

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

**Construção, caracterização, antigenicidade e imunogenicidade de proteína
multiepítopo dos Alphaherpesvirus bovinos 1 e 5**

Nadálin Yandra Botton

Pelotas, 2025

Nadálin Yandra Botton

**Construção, caracterização, antigenicidade e imunogenicidade de proteína
multiepítopo dos Alphaherpesvirus bovinos 1 e 5**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Saúde Única)

Orientador: Prof. Dr. Geferson Fischer

Pelotas, 2025

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

B751c Botton, Nadálin Yandra

Construção, caracterização, antigenicidade e imunogenicidade de proteína multiepítopo dos Alphaherpesvirus bovinos 1 e 5 [recurso eletrônico] / Nadálin Yandra Botton ; Geferson Fischer, orientador. — Pelotas, 2025.

87 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2025.

1. Hespervirus bovinos. 2. Bioinformática. 3. Vacina multiepítopo. 4. Glicoproteínas. 5. Diagnóstico. I. Fischer, Geferson, orient. II. Título.

CDD 636.208979

Nadálin Yandra Botton

Construção, caracterização, antigenicidade e imunogenicidade de proteína
multiepítipo dos Alphaherpesvirus bovinos 1 e 5

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências,
Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade
Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 24/02/2025

Banca examinadora:

Prof. Dr. Geferson Fischer (Orientador)
Doutor em Biotecnologia Agrícola pela Universidade Federal de Pelotas

Dr^a Cristina Mendes Peter
Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Dr. Paulo Ricardo Centeno Rodrigues
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Dr. Amilton Clair Pinto Seixas Neto
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dr^a Silvia de Oliveira Hübner (Suplente)
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais Jaqueline Paula Seemann Botton e Silvar Antônio Botton pelo apoio, conforto e confiança.

A minha família, por sempre se fazerem presentes para mim.

Ao meu, hoje marido, Léo, por sempre estar por perto me incentivando, mesmo quando estávamos a um oceano de distância. É muito bom compartilhar a vida com você.

À Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária (PPGV), pela oportunidade de ingressar na Pós-Graduação.

Ao meu orientador, Dr. Geferson Fischer, que além de orientador, tornou-se um amigo durante esta caminhada. Obrigada por estar sempre ao meu lado e por me ensinar todos os dias sobre ciência, fé e vida. A sua integridade e ética são o melhor exemplo de sucesso, professor, e eu tenho muito orgulho de estar sendo formada por você.

Aos professores, Dr. Gilberto D'Ávila Vargas, Dr. Marcelo de Lima e Dra. Silvia de Oliveira Hübner, por estarem sempre dispostos a dialogarem sobre o projeto de pesquisa.

Ao professor Dr. Luciano da Silva Pinto, por auxiliar em todas as etapas desta pesquisa e por gentilmente abrir as portas do laboratório que está sob a sua supervisão para que este projeto pudesse ser desenvolvido.

Aos amigos do Laboratório de Virologia e Imunologia (Labvir) da UFPel, pelos seis anos de parceria; especialmente aos que me receberam neste laboratório, Dr. Paulo Ricardo Centeno Rodrigues, Dra. Cristina Mendes Peter e MsC Lariane da Silva Barcelos; para o meu colega de dia a dia e amigo de todas as horas, MsC Matheus Iuri Fhühauf; e para quem eu vou deixar minha “herança”, minha estagiária, parceira de bancada e fiel escudeira, Marina Sturbelle Garcia.

Aos amigos do Laboratório de Bioprospecção e Proteômica (BioProLab) da UFPel, pela calorosa acolhida e auxílio durante o desenvolvimento deste projeto, especialmente nas pessoas dos queridos MsC. Guilherme Feijó de Sousa e Dr. Amilton Clair Pinto Seixas Neto.

À coordenadora do PPGV-UFPel, Dra. Bruna da Rosa Curcio. Obrigada por ser inspiração de mulher e profissional, e por pensar tão à frente do seu tempo.

A todos aqueles que contribuíram para o meu aprimoramento pessoal e profissional.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Resumo

BOTTON, Nadálin Yandra. **Construção, caracterização, antigenicidade e imunogenicidade de proteína multiepítopo dos Alphaherpesvirus bovinos 1 e 5.** 2024. 87f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2024.

Os herpesvirus bovinos são importantes microrganismos causadores de distúrbios respiratórios, reprodutivos e encefálicos que ainda acometem as criações de bovinos em todo o mundo, podendo também afetar bubalinos, ovinos e caprinos. A vacinação é o método mais efetivo de controle e redução das doenças provocadas por esses microrganismos, e nesse âmbito, diferentes plataformas vacinais têm sido desenvolvidas ao longo dos anos com essa finalidade. O objetivo deste estudo foi o desenvolvimento de uma proteína multiepítopo a partir da união de epítomos imunodominantes das glicoproteínas B, C e D dos BoAHVs 1 e 5, e sua avaliação para utilização em teste diagnóstico e vacinação de bovinos sob condições de campo. Inicialmente foi realizada a recuperação (NCBI) e curadoria (MUSCLE e BLASTp) das sequências das glicoproteínas dos organismos de interesse, para posterior predição de epítomos reconhecidos por linfócitos B (BepiPred 2.0), células T citotóxicas (NetMHCpan EL 4.1) e células T *helper* (NetMHCIIpan 4.0). Posteriormente à análise de antigenicidade (VaxiJen 2.0), a proteína multiepítopo, que daria origem à vacina multiepítopo, foi montada utilizando os ligantes GGGGS e EAAAK entre os epítomos de uma mesma glicoproteína ou entre os epítomos de glicoproteínas diferentes, respectivamente. Após, as análises de parâmetros físico-químicos e perfil de alergenicidade, foram realizadas através dos servidores ProtParam e AlgPred seguida de uma nova análise de antigenicidade (VaxiJen 2.0). A modelagem e o docking molecular foram realizados através dos servidores I-TESSER e ClusPro, respectivamente, com o modelo do receptor TLR bovino obtido através do banco de dados AlphaFoldDB. Para a expressão da proteína multiepítopo o vetor pET24a contendo o gene de interesse foi utilizado para transformar a cepa de *E. coli* BL21 (DE3) Star por choque térmico. O cultivo foi realizado em 500 mL de meio LB líquido sob condições ideais para o seu crescimento e expressão da proteína multiepítopo. Em seguida a amostra foi processada e em sequência purificada por cromatografia de afinidade no equipamento AKTA Purifier, para posterior diálise e quantificação por BCA. A caracterização foi realizada por Western blotting e a antigenicidade por teste de ELISA indireto com protocolo *in house*. A imunogenicidade foi avaliada a partir da imunização de 5 bovinos com 400 µg da proteína multiepítopo conjugada com o adjuvante Montanide™ ISA 50 V2, pela via intramuscular (vacina multiepítopo). O grupo placebo foi inoculado com solução salina tamponada (PBS). Para determinação do nível de anticorpos totais IgG, o teste de ELISA indireto, com protocolo *in house*, foi empregado. A proteína multiepítopo apresenta 321 aminoácidos, peso molecular

de 33.24 kDa, pI teórico de 9.88, estimativa de meia vida em *E. coli* de >10 horas, GRAVY de -0,507, antigenicidade de 1.1543 e se caracteriza como instável e sem potencial alergênico. A proteína multiepítopo também é capaz de interagir com alta energia de interação (-1264.7 kcal/mol) com 88 membros do cluster. Suas frações solúvel e insolúvel foram reconhecidas pelo anti-HIS6x em um Western blotting, caracterizando-a pelo seu peso molecular de ~33 kDa. A proteína multiepítopo foi fortemente reconhecida pelos anticorpos IgG-anti-alphaherpesvirus dos soros bovinos, demonstrando sua antigenicidade. A vacina multiepítopo foi capaz de induzir uma resposta imunológica humoral a nível de IgG total. A proteína multiepítopo pode ser utilizada em testes diagnósticos e em vacinas contra os Alphaherpesvirus bovinos 1 e 5.

Palavras-chave: herpesvirus bovinos; bioinformática; vacina multiepítopo; diagnóstico; glicoproteínas.

Abstract

BOTTON, Nadálin Yandra. **Construction, characterization, antigenicity and immunogenicity of multiepitope protein of Bovine alphaherpesvirus 1 and 5.** 2024. 87f. Thesis (Doctor degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2024.

Bovine herpesviruses are significant microorganisms responsible for respiratory, reproductive, and encephalic disorders that continue to affect cattle farming worldwide, with potential impacts on buffaloes, sheep, and goats as well. Vaccination is the most effective method for controlling and reducing diseases caused by these microorganisms. In this context, various vaccine platforms have been developed over the years to achieve this goal. The objective of this study was the development of a multiepitope protein derived from the union of immunodominant epitopes of glycoproteins B, C, and D of BoAHVs 1 and 5, and its evaluation for use in diagnostic tests and vaccination of cattle under field conditions. Initially, the retrieval (NCBI) and curation (MUSCLE and BLASTp) of the glycoprotein sequences of the target organisms were performed, followed by the prediction of epitopes recognized by B lymphocytes (BepiPred 2.0), cytotoxic T cells (NetMHCpan EL 4.1), and helper T cells (NetMHCIIpan 4.0). Subsequently, after the antigenicity analysis (VaxiJen 2.0), the multiepitope protein, which would serve as the basis for the multiepitope vaccine, was constructed using GGGGS and EAAAK linkers between epitopes of the same glycoprotein or between epitopes of different glycoproteins, respectively. Following this, analyses of physicochemical parameters and allergenicity profiles were conducted using ProtParam and AlgPred servers, respectively, followed by another antigenicity analysis (VaxiJen 2.0). Protein modeling and molecular docking were performed using the I-TASSER and ClusPro servers, respectively, with the bovine TLR-7 receptor model obtained from the AlphaFoldDB database. For the expression of the multiepitope protein, the pET24a vector containing the gene of interest was used to transform the *E. coli* BL21 (DE3) Star strain via heat shock. Cultivation was carried out in 500 mL of liquid LB medium under optimal conditions for growth and expression of the multiepitope protein. The sample was then processed and subsequently purified using affinity chromatography on an ÄKTA Purifier system, followed by dialysis and quantification using the BCA method. Characterization was performed through Western blotting, and antigenicity was evaluated via indirect ELISA using an in-house protocol. Immunogenicity was assessed by immunizing five cattle with 400 µg of the multiepitope protein conjugated with Montanide™ ISA 50 V2 adjuvant, administered intramuscularly (multiepitope vaccine). The placebo group was inoculated with phosphate-buffered saline (PBS). To determine total IgG antibody levels, an indirect ELISA test using an in-house protocol was employed. The multiepitope protein consists of 321 amino acids, has a molecular weight of 33.24 kDa, a theoretical pI of

9.88, an estimated half-life in *E. coli* of >10 hours, a GRAVY score of -0.507, antigenicity of 1.1543, and is characterized as unstable and non-allergenic. The multiepitope protein was also capable of interacting with a high binding energy (-1264.7 kcal/mol) with 88 cluster members. Its soluble and insoluble fractions were recognized by anti-HIS6x antibodies in a Western blotting assay, confirming its molecular weight of approximately ~33 kDa. The multiepitope protein was strongly recognized by IgG anti-Alphaherpesvirus antibodies from bovine sera, demonstrating its antigenicity. The multiepitope vaccine successfully induced a humoral immune response at the total IgG level. The multiepitope protein can be employed in diagnostic tests and vaccines against bovine Alphaherpesviruses 1 and 5.

Keywords: bovine herpesviruses; bioinformatics; multiepitope vaccine; diagnosis; glycoproteins.

Lista de Figuras

Figura 1	Organização estrutural e genômica dos BoAHV-1 e BoAHV-5.....	17
Figura 2	Modelagem da estrutura tridimensional da glicoproteína B dos BoAHV-1 BoAHV-5.....	20
Figuras do Artigo 1		
Figure 1	Secondary structure analysis of the BOV 13 messenger RNA (mRNA) using the RNAFold software. a: Prediction of the minimum free energy (MFE) secondary structure of the BOV 13 mRNA. b: Prediction of the centroid secondary structure of the BOV 13 mRNA. c: Positional entropy analysis of the MFE (red), centroid (blue), and thermodynamic ensemble (green) secondary structures. Red arrows in the MFE and centroid structures indicate the free ends that enable mRNA interaction with the ribosome. Figure 1 was generated using RNAFold software and edited using Canva.com.....	51
Figure 2	Prediction of the structural arrangements of the BOV 13 multi-epitope protein using SOPMA software. Random coil (letters Cc in yellow), extended strand (letters Ee in red), and α -helix (letters Hh in blue) are represented. Figure 2 was generated using SOPMA software and edited using Canva.com.....	52
Figure 3	Structural alignment between bovine TLR-7 (AlphaFoldDB ID: AF-A0A3Q1MK24-F1) (blue) and human TLR-7 (PDB ID: 7CYN) (green).....	53
Figure 4	Molecular docking between the BOV 13 multi-epitope protein (red) and bovine TLR-7 (blue). a: BOV 13 multi-epitope protein (red) + bovine TLR-7 (blue). b: BOV 13 multi-epitope protein (red) + bovine TLR-7 (blue) structurally aligned with human TLR-7 (green).....	53

- Figure 5 Confirmation of expression in the *E. coli* BL21 (DE3) Star strain and characterization of the BOV 13 multi-epitope protein by Western blotting. The BOV 13 multi-epitope protein has an approximate molecular weight of 33 kDa, positioned just above the molecular weight marker band (Bis-Tris 10% MES buffer) at ~31 kDa. The black arrow indicates the molecular weight marker band. The western blot was performed by Dr. Nadálin Yandra Botton. Figure 5 was created using Canva.com..... 54
- Figure 6 Antigenicity assessment of the BOV 13 multi-epitope protein by Indirect ELISA. Protein concentrations of 50 ng (orange bar), 100 ng (yellow bar), 150 ng (blue bar), and 200 ng (green bar) were tested for plate sensitization. A bovine serum sample with a neutralizing antibody titer of 128 against BoAHV-1/5 was used as the positive control, while fetal bovine serum (FBS) served as the negative control. The negative control is represented by its respective standard deviation. Figure 6 was created using Microsoft Word 360..... 55

Lista de Tabelas

Table 1	Specifications of the complete sequences of glycoproteins B, C, and D from BoAHV 1/5 according to the NCBI.....	48
Table 2	Selected peptides from the conserved regions of glycoproteins B, C, and D of BoAHV 1/5, ranked by antigenicity, for the construction of the multi-epitope protein.....	49
Table 3	Evaluation of the physicochemical properties, antigenicity, and allergenicity of the BOV 13 multi-epitope protein using the ProtParam, AlgPred, and VaxiJen tools.....	50

Sumário

1 Introdução.....	13
2 Revisão da Literatura.....	15
2.1 Histórico dos BoAHV.....	15
2.2 Taxonomia.....	16
2.3 Estrutura viral e organização genômica.....	16
2.4 Glicoproteínas.....	17
2.4.1 Glicoproteína B.....	19
2.4.2 Glicoproteína C.....	20
2.4.3 Glicoproteína D.....	22
2.5 Resposta imunológica contra os BoAHV.....	23
2.6 Aplicações das glicoproteínas B, C e D dos BoAHV em vacinologia.....	25
2.7 A imunoinformática pode ser uma estratégia para a construção de vacinas contra os BoAHV?.....	32
3 Artigo 1 Construction, expression, and characterization of a multi-epitope protein based on envelope glycoproteins B, C, and D of <i>Varicellovirus bovinealpha 1/5</i> in <i>Escherichia coli</i>.....	39
4 Considerações Finais.....	72
Referências.....	73

1 Introdução

Os Alphaherpesvirus bovinos são agentes virais de grande impacto econômico na pecuária, afetando especialmente bovinos (Silva *et al.*, 2021). Dentre suas espécies, o *Varicellovirus bovinoalpha1* (BoAHV-1) está associado a doenças respiratórias e reprodutivas, podendo levar à infertilidade e abortos (Nandi *et al.*, 2009), enquanto o *Varicellovirus bovinoalpha5* (BoAHV-5) é o principal responsável por manifestações neurológicas, incluindo encefalite letal, especialmente em animais jovens (Zajac *et al.*, 2010). Esses vírus possuem ampla distribuição mundial, o que reforça sua relevância sanitária e econômica (Can-Sahna *et al.*, 2024; Engdawork *et al.*, 2024; Hao *et al.*, 2024; Paredes-Galarza *et al.*, 2024; Petrini *et al.*, 2024; Verma *et al.*, 2024).

