in dogs with Ehrlichia canis, E. chaffeensis, Anaplasma platys and A. phagocytophilum*. *PLoS One*, v. 11, n. 2, p. e0148239, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148239>>. Acesso em: 21 jun. 2022.

NEAVE, Matthew J. et al. *Comparative genomic analysis of the first Ehrlichia canis detections in Australia*. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 13, n. 3, p. 101909, 2022.

NOORAEI, Soren et al. 2023. *Immunogenicity of different types of adjuvants and nano-adjuvants in veterinary vaccines: a comprehensive review*. *Vaccines*, v. 11, n. 2, p. 453. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/vaccines11020453>>. Acesso em: 19 mar. 2024.

NYIKA, Aceme et al. 2002. *DNA vaccination with map1 gene followed by protein boost augments protection against challenge with Cowdria ruminantium, the agent of heartwater. Vaccine*, v. 20, n. 7-8, p. 1215-1225. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(01\)00430-3](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(01)00430-3)>. Acesso em: 28 mar. 2024.

PALACIOS, Carlos; DE ECHAIDE, Susana Torioni; MATTION, Nora. 2014. *Evaluation of the immune response to Anaplasma marginale MSP5 protein using a HSV-1 amplicon vector system or recombinant protein. Research in Veterinary Science*, v. 97, n. 3, p. 514-520. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.10.005>>. Acesso em: 28 mar. 2024.

PALGEN, Jean-Louis et al. 2021. *Optimize prime/boost vaccine strategies: trained immunity as a new player in the game. Frontiers in Immunology*, v. 12, p. 612747. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.612747>>. Acesso em: 18 mar. 2024.

PANTI-MAY, Jesús Alonso; RODRÍGUEZ-VIVAS, Roger Iván. 2020. *Canine babesiosis: A literature review of prevalence, distribution, and diagnosis in Latin America and the Caribbean. Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, v. 21, p. 100417. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100417>>. Acesso em: 16 nov. 2023.

PARVIZPOUR, Sepideh et al. 2020. *Epitope-based vaccine design: a comprehensive overview of bioinformatics approaches. Drug Discovery Today*, v. 25, n. 6, p. 1034-1042. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.03.006>>. Acesso em: 30 mar. 2024.

PATEL, Dharti Keyur et al. 2022. *Linkers: A synergistic way for the synthesis of chimeric proteins. Protein Expression and Purification*, v. 191, p. 106012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pep.2021.106012>>. Acesso em: 19 dez. 2023.

PAULA, Warley Vieira de Freitas et al. 2021. *Seroprevalence and hematological abnormalities associated with Ehrlichia canis in dogs referred to a veterinary teaching hospital in central-western Brazil. Ciência Rural*, v. 52. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20201131>>. Acesso em: 28 dez. 2023.

PAULAN, Silvana de Cássia et al. *Seroprevalence rates of antibodies against Leishmania infantum and other protozoan and rickettsial parasites in dogs. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 22, p. 162-166, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1984-29612013000100031>>. Acesso em: 16 nov. 2023.

PEDRA, Joao HF et al. 2008. *c-Jun NH2-terminal kinase 2 inhibits gamma interferon production during Anaplasma phagocytophilum infection. Infection and Immunity*, v. 76, n. 1, p. 308-316. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/IAI.00599-07>>. Acesso em: 10 abr. 2024.

PEREIRA, Maria et al. 2019. *Development of dog immune system: from in uterus to elderly. Veterinary Sciences*, v. 6, n. 4, p. 83. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/vetsci6040083>>. Acesso em: 25 fev. 2024.

PEREZ, Miriam et al. 2006. *Human infection with Ehrlichia canis accompanied by clinical signs in Venezuela. Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1078, n. 1, p. 110-117. Disponível em: <<https://doi.org/10.1196/anais.1374.016>>. Acesso em 28 dez. 2023.

POOLSAWAT, Napassorn et al. 2023. *Ehrlichia canis*: Molecular characterization and genetic diversity based on the p28 and trp36 genes. **Research in Veterinary Science**, v. 155, p. 88-102. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.11.013>>. Acesso em: 26 dez. 2023.

PRUNEAU, Ludovic et al. 2014. Understanding *Anaplasmatataceae* pathogenesis using “Omics” approaches. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, p. 86. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00086>>. Acesso em 10 abr. 2024.

QUROLLO, Barbara A. et al. 2014. A serological survey of tick-borne pathogens in dogs in North America and the Caribbean as assessed by *Anaplasma phagocytophilum*, *A. platys*, *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, and *Borrelia burgdorferi* species-specific peptides. **Infection Ecology & Epidemiology**, v. 4, n. 1, p. 24699. Disponível em: <<https://doi.org/10.3402/iee.v4.24699>>. Acesso em 21 jun. 2022.

RAJPUT, Zahid Iqbal et al. 2007. *Adjuvant effects of saponins on animal immune responses*. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 8, p. 153-161. Disponível em: <<https://doi.org/10.1631/jzus.2007.B0153>>. Acesso em: 17 dez. 2023.

RAMAKANT, Rajesh Kumar; VERMA, H. C.; DIWAKAR, R. P. 2020. *Canine ehrlichiosis: A review*. **J Entomol Zool Stud**, v. 8, n. 2, p. 1849-1852. Disponível em: <<https://doi.org/10.13140/RG.2.2.27635.68649>>. Acesso em: 28 dez. 2023.

RAPPUOLI, Rino. 2000. *Reverse vaccinology*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, n. 5, p. 445-450. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(00\)00119-3](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(00)00119-3)>. Acesso em 21 fev. 2023.

RAPPUOLI, Rino. 2001. *Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development*. **Vaccine**, v. 19, n. 17-19, p. 2688-2691. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(00\)00554-5](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(00)00554-5)>. Acesso em: 20 dez. 2023.

RAR, Vera; TKACHEV, Sergey; TIKUNOVA, Nina. 2020. *Genetic diversity of Anaplasma bacteria: Twenty years later*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 91, p. 104833. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104833>>. Acesso 10 mar. 2024.