As doenças causadas pelos BoAHV representam um desafio significativo, especialmente para o Brasil, que possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, com cerca de 238,6 milhões de cabeças de gado (IBGE, 2023). Mais que as doenças, esses vírus possuem a capacidade de estabelecer infecções latentes em células nervosas de seus hospedeiros, que culminam com episódios imprevisíveis de reativação e excreção viral, e contribuem para a persistência da infecção nos rebanhos, especialmente em áreas endêmicas (Ostler; Jones, 2023).

Resumidamente, a partícula viral dos BoAHV é composta por um genoma de DNA linear de fita dupla, encapsulado em um capsídeo de formato icosaédrico que é imediatamente recoberto por uma camada proteica amorfa denominada de tegumento. A porção mais externa desta partícula é o envelope, e este contém inúmeras projeções de glicoproteínas que desempenham funções essenciais para a replicação e disseminação viral (Gatherer *et al.*, 2021).

As glicoproteínas B (gB), C (gC) e D (gD) dos BoAHV 1 e 5 apresentam uma alta homologia estrutural e funcional, sendo fundamentais na interação viral com receptores celulares e no processo de fusão com a célula hospedeira. Além disso, são alvos principais da resposta imunológica celular e humoral (Levings *et al.*, 2015; Rashmi *et al.*, 2024) Estudos indicam que essas glicoproteínas compartilham entre 75% e 98% de identidade na sequência de aminoácidos entre as espécies virais,

tornando-se alvos promissores para o desenvolvimento de vacinas capazes de conferir proteção cruzada contra ambos os vírus (Delhon *et al.*, 2003; Marin *et al.*, 2020). Diante da importância das glicoproteínas virais na biologia do vírus, pesquisas recentes têm direcionado esforços para o desenvolvimento de candidatos vacinais baseados nessas proteínas (Araújo *et al.*, 2018; Wen *et al.*, 2020; Quinteiro-Barbosa *et al.*, 2023; Hoa *et al.*, 2024).

Embora as vacinas convencionais tenham um papel importante no controle das infecções pelos BoAHV, suas limitações precisam ser superadas (Krishnagopal; Van Drunen Little-Van Den Hurk, 2024). As vacinas vivas atenuadas, apesar de induzirem respostas imunológicas rápidas e duradouras, podem causar abortos quando administradas em fêmeas prenhes. Já as vacinas inativadas, seguras para matrizes gestantes, frequentemente desencadeiam respostas imunes menos robustas (Pathak *et al.*, 2025).

Nesse contexto, a imunoinformática surge como uma alternativa promissora, permitindo o desenvolvimento racional de vacinas por meio de ferramentas computacionais capazes de identificar alvos imunogênicos dentro de um genoma conhecido. Essa abordagem possibilita a seleção de epítomos que sejam reconhecidos por células T e B, como ocorre com as glicoproteínas B, C e D dos BoAHV, e a execução de uma série de análises *in silico* no alvo específico de pesquisa, antes das avaliações *in vitro* e *in vivo*, reduzindo, principalmente, o tempo e os custos envolvidos na fase inicial de experimentação (Korber *et al.*, 2006; Hedge *et al.*, 2018; Mehmood *et al.*, 2021; Shawan *et al.*, 2023).

Assim, o presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de uma proteína multiepítomo a partir da combinação de epítomos imunodominantes das glicoproteínas B, C e D dos BoAHV 1 e 5, utilizando estratégias de imunoinformática. Além disso, avaliou-se seu potencial para aplicação tanto em testes diagnósticos quanto na vacinação de bovinos sob condições de campo, visando aprimorar as estratégias de controle dessas infecções.

2 Revisão da Literatura

2.1 Histórico dos BoAHV

Os alphaherpesvirus acompanharam o nascimento das civilizações e, provavelmente, a evolução dos animais que infectaram, especialmente através da sua bem-sucedida estratégia de sobrevivência que culmina em infecções latentes e hospedeiros infectados pelo resto da vida (Ujvari, 2008).

O BoAHV-1 foi primeiramente descrito na Alemanha no século XIX, mais precisamente no ano de 1841, por Büchner e Trommsdorf (1841), associado ao "Bläschenausschlag", um exantema vesicular coital. A etiologia foi confirmada em 1928, quando Reisinger e Reimann (1928) demonstraram a transmissão venérea da doença. Inicialmente, o BoAHV-1 estava restrito ao trato genital, manifestando-se como vulvovaginite pustulosa infecciosa (IPV) em fêmeas bovinas e balanopostite pustulosa infecciosa (IPB) em machos bovinos. No entanto, no ano de 1954, uma nova forma respiratória da infecção, a rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), foi identificada em confinamentos nos Estados Unidos, espalhando-se para a Europa com a importação de gado leiteiro norte-americano (Schroeder; Movs, 1954).

Atualmente, o BoAHV-1 é reconhecido como uma única espécie viral composta por três subtipos: BoAHV-1.1, BoAHV-1.2a e BoAHV-1.2b, que diferem geneticamente e em aspectos clínicos. O subtipo BoAHV-1.1 está associado a doenças respiratórias (IBR), enquanto o BoAHV-1.2a é relacionado com doença respiratória, IPV, IPB e casos de aborto. O subtipo 1.2b, em particular, não foi relacionado ao aborto, mas à IBR, IPB e IPV (Franco *et al.*, 2017). Os subtipos de BoAHV-1 são amplamente distribuídos pelo mundo (Engdawork *et al.*, 2024; Hao *et al.*, 2024; Paredes-Galarza *et al.*, 2024; Petrini *et al.*, 2024).

Já o BoAHV-5 foi reportado pela primeira vez no ano de 1962, na Austrália, por Johnston *et al.* (1962), causando encefalite em bovinos. A morfologia do vírion, o efeito citopático provocado em culturas de células e as propriedades antigênicas, levaram os pesquisadores a considerarem o vírus isolado uma variante neuropatogênica do BoAHV-1, que por muito tempo foi denominada de subtipo 1.3 (Franco *et al.*, 2017).

Posteriormente, estudos comparativos deste agente com diferentes cepas de BoAHV-1 baseados no mapeamento do sítio de restrição do DNA viral (Brake; Studdert, 1985), testes de neutralização cruzada e reatividade de anticorpos monoclonais (Metzler *et al.*, 1986) indicaram que esses subtipos virais diferiam em propriedades genômicas e antigênicas, fazendo com que o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) reconhecesse, o então subtipo 1.3 de BoAHV-1, como uma espécie viral distinta, reclassificando-o no ano de 1992 como BoAHV-5 (Roizman *et al.*, 1992). Embora o BoAHV-5 seja mais restrito a América do Sul (Franco *et al.*, 2017; Paredes-Galarza *et al.*, 2024), países como Índia (Verma *et al.*, 2024) e Turquia (Can-Sahna *et al.*, 2024) têm reportado a sua presença nos rebanhos recentemente.

2.2 Taxonomia

As espécies de Alphaherpesvirus bovinos 1 e 5, recentemente renomeadas como *Varicellovirus bovinoalpha1* (BoAHV-1) e *Varicellovirus bovinoalpha5* (BoAHV-5), estão classificadas na ordem *Herpesvirales*, família *Orthoherpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e gênero *Varicellovirus*. A família *Orthoherpesviridae* abrange, ainda, outras duas subfamílias (*Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae*), dentro das quais se encontram 17 gêneros e cerca de 105 espécies virais que afetam humanos e animais. Dentre estas espécies, 49 são classificadas na subfamília *Alphaherpesviridae*, sendo 20 delas, somente no gênero *Varicellovirus* (Gatherer *et al.*, 2021).

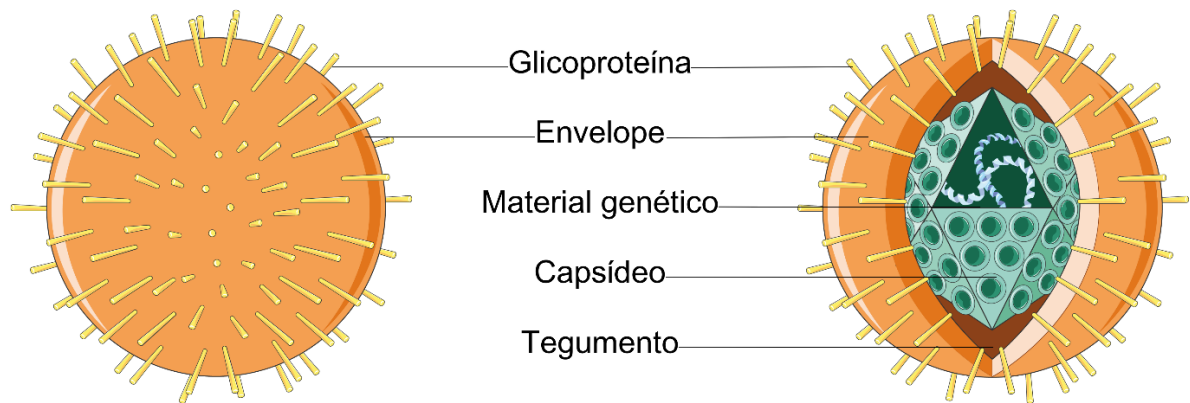
2.3 Estrutura viral e organização genômica

As partículas virais dos BoAHV são envelopadas, possuem cerca de 120-300 nanômetros (nm) de diâmetro e contêm em sua superfície numerosas protusões denominadas de glicoproteínas. Imediatamente abaixo do envelope, se encontra o tegumento, uma camada proteica amorfa que recobre o capsídeo, que por sua vez, apresenta formato icosaédrico, 100-110 nm de diâmetro e cinco proteínas conservadas (Franco *et al.*, 2017).

O genoma desses vírus é composto por uma molécula de DNA linear de fita dupla (dsDNA) com comprimento de cerca de 135 quilo pares de base (kbp) para BoAHV-1 e 137 kbp para BoAHV-5 (Engels *et al.*, 1987; Delhon *et al.*, 2003). O arranjo apresentado pelo genoma é da classe D (Ostler; Jones, 2023), podendo ser dividido em uma região única longa (UL) e uma região única curta (US), ambas flanquadas por repetições internas (IR) e terminais (TR) invertidas (Gatherer *et al.*, 2021).

O genoma de BoAHV-1 contém 70 genes, dois dos quais (bICP4 e IE/4.2) são duplicados entre as repetições invertidas (D'Offay *et al.*, 2013), enquanto o genoma de BoAHV-5 contém 72 genes, 68 dos quais estão presentes nas regiões únicas e dois reguladores (bICP4 e bICP22) que estão localizados dentro da região de repetição (Delhon *et al.*, 2003). Na Figura 1 é demonstrada uma representação esquemática da organização estrutural e genômica dos BoAHV.

(a) Estrutura viral:



(b) Organização genômica:



Figura 1. Organização estrutural e genômica dos *Varicellovirus bovinoalpha1* (BoAHV-1) e *Varicellovirus bovinoalpha5* (BoAHV-5). (a) Representação esquemática dos vírions de BoAHV-1 e BoAHV-5, contendo o envelope, advindo de secções de membranas celulares alteradas, bem como protusões denominadas de glicoproteínas, seguido por uma camada proteica amorfa chamada de tegumento, que recobre o capsídeo em formato icosaédrico e posteriormente o genoma de DNA linear de fita dupla (dsDNA) que, por sua vez, codifica 69 genes para BoAHV-1 e 72 genes para BoAHV-5. (b) Representação esquemática da organização genômica dos BoAHV-1 e BoAHV-5, demonstrando o arranjo de classe D, com as regiões única longa (UL) e única curta (US) flanqueadas por repetições internas (IR) e terminais (TR) invertidas, e por repetições diretas terminais (tdr) também em sentido invertido. A localização e a orientação dos genes que codificam as glicoproteínas B, C e D são indicadas pelas flechas azul e rosa. A região UL dos genomas dos BoAHV-1 e BoAHV-5 codificam os genes UL27 e UL44 que darão origem às glicoproteínas B (gB) e C (gC), respectivamente, e a região US, codifica o gene US6 que dará origem à glicoproteína D (gD). A flecha azul indica que a conservação média, a nível de proteína, entre os genes de BoAHV-1 e BoAHV-5 é maior que 90%, enquanto a flecha rosa indica uma conservação menor que 80%. Figura adaptada de Zajac *et al.* (2010) e Gatherer *et al.* (2021) com Canva.com.

2.4 Glicoproteínas

As glicoproteínas são, estruturalmente, moléculas compostas por uma porção proteica e cadeias de carboidratos (glicanos) covalentemente ligadas, por meio de um processo de glicosilação. Essa modificação ocorre durante a síntese proteica e o

processamento pós-traducional e pode resultar em ligações N-glicosídicas, quando o glicano é ligado ao nitrogênio da asparagina, ou O-glicosídicas, quando ocorre ligação ao oxigênio de serina ou treonina. Essas alterações estruturais conferem às glicoproteínas estabilidade, resistência à degradação enzimática e capacidade de interação com receptores celulares, sendo essenciais, desta forma, para diversas funções biológicas (Gerwig, 2021).

No caso dos BoAHV, as glicoproteínas desempenham um papel central no ciclo de infecção viral. Elas são responsáveis por funções vitais, como a adesão e entrada do vírus às células hospedeiras, fusão de membranas e disseminação viral dentro do organismo do hospedeiro (Rashmi *et al.*, 2024). O genoma dos BoAHV contém regiões específicas para a codificação das glicoproteínas. A região única longa (UL) codifica seis delas: gB (UL27), gC (UL44), gH (UL22), gL (UL1), gK (UL53) e gM (UL10). Já na região única curta (US), encontram-se os genes que codificam gG (US4), gD (US6), gL (US7) e gE (US8) (Delhon *et al.*, 2003; D'Offay *et al.*, 2013). As glicoproteínas gB, gC, gD, gH, gK e gL estão envolvidas na adesão e entrada viral, embora apenas as interações entre gB, gD, gH e gL sejam indispensáveis para a entrada nas células hospedeiras (Spear, 2004). Estudos com vírus mutantes indicam que gC, gE, gG, gL e gM não são essenciais, enquanto gB e gD são imprescindíveis para a replicação viral (Engels; Ackermann, 1996; Kaashoek *et al.*, 1998; Marawan *et al.*, 2021).