RATHINASAMY, Vignesh et al. 2019. *Babesiosis vaccines: lessons learned, challenges ahead, and future glimpses*. **Trends in Parasitology**, v. 35, n. 8, p. 622-635. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.06.002>>. Acesso em: 16 nov. 2023.

RAWAT, Suraj Singh et al. 2023. *Immunoinformatics approaches for vaccine design: a fast and secure strategy for successful vaccine development*. **Vaccines**, v. 11, n. 2, p. 221. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/vaccines11020221>>. Acesso em: 30 mar. 2024.

ROATT, Bruno Mendes et al. 2012. *Performance of LBSap vaccine after intradermal challenge with L. infantum and saliva of Lu. longipalpis: immunogenicity and parasitological evaluation*. **PloS one**, v. 7, n. 11, p. e49780. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049780>>. Acesso em: 05 set. 2024.

ROCHA, Sandra C. et al. 2022. *Transmission Cycle of Tick-Borne Infections and Co-Infections, Animal Models and Diseases*. **Pathogens**, v. 11, n. 11, p. 1309. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/pathogens11111309>>. Acesso em: 7 ago. 2023.

RODRÍGUEZ-ALARCÓN, Carlos A. et al. 2020. *Demonstrating the presence of Ehrlichia canis DNA from different tissues of dogs with suspected subclinical ehrlichiosis*. **Parasites & Vectors**, v. 13, p. 1-7. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13071-020-04363-0>>. Acesso em: 10 mar. 2024.

RUDOLER, Nir et al. 2012. *Evaluation of an attenuated strain of Ehrlichia canis as a vaccine for canine monocytic ehrlichiosis*. **Vaccine**, v. 31, n. 1, p. 226-233. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vacina.2012.10.003>>. Acesso em: 1 jan. 2024.

RUDOLER, Nir et al. 2015. *Comparison of the acute phase protein and antioxidant responses in dogs vaccinated against canine monocytic ehrlichiosis and naive-challenged dogs*. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 1-10. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13071-015-0798-1>>. Acesso em: 1 jan. 2024.

SAINZ, Ángel et al. 2015. *Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe*. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 1-20. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13071-015-0649-0>>. Acesso em: 5 jan. 2024.

SAITO, Tais B.; WALKER, David H. 2016. *Ehrlichioses: an important one health opportunity*. **Veterinary Sciences**, v. 3, n. 3, p. 20. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/vetsci3030020>>. Acesso em: 1 jan. 2024.

SANTOS, Huarrisson A. et al. 2011. *Detection of Anaplasma phagocytophilum in Brazilian dogs by real-time polymerase chain reaction*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 4, p. 770-774. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/1040638711406974>>. Acesso em: 6 mar. 2024.

SANTOS, Huarrisson A. et al. 2013. *Molecular epidemiology of the emerging zoonosis agent Anaplasma phagocytophilum (Foggie, 1949) in dogs and ixodid ticks in Brazil*. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 1, p. 1-10. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-348>>. Acesso em: Jun. 2022.

SARAIVA, Margarida; O'GARRA, Anne. 2010. *The regulation of IL-10 production by immune cells*. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 3, p. 170-181. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nri2711>>. Acesso em: 27 mar. 2024.

SCHETTERS, T. H. et al. 1995. *Strain variation limits protective activity of vaccines based on soluble Babesia canis antigens*. **Parasite Immunology**, v. 17, n. 4, p. 215-218. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1995.tb00891.x>>. Acesso em: 16 nov. 2023.

SCHETTERS, Th PM et al. 2001. *Vaccination of dogs against heterologous Babesia canis infection using antigens from culture supernatants*. **Veterinary Parasitology**, v. 100, n. 1-2, p. 75-86. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(01\)00485-x](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(01)00485-x)>. Acesso em: 16 nov. 2023.

SCHETTERS, Th PM et al. 2007. *Immunity against Babesia rossi infection in dogs vaccinated with antigens from culture supernatants*. **Veterinary Parasitology**, v. 144, n. 1-2, p. 10-19. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.09.026>>. Acesso em: 26 dez. 2023.

SCHETTERS, Th PM et al. 1996. *Not peripheral parasitaemia but the level of soluble parasite antigen in plasma correlates with vaccine efficacy against Babesia canis*. **Parasite Immunology**, v.

18, n. 1, p. 1-6. Disponível em: <<https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1996.d01-1.x>>. Acesso em: 16 nov. 2023.

SCHIJNS, Virgil et al. 2020. *Modulation of immune responses using adjuvants to facilitate therapeutic vaccination*. **Immunological Reviews**, v. 296, n. 1, p. 169-190. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/imr.12889>>. Acesso em: 25 fev. 2024.

SCHNITTGER, Leonhard et al. 2012. *Babesia: a world emerging*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 8, p. 1788-1809. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.07.004>>. Acesso em 28 dez. 2023.

SCHUMACHER, Jens et al. 2018. *Enhanced stability of a chimeric hepatitis B core antigen virus-like-particle (HBcAg-VLP) by a C-terminal linker-hexahistidine-peptide*. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 16, p. 1-21. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12951-018-0363-0>>. Acesso em: 1 abr. 2024.

SILVEIRA, Júlia AG et al. 2015. *The first clinical and laboratory evidence of co-infection by Anaplasma phagocytophilum and Ehrlichia canis in a Brazilian dog*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, n. 3, p. 242-245. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.01.003>>. Acesso em 3 jan. 2024.

SILVEIRA, Júlia AG et al. 2017. Important frequency of *Anaplasma phagocytophilum* infection in a population of domiciled dogs in an urbanized area in south-eastern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, p. 958-962. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-736X2017000900010>>. Acesso em 10 mar. 2024.

SINGH, Manmohan; T O'HAGAN, Derek. 2003. *Recent advances in veterinary vaccine adjuvants*. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 5-6, p. 469-478. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(03\)00053-5](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(03)00053-5)>. Acesso em: 24 dez. 2023.

SINGH, Satarudra Prakash; MISHRA, Bhartendu Nath. *Major histocompatibility complex linked databases and prediction tools for designing vaccines*. **Human Immunology**, v. 77, n. 3, p. 295-306. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.humimm.2015.11.012>>. Acesso em: 30 mar. 2024.

SOARES, Aline O. et al. *Evaluation of ectoparasites and hemoparasites in dogs kept in apartments and houses with yards in the city of Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária= Brazilian Journal of Veterinary Parasitology: Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria**, v. 15, n. 1, p. 13-16, 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16646996/>>. Acesso em: 2 abr. 2023.

SOKOLOVSKA, Anna; HEM, Stanley L.; HOGENESCH, Harm. 2007. *Activation of dendritic cells and induction of CD4+ T cell differentiation by aluminum-containing adjuvants*. **Vaccine**, v. 25, n. 23, p. 4575-4585. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.03.045>>. Acesso em: 2 abr. 2023.

SOLANO-GALLEGO, Laia et al. 2016. *A review of canine babesiosis: the European perspective*. **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 1-18. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13071-016-1596-0>>. Acesso em 28 dez. 2023.

SOLANO-GALLEG0, Laia; BANETH, Gad. 2011. *Babesiosis in dogs and cats—expanding parasitological and clinical spectra*. **Veterinary Parasitology**, v. 181, n. 1, p. 48-60. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.04.023>>. Acesso em: 6 mar. 2024.

SOLER, Eric; HOUDEBINE, Louis-Marie. *Preparation of recombinant vaccines*. **Biotechnology Annual Review**, v. 13, p. 65-94, 2007. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(07\)13004-0](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(07)13004-0)>. Acesso em: 16 dez. 2023.

SORIA-GUERRA, Ruth E. et al. 2015. *An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: implications on vaccine development*. **Journal of Biomedical Informatics**, v. 53, p. 405-414. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jbi.2014.11.003>>. Acesso em: 30 mar. 2024.

STAROVEROV, S. A. et al. 2021. *Immune response of mice against Babesia canis antigens is enhanced when antigen is coupled to gold nanoparticles*. **Acta Parasitologica**, v. 66, p. 493-500. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11686-020-00305-z>>. Acesso em 13 mar. 2024.

STORNI, Tazio et al. 2005. *Immunity in response to particulate antigen-delivery systems*. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 3, p. 333-355. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.09.008>>. Acesso em: 25 fev. 2024.

SUN, Hong-Xiang; XIE, Yong; YE, Yi-Ping. 2009. *Advances in saponin-based adjuvants*. **Vaccine**, v. 27, n. 12, p. 1787-1796. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.091>>. Acesso em: 30 jan. 2023.

TAJIMA, Tomoko; WADA, Makoto. 2013. *Inhibitory effect of interferon gamma on frequency of Ehrlichia canis-infected cells in vitro*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 156, n. 3-4, p. 200-204. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.09.014>>. Acesso em: 30 abr. 2024.

THAKUR, Aneesh; PEDERSEN, Lasse E.; JUNGENSEN, Gregers. 2012. *Immune markers and correlates of protection for vaccine induced immune responses*. **Vaccine**, v. 30, n. 33, p. 4907-4920. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vacina.2012.05.049>>. Acesso em: 20 mar. 2024.

THIRUMALAPURA, Nagaraja R. et al. 2013. *Recombinant Ehrlichia P29 protein induces a protective immune response in a mouse model of ehrlichiosis*. **Vaccine**, v. 31, n. 50, p. 5960-5967. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.10.036>>. Acesso em: 1 jan. 2024.

THIRUMALAPURA, Nagaraja R.; WALKER, David H. 2015. *Ehrlichia*. In: *Molecular medical microbiology*. **Academic Press**. p. 2011-2032. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00109-8>>. Acesso em: 27 jan. 2023.

TRAPP, Silvia M. et al. 2006. *Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population*. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 3-4, p. 223-230. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.03.030>>. Acesso em: 16 nov. 2023.

UL QAMAR, Muhammad Tahir et al. 2021. *Designing multi-epitope vaccine against Staphylococcus aureus by employing subtractive proteomics, reverse vaccinology and immuno-informatics approaches*. **Computers in Biology and Medicine**, v. 132, p. 104389. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2021.104389>>. Acesso em: 22 mar. 2024.

VALENTE, Pâmela Cristina Lopes Gurgel. 2014. **Avaliação dos métodos diagnósticos e dos parâmetros hematológicos nas hemoparasitoses caninas no estado de Minas Gerais**. Orientadores: Paulo Ricardo de Oliveira Paes; Dissertação (Mestrado)- Escola de Veterinária (Universidade Federal de Minas Gerais), UFMG (Universidade Federal de Minas Gerais), Minas Gerais. Disponível em: <<https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/SMOC-9SQFD5>>. Acesso em: 13 abril. 2023.

VAN WYK, Clara-Lee et al. 2023. *Distribution of Rhipicephalus sanguineus and Haemaphysalis elliptica dog ticks and pathogens they are carrying: A systematic review*. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, p. 100969. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2023.100969>>. Acesso em: 1 jan. 2024.

VIANA, Kelvinson Fernandes et al. *Therapeutic vaccine of killed Leishmania amazonensis plus saponin reduced parasite burden in dogs naturally infected with Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 254, p. 98-104, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.03.010>>. Acesso em: 25 mai. 2023.

VIEIRA, Rafael Felipe da Costa et al. 2011. Ehrlichiosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, p. 01-12. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1984-29612011000100002>>. Acesso em: 28 dez. 2023.

VIEIRA, Thállitha Samih Wischral Jayme et al. 2013. Serosurvey of tick-borne pathogens in dogs from urban and rural areas from Parana State, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, p. 104-109. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1984-29612013000100019>>. Acesso em 5 jan. 2024.

VOGEL, Frederick R. 2000. *Improving vaccine performance with adjuvants*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, n. Supplement_3, p. S266-S270, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1086/3138833>>. Acesso em: 31 jan. 2023.