As gB, gC e gD são consideradas as glicoproteínas mais importantes para o ciclo viral dos BoAHV devido ao seu papel central em etapas críticas da infecção. Além disso, essas glicoproteínas são altamente imunogênicas e os principais alvos da resposta imunológica do hospedeiro, o que reforça sua relevância na patogênese do vírus e no desenvolvimento de estratégias de diagnóstico e vacinação contra estes agentes (Levings *et al.*, 2015; Krishnagopal; Van Drunen Little-Van Den Hurk, 2024). A escolha dessas três glicoproteínas para o desenvolvimento deste trabalho baseou-se na sua importância funcional, impacto na virulência e no ciclo infeccioso, além de sua potencial aplicabilidade como alvos estratégicos para diagnósticos e controle das infecções por BoAHV-1 e BoAHV-5. Abaixo apresentamos uma revisão direcionada para as glicoproteínas B, C e D dos BoAHV, bem como a sua aplicação em vacinologia.

2.4.1 Glicoproteína B

A glicoproteína B (gB) é codificada pelo gene UL27, localizado entre as regiões de ~55564-58365 e ~56661-59504 pares de base (bp) no genoma das espécies BoAHV-1 e BoAHV-5, respectivamente. Possui cerca de 2802 bp, 935 aminoácidos (aa) e peso molecular de cerca de 130 quilodalton (kDa) no BoAHV-1, enquanto no BoAHV-5 a mesma glicoproteína apresenta 2844 bp, cerca de 12 aminoácidos a mais (947 aa) e peso molecular semelhante à gB de BoAHV-1 (Delhon *et al.*, 2003; D'Offay *et al.*, 2013). Ainda, esta glicoproteína apresenta seis sítios de N-glicosilação na espécie BoAHV-1 e sete sítios na espécie BoAHV-5 (Quinteiro-Barbosa *et al.*, 2023).

A gB é caracterizada como uma proteína transmembrana trimérica do tipo III, essencial nos Hespesvirus bovinos (Connolly *et al.*, 2021). Em ambas as espécies de BoAHV, possui dois domínios altamente conservados, denominados de *PH-like domain 1* e *2* (Quinteiro-Barbosa *et al.*, 2023). Esses domínios são conservados também entre todos os membros da subfamília *Alphaherpesvirinae*, e possivelmente, estejam relacionados à função biológica desta proteína no ciclo viral: a ligação do vírus a receptores celulares de glicosaminoglicanos (GAGs), como o sulfato de heparan, mediando a fusão da partícula viral com a célula hospedeira (Li *et al.*, 1995; Campadelli-Fiume *et al.*, 2000). Essa glicoproteína é conservada entre todos os membros da família *Herpesviridae*, e entre os BoAHV-1 e BoAHV-5 apresenta uma identidade na sequência de nucleotídeos de 93 a 95% (Delhon *et al.*, 2003; Puentes *et al.*, 2016).

Como uma proteína de fusão, acredita-se que a gB inicie sua atividade em uma conformação de pré-fusão. Após ser ativada pela ligação ao receptor celular, juntamente com o envolvimento da gD e do complexo gH-gL, a gB sofre uma mudança conformacional e insere resíduos hidrofóbicos de sua estrutura na membrana da célula do hospedeiro, permitindo a ancoragem e subsequente dobramento da proteína sobre si mesma. Esse movimento aproxima as membranas viral e celular, culminando na fusão e na liberação do material genético viral no interior da célula. Nesse mecanismo, a região amino-terminal da gB desempenha um papel crítico ao induzir e estabilizar essas mudanças conformacionais (White *et al.*, 2008; Atanasiu *et al.*, 2010).

Estudos indicam que anticorpos neutralizantes direcionados contra a conformação de pré-fusão da gB poderiam bloquear, de forma mais eficaz, a entrada do vírus na célula, inibindo a fusão das membranas (Connolly *et al.*, 2021). Contudo, tais anticorpos ainda não foram identificados para os herpesvírus simples (HSV) ou

os BoAHV (Cairns *et al.*, 2014), o que reforça a necessidade de mais investigações. Em suporte a essa ideia, Okazari *et al.* (2006) demonstraram que a região amino-terminal da gB é essencial para a neutralização do BoAHV-1, destacando sua importância funcional e seu potencial como alvo para intervenções antivirais e terapias imunológicas.

A gB caracteriza-se como um importante alvo de anticorpos e também de células T citotóxicas (CTL) e células T auxiliares (HTL) em todos os membros subfamília *Alphaherpesvirinae*, apresentando potencial para o desenvolvimento de vacinas. A Figura 2 apresenta estrutura tridimensional da glicoproteína B de BoAHV-1 e BoAHV-5, destacando os seus dois domínios conservados *PH-like domain 1* e 2.

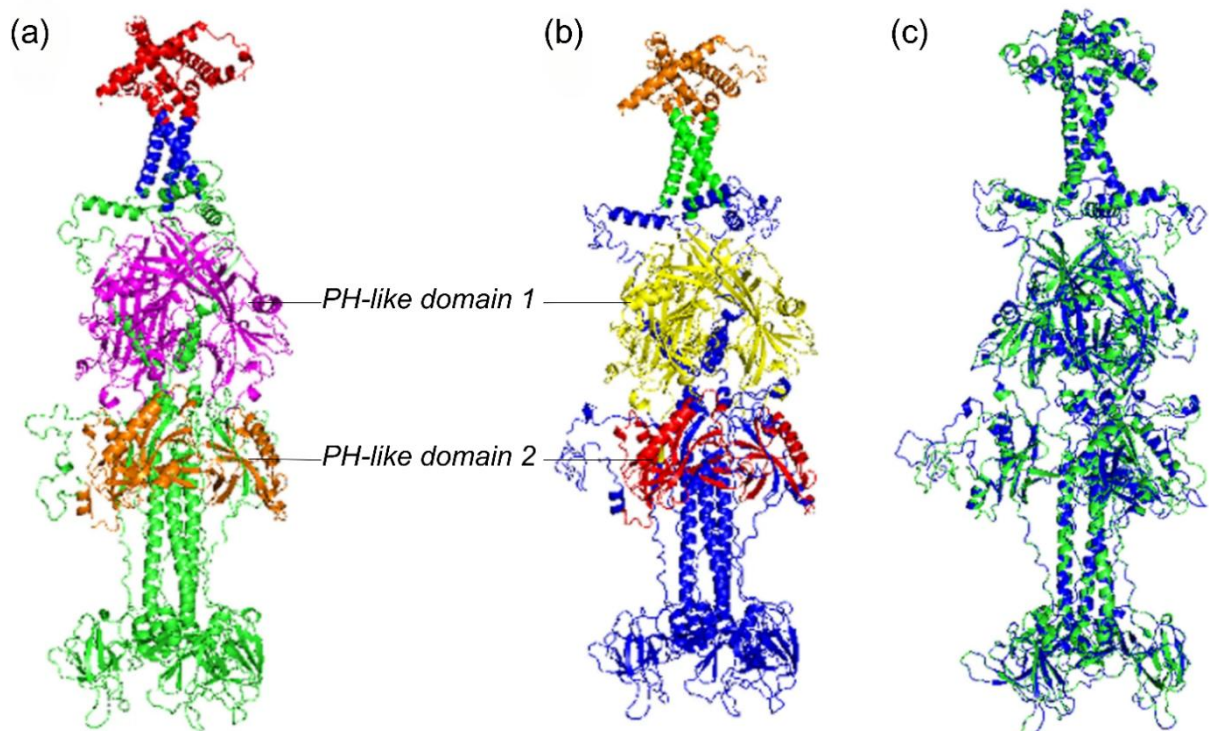


Figura 2. Modelagem da estrutura tridimensional da glicoproteína B dos *Varicellovirus bovinoalpha1* (BoAHV-1) e *Varicellovirus bovinoalpha5* (BoAHV-5). (a) Estrutura tridimensional da glicoproteína B do BoAHV-1, com o arranjo de *PH-like domain 1* demonstrado pela cor rosa e de *PH-like domain 2* demonstrado pela cor laranja. (b) Estrutura tridimensional da glicoproteína B do BoAHV-5, com o arranjo de *PH-like domain 1* demonstrado pela cor amarela e de *PH-like domain 2* demonstrado pela cor vermelha. (c) Sobreposição das estruturas tridimensionais de BoAHV-1 (demonstrada pela cor verde) e BoAHV-5 (demonstrada pela cor azul). Figura adaptada de Quinteiro-Barbosa *et al.* (2023) com Canva.com.

2.4.2 Glicoproteína C

A glicoproteína C (gC) é codificada pelo gene UL44 em ambas as espécies de BoAHV. No BoAHV-1, sua sequência genética está localizada entre as regiões ~16706-18232 bp, com um comprimento de 1527 bp, resultando em uma proteína de

508 aminoácidos (D'Offay *et al.*, 2013). No BoAHV-5, sua posição genômica encontra-se entre ~17591-19051 bp, com 1461 bp, com 486 aminoácidos (Delhon *et al.*, 2003). O peso molecular aproximado para a gC de ambas as espécies é de 91 kDa (Liang *et al.*, 1992). Além disso, em ambas as espécies virais, quatro sítios de glicosilação foram identificados para essa glicoproteína (Fitzpatrick *et al.*, 1989).

A glicoproteína C (gC) é classificada como uma proteína transmembrana dimérica do tipo I e embora seja caracterizada como não essencial para a infecção celular, gC desempenha um papel fundamental na biologia dos BoAHV, facilitando a ligação dos vírions aos receptores celulares de GAGs, especialmente ao sulfato de heparan, presentes na superfície das células hospedeiras (Kaashoek *et al.*, 1998; Robinson *et al.*, 2008).

Apesar de sua ausência não impedir a infecção viral, gC otimiza significativamente a adesão do vírus. Estudos com o HSV demonstram que a sua presença pode ampliar em quase dez vezes a eficiência da entrada viral nas células (Hilterbrand *et al.*, 2021). Quando gB, gD e o complexo gH-gL estão presentes, a entrada do vírus na célula ocorre normalmente, tornando gC tecnicamente dispensável para esse passo específico (Atanasiu *et al.*, 2010). No entanto, quando gC está presente na partícula viral, ela pode substituir a necessidade das glicoproteínas gB, gD, gH e gL para a adesão inicial aos receptores celulares (Spear *et al.*, 2000), sugerindo que esta proteína confere aos BoAHV uma vantagem competitiva na interação com o hospedeiro.

A gC dos BoAHV-1 e BoAHV-5 compartilha aproximadamente 75% de identidade na sequência de aminoácidos (Delhon *et al.*, 2003; Zajac *et al.*, 2010). As principais diferenças entre essas sequências estão concentradas no ectodomínio amino-terminal, região que está envolvida na ligação ao receptor celular (Okazaki *et al.*, 1994; Chowdhury, 1995). A alteração nessa região pode explicar o neurotropismo, neuroinvasividade e a neurovirulência expressas diferencialmente pelos BoAHV-1 e BoAHV-5. Em um modelo experimental utilizando coelhos, Chowdhury *et al.* (2000) demonstraram que a deleção da gC no BoAHV-5 reduziu sua neurovirulência, enquanto a expressão da gC do BoAHV-1 no BoAHV-5 resultou em um perfil de infecção alterado, reforçando sua influência no tropismo e patogenicidade viral.

Além disso, a gC desempenha um papel fundamental na modulação da resposta imune do hospedeiro, incluindo sua interação com componentes do sistema complemento. A gC se liga ao fragmento C3b, uma das principais moléculas do

sistema complemento, e impede a formação do complexo de ataque à membrana (MAC), inibindo não somente a lise celular, mas também a inflamação mediada por complemento. Essa interação permite que os BoAHV sobrevivam por mais tempo no organismo, facilitando a disseminação viral (Hung *et al.*, 1994; Lubinski *et al.*, 1998).

Ainda, a gC é um dos alvos imunológicos mais importantes dos BoAHV, sendo reconhecida tanto por anticorpos neutralizantes quanto por CTL e HTL (Muylkens *et al.*, 2007; Levings *et al.*, 2015). Sua exposição na superfície do vírion e sua participação na interação inicial com os receptores celulares fazem com que seja altamente imunogênica, desencadeando respostas humorais e celulares do hospedeiro (Franco *et al.*, 2017). Dessa forma, seu potencial como componente vacinal contra os BoAHV pode ser amplamente explorado.

2.4.3 Glicoproteína D

A glicoproteína D (gD) é codificada pelo gene US6, localizado entre as regiões de ~118819-120072 e ~121129-122382 bp nos genomas de BoAHV-1 e BoAHV-5, possuindo aproximadamente 1254 bp de comprimento, 417 aminoácidos e um peso molecular de cerca de 71 kDa em ambas as espécies virais (Tikoo *et al.*, 1990; Delhon *et al.*, 2003; D'Offay *et al.*, 2013). Para BoAHV-1, a gD apresenta três sítios de glicosilação, enquanto em BoAHV-5, são encontrados dois sítios (Abdelmagid *et al.*, 1995).

Esta glicoproteína de membrana do tipo I tem como função principal a interação com receptores celulares, sendo a nectina-1 o principal receptor para os BoAHV, embora também interaja com o mediador de entrada de herpesvírus (HVEM) e o sulfato de heparam modificado por 3-O-sulfotransferase, que são importantes para outras espécies virais (Spear *et al.*, 2000). A gD exibe aproximadamente 98% de identidade nas sequências de aminoácidos entre BoAHV-1 e BoAHV-5. A maior parte da região amino-terminal é bem conservada, enquanto as diferenças mais significativas entre essas espécies estão localizadas na porção carboxi-terminal do ectodomínio da proteína, próximo à região transmembrana (Abdelmagid *et al.*, 1995; Gabev *et al.*, 2010; Zajac *et al.*, 2010).

A região carboxi-terminal da gD desempenha um papel essencial na ativação do processo de fusão viral e na interação com cofatores celulares indispensáveis para a entrada do vírus. Esta porção está envolvida na transdução do sinal de ligação ao receptor, o que permite que a gD desencadeie mudanças conformacionais nas

glicoproteínas de fusão, como gB e o complexo gH-gL, facilitando a fusão do envelope viral com a membrana plasmática da célula hospedeira (Gianni *et al.*, 2009; Gallagher *et al.*, 2013).

O estudo de Yue *et al.* (2020) explora o papel do motivo PxxW na porção carboxi-terminal do ectodomínio da gD de herpesvírus como HSV-1, PRV e BoAHV-1, na regulação da interação com a nectina-1. Esse motivo, presente na região carboxi-terminal, forma uma estrutura que bloqueia parcialmente o sítio de ligação à nectina-1, diminuindo a afinidade da interação. Como resultado, a gD completa tem uma afinidade 80 vezes menor pela a nectina-1 quando comparada com variantes truncadas, que não possuem essa região terminal. A presença do motivo PxxW nas espécies HSV-1, PRV e BoAHV-1 reduz a taxa de associação da gD com a nectina-1, tornando a interação mais lenta, enquanto as formas truncadas de gD, sem essa porção, apresentam uma ligação mais rápida. As variações estruturais na gD entre BoAHV-1 e BoAHV-5, especialmente nesta região carboxi-terminal, podem ser responsáveis pelas diferenças observadas nos perfis de neuroinvasividade e neurovirulência entre essas duas espécies virais, além das variações na glicoproteína C.

O papel da gD no estágio inicial da infecção pelos BoAHV e sua abundância no envelope viral tornam-a um alvo central do sistema imunológico do hospedeiro. De fato, entre as glicoproteínas dos herpesvírus bovinos, a gD é a mais amplamente estudada para o desenvolvimento de vacinas e testes imunodiagnósticos, dada sua importância na indução de respostas imunes eficazes (Babiuk *et al.*, 1996; Muylkens *et al.*, 2007; Krishnagopal; Van Drunen Littel-Van Den Hurk, 2024).

2.5 Resposta imunológica contra os BoAHV

As infecções por BoAHV-1 e BoAHV-5 são capazes de desencadear respostas imunes inatas e adaptativas no hospedeiro. Inicialmente, a resposta imune é mediada por células da imunidade inata, especialmente macrófagos, células dendríticas (DCs) e células *natural killer* (NK), que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) através de receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs), ou, no caso das células NK, que detectam, especialmente, a regulação negativa na expressão do complexo de histocompatibilidade principal I (MHC-I). Esses mecanismos ativam vias de sinalização celulares que levam a produção de citocinas e quimiocinas comprometidas com o controle da infecção (Righi *et al.*, 2023). O IFN-

I, por exemplo, pode ser detectado 5 horas (h) depois da infecção por BoAHV-1, com pico na secreção nasal e no sangue cerca de 36 a 72 h após (Ohmann; Babiuk, 1985). Além disso, Palmer *et al.* (1990) demonstraram que as células NK, em particular, reconhecem as glicoproteínas B e D de BoAHV-1 e promovem atividade citolítica nas células infectadas.

No entanto, as respostas inatas não são suficientes para controlar completamente a infecção, mas a sua magnitude influencia fortemente a robustez da resposta adaptativa (Krishnagopal; Van Drunen Littel-Van Den Hurk, 2024). A resposta do linfócito T citotóxico (CTL), comprometido com a eliminação das células infectadas, é particularmente importante para esta infecção devido a capacidade dos BoAHV em se espalharem de célula para célula (Raaperi *et al.*, 2014). Denis *et al.* (1993) identificou as glicoproteínas C e D dos BoAHV como alvos da resposta imune mediada por células T CD8+. Além disso, as células T *helper* (HTL) que abrangem o subconjunto Th1, comprometidas com a defesa contra patógenos intracelulares, promovendo a citotoxicidade e a produção de interferon gama (IFN- γ), e Th2, caracterizada por desencadear a produção de anticorpos, também estão envolvidas na resposta contra os BoAHV (Righi *et al.*, 2023). As glicoproteínas B, C e D já foram descritas como alvos das células T CD4+ (Tikoo *et al.*, 1995). As células T $\gamma\delta$, que desempenham papéis semelhantes às células NK e aos CTL e que representam cerca de 60% do total de células T circulantes em ruminantes, também são importantes no combate a infecção (Baldwin *et al.*, 2021). Estudos de Amadori *et al.* (1995) e Endsley *et al.* (2002) demonstraram um aumento dessas células no sangue periférico após a exposição dos animais ao BoAHV-1.

Os anticorpos são, também, constituintes fundamentais na imunidade contra os BoAHV-1 e BoAHV-5, especialmente durante a exposição secundária ao vírus (Muylkens *et al.*, 2007). Durante a infecção primária, eles não estão presentes em níveis suficientes para impedir a disseminação viral, mas à medida que a recuperação avança, eles começam a ser produzidos e desempenham um papel protetor, especialmente as classes IgG e IgA (Zajac *et al.*, 2010). A neutralização do vírus extracelular por anticorpos é essencial para impedir a sua propagação e para limitar as consequências da reativação do vírus. Além da neutralização, os anticorpos podem mediar a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) e a ativação do sistema complemento, contribuindo para a eliminação de células infectadas (Abbas *et*

al., 2023). As glicoproteínas B, C e D dos BoAHV já foram descritas como alvos de anticorpos totais e neutralizantes (Marshall *et al.*, 1998; Levings *et al.*, 2015).

2.6 Aplicações das glicoproteínas B, C e D dos BoAHV em vacinologia

Diante da importância das glicoproteínas B, C e D no ciclo viral e na indução da resposta imune contra os BoAHV, é natural que as pesquisas sobre estratégias vacinais para esses agentes se concentrem nessas proteínas. Em particular, vacinas de subunidade, vacinas vetorizadas e vacinas de DNA têm sido exploradas como abordagens promissoras para otimizar a imunogenicidade e a proteção contra a infecção, investigando especificamente estes alvos do envelope viral, e uma diversidade de adjuvantes (Krishnagopal; Van Drunen Littel-Van Den Hurk, 2024). Abaixo apresentamos alguns estudos relacionados com a utilização das glicoproteínas em conjunto ou isoladas como candidatas vacinais.

Wen *et al.* (2020) construíram uma vacina de subunidade com epítomos das glicoproteínas B, C e D do BoAHV-1 unidos pelo ligante AAYAAY e fusionados com um epítipo universal de células T CD4⁺ da toxina tetânica P2 e com a interleucina 6 (IL-6) bovina (BoIL-6) ou IL-6 de rato (RaIL-6), que foram expressos em sistema procarioto. Coelhos foram imunizados via intramuscular com 100 µg de cada formulação em três doses, além do controle positivo com uma vacina inativada contra BoAHV-1, com intervalo de 21 dias. P2-gD/gC/gB-BoIL-6 gerou níveis mais elevados de anticorpos específicos para BoHV-1, anticorpos neutralizantes, IFN-γ e interleucina 4 (IL-4) em comparação com as demais formulações. Além disso, esses animais reduziram drasticamente a eliminação viral e lesões teciduais nos pulmões e traqueia após desafio viral e reativação em comparação com os animais que receberam as outras formulações. Os animais também não apresentaram reações adversas à vacinação, tornando a proteína um potencial candidato a vacina para controlar a doença provocada por BoAHV-1, especialmente em vacas prenhes.

A inoculação das mesmas glicoproteínas (em conjunto ou individualmente) com o adjuvante Avridine em bovinos, em duas doses vacinais de 2 mL pela via intramuscular, induziram altos níveis de anticorpos, além de protegerem contra a doença provocada por BoAHV-1. No entanto a infecção não foi impedida, embora ocorreu em menor proporção quando comparada com a infecção nos animais dos grupos controles. A disseminação sistêmica do vírus também pareceu não ocorrer nos

grupos tratamentos, pois não houve alteração drástica da função dos leucócitos após o desafio viral (Babiuk *et al.*, 1987).

Em um estudo recente, Liu *et al.* (2021) investigaram a aplicação das glicoproteínas gB, gC e gD em uma vacina de DNA. Para isso, construíram plasmídeos expressando essas glicoproteínas, os quais foram conjugados a esferas magnéticas de polietilenoimina (PEI) e encapsulados em polietilenoglicol (PEG) 600 para administração intranasal em camundongos, em duas doses vacinas de 5 µg, com um intervalo de um mês entre as aplicações. A expressão das proteínas virais foi amplamente detectada no pulmão dos camundongos vacinados, demonstrando a eficiência da entrega do DNA. A vacina mostrou-se segura em experimentos *in vivo*, embora tenha sido observada uma toxicidade transitória de curta duração. A resposta humoral foi robusta, com níveis significativamente elevados de anticorpos IgG e IgA nos camundongos vacinados, especialmente naqueles que receberam a formulação contendo PEI e PEG, em comparação com os grupos controle e aqueles imunizados sem esses adjuvantes. Notavelmente, os níveis de anticorpos permaneceram elevados até a 17^a semana após a vacinação, indicando uma resposta duradoura. Além disso, a formulação contendo DNA+PEI+PEG induziu títulos significativamente mais altos de anticorpos neutralizantes em comparação com os demais grupos. A análise do perfil de citocinas e a elevação na porcentagem de células T CD4⁺ e CD8⁺ sugeriram que a vacina foi capaz de desencadear uma forte resposta imune celular.

Além da utilização das três glicoproteínas, a combinação gB-gD em uma vacina de DNA também foi avaliada em camundongos. Cinco inoculações pelas vias intramuscular (2), subcutânea (1) e intranasal (2) foram realizadas com intervalos de duas semanas e dose de 50 µL. Os resultados mostraram que a vacina induziu uma resposta imune significativa, com a produção de anticorpos totais IgG e IgA e anticorpos neutralizantes contra o BoHV-1, além da ativação de células T. Além disso, observou-se uma melhora na resposta imune quando comparada à administração individual dos genes, sugerindo que a combinação das glicoproteínas pode potencializar a imunogenicidade da vacina (Caselli *et al.*, 2005).

Devido a sua importância como alvos imunogênicos, essas glicoproteínas também foram analisadas separadamente como candidatas em diferentes plataformas vacinais.

Hou *et al.* (2022) imunizaram *guinea pigs* com duas doses da glicoproteína B recombinante purificada expressa em sistema procarioto emulsificada com adjuvante

de Freund (100 µg/dose), em intervalo de 14 dias. Como controle positivo uma vacina composta por BoAHV-1 inativado e adjuvante de Freund foi utilizada. Os resultados indicaram que os animais imunizados com a vacina de subunidade de gB produziram altos níveis de anticorpos totais anti-gB e anticorpos neutralizantes. Esta vacina também reduziu significativamente a eliminação viral e os danos ao tecido pulmonar após o desafio com BoAHV-1. No entanto, seu efeito foi menor em comparação ao da vacina com BoAHV-1 inativado. Os autores acreditam que a glicosilação dessa proteína pode estar associada com a geração da imunidade contra o BoAHV.

Também relacionado à gB, Quinteiro-Barbosa *et al.* (2023) desenvolveram uma proteína recombinante composta pelos *PH-like domain 1* do BoAHV-1 e *PH-like domains 2* do BoAHV-5. A proteína foi expressa em *Komagataella phaffii* e os adjuvantes Montanide™ ISA 50 V2 ou Hidróxido de alumínio foram adicionados. Os candidatos vacinais foram avaliados em camundongos, administrados com 50 µg de cada formulação pelas vias intramuscular e subcutânea, em três doses, com duas semanas de intervalo. Uma vacina comercial inativada foi incluída no experimento como controle positivo. A imunidade a nível de anticorpos neutralizantes gerada pela formulação contendo o adjuvante Montanide™ ISA 50 V2, inoculada pela via intramuscular, foi superior às demais formulações e vias de aplicação já aos 14 dias após a primeira imunização. A imunidade gerada por essa formulação manteve-se superior às demais até o fim do período experimental, 14 dias após a terceira imunização. A imunização também não gerou reações adversas nos animais vacinados.

A gC foi avaliada como antígeno em uma vacina de DNA por Gupta *et al.* (2001). No estudo, bezerros foram imunizados mensalmente através da injeção de um plasmídeo codificante da gC, por via intramuscular (IM) (500 µg) ou intradérmica (ID) (250 µg), totalizando seis doses. A resposta imune induzida pela via ID foi superior à da via IM em termos de imunogenicidade. No entanto, quando os animais foram desafiados com o BoAHV-1, a via ID mostrou-se menos eficaz na proteção. Após o desafio viral, todos os bezerros imunizados apresentaram um aumento nos títulos de IgG já no terceiro dia, indicando uma resposta anamnésica, enquanto o grupo controle não imunizado desenvolveu anticorpos neutralizantes apenas no sétimo dia. Os bezerros imunizados exibiram um leve aumento na temperatura corporal e sintomas clínicos brandos, e aqueles vacinados pela via IM eliminaram o vírus mais precocemente em comparação com os imunizados por via ID. Esses achados

sugerem que a vacinação de DNA com gC pode induzir a produção de anticorpos neutralizantes e ativar células B de memória com potencial resposta linfoproliferativa ao BoAHV-1 em bovinos. No entanto, a imunidade gerada não foi suficiente para conferir proteção completa contra o desafio viral. Toussaint *et al.* (2005) demonstraram que plasmídeos que codificavam a gC não induziram imunidade protetora em bovinos, enquanto aqueles que codificaram a gD provocaram um grau mais alto de proteção contra o desafio de BoAHV-1.

A glicoproteína D é a proteína virai mais investigada para o desenvolvimento de vacinas e tem sido amplamente estudada ao longo dos anos. Pesquisas recentes destacam seu uso em diferentes plataformas vacinais, incluindo vacinas de DNA, vetorizadas e de subunidade, reforçando seu potencial como um alvo imunogênico promissor.

Kornuta *et al.* (2021a) desenvolveram uma vacina de DNA expressando uma forma truncada da glicoproteína D (gD), encapsulada em uma formulação lipossomal contendo LPS e MAN α 1-2MAN-PEG-DOPE (pCIgD-Man-L). A imunização de bovinos e camundongos com essa formulação resultou em uma resposta imune aprimorada em ambos os modelos animais. No que se refere à imunidade humoral, observou-se um aumento significativo nos níveis de anticorpos totais no soro dos animais vacinados. Já em relação à imunidade celular, a formulação pCIgD-Man-L induziu uma resposta proliferativa significativamente maior contra o BoAHV-1 em comparação à vacina contendo o plasmídeo não encapsulado. Além disso, a estimulação de células dendríticas bovinas com a formulação completa levou à regulação positiva da molécula CD40 em sua superfície, sugerindo um aprimoramento da resposta imune inata. Após o desafio viral, os bovinos imunizados com pCIgD-Man-L apresentaram menor excreção viral, indicando uma proteção mais eficaz.

Os mesmos autores também avaliaram uma abordagem alternativa utilizando uma vacina de DNA contendo um plasmídeo expressando a gD e outro expressando o ligante do CD40 (CD40L), uma molécula coestimuladora presente transitoriamente em células T CD4⁺ ativadas e, em menor extensão, em células B e plaquetas ativadas. Esses plasmídeos foram combinados com o adjuvante Montanide™ GEL01 e administrados por via ID em bovinos, em três doses. Os resultados demonstraram que a inclusão do plasmídeo CD40L com GEL01 potencializou a resposta imune induzida pelo pCIgD, aumentando significativamente os níveis de IgG total anti-BoAHV-1, bem como das subclasses IgG1, IgG2 e anticorpos neutralizantes no soro.

Após o desafio viral, os bovinos vacinados com pCIgD-GEL01-CD40L apresentaram uma redução expressiva na excreção viral e na pontuação clínica da infecção. Aproximadamente 80% dos animais desse grupo também exibiram anticorpos IgG1 anti-BoAHV-1 específicos em swabs nasais. Além disso, os PBMCs desses animais mostraram a maior taxa de resposta linfoproliferativa positiva ao vírus, além de níveis significativamente elevados de IFN- γ e IL-4, evidenciando a ativação da resposta imune celular (Kornuta *et al.*, 2021b).

Além desses estudos, Manoj *et al.*, (2004), Toussaint *et al.* (2005), Snider *et al.* (2008), Mackenzie-Dyck *et al.* (2014) e Quattrocchi *et al.*, (2017) também demonstraram a funcionalidade de vacinas de DNA baseadas na glicoproteína D do BoAHV-1. Esses achados reforçam o potencial deste componente viral em vacinas de DNA, mas também demonstram a importância da utilização de substâncias adjuvantes para melhorar a eficiência da imunização.