VITORIANO-SOUZA, Juliana et al. 2008. *Kinetics of cell migration to the dermis and hypodermis in dogs vaccinated with antigenic compounds of Leishmania braziliensis plus saponin*. **Vaccine**, v. 26, n. 31, p. 3922-3931. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.04.084>>. Acesso em: 05 set. 2024.

WANG, Pengfei. 2021. *Natural and synthetic saponins as vaccine adjuvants*. **Vaccines**, v. 9, n. 3, p. 222. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/vaccines9030222>>. Acesso em: 17 dez. 2023.

WINSLOW, Gary M. et al. 2000. *Antibody-mediated elimination of the obligate intracellular bacterial pathogen Ehrlichia chaffeensis during active infection*. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 4, p. 2187-2195, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/IAI.68.4.2187-2195.2000>>. Acesso em: 1 abr. 2024.

WOLDEHIWET, Zerai. 2010. *The natural history of Anaplasma phagocytophilum*. **Veterinary Parasitology**, v. 167, n. 2-4, p. 108-122. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.013>>. Acesso em: 2 jan. 2024.

YAGER, Eric et al. 2005. *Essential role for humoral immunity during Ehrlichia infection in immunocompetent mice*. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 12, p. 8009-8016, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/IAI.73.12.8009-8016.2005>>. Acesso em: 1 abr. 2024.

YU, Kai et al. 2015. *Synthetic fusion protein design and applications*. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 1, p. 155-164. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.11.005>>. Acesso em: 2 maio. 2023.

ZHANG, G. et al. 2023. **Ehrlichiosis: tick-borne malady**. *One Health Triad*, Unique Scientific Publishers, Faisalabad, Pakistan, v. 3, p. 69-77. Disponível em: <<https://doi.org/10.47278/book.oht/2023.79>>. Acesso em: 1 jan. 2024.

ZHANG, Xiaofeng et al. 2008. *Genetic and antigenic diversities of major immunoreactive proteins in globally distributed Ehrlichia canis strains*. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 7, p. 1080-1088. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/CVI.00482-07>>. Acesso em: 26 dez. 2023.

ZHANG, Xinyuan et al. 2021. *Carbohydrate-containing nanoparticles as vaccine adjuvants*. **Expert Review of Vaccines**, v. 20, n. 7, p. 797-810. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/14760584.2021.1939688>>. Acesso em: 6 fev. 2023.

ZHANG, Yang. *I-TASSER server for protein 3D structure prediction*. **BMC Bioinformatics**, v. 9, p. 1-8, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-40>>. Acesso em: 9 jul. 2023.

ZUCHI, Tainá Luana Vieira Lopes et al. 2020. *Serological and Molecular Evaluation of Ehrlichiosis, Babesiosis and Leishmaniosis in Concórdia Municipality, Santa Catarina, Brazil*. **Journal of Advanced Veterinary Research**, v. 10, n. 3, p. 141-145. Disponível em: <<https://advetresearch.com/index.php/AVR/article/view/467>>. Acesso em: 28 dez. 2023.

ZWEYGARTH, Erich et al. 2014. *In vitro culture and structural differences in the major immunoreactive protein gp36 of geographically distant Ehrlichia canis isolates*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 4, p. 423-431. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.01.011>>. Acesso em: 21 fev. 2024.

ZYGNER, Wojciech et al. *Canine Babesiosis Caused by Large Babesia Species: Global Prevalence and Risk Factors—A Review*. **Animals**, v. 13, n. 16, p. 2612, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ani13162612>>. Acesso em: 27 dez. 2023.

ZYGNER, Wojciech; GÓJSKA-ZYGNER, Olga; NORBURY, Luke J. 2023. *Pathogenesis of Anemia in Canine Babesiosis: Possible Contribution of Pro-Inflammatory Cytokines and Chemokines—A Review*. **Pathogens**, v. 12, n. 2, p. 16. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/pathogens12020166>>. Acesso em: 11 abr. 2024.

APÊNDICE

Apêndice A – TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido)

Título do Projeto: DESENVOLVIMENTO DE UMA VACINA QUIMÉRICA CONTRA *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis* e *Babesia canis* EM CÃES

Nome da Pesquisadora Responsável: Adrieli Barboza de Souza - CRBio 130080/07-D

Comitê de Ética: CEUA/UNILA

Objetivos do estudo: Desenvolver e avaliar a segurança e imunogenicidade de uma vacina recombinante contra *Anaplasma spp.*, *Ehrlichia canis* e *Babesia canis* em cães.

Potenciais riscos para os animais: As reações pós-vacinação mais frequentemente reportadas são uma tumefação difusa (inchaço) e/ou a presença de um nódulo endurecido, acompanhados de dor, no local da vacinação. Normalmente desaparecem no prazo de 4 dias. Em casos raros, as reações após a administração da segunda dose da vacina podem permanecer durante 14 dias. Também podem ocorrer sinais sistêmicos, tais como, letargia e redução do apetite, por vezes acompanhados de piroxia e postura rígida. Estas reações devem desaparecer no prazo de 2 a 3 dias.

Benefícios: Avaliação molecular, bioquímica, hematológica e sorológicas, de forma gratuita antes da aplicação e após a finalização do protocolo vacinal, para identificar se o animal teve contato com as bactérias e protozoário, que pode ser prejudicial à saúde e que, em caso positivo, receberá laudo para que possa ser realizado o tratamento correto (**o tratamento é responsabilidade do tutor**).

ESCLARECIMENTOS AO PROPRIETÁRIO SOBRE A PARTICIPAÇÃO DO ANIMAL NESTE ESTUDO

Sua autorização para a inclusão do seu animal neste estudo é **voluntária**. Seu animal poderá ser retirado do estudo, a qualquer momento, sem que isso cause qualquer prejuízo a você e/ou a ele. A confidencialidade dos seus dados pessoais será preservada. Os membros da CEUA ou as autoridades regulatórias poderão solicitar suas informações, e nesse caso, elas serão dirigidas especificamente para fins de inspeções regulares.