Já o estudo de Bilge-Dagalp *et al.* (2021) desenvolveu um clone infeccioso do genoma BoAHV-4 carregando um vetor de cromossomo artificial bacteriano (BoAHV-4-BAC) e explorado para expressar uma forma truncada de glicoproteína D (tgD) do BoAHV-1 (BoHV-4-tgD Δ TK) como um candidato a vacina. A imunogenicidade desta construção foi comparada a um vetor de DNA expressando o mesmo antígeno (pC-tgD) em modelo murino. Os resultados demonstraram que a imunização induziu a produção significativa de anticorpos contra a gD de BoAHV-1, especificamente da classe IgG3 quando os animais foram vacinados com BoAHV-4-tgD Δ TK. O título de anticorpos neutralizantes também foi significativamente maior no grupo que recebeu essa vacina. Em comparação com pC-tgD, BoAHV-4-tgD Δ TK provocou maiores respostas de IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 e TNF-alfa no sobrenadante de esplenócitos estimuladas por vírus. Esses achados sugerem que o BoAHV-4 recombinante pode ser, também, uma plataforma promissora para o desenvolvimento de vacinas contra o BoAHV-1, podendo contribuir para estratégias de controle da infecção em bovinos.

O estudo de Ferrer *et al.* (2011) demonstra que uma vacina baseada em um vetor do vírus vaccínia Ankara (MVA) expressando a versão secretada da gD de BoAHV-1, acrescida com a toxina da cólera, e inoculada em camundongos e coelhos, também pode induzir imunidade humoral a nível de IgA e IgG, além de proteger contra a doença causada por BoAHV- após desafio viral. Gogev *et al.* (2004) demonstrou o adenovírus humano tipo 5 como vetor viral, expressando a gD de BoAHV-1, e

utilizando a quitosana como sistema de entrega para a administração nasal em bovinos.

Por fim, a gD também foi amplamente explorada como proteína recombinante em diversos ensaios para o desenvolvimento de vacinas. Dummer *et al.* (2014) e Araújo *et al.* (2018) avaliaram a resposta imune de camundongos e bovinos, respectivamente, após a imunização com a gD recombinante do BoAHV-5 (rgD5) produzida em *Pichia pastoris* e incorporada em diferentes formulações vacinais.

No experimento com camundongos, uma dose de 40 µg de rgD5 foi utilizada em três aplicações com intervalos de 14 dias. A maioria das formulações induziu resposta imune humoral já após a primeira inoculação, exceto quando a rgD5 foi administrada via subcutânea sem adjuvante, onde a produção de anticorpos só foi detectada após a terceira dose. As formulações contendo adjuvantes oleosos (Montanide™ ISA 50 V2, Emulsigen e Emulsigen-DDA) geraram títulos mais elevados de anticorpos neutralizantes em comparação com aquelas sem adjuvante. Além disso, as vacinas com rgD5 estimularam a expressão elevada de mRNA de IFN-γ e IL-17, indicando uma resposta imune celular robusta (Dummer *et al.*, 2014).

Para os bovinos, foram administradas duas doses com intervalo de 26 dias, seguidas de uma dose de reforço após 357 dias, utilizando 100 µg de rgD5, além de formulações com o BoAHV-5 inativado (iBoAHV-5) + rgD5 e diferentes adjuvantes. As vacinas formuladas com BoAHV-5 inativado (iBoAHV-5) + rgD5 promoveram um aumento de cinco vezes nos níveis de IgG total contra BoAHV-5, BoHV-1 e rgD5, em comparação com a vacina comercial e o grupo controle negativo. Além disso, observou-se um aumento significativo nos níveis de IgG1 e IgG2a para rgD5, e os títulos de anticorpos neutralizantes contra BoAHV-1 e BoAHV-5 foram quatro vezes superiores nas vacinas contendo iBoAHV-5 + rgD5.

Araújo *et al.* (2023) demonstraram, ainda, que esta mesma vacina, composta por iBoAHV-5 (1,5 mL) + rgD5 (100 mg), adjuvada com Montanide™ ISA V2 (50%), induziu respostas de anticorpos de longa duração, provocando também, a transcrição de mRNA de Bcl6 e CXCR5, que medeiam células B de memória e células plasmáticas de longa vida em centros germinativos. Além disso, os autores também observaram respostas mais altas e mais precoces de IgG total específico para rgD5 e a regulação positiva da transcrição de mRNA de IL2, IL4, IL10, IL-15 e IFN-γ, indicando uma resposta imune mista.

Os resultados conjuntos dessas pesquisas demonstram que a rgD5 expressa em *Pichia pastoris* provavelmente preservou epítomos imunogênicos essenciais, sendo capaz de induzir respostas imunes humorais e celulares robustas em camundongos e bovinos, reforçando seu potencial como um antígeno vacinal promissor contra os BoAHV.

Em um estudo recente, publicado em dezembro de 2024 por Hoa *et al.* (2024), foram avaliadas as respostas imunológicas induzidas pelo ectodomínio da glicoproteína D (gD) do BoAHV-5, expresso em *Escherichia coli* (EgD) e em baculovírus (BgD). A imunização foi realizada em bovinos (200 µg) e camundongos (5 µg), utilizando formulações adjuvadas com Montanide™ ISA 206 VG na proporção 1:1. As vacinas foram administradas em duas doses, com intervalos de 14 dias, sendo 0,2 mL por dose para camundongos e 0,5 mL para bovinos.

Os resultados mostraram que ambas as formulações induziram níveis semelhantes de IgG total em camundongos. No entanto, a vacina contendo BgD gerou títulos de anticorpos neutralizantes aproximadamente três vezes superiores aos induzidos pela vacina com EgD. Em bovinos, o perfil da resposta de IgG total foi semelhante ao observado em camundongos, mas nenhum dos tratamentos foi eficaz na indução de anticorpos neutralizantes. Esses achados indicaram que, embora a BgD tenha se mostrado mais imunogênica do que a EgD, ainda é necessário aprimoramentos, especialmente no que tange ao sistema de expressão e possivelmente dose de inoculação para estimular uma resposta imune protetora eficaz em bovinos (Hoa *et al.*, 2024).

Além desses, outros estudos acerca do desenvolvimento de vacinas utilizando a gD como antígeno recombinante estão disponíveis na literatura. (Gifford *et al.*, 1990; Van Donkersgoed *et al.*, 1994; Ioannou *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2018).

Fica evidente ao longo dos estudos apresentados a relevância das glicoproteínas B, C e D virais na vacinologia, especialmente no desenvolvimento de formulações imunogênicas contra os BoAHV. No entanto, na maioria dos casos, essas aplicações permanecem restritas a modelos experimentais, sem uma transposição efetiva para as espécies-alvo. Além disso, muitas pesquisas consideram apenas um dos vírus isoladamente, sem abordar a necessidade de proteção conjunta contra BoAHV-1 e BoAHV-5, apesar de ambos apresentarem impacto econômico e sanitário significativo. Isso ressalta a importância de avançar na validação de formulações em

bovinos, garantindo que as vacinas desenvolvidas sejam eficazes e aplicáveis na prática pecuária contra ambos os agentes.

2.7 A imunoinformática pode ser uma estratégia para a construção de vacinas contra os BoAHV?

A imunoinformática é um campo emergente que utiliza ferramentas computacionais para prever e analisar interações entre componentes do sistema imunológico e antígenos, otimizando o desenho racional e facilitando o desenvolvimento de imunobiológicos. A combinação entre imunologia, bioinformática e inteligência artificial, fornecida por esse campo das ciências, melhora a precisão na escolha de alvos imunológicos, reduzindo, principalmente, o tempo e os custos envolvidos na fase inicial de experimentação (Korber et al., 2006; Hegde et al., 2018; Mehmood et al., 2021).

O primeiro exemplo de uso da imunoinformática para a construção racional de uma vacina iniciou através do sequenciamento do genoma completo da cepa MC58 da bactéria *Neisseria meningitidis*. A seleção dos alvos antigênicos para uma vacina meningocócica do sorogrupo B iniciou no ano de 2000, e os últimos resultados, relacionados à imunogenicidade do candidato vacinal em camundongos, foi publicado no ano de 2011, demonstrando altos níveis de anticorpos neutralizantes e proteção cruzada contra três variantes avaliadas (Tettelin et al., 2000; Pizza et al., 2000; Giuliani et al., 2006; Scarselli et al., 2011).

No que tange a vacinas virais baseadas na imunoinformática, a primeira delas foi desenvolvida por McLellan et al. (2013), levando em consideração a glicoproteína de fusão (F) do vírus sincicial respiratório humano (hRSV). O estudo utilizou modelagem estrutural para projetar um antígeno mais eficaz, priorizando a estabilização do sítio antigênico Ø, uma região crítica do estado de pré-fusão da glicoproteína F, alvo de anticorpos neutralizantes altamente potentes. Para garantir a estabilidade desse sítio imunogênico, os pesquisadores modificaram a estrutura proteica introduzindo resíduos de cisteína e preenchendo cavidades hidrofóbicas, o que permitiu que a proteína resistisse a variações de pH e temperatura. Ensaios em camundongos e macacos demonstraram que as variantes estabilizadas da proteína F induziram uma resposta imune robusta, com níveis elevados de anticorpos neutralizantes, ultrapassando significativamente o limite necessário para proteção

contra o vírus e apresentando desempenho superior à vacina comercial utilizada nos testes.

Mas quais abordagens são utilizadas pelos pesquisadores para a construção de vacinas baseadas na imunoinformática? Elas podem ser aplicáveis aos BoAHV? Vamos começar pelos bancos de dados, que permitem o acesso a uma quantidade imensa de informações sobre uma diversidade de organismos, incluindo a sua sequência biológica. Entre os bancos de dados mais utilizados estão o NCBI (National Center for Biotechnology Information) e o Uniprot (Universal Protein Resource) (Hegde *et al.*, 2018; Mehmood *et al.*, 2021). Os algoritmos de mineração dos dados compõe a outra parte da resposta. É através deles que somos capazes de realizar as predições baseadas na sequência biológica de um organismo de interesse. As ferramentas disponíveis para as etapas críticas de construção de vacinas, imunoterapias e até mesmo adjuvantes foram revisadas por Bahrami *et al.* (2019) e Shawan *et al.* (2023). Por fim, mas não menos importante, SIM! As ferramentas disponíveis são aplicáveis a muitos microrganismos, inclusive os de interesse veterinário, como os BoAHV (Pathak *et al.*, 2025).

A primeira parte do processo de construção de qualquer vacina inclui compreender quais são os alvos imunológicos dentro da sequência biológica de um organismo. Por isso, são realizadas predições de epítomos que possam ser reconhecidos por células B, células CTL e células HTL. Pelo menos 17 ferramentas estão disponíveis para a predição de epítomos de células B e 24 para os de células T (Bahrami *et al.*, 2019). A capacidade de indução de citocinas por epítomos HTL também pode ser avaliada. Especificamente três softwares estão disponíveis: IFNepitope, que avalia a capacidade de indução de IFN- γ , IL4pred e IL10pred que avaliam a capacidade de indução de IL-4 e IL-10, respectivamente (Wang *et al.*, 2008; Dhanda *et al.*, 2013; Nagpal *et al.*, 2017).

Para a construção do que os pesquisadores chamam de proteína multiepítopo, é necessário a inserção de ligantes entre os epítomos, que os mantém unidos. Uma série de ligantes já foi determinada e estes podem ser utilizados de acordo com suas funções biológicas e estruturais. Alguns exemplos são os ligantes AAY, GPGPG, KK, GGGGS e EAAAK (Patel *et al.*, 2022; Shawan *et al.*, 2023). O trabalho de Wen *et al.* (2020) demonstrou que uma vacina de subunidade construída com epítomos das glicoproteínas B, C e D de BoAHV-1 unidos através do ligante AAY em tandem foi

mais eficiente na geração de resposta imunológica em coelhos quando comparado aos mesmos epítomos unidos por GGGGS.

A próxima etapa do trabalho envolve a avaliação detalhada das características do produto construído, garantindo sua viabilidade como candidato vacinal. Entre as principais análises, destacam-se a antigenicidade, propriedades físico-químicas e alergenicidade (Mehmood *et al.*, 2021; Shawan *et al.*, 2023). A predição da antigenicidade pode ser realizada pelos softwares ANTIGENpro e VaxiJen, sendo este último o mais utilizado (Bahrami *et al.*, 2019). Para avaliar as propriedades físico-químicas, a ferramenta ProtParam é indicada pois fornece informações essenciais, como peso molecular, ponto isoelétrico (pI) da molécula, índice de instabilidade, estabilidade térmica, solubilidade e tempo de meia-vida em diferentes sistemas de expressão heterólogos, além de outras análises importantes para a compreensão da estrutura primária do produto (Singh *et al.*, 2016; Ribeiro *et al.*, 2024). Já a análise de alergenicidade conta com cerca de nove plataformas disponíveis, permitindo uma avaliação direcionada da segurança do constructo (Bahrami *et al.*, 2019).

A predição da estrutura secundária do mRNA e da proteína construída também podem ser realizadas, fornecendo *insights* importantes sobre sua estabilidade estrutural e eficiência de tradução (Bahrami *et al.*, 2019; Mehmood *et al.*, 2021). No entanto, a maioria dos estudos não inclui essa etapa em suas análises, avançando diretamente para a modelagem estrutural da proteína e a realização de *docking* molecular (Ribeiro *et al.*, 2024). Esse processo visa prever a afinidade de ligação, através da energia de interação, entre o imunógeno com moléculas-alvo do sistema imune como, por exemplo, os TLRs (Bagal *et al.*, 2022). Servidores como HADDOCK, ZDOCK, pyDock e ClusPro estão disponíveis para esta avaliação (Porter *et al.*, 2019). Para uma análise mais refinada, a dinâmica molecular permite avaliar a estabilidade da interação ao longo do tempo, considerando fatores como temperatura e flexibilidade molecular (Morris; Corte, 2021; Singh *et al.*, 2022). Essas avaliações combinadas possibilitam uma triagem eficiente do produto construído antes da validação experimental, otimizando o desenvolvimento de vacinas em termos de custo, tempo e eficiência.

Como já comentado anteriormente, a imunoinformática para construção de vacinas não se limita a saúde humana. Com as doenças animais sendo responsáveis por mais de 20% das perdas na produção global (Karmacharya *et al.*, 2024), é natural que essa área do conhecimento sirva também para o desenvolvimento de imunizantes

mais eficazes contra doenças infecciosas em animais de produção e companhia (Pathak *et al.*, 2025). Especificamente para microrganismos virais que acometem bovinos, a imunoinformática já chegou muito longe, e pode auxiliar também na construção de imunógenos mais eficientes contra os BoAHV.

Os estudos de Riaz *et al.* (2024) e Wei *et al.* (2025) evidenciam o potencial da imunoinformática no desenvolvimento de candidatos vacinais contra o vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV). Ambos utilizaram abordagens computacionais para identificar epítomos imunogênicos das proteínas virais, permitindo a construção de imunógenos otimizados. No estudo de Riaz *et al.* (2024), os pesquisadores projetaram uma vacina multiepítomo composta por epítomos das proteínas E1, E2, E_{ns} e NS3, selecionados por sua capacidade de ativar CTL e células B. Esses epítomos foram conectados pelo ligante GP GPG, enquanto a subunidade B da toxina da cólera, utilizada como adjuvante de mucosa, foi incorporada ao imunógeno por meio do ligante EAAAK. Análises de docking molecular demonstraram uma forte interação entre a construção vacinal e o receptor TLR-3, enquanto simulações de dinâmica molecular confirmaram sua estabilidade estrutural em ambiente biológico.

A pesquisa de Wei *et al.* (2025) adotou uma estratégia semelhante, porém focada exclusivamente nas glicoproteínas E0 e E2 de diferentes subtipos de BVDV. Foram selecionados epítomos imunodominantes para CTL, HTL e células B, conectados pelos ligantes AAY, GP GPG e KK, respectivamente. Além disso, a β -defensina-3 foi utilizada como adjuvante molecular, vinculada ao constructo pelo ligante EAAAK. O docking molecular indicou que dois dos imunógenos projetados estabeleceram interações estáveis com os receptores TLR-2 e TLR-4, com a ligação confirmada por simulações dinâmicas. A simulação imunológica revelou o potencial dessas construções em induzir altos níveis de IgM, IgG, IFN- γ e IL-2, essenciais para uma resposta imune eficaz contra o BVDV. Além disso, a clonagem *in silico* previu uma expressão eficiente dos imunógenos em sistemas de *E. coli*. Esses estudos reforçam o papel da imunoinformática na aceleração do desenvolvimento de vacinas contra doenças que impactam significativamente a pecuária, embora ensaios experimentais na espécie-alvo sejam essenciais para validar a eficácia das formulações projetadas.

Candidatos vacinais contra o coronavírus bovino (BCoV) também foram projetados utilizando abordagens imunoinformáticas. Jiang *et al.* (2024) selecionaram epítomos de CTL, HTL e células B a partir do proteoma viral e construíram seis

candidatos vacinais incorporando três adjuvantes moleculares distintos: β -defensina-3, a proteína de adesão de hemaglutinina ligada à heparina (HBHA) de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* e a proteína ribossômica L7/L12 de *Mycobacterium tuberculosis*. Após análises de antigenicidade, solubilidade, alergenicidade e propriedades físico-químicas, um dos constructos foi selecionado para estudos mais aprofundados. O docking e a dinâmica molecular demonstraram uma forte interação entre o candidato vacinal e os receptores TLR-4, MHC-I e MHC-II, indicando um potencial robusto de ativação imune. Além disso, a clonagem *in silico* previu uma eficiente expressão do constructo em sistema de *E. coli*, sugerindo viabilidade para produção laboratorial. Já o estudo conduzido por Duraisamy *et al.* (2024), que explorou as proteínas estruturais do BCoV para a construção de candidatos vacinais, com a subunidade B da toxina da cólera como adjuvante, encontrou forte ligação do imunógeno com o receptor TLR-2, além de indução significativa de IgM, IgG1, IgG2, CTL e HTL, durante a simulação imunológica. Esses estudos demonstram o potencial dos candidatos vacinais desenvolvidos e reforçam a importância da imunoinformática na criação de vacinas racionais, fornecendo uma base sólida para futuras validações experimentais.

Dois estudos recentes também demonstram a avaliação de vacinas multiepítipo *in silico* contra a dermatite nodular contagiosa dos bovinos, ou *Lumpy Skin Disease Virus* (LSDV) (Shahab *et al.*, 2023; Salauddin *et al.*, 2024). Epítomos imunogênicos do vírus foram acoplados entre si e com a proteína ribossomal 50S L7/L12, como adjuvante molecular. No estudo de Shahab *et al.* (2023) o adjuvante molecular ainda foi acrescido com a sequência do epítipo de ligação HLA-DR para melhorar a sua eficiência. Ambos os estudos demonstraram boas eficiências de ligação com os receptores TLR-4 e/ou TLR-9, corroborados pela simulação de dinâmica molecular que estabeleceu uma ligação estável. A simulação imunológica demonstrou o estímulo de células B de memória, especialmente IgM e IgG1, e expressão de IFN- γ . A prova de conceito, *in vivo*, ainda não foi publicada na literatura.

Além dos estudos citados, abordagens baseadas em imunoinformática já foram exploradas no desenvolvimento *in silico* de candidatos vacinais contra diversos vírus de interesse veterinário, especificamente para bovinos, como o vírus da Peste dos Pequenos Ruminantes (PPRV) (Gaafar *et al.*, 2019), o vírus da Febre Efêmera Bovina (BEFV) (Pyasi *et al.*, 2021), o vírus da Leucemia Bovina (BLV) (Samad *et al.*, 2022), o vírus da Febre do Vale do Rift (RVFV) (Oladipo *et al.*, 2024) e o vírus da Língua Azul

(*Bluetongue Virus* – BTV) (Kolla *et al.*, 2024). Apesar dos avanços computacionais na predição de epítomos imunogênicos, na modelagem estrutural e nas simulações de interação molecular, todas essas pesquisas compartilham uma limitação crucial: nenhuma delas foi validada experimentalmente em modelos biológicos ou na espécie alvo.

A realização de experimentos *in vitro* e *in vivo* é essencial para estabelecer uma prova de conceito e confirmar a eficácia dos candidatos vacinais em um ambiente biológico real. Ensaio laboratoriais permitem avaliar aspectos como imunogenicidade, resposta celular e humoral, além de estabilidade da formulação vacinal e possíveis efeitos adversos, aspectos que as análises computacionais, por mais sofisticadas que sejam, ainda não conseguem prever com total precisão. Sem essas validações experimentais, a transposição de candidatos vacinais *in silico* para aplicações práticas permanece incerta (Pathak *et al.*, 2025). Portanto, para que as estratégias baseadas em imunoinformática avancem para a fase clínica e sejam utilizadas na profilaxia de doenças infecciosas, é indispensável a realização de testes que confirmem sua viabilidade e segurança no organismo hospedeiro.

Um exemplo concreto da transposição de candidatos vacinais *in silico* para ensaios experimentais é demonstrado nos estudos de Quinteiro-Barbosa *et al.* (2023a) e Quinteiro-Barbosa *et al.* (2023b) (revisado no item 2.6). Os autores utilizaram imunoinformática para projetar um imunógeno contra os BoAHV, identificando epítomos relevantes reconhecidos por CTL, HTL e células B nos domínios PH-like 1 e 2 da glicoproteína B viral. Para a construção da vacina, os pesquisadores uniram o *PH-like domain 1* de BoAHV-1 ao *PH-like domain 2* de BoAHV-5 por meio de um ligante GS repetido em tandem (8x). O constructo foi submetido a análises de propriedades físico-químicas e estrutura secundária, que previram um peso molecular de 110 kDa, além de uma predominância de regiões em α -hélice e β -folha. A modelagem estrutural indicou que o ligante favorecia o dobramento adequado dos domínios, embora o docking molecular com possíveis receptores não tenha sido realizado nessa etapa.

Para validar os achados computacionais, os autores expressaram a proteína recombinante em *Komagataella phaffii*, confirmando sua identidade pelo peso molecular de 110 kDa, conforme previsto anteriormente. A proteína também foi reconhecida por um anticorpo monoclonal de um kit ELISA comercial para diagnóstico de IBR, reforçando sua similaridade estrutural com o antígeno viral. Em seguida, uma

vacina foi formulada com a proteína e diferentes adjuvantes comerciais e administrada em camundongos pelas vias subcutânea ou intramuscular. Os resultados mostraram que a formulação contendo o adjuvante Montanide™ ISA 50 V2, administrada via intramuscular, induziu níveis superiores de anticorpos neutralizantes em comparação com os demais tratamentos. Além disso, nenhum dos grupos imunizados apresentou reações adversas. Embora a vacina ainda não tenha sido testada na espécie-alvo, esse estudo representa um ensaio pré-clínico fundamental, validando experimentalmente os resultados obtidos nas predições imunoinformáticas e demonstrando a viabilidade da abordagem para o desenvolvimento de imunógenos contra os BoAHV. Este foi o primeiro relato da aplicação de imunoinformática em um candidato vacinal contra os BoAHV-1 e 5.

3 Artigo 1

Construction, expression, and characterization of a multi-epitope protein based on envelope glycoproteins B, C, and D of *Varicellovirus bovinealpha 1/5* in *Escherichia coli*

Nadálin Yandra Botton, Guilherme Feijó de Sousa, Marina Sturbelle Garcia, Matheus Iuri Frühauf, Lariane da Silva Barcelos, Alessandra Neis, Silvia de Oliveira Hübner, Marcelo de Lima, Lucino da Silva Pinto e Geferson Fischer

Submetido à revista Applied Microbiology and Biotechnology

Construction, expression, and characterization of a multi-epitope protein based on envelope glycoproteins B, C, and D of *Varicellovirus bovinealpha 1/5* in *Escherichia coli*

Nadálín Yandra Botton¹, Guilherme Feijó de Sousa², Marina Sturbelle Garcia¹, Matheus Iuri Frühauf³, Lariane da Silva Barcelos³, Alessandra Neis⁴, Silvia de Oliveira Hübner¹, Marcelo de Lima¹, Luciano da Silva Pinto² and Geferson Fischer¹

¹ Laboratório de Virologia e Imunologia (Labvir), Departamento de Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, Campus Universitário, s/n, Capão do Leão, CEP 96160-000, Rio Grande do Sul, Brazil; nadalinyb@gmail.com (NYB) (ORCID: 0000-0002-7259-7710); sturbellemarina@gmail.com (MSG) (ORCID: 0009-0007-7832-1129); silviaohubnar@gmail.com (SdOH) (ORCID: 0000-0003-0482-9599); mdelima.ufpel@gmail.com (MdL) (ORCID: 0000-0003-3102-1659); geferson.fischer@gmail.com (GF) (ORCID: 0000-0002-3521-395X).

² Laboratório de Bioinformática e Proteômica (BioPro_Lab.), Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, Campus Universitário, s/n, Capão do Leão, CEP 96160-000, Rio Grande do Sul, Brazil; guilhermefeijodesousa@gmail.com (GFdS) (ORCID: 0000-0002-7425-3444); ls_pinto@hotmail.com (LdSP) (ORCID: 0000-0001-8656-4031).

³ Department of Veterinary Pathobiology, Oklahoma State University, Stillwater, 74078, Oklahoma, United States of America; matheus.fruhauf@outlook.com (MIF) (ORCID: 0000-0002-8786-5933); ldsilv@okstate.edu (LSB) (ORCID: 0000-0001-9235-9931).

⁴ FIOCRUZ - PARANÁ, Instituto Carlos Chagas, Rua Prof. Algacyr Munhoz Mader, 3775, Cidade Industrial de Curitiba (CIC), Curitiba, CEP 81350-010, Paraná, Brazil; alessandraneisbiotec@gmail.com (AN) (ORCID: 0000-0001-9388-9520).

*Correspondence author: geferson.fischer@gmail.com (GF) Tel.: +5553 99913-4421 (GF).

Abstract

The *Varicellovirus bovinealpha1* (BoAHV-1) and 5 (BoAHV-5) are important microorganisms associated with respiratory, reproductive, and neurological disorders. These viruses have been reported in cattle since the 1950s (BoAHV-1) and 1960s (BoAHV-5) and continue to affect cattle worldwide. Envelope glycoproteins B, C, and D are essential for viral attachment and fusion with host cells, making them the main targets of the immune response, and therefore, promising antigen candidates for vaccine development. This study aimed to construct a multi-epitope protein, utilizing immunoinformatic-driven methodologies, comprising selected epitopes of envelope glycoproteins B, C, and D of BoAHV 1/5, to perform in silico structural and functional characterization, and to express the construct in an *Escherichia coli* system for subsequent immunogenic evaluation. The multi-epitope protein was designed and characterized via bioinformatic approaches. It was cloned into the pET24-a vector and expressed in prokaryotic system for posterior in vitro validation by Western blotting. The multi-epitope protein, composed of 321 amino acids with a molecular weight of 33.24 kDa, a theoretical pI of 9.88, an estimated half-life in *E. coli* exceeding 10 hours, a GRAVY score of -0.507, and an antigenicity score of 1.1543, exhibited characteristics of solubility and non-allergenicity. Furthermore, molecular docking analyses revealed a strong interaction with bovine Toll-like receptor 7, exhibiting a free interaction energy of -1264.7 kcal.mol⁻¹. Also, the multi-epitope protein was successfully expressed by the *E. coli* system (520 ng.μL⁻¹) and recognized for anti-HIS6x antibody in a Western blotting technique, characterizing it through its molecular weight of ~33 kDa. The multi-epitope protein was effectively recognized as an antigen in indirect ELISA by bovine sera containing neutralizing antibody titers of 16, 32, 64, 128, and 256. Overall, it was shown that the multi-epitope protein of BoAHV 1/5 exhibits favorable structural and functional properties, as well as good expression rate in the prokaryotic system, making it a promising candidate for future studies aimed at evaluating its immunogenicity in animal models.

Key words: Glycoprotein; bioinformatics; viruses; construction; vaccine.

Key points

- The multi-epitope protein shows strong TLR-7 interaction in silico.
- The multi-epitope protein was successfully expressed in *E. coli* and recognized by anti-HIS6x antibody.
- ELISA confirmed recognition of the multi-epitope protein by bovine sera containing neutralizing antibodies.

1. Introduction

Bovine alphaherpesviruses are significant pathogens responsible for substantial economic losses in cattle farming, with the capacity to infect other ruminants such as sheep, goats, and buffalo (Diel et al. 2007; Borujeni et al. 2020; Silva et al. 2021; Paredes-Galarza et al. 2024). Within this group, *Varicellovirus bovinealpha1* (BoAHV-1) is primarily linked to respiratory and reproductive disorders, often leading to infertility and abortion events (Nandi et al. 2009). In contrast, *Varicellovirus bovinealpha5* (BoAHV-5) is associated with severe neurological manifestations, including fatal encephalitis, particularly in young calves (Zajac et al. 2010). The global distribution of these viruses underscores their relevance in veterinary medicine and animal production systems (Can-Sahna et al. 2024; Engdawork et al. 2024; Hao et al. 2024; Paredes-Galarza et al. 2024; Petrini et al. 2024; Verma et al. 2024).

These viruses belong to the order *Herpesvirales*, family *Orthoherpesviridae*, subfamily *Alphaherpesvirinae*, and genus *Varicellovirus* (Gatherer et al. 2021). A critical feature of these pathogens is their ability to establish latent infections within neural ganglia, with episodic reactivation and viral shedding, contributing to sporadic outbreaks, particularly in endemic regions (Ostler and Jones 2023).

The BoAHV-1 and BoAHV-5 genomes consist of a linear double-stranded DNA (dsDNA) molecule ranging from approximately 135 to 140 kilobases pairs (kbp) in length. This genetic material is enclosed within an icosahedral capsid measuring around 100 nanometers (nm) in diameter. Surrounding the capsid is the proteinaceous tegument, which bridges the capsid to the outermost envelope. The viral envelope, derived from modified host cell membranes, is studded with glycoprotein projections that serve essential functions for the virus (Gatherer et al. 2021).

Recent advances in vaccine development have concentrated on viral glycoproteins due to their critical roles in the viral life cycle and host immune recognition (Araujo et al. 2018; Wen et al. 2020; Quinteiro-Barbosa et al. 2023; Hoa et al. 2024). Among the glycoproteins identified in BoAHV-1 and BoAHV-5, which share a high degree of structural and functional homology (Babiuk et al. 1996; Zajac et al. 2010), three are particularly relevant: glycoprotein B (gB), glycoprotein C (gC), and glycoprotein D (gD). These molecules are essential for viral attachment to cellular receptors and membrane fusion, while also serving as major targets for cytotoxic T lymphocytes and the primary inducers of neutralizing antibodies (Denis et al. 1993; Rashmi et al. 2024). Notably, these glycoproteins exhibit an amino acid sequence homology of 75% to 98% between the two viral species (Marin et al. 2020), reinforcing their potential as vaccine targets for cross-protection.