O Médico Veterinário responsável pelo seu animal será a Natália Soares Teixeira, inscrita no CRMV-PR sob o número 15499. Além dele, a equipe da pesquisadora responsável Adrieli Barboza de Souza e Kelvinson Fernandes Viana também serão responsáveis pelo bem-estar do seu animal durante todo o período do estudo. Quando for necessário, durante ou após o período do estudo, você poderá entrar em contato com a pesquisadora principal pelo contato: adrieli.bsouza@hotmail.com e/ou (45) 999523731.

Declaração de consentimento livre e esclarecido

Eu, _____, tutor(a)/responsável legal pelo animal _____, declaro que fui devidamente esclarecido(a) sobre todos os procedimentos deste estudo/projeto, seus riscos e benefícios ao animal pelo qual sou responsável. Fui também informado(a) que posso retirar meu animal do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do meu animal identificado, a seguir, neste estudo.

Nome do tutor/responsável legal pelo animal: _____

CPF ou RG: _____

Telefone: () _____ **E-mail:** _____

Identificação do animal

Nome:	Nº de identificação:
Raça:	Sexo: () Fêmea () Macho

Este documento será assinado em **duas vias**, sendo que uma via ficará comigo e outra com a Pesquisadora responsável.

Foz do Iguaçu/PR, ____/____/____

Pesquisadora Responsável
Adrieli Barboza de Souza
CRBio 130080/07-D

Assinatura do(a) tutor(a)

Apêndice B – Tabela de peptídeos de ligação a MHC de classe I

Tabela 9. Análise de Ligação de Peptídeos a Moléculas de MHC de Classe I utilizando IEDB

Alelo	Comprimento do		Peptídeo	Score	rank
	peptídeo				
DLA-8803401	9		KMFEVYKTL	847.511	0.02
DLA-8803401	9		KVVPHGIWF	8.257	0.03
DLA-8850101	9		HVISDLHGV	798.647	0.02
DLA-8850801	9		KMFEVYKTL	656.831	0.06
DLA-8850101	9		KMFEVYKTL	651.201	0.08
DLA-8850801	9		QVTHVIEEK	578.077	0.12
DLA-8850801	9		HVISDLHGV	560.349	0.14
DLA-8850801	9		KVVPHGIWF	507.203	0.22
DLA-8803401	9		IANHPGHGY	493.576	0.16
DLA-8850101	9		FTAAITPLF	486.338	0.2

Fonte: Autora, 2022.

Apêndice C – Peptídeos de ligação a MHC de classe II

Tabela 10. Análise de Ligação de Peptídeos a Moléculas de MHC de Classe II utilizando o IEDB

Alelo	Comprimento do		<i>Score</i>	<i>rank</i>
	peptídeo	Peptídeo		
HLA-DRB1*08:02	15	GHGYHILFKNNGHVI	9.487	0.01
HLA-DRB1*08:02	15	PGHGYHILFKNNGHV	9.509	0.01
HLA-DRB1*04:05	15	KMFEVYKTLTDPEDP	9.804	0.01
HLA-DRB1*11:01	15	GHGYHILFKNNGHVI	9.831	0.01
HLA-DRB1*11:01	15	PGHGYHILFKNNGHV	9.837	0.01
HLA-DRB1*04:05	15	MFEVYKTLTDPEDPS	9.844	0.01
HLA-DRB1*04:05	15	FEVYKTLTDPEDPSE	9.863	0.01
HLA-DRB1*11:01	15	HPGHGYHILFKNNGH	9.768	0.02
HLA-DRB1*04:05	15	EVYKTLTDPEDPSEV	9.780	0.02
HLA-DQA1*03:01/D QB1*03:02	15	FEVYKTLTDPEDPSE	626	0.03

Fonte: Autora, 2022.

Apêndice D -- Tabela de resultados do BepiPred com os epítomos lineares de células B preditos utilizado o programa IEDB

Tabela 11. Resultados do BepiPred com os epítomos lineares de células B preditos utilizado o programa IEDB

Posição	Resíduo	Pontuação	Atribuição
18	N	509	E
19	I	528	E
20	D	536	E
21	F	540	E
22	A	542	E
23	H	517	E
24	D	518	E
25	F	515	E
26	H	521	E
27	I	527	E
28	H	530	E
29	Q	518	E
30	G	522	E
32	R	504	E
33	F	511	E
35	V	501	E
43	D	514	E
44	I	522	E
45	A	523	E
46	N	521	E

Fonte: Autora, 2022.

ANEXO

Anexo A – Sequência de DNA otimizada para *E. Coli*, de aminoácidos, do vetor e sequência final utilizadas pela empresa para sintetizar a proteína recombinante