Although conventional vaccines have played a role in controlling BoAHV-1 and BoAHV-5 infections (Krishnagopal and van Drunen Littel-van den Hurk 2024), current formulations have limitations. Live-attenuated vaccines, despite their ability to elicit robust immune responses with local and systemic immunity and long-term protection, pose risks such as abortion when administered to pregnant females. Inactivated vaccines, a safer option for pregnant animals, often induce weaker immune responses (Andey et al. 2024). A promising alternative for designing more effective and potentially cost-efficient vaccines is immunoinformatics. This approach utilizes computational prediction tools to identify antigenic candidates within a known viral genome (Martinelli 2022). By leveraging immunoinformatics, vaccine development can be guided by rational selection criteria, prioritizing targets that are antigenic, structurally stable, and capable of being recognized by major histocompatibility complex (MHC) class I and II molecules, as well as B lymphocytes (Parvizpour et al. 2020). Among the most promising candidates fulfilling these criteria are the BoAHV-1 and BoAHV-5 glycoproteins B, C, and D.

Thus, the present study aimed to construct a multi-epitope protein comprising selected epitopes of envelope glycoproteins B, C, and D of BoAHV 1/5 utilizing immunoinformatic-driven methodologies. Furthermore, this research sought to perform in silico structural and functional characterization and to express the construct in an *Escherichia coli* system for subsequent immunogenic evaluation.

2. Material and Methods

2.1. Retrieval and curation of glycoprotein sequences

The complete amino acid sequences of glycoproteins B, C, and D from BoAHV-1 and BoAHV-5 were obtained from the NCBI database in FASTA format. Independent global alignments for each glycoprotein (B, C, and D) were performed using the MUSCLE algorithm to identify conserved regions, which were subsequently selected for downstream analyses (Edgar 2004).

To assess potential homology with host proteins, the pBLAST tool was employed using the "non-redundant protein sequences (nr)" option. The viral glycoprotein sequences were queried against proteins from *Bos* (taxid: 9903), *Bos taurus* (taxid: 9913), and *Bos bovis* (taxid: 9913), as curated in the NCBI database. Viral sequences exhibiting less than 35% identity and an E-value threshold of 0.005 were classified as sufficiently divergent, indicating a low probability of homology with bovine proteins (Naz et al. 2015).

2.2. Epitope prediction

2.2.1. B-cell epitope prediction

Linear B-cell epitopes were predicted using BepiPred-2.0 (Jespersen et al. 2017; Raoufi et al. 2020), which applies a random forest algorithm trained on antigen-antibody crystal structures to identify residues likely to be part of epitopes. The default threshold (0.5) was used as recommended by the developers. Additionally, the Emini Surface Accessibility Prediction tool (S_n greater than 1.0) was used to estimate the surface exposure of residues (Emini et al. 1986), and the Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity method (threshold ≥ 1.0) identified antigenic determinants based on physicochemical properties and residue frequencies (Kolaskar and Tongaonkar 1990). These complementary tools helped refine the selection of immunogenic regions for multi-epitope protein design.

2.2.2. Cytotoxic T Lymphocyte (CTL) epitope prediction

Cytotoxic T Lymphocyte (CTL) epitopes were predicted using NetMHCpan EL 4.1, a tool based on artificial neural networks trained on eluted ligand data to accurately estimate peptide binding affinities to MHC-I molecules (Reynisson et al. 2020). Epitope selection was based on a stringent percentile rank threshold of ≤ 0.1 , with all peptides standardized to a length of nine amino acids (Kossack et al. 2022). The analysis included all available bovine MHC-I (BoLA) allele sets to ensure broad immunogenetic coverage.

2.2.3. Helper T Lymphocytes (HTL) epitope prediction

The NetMHCIIpan 4.0 server, which utilizes artificial neural networks trained on binding affinity and eluted ligand data to predict peptide interactions with MHC-II molecules, was employed for HTL epitope prediction (Reynisson et al. 2020). In the absence of bovine BoLA alleles in the database, murine MHC-II alleles were selected as a reference model. Peptides of 15 amino acids in length with a percentile rank ≤ 0.5 were considered promising HTL epitope candidates (Fadaka et al. 2021).

2.2.4. Clustering of B-Cell, CTL, and HTL epitopes

The peptide sequences obtained from previous screenings were aligned using the Epitope Cluster Analysis tool, which groups epitopes into clusters based on sequence identity. Clustering was performed using the “cluster-break for clear representative sequences” method, with a minimum sequence identity threshold of 70%, as recommended by the tool’s developers (Dhanda et al. 2018). Representative epitopes from each cluster were selected for subsequent antigenicity evaluation.

2.3. Antigenicity analysis of epitopes

Following the clustering process, B-cell, CTL, and HTL epitopes were evaluated for antigenic potential using the VaxiJen 2.0 server. This tool applies an auto cross-covariance transformation to convert protein sequences into uniform vectors based on principal physicochemical properties of amino acids (Doytchinova and Flower 2007). A threshold of ≥ 0.8000 was adopted for viral antigenicity, and peptides meeting this criterion were selected for inclusion in the multi-epitope construct.

2.4. Multi-epitope protein design

For the assembly of the multi-epitope protein, peptides selected based on established criteria, such as binding affinity to B-cell, CTL, and HTL epitopes, as well as antigenicity analysis, were connected using GGGGS and EAAAK linkers, for peptides derived from the same and different glycoproteins, respectively (He et al. 2021). In addition to enhancing protein solubility, these linkers can improve stability, expression, and the biological activity of the resulting structure (Chen et al. 2013). Also, a histidine tag (His 6x) was added to the C-terminal region of the construct to facilitate protein identification and recovery at the end of the purification process.

2.5. Physicochemical and immunogenic properties assessment of the multi-epitope protein

Physicochemical properties of the multi-epitope construct - including amino acid composition, molecular weight, theoretical isoelectric point (pI), number of positively and negatively charged residues, estimated half-life, instability index, aliphatic index, and grand average of hydropathicity (GRAVY) - were analyzed using the ProtParam tool (Gasteiger et al. 2005). Allergenicity was predicted using the AlgPred server, which applies a hybrid approach that combines SVMc, IgE epitope mapping, ARPs BLAST, and MAST analysis (Saha and Raghava 2006). Additionally, the construct's antigenic potential was evaluated with the VaxiJen 2.0 server, using a threshold of ≥ 0.8000 for viral antigenicity (Doytchinova and Flower 2007).

2.6. Secondary and tertiary structure prediction

The secondary structure of the mRNA encoding the multi-epitope protein was predicted using the RNAFold web server, which estimates the most thermodynamically stable conformation of RNA molecules based on minimum free energy (MFE) models, as previously described by Zuker and Stiegler (1981). For protein secondary structure prediction, the SOPMA tool was applied, which calculates the distribution of structural elements such as α -helices, β -sheets, random coils, and extended strands based on an alignment of homologous

sequences (Roy et al. 2010). The tertiary structure of the multi-epitope protein was modeled using I-TASSER, a hierarchical approach that integrates threading, structural assembly, and atomic-level refinement to generate high-confidence 3D protein models (Zheng et al. 2021; Zhou et al. 2022).

2.7. Bovine TLR-7 receptor and multi-epitope protein molecular docking

For molecular docking, the ClusPro protein-protein interaction prediction software was used, which performs global docking without requiring prior knowledge of the contact interface between the structures (Kozakov et al. 2017; Lensink et al. 2017; Poter et al. 2019). The server was employed for the multi-epitope protein (ligand) docking with bovine TLR-7 (receptor). The model of the bovine TLR-7 was retrieved from the AlphaFold database (Varadi et al. 2022), integrated with UniProt (ID A0A3Q1MK24). The portion corresponding to the transmembrane and intracellular regions was removed, aligning with methodologies applied in previous studies (Pyasi et al. 2021).

2.8. Expression and processing of the multi-epitope protein

The pET24a (+) vector containing the sequence of interest (Epoch Life Science, USA) was used to transform *Escherichia coli* BL21 (DE3) Star via heat shock, followed by cultivation on LB agar plates supplemented with the appropriate selection antibiotic (100 µg.mL⁻¹ of kanamycin), according to the plasmid construct. A single colony was picked up and grown overnight in liquid LB medium at 37 °C with agitation (180 rpm). This pre-culture was subsequently used to inoculate 500 mL of the same medium. Protein expression was induced during the exponential growth phase (OD₆₀₀ = 0.6 - 0.8) by adding 1 mM IPTG, and the culture was incubated overnight at 27 °C with agitation at 70 rpm.

For cell lysis, the harvested cells were resuspended in lysis buffer (200 mM NaH₂PO₄, 0.5 M NaCl, 5 mM imidazole, 100 µg.mL⁻¹ lysozyme, pH 8.0) and subjected to sonication. The lysate was centrifuged (12,000 × g, 40 min, 4 °C) to separate the soluble and insoluble protein fractions. The insoluble pellet was subsequently treated with solubilization buffer containing 8 M urea. Purification was performed using immobilized metal affinity chromatography (IMAC) using a HisTrap™ FF column charged with Ni²⁺ ions on an ÄKTA Purifier system. Elution was achieved using a stepwise imidazole gradient (up to 500 mM). The eluted protein was dialyzed against PBS (pH ~7.2) to remove urea and excess salts. The concentration of the purified protein was determined using the BCA Protein Assay Kit (Pierce, USA), following the manufacturer's instructions.

2.9. Characterization of the multi-epitope protein by Western Blotting

One-dimensional SDS-PAGE was carried out under denaturing conditions. Briefly, 15 μ L of each sample was mixed with 5 μ L of loading buffer and heated at 100 °C for 10 minutes. Samples, along with a molecular weight marker (Bis-Tris 10% MES buffer), were loaded onto a 12% polyacrylamide gel and electrophoresed at 120 V for approximately 2 hours.

Following electrophoresis, proteins were electrotransferred onto a nitrocellulose membrane using the Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad, USA). The membrane was blocked with 5% non-fat dry milk in PBS for 1 hour at 4 °C, then washed five times with 1× PBS-Tween 20. For detection, the membrane was incubated overnight at 4 °C with a peroxidase-conjugated monoclonal anti-His6 antibody (Sigma, USA) at a 1:10,000 dilution. After five additional washes, specific bands were visualized by colorimetric detection using a substrate solution composed of 50 mM Tris-HCl (9 mL), 2 mL of nickel sulfate, 0.0012 g of 3,3'-diaminobenzidine (DAB), and 20 μ L of H₂O₂ (Hnasko and Hnasko 2015).

2.10. Antigenicity assessment of the multi-epitope protein by Indirect ELISA

An indirect ELISA was standardized using 96-well Nunc-Immuno™ Microwell™ plates (Thermo Fisher Scientific, USA), coated overnight at -20 °C with a multi-epitope protein at concentrations of 50, 100, 150, and 200 ng.well⁻¹ in carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6). After washing with 1× PBS-Tween 20, plates were blocked with 5% non-fat dry milk and incubated at 37 °C for 30 min. Bovine sera with neutralizing antibody titers of 2, 16, 32, 64, and 256 (as determined by serum neutralization assay) were diluted 1:200, added in triplicate, and incubated for 1 h at 37 °C. Positive and negative controls consisted of bovine serum with a titer of 128 and fetal bovine serum (FBS), respectively, both diluted 1:200. After washing, plates were incubated for 1 h with HRP-conjugated anti-bovine IgG (2 mg.mL⁻¹, Sigma-Aldrich®), diluted 1:5000. Detection was performed using o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) in citrate-phosphate buffer (pH 4.0) with hydrogen peroxide. The reaction was stopped after 15 min with 2 M sulfuric acid, and absorbance was measured at 490 nm using a TP Reader® ELISA reader (Thermo Plate). The assay followed the protocol established by Fischer et al. (2007). Samples were considered positive for anti-BoAHV-1/5 IgG if the optical density exceeded the negative control absorbance plus one standard deviation, calculated in Microsoft® Excel, as previously described (Xu et al. 2015).

3. Results

3.1. Retrieval and curation of glycoprotein sequences

The sequences of glycoproteins B, C, and D from BoAHV 1/5 were retrieved from the NCBI biological data repository, and their specifications are presented in Table 1.

Table 1. Specifications of the complete sequences of glycoproteins B, C, and D from BoAHV 1/5 according to the NCBI.

Glycoprotein	Viral specie	Amino acid size	GenBank access number
B	BoAHV-1	935 amino acids	QFN66971.1
B	BoAHV-5	947 amino acids	AQM74700.1
C	BoAHV-1	508 amino acids	QBH75030.1
C	BoAHV-5	486 amino acids	AQM74731.1
D	BoAHV-1	417 amino acids	QBI59676.1
D	BoAHV-5	417 amino acids	AQM74722.2

After the global alignment of the viral glycoprotein B, C, and D sequences, their conserved regions were retained and subjected to protein-protein identity analysis. The results indicated no homology (identity < 35%) between the evaluated glycoprotein sequences and the protein sequences of the compared organisms *Bos*, *Bos taurus*, and *Bos bovis*, with a confidence level of 95% (E-value: 0.005).

3.2. Epitope prediction

The conserved regions of each BoAHV glycoprotein were analyzed for epitope prediction. For glycoprotein B (gB), a total of 60 cytotoxic T-lymphocyte (CTL), 30 helper T-lymphocyte (HTL), and 15 B-cell binding peptides were identified. Glycoprotein C (gC) yielded 23 CTL, 26 HTL, and 7 B-cell binding peptides, while glycoprotein D (gD) showed 45, 33, and 6 peptides predicted to interact with CTL, HTL, and B-cells, respectively. Subsequently, epitope clustering was performed to identify overlapping regions recognized by all three immune components. This process resulted in the selection of 19 shared peptides for gB, 13 for gC, and 14 for gD.

3.3. Antigenicity analysis of epitopes

Antigenicity analysis was conducted on the clustered peptides, applying a threshold of ≥ 0.8000 to select candidates for inclusion in the multi-epitope construct. Based on this criterion, a total of 12 peptides were selected: 3 from gB, 5 from gC, and 4 from gD. The selected peptides and their corresponding antigenicity scores are summarized in Table 2.

Table 2. Selected peptides from the conserved regions of glycoproteins B, C, and D of BoAHV 1/5, ranked by antigenicity, for the construction of the multi-epitope protein.

Glycoprotein	Peptide	Antigenicity value
B	SAVERQEHKAKKSNKGGPLLATRLTQLALRRRAPPEYQ	1.0057
	QLPMAD	
B	QYTDRVPVGM	0.8951
B	GGAERAAGAGDGRRGQRRH	0.8248
C	LLFVAQNCSIAYRSAELGDNYIFPSA	0.9021
C	KSQRKVVTVTTHRAPAVSVEPQPALEGA	0.8480
C	PAPLPEFSATATYDASPLIGS	0.8784
C	AEYYPPRSTRLHWF	1.0991
C	VRDGIAPSRTEQTGVCAERP	0.9981
D	CFPIQDYEQSKVLRLTY	0.8386
D	LRLTYLTQYY	0.8639
D	GAAAYFVYTRRLGAGPL	0.8655
D	RLGAGPLPKKAKKLLAFGNVNYSAL	1.0292

3.4. Multi-epitope protein design

The 12 peptides selected for the construction of the multi-epitope protein were connected using the GGGGS and EAAAK linkers, as well as a histidine tag (His 6x) to the C-terminal region of the construct. The resulting protein was designated BOV 13.