I. Projects Description:

Item	1. Syno® 2.0 Gene Synthesis
<i>Project ID</i>	S027688-01
<i>Gene Name</i>	Quimera Ehrlichia, B
<i>Gene Length</i>	903 bp
<i>Vector</i>	<i>Vector name: pET-32a(+)</i>
	<i>Cloning site: NcoI CCATGG and XhoI CTCGAG</i>
	<i>Resistance: Ampicillin</i>
	<i>Ship the vector to Synbio Technologies: No</i>
<i>Delivery Form</i>	5 µg lyophilized plasmid
DNA Sequence (Optimized for <i>E. Coli</i>)	
CCATGGCCGCCGGAACACGAAGAAATTAGTCTGCCGCTGCCGTACAAAACCATACCGCAGAA CAGCCGAGCTTTCTGGGTTACGACAAAGAGAAACGTGGCGCACCGATGATTGCTTTTGGCGGT GGTGGTGAAGTTGCAGGCGGCGAATCTGGTGATGGTTCTGTTGGCGGCAAGAAGACGCACGT TTTACCGCTTGGCAAGGTCTGGAAGGCGGTGGTTCTGGTATGGCAGACGAAATTCGCGGTAGCA GCAGCGGCGAAAATATCGAAGATAACGTTAACGTTGTCGGCGTTGCGAAAAGCAAAAACTGT TCGTATCATCGTCGTTCTGATTGCCACCGGCCTGATGTACTACTTCTTCTTCAACAAAGAG AGCAGCGAGGACGAAGAAGATACCCAGGTTACCCACGTCATCGAAGAAAAAGAAGTTGGCGG TTCTGGCGCAGCATCTGGTTTTACCGCAGCAATTACCCCGCTGTTTCATGGTCCCCTGATGTTTT TCGCGGGCGGTAGCGGTACCGACGATAACGATAAAGTCGTTCCGCACGGTATCTGGTTTATTGA AGGCGTCTACGAGACCGACAAAATGTTTCGAGGTCTACAAAACCCTGACCGATCCGGAAGATCC GTCTGAAGTTACCCGTCTGACCACCGTTTCTGGCGCATCTGGCGGTTCTGGTATGCTGTTTATCC TGATGGGCTACTGCATGCTGCATCTGACCACCGAAATCACCAACATCGACTTTGCGCACGATTTC CATATCCATCAGGGCGAACGTTTTGGCGTTTCTTCTGGCGATCTGGAAGTGGATATCGCGAATCA TCCGGGTCACGGTTATCACATCCTGTTCAAAAACAACGGCCACGTCATTTCTGATCTGCACGGC GTTCTCGAG	
Original Amino Acid	
PPEHEEISLPLPYKTITAEQPSFLGYDKEKRGAPMIAFGGGGEVAGGESGDGSVGGKEDARFTAWQ GLEGGGSGMADEIRGSSSGENIEDNVNVVGVAKSKKLFVIIIVLIATGLMYYFFFNKESSEDEED TQVTHVIEEKEVGGSGAASGFTAATPLFMVPLMFFAGGSGTDDNDKVVPFGIWFIEGVYETDKM FEVYKTLTDPEDPSEVTRLTTVSGASGGSGMLFILMGYCMHLHTTEITNIDFAHDFHIHQGERFGVS SGDLELDIANHPGHGYHILFKNNGHVISDLHGV	
Vector Sequence	

TGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCA
 GCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCT
 CGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATT
 AGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCCAAAAAAGCTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCA
 TCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCT
 TGTTCCAAACCTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTATAAGGGATTTTG
 CCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTAAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAAACA
 AAATATTAACGTTTACAATTTACAGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTG
 TTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCA
 ATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTG
 CGGCATTTTGCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGAAG
 ATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGA
 GTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGT
 ATTATCCCGTATTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGAC
 TTGGTTGAGTACTACAGTACAGAGAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTA
 TGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGA
 GGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGT
 TGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGC
 AATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACA
 ATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGC
 TGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCA
 CTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACT
 ATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACCTG
 TCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAGGATC
 TAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACT
 GAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAAT
 CTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGC
 TACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTCTCT
 AGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCT
 GCTAATCCTGTTACCAAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTC
 AAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTTCGTGCACACAGC
 CCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGC
 GCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAG
 GAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTC
 GCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGAAAAA
 ACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCTTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTT
 TCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTC
 GCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGAT
 GCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATATGGTGCACCTCTCAGTAC
 AATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTCA
 TGGCTGCGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCG
 GCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCG
 TCATCACCGAAACGCGCGAGGCAGCTGCGGTAAAGCTCATCAGCGTGGTCGTGAAGCGATTTC
 ACAGATGTCTGCCTGTTTCATCCGCGTCCAGCTCGTTGAGTTTCTCCAGAAGCGTTAATGTCTGG
 CTTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGGTTTTTTCCTGTTTGGTCACTGATGCCTCCGTGT
 AAGGGGGATTTCTGTTTCATGGGGGTAATGATACCGATGAAACGAGAGAGGATGCTCACGATAC
 GGGTTACTGATGATGAACATGCCCGGTTACTGGAACGTTGTGAGGGTAAACAACTGGCGGTAT
 GGATGCGGCGGGACCAGAGAAAAATCACTCAGGGTCAATGCCAGCGCTTCGTTAATACAGAT
 GTAGGTGTTCCACAGGGTAGCCAGCAGCATCCTGCGATGCAGATCCGGAACATAATGGTGCAG
 GCGCTGACTTCCGCGTTTTCCAGACTTTACGAAACACGGAAACCGAAGACCATTTCATGTTGTT
 GCTCAGGTCGCAGACGTTTTGCAGCAGCAGTCGCTTCACGTTTCGCTCGCGTATCGGTGATTCA
 TTCTGCTAACCAGTAAGGCAACCCCGCCAGCCTAGCCGGGTCTCAACGACAGGAGCACGAT
 CATGCGCACCCGTGGGGCCGCCATGCCGGCGATAATGGCTGCTTCTCGCCGAAACGTTTGGT
 GGCGGGACCAAGTACGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGCAAGATTCCGAATACCGCAAGCGAC
 AGGCCGATCATCGTCGCGTCCAGCGAAAGCGGTCTCGCCGAAATGACCCAGAGCGCTGC
 CGGCACCTGTCTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGCGGCGACGATAGTCAT
 GCCCCGCGCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGTTGAAGGCTCTCAAGGGCATCGGTGAGATC
 CCGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTTACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTC
 GGGAAACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTGC
 GTATTGGGCGCCAGGGTGGTTTTTCTTTTACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTC

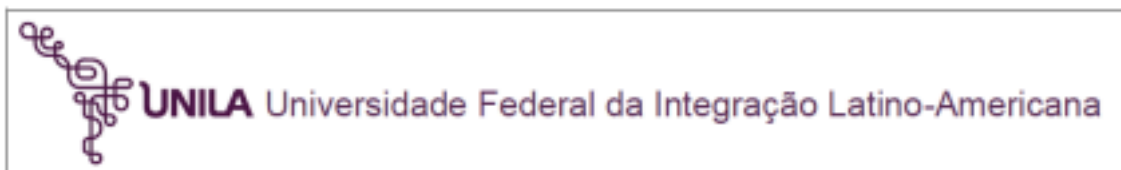
ACCGCCTGGCCCTGAGAGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTGTCCCCAGCAGGCGAAA
 ATCCTGTTTGATGGTGGTTAACGGCGGGATATAACATGAGCTGTCTTCGGTATCGTCGTATCCCA
 CTACCGAGATGTCCGCACCAACGCGCAGCCCGGACTCGGTAATGGCGCGCATTGCGCCCAGC
 GCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTCATTACAGCATTTGCATG
 GTTTGTTGAAAACCGGACATGGCACTCCAGTCGCCTTCCCGTTCGCTATCGGCTGAATTTGAT
 TGCGAGTGAGATATTTATGCCAGCCAGCCAGACGCAGACGCGCCGAGACAGAACTTAATGGG
 CCCGCTAACAGCGCGATTTGCTGGTGACCCAATGCGACCAGATGCTCCACGCCCAGTCGCGTA
 CCGTCTTCATGGGAGAAAATAATACTGTTGATGGGTGCTGGTCAGAGACATCAAGAAATAAC
 GCCGGAACATTAGTGCAAGGACGCTTCCACAGCAATGGCATCCTGGTCATCCAGCGGATAGTTA
 ATGATCAGCCCACTGACGCGTTGCGCGAGAAGATTGTGCACCGCCGCTTTACAGGCTTCGACG
 CCGCTTCGTTCTACCATCGACACCACCACGCTGGCACCCAGTTGATCGGCGCGAGATTTAATC
 GCCGCGACAATTTGCGACGGCGCGTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGCAACGCCAATCAGCA
 ACGACTGTTTGGCCGCCAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGTCCGCCATCG
 CCGTCTCCACTTTTCCCGCGTTTTCGCAGAAACGTGGCTGGCTGGCTTACCACGCGGGAAA
 CCGTCTGATAAGAGACACCGGCATACTCTGCGACATCGTATAACGTTACTGGTTTCACATTAC
 CACCCTGAATTGACTCTCTTCCGGGCGCTATCATGCCATAACCGCGAAAGGTTTTGCGCCATTG
 ATGGTGTCCGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCCAGTAGT
 AGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCGCAAGGAATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGCCCAA
 CAGTCCCCCGGCCACGGGGCCTGCCACCATAACCCACGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCCGA
 AGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCATCGGTGATGTCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTG
 TGGCGCCGGTGATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCGATCTCGATCCCG
 CGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAAT
 TTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACTGACGACA
 GTTTTGACACGGATGTACTCAAAGCGGACGGGGCGATCCTCGTCGATTCTGCGGCAGAGTGGT
 GCGGTCCGTGCAAAATGATCGCCCCGATTCTGGATGAAATCGCTGACGAATATCAGGGCAAAC
 TGACCGTTGCAAACTGAACATCGATCAAAACCCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCATCCGTG
 GTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAAACGGTGAAGTGGCGGCAACCAAAGTGGGTGCACTG
 TCTAAAGGTCAGTTGAAAGAGTTCCCTCGACGCTAACCTGGCCGGTCTGGTTCTGGCCATATG
 CACCATCATCATCATCTTCTTCTGGTCTGGTGCCACGCGGTTCTGGTATGAAAGAAACCGCTG
 CTGCTAAATTCGAACGCCAGCACATGGACAGCCCAGATCTGGGTACCGACGACGACGACAAG
 GCGATGGCTGATATCGGATCCGAATTCGAGCTCCGTGCGACAAGCTTGGCGCCGCACTCGAGCA
 CCACCACCACCACCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTG
 CTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTT
 TTTTGCTGAAAGGAGGAACATATCCGGAT

Final Construct Sequence

CCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAA
 GCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCGTCATACCGAAACGCGCG
 AGGCAGCTGCGGTAAAGCTCATCAGCGTGGTTCGTGAAGCGATTACAGATGTCTGCCTGTTCA
 TCCGCGTCCAGCTCGTTGAGTTTCTCCAGAAGCGTTAATGTCTGGCTTCTGATAAAGCGGGCC
 ATGTTAAGGGCGGTTTTTCTGTTTGGTCACTGATGCCTCCGTGTAAGGGGATTTCTGTTCA
 TGGGGGTAAATGATACCGATGAAACGAGAGAGGATGCTCACGATACGGGTACTGATGATGAAC
 ATGCCCGGTTACTGGAACGTTGTGAGGGTAAACAACCTGGCGGTATGGATGCGGCGGGACCAG
 AGAAAAATCACTCAGGGTCAATGCCAGCGCTTCGTTAATACAGATGTAGGTGTTCCACAGGGT
 AGCCAGCAGCATCCTGCGATGCAGATCCGGAACATAATGGTGCAGGGCGCTGACTTCCGCGTT
 TCCAGACTTTACGAAACACGGAAACCGAAGACCATTTCATGTTGTTGCTCAGGTCGAGACGTT
 TTGCAGCAGCAGTCGCTTACGTTGCTCGCGTATCGGTGATTTCATTCTGCTAACAGTAAGGC
 AACCCCGCCAGCCTAGCCGGGTCTCAACGACAGGAGCACGATCATGCGCACCCGTGGGGCC
 GCCATGCCGCGGATAATGGCCTGCTTCTCGCCGAAACGTTTGGTGGCGGGACCAGTGACGAA
 GGCTTGAGCGAGGGCGTGCAAGATTCCGAATACCGCAAGCGACAGGCCGATCATCGTCGCGC
 TCCAGCGAAAGCGGTCTCGCCGAAATGACCCAGAGCGCTGCCGGCACCTGTCTACGAGT
 TGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGCGGCGACGATAGTCATGCCCCGCGCCACCGGAAG
 GAGCTGACTGGGTTGAAGGCTCTCAAGGGCATCGGTGAGATCCCGGTGCCTAATGAGTGAG
 CTAACCTTACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCAGTTCGGGAAACCTGTCGTGCCAG
 CTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGGCTATTGGGCGCCAGGGTGGT
 TTTTCTTTTACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTACCAGCCTGGCCCTGAGAGAG
 TTGCAGCAAGCGGTCCACGCTGTTTTGCCCGCAGCGCGGAAATCCTGTTTGATGGTGGTTAA
 CGGCGGGATATAACATGAGCTGTCTTCGGTATCGTCGTATCCCACTACCGAGATGTCCGCACCA

ACGCGCAGCCCGGACTCGGTAATGGCGCGCATTGCGCCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACC
 AGCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTCATTAGCATTGTCATGGTTTGTGAAAACCGGACATG
 GCACTCCAGTCGCCTTCCCGTTCCGCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTATGCC
 AGCCAGCCAGACGCGAGACGCGCCGAGACAGAACTTAATGGGCCCCGCTAACAGCGCGATTGCG
 TGGTGACCCAATGCGACCAGATGCTCCACGCCCAGTCGCGTACCGTCTTCATGGGAGAAAATA
 ATACTGTTGATGGGTGTCTGGTCAGAGACATCAAGAAATAACGCCGGAACATTAGTGCAGGCA
 GCTTCCACAGCAATGGCATCCTGGTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCAGCCCAGTACGCGGTT
 GCGCGAGAAGATTGTGCACCGCCGCTTTACAGGCTTCGACGCGGCTTCGTTTACCATCGACA
 CCACCACGCTGGCACCCAGTTGATCGGCGCGAGATTTAATCGCCGCGACAATTTGCGACGGCG
 CGTGACAGGGCCAGACTGGAGGTGGCAACGCCAATCAGCAACGACTGTTTGCCCGCCAGTTGT
 TGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGCCATCGCCGCTTCCACTTTTTCCCGCGTTT
 TCGCAGAAACGTGGCTGGCCTGGTTTACCACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCGGCA
 TACTTTCGACATCGTATAACGTTACTGGTTTCACATTACACCACCTGAATTGACTCTCTTCCGG
 GCGCTATCATGCCATACCGCGAAAGGTTTTGCGCCATTCGATGGTGTCCGGGATCTCGACGCTC
 TCCCTTATCGGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCAGTAGTAGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGC
 CGCCGCAAGGAATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCCCCGCCACGGGGCCTG
 CCACCATACCACGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCAT
 CGGTGATGTCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCCGGCCACG
 ATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAG
 GGAATTTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGAT
 ATACATATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACTGACGACAGTTTTGACACGGATGTACTCAAAG
 CGGACGGGGCGATCCTCGTCGATTTCTGGGCAGAGTGGTGCGGTCCGTGCAAAATGATCGCCC
 CGATTCTGGATGAAATCGCTGACGAATATCAGGGCAAACGACCGTTGCAAACTGAACATCG
 ATCAAAACCCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCATCCGTGGTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAA
 AAACGGTGAAGTGGCGGCAACCAAAGTGGGTGCACTGTCTAAAGGTCAGTTGAAAGAGTTCC
 TCGACGCTAACCTGGCCGTTTCTGGTTCTGGCCATATGCACCATCATCATCATTCTTCTGGT
 CTGGTGCCACGCGGTTCTGGTATGAAAGAAACCGCTGCTGCTAAATTCGAACGCCAGCACATG
 GACAGCCCAGATCTGGGTACCGACGACGACGACAAGGCCATGGCCCGGAACACGAAGAA
 ATTAGTCTGCCGCTGCCGTACAAAACCATACCGCAGAACAGCCGAGCTTTCTGGGTTACGAC
 AAAGAGAAACGTGGCGCACCGATGATTGCTTTTGGCGGTGGTGGTGAAGTTGCAGGCGGCGA
 ATCTGGTGATGGTTCTGTTGGCGGCAAGAAGACGCACGTTTTTACCGCTTGGCAAGGTCTGGA
 AGGCGGTGGTTCTGGTATGGCAGACGAAATTCGCGGTAGCAGCAGCGGCGAAAATATCGAAG
 ATAACGTTAACGTTGTGCGCGTTGCGAAAAGCAAAAACTGTTTCGTCATCATCGTCGTTCTGA
 TTGCCACCGGCCTGATGTACTACTTCTTCTTCTTCAACAAAGAGAGCAGCGAGGACGAAGAA
 GATACCCAGGTTACCCACGTCATCGAAGAAAAAGAAGTTGGCGGTTCTGGCGCAGCATCTGGT
 TTTACCGCAGCAATTACCCCGCTGTTTCATGGTCCCGCTGATGTTTTTTCGCGGGCGGTAGCGGTA
 CCGACGATAACGATAAAGTCGTTCCGACGGTATCTGGTTTATTGAAGGCGTCTACGAGACCG
 ACAAATGTTTCGAGGTCTACAAAACCCTGACCGATCCGGAAGATCCGTCTGAAGTTACCCGTC
 TGACCACCGTTTCTGGCGCATCTGGCGGTTCTGGTATGCTGTTTATCCTGATGGGCTACTGCAT
 GCTGCATCTGACCACCGAAATCACCAACATCGACTTTGCGCACGATTTCCATATCCATCAGGGC
 GAACGTTTTTGGCGTTTCTTCTGGCGATCTGGAACCTGGATATCGCGAATCATCCGGGTCACGGTT
 ATCACATCCTGTTCAAAAAACAACGGCCACGTCATTTCTGATCTGCACGGCGTTCTCGAGCACC
 ACCACCACCACCTGAGATCCGGCTGCTAACAAGCCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCT
 GCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTT
 TTGCTGAAAGGAGGAACCTATATCCGGAT

Fonte: FastBio, 2023.

Anexo B – Aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – UNILA**

O projeto intitulado "Bioprospecção de Imunobiológicos Destinados à Saúde Animal e Humana", processo de número 001/2018, sob responsabilidade do professor Kelvinson Fernandes Viana, está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Lei de Procedimentos para o Uso Científico de Animais (Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008), sendo portanto aprovado pela CEUA desta universidade, em reunião realizada em 19 de abril do corrente ano.

Foz do Iguaçu, 21 de abril de 2019

A handwritten signature in black ink, appearing to be "F. T.", is shown above the printed name of the coordinator.

Prof. Dr. Flávio Luiz Tavares
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais - UNILA