3.5. Physicochemical and immunogenic property assessment of the multi-epitope protein

Following its design, the multi-epitope protein was assessed for physicochemical properties, allergenic potential, and antigenicity. Overall, the BOV 13 multi-epitope protein exhibited a molecular weight of 33.24 kilodaltons (kDa), a theoretical isoelectric point (pI) of 9.88, and an aliphatic index of 62.46. The estimated half-life in bacteria was > 10 hours, and the stability profile suggested that the construct may be unstable (instability index: 58.85, threshold: 40).

Additionally, the multi-epitope protein was classified as non-allergenic and soluble, with a GRAVY score of -0.507 (negative GRAVY values indicate hydrophilicity). The antigenicity calculated after the construction of the multi-epitope protein was 1.1543. The values for each evaluated property are presented in Table 3.

Table 3. Evaluation of the physicochemical properties, antigenicity, and allergenicity of the BOV 13 multi-epitope protein using the ProtParam, AlgPred, and VaxiJen tools.

Assessed property	Multi-epitope protein BOV 13
Number of amino acids	321
Molecular weight (kDa)	33.24
Theoretical isoelectric point (pI)	9.88
Negative residues (Asp + Glu)	22
Positive residues (Arg + Lys)	37
Estimated half-life (hours)	
Bacteria (<i>E. coli</i>)	> 10 h
Mammalian (Reticulocyte)	30 h
Yeast	> 20 h
Instability index	58.85 (unstable)
Aliphatic index	62.46
Grand average of hydropathicity (GRAVY)	-0,507 (soluble)
Antigenicity (VaxiJen 2.0)	1.1543
Allergenicity (AlgPred)	Non-allergenic

AlgPred: software for predicting the allergenicity of a protein; Arg: arginine; Asp: asparagine; *E. coli*: *Escherichia coli*; Glu: glutamate; Lys: lysine. ProtParam: software for predicting the physicochemical properties of a protein; VaxiJen: software for predicting the antigenicity of a protein.

3.6. Secondary and tertiary structure prediction

Following preliminary evaluations, the BOV 13 construct was analyzed for its mRNA secondary structure. The minimum free energy (MFE) structure exhibited a ΔG of $-394.50 \text{ kcal.mol}^{-1}$, while the centroid structure presented a higher free energy of $-273.50 \text{ kcal.mol}^{-1}$. The thermodynamic ensemble had a free energy of $-412.36 \text{ kcal.mol}^{-1}$, an ensemble diversity of 251.73, and an MFE structure frequency of 0%. The predicted MFE (Figure 1a) and centroid (Figure 1b) secondary structures are depicted in Figure 1. Positional entropy analysis (Figure 1c) indicated structural variability, particularly highlighting regions where the MFE and centroid structures diverged, suggesting local conformational flexibility in the BOV 13 mRNA. However, it is important to emphasize

that neither the free ends nor the interaction energy represent barriers to the ribosome interaction with the BOV 13 messenger RNA structure.

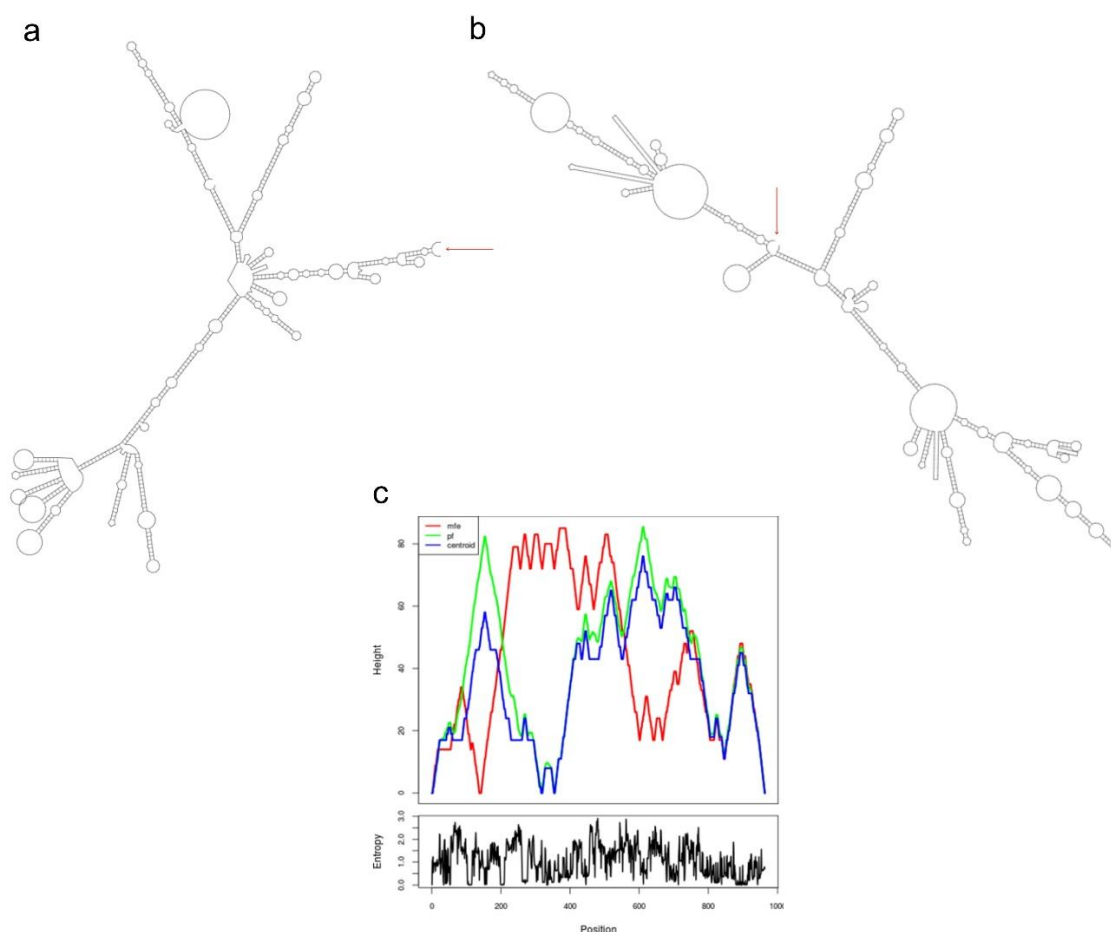


Figure 1. Secondary structure analysis of the BOV 13 messenger RNA (mRNA) using the RNAFold software. a: Prediction of the minimum free energy (MFE) secondary structure of the BOV 13 mRNA. b: Prediction of the centroid secondary structure of the BOV 13 mRNA. c: Positional entropy analysis of the MFE (red), centroid (blue), and thermodynamic ensemble (green) secondary structures. Red arrows in the MFE and centroid structures indicate the free ends that enable mRNA interaction with the ribosome. Figure 1 was generated using RNAFold software and edited using Canva.com.

The secondary structure analysis of the BOV 13 multi-epitope protein revealed the formation of three main structural arrangements. The most predominant was the random coil (61.68%), followed by the extended strand (20.87%), which may be associated with β -sheet formation, and the α -helix (17.45%). Figure 2 illustrates the predicted secondary structure of the BOV 13 multi-epitope protein.

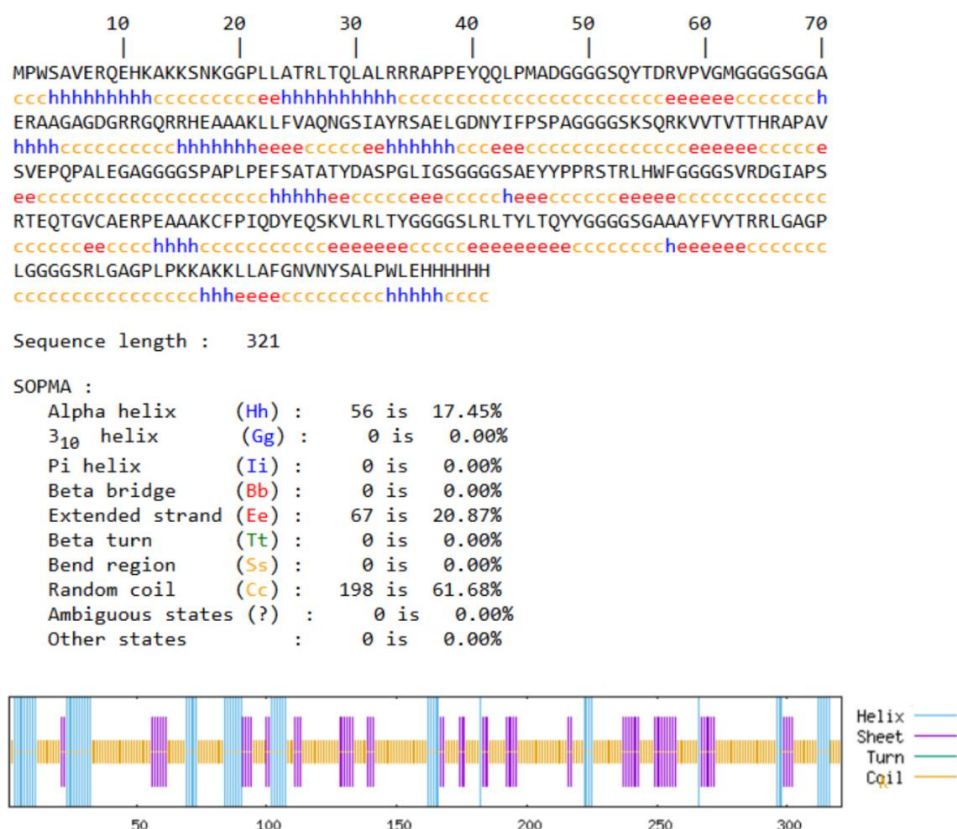


Figure 2. Prediction of the structural arrangements of the BOV 13 multi-epitope protein using SOPMA software. Random coil (letters Cc in yellow), extended strand (letters Ee in red), and α -helix (letters Hh in blue) are represented. Figure 2 was generated using SOPMA software and edited using Canva.com.

3.7. Bovine TLR-7 receptor and multi-epitope protein molecular docking

For molecular docking, the human TLR-7 (PDB ID: 7CYN) and bovine TLR-7 structures were first aligned, with the Root Mean Square Deviation (RMSD) between the structures being 0.91 Å, which can be used for structural comparisons. The human TLR-7 was experimentally obtained in its dimeric form, and upon aligning the structures, the interaction interface between the proteins was identified (Figure 3). The protruding loop within the TLR receptor is responsible for the interaction between the dimers.

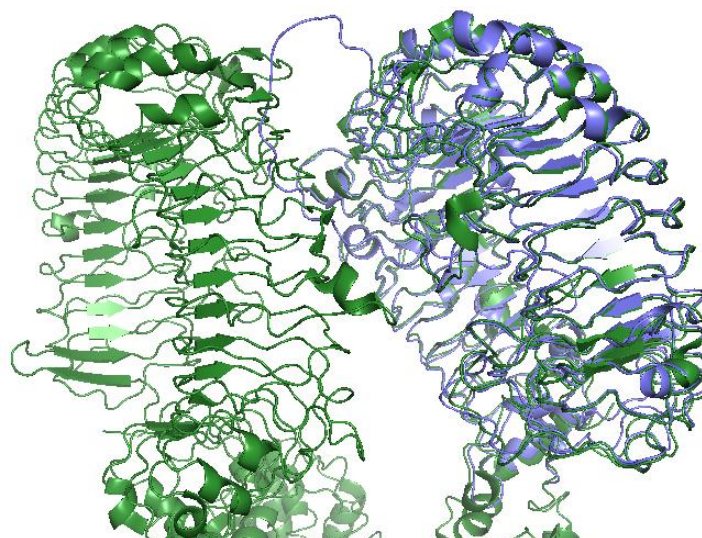


Figure 3. Structural alignment between bovine TLR-7 (AlphaFoldDB ID: AF-A0A3Q1MK24-F1) (blue) and human TLR-7 (PDB ID: 7CYN) (green).

Molecular docking revealed that the BOV 13 multi-epitope protein interacts with a high interaction energy ($-1264.7 \text{ kcal.mol}^{-1}$) with 88 cluster members. The interaction occurred at different sites from those typically observed, with binding at the bottom of the receptor (Figures 4a and 4b). However, it is possible that this interaction will not interfere with the functions of either the multi-epitope protein or the TLR-7 receptor.

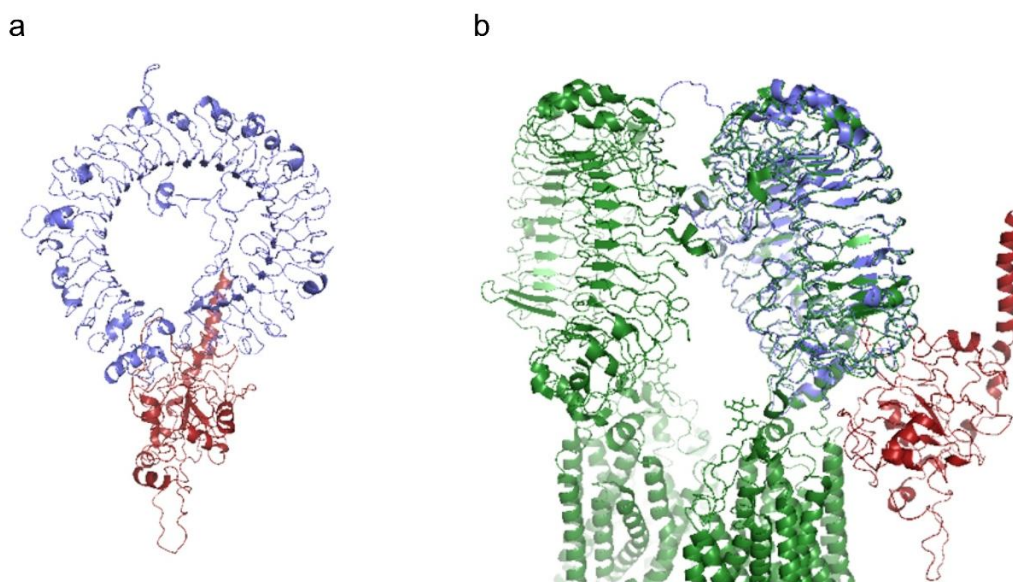


Figure 4. Molecular docking between the BOV 13 multi-epitope protein (red) and bovine TLR-7 (blue). a: BOV 13 multi-epitope protein (red) + bovine TLR-7 (blue). b: BOV 13 multi-epitope protein (red) + bovine TLR-7 (blue) structurally aligned with human TLR-7 (green).

3.8. Expression and processing of the multi-epitope protein

The gene of interest, cloned into the pET24a (+) vector, was successfully expressed in *E. coli* BL21 (DE3) Star culture. The protein concentration, measured using the BCA kit after purification and dialysis, was 520 ng. μ L⁻¹.

3.9. Characterization of the multi-epitope protein by Western Blotting

Following the expression of the BOV 13 multi-epitope protein, Western blot analysis of the bacterial extract confirmed successful expression, revealing a distinct band at the expected molecular weight of approximately 33 kDa (Figure 5). After processing and purification of the extract, the isolated protein was subjected to a second Western blot, where it was specifically recognized by the anti-HIS6x monoclonal antibody, further validating the identity of the BOV 13 construct at the same molecular weight (Figure 5).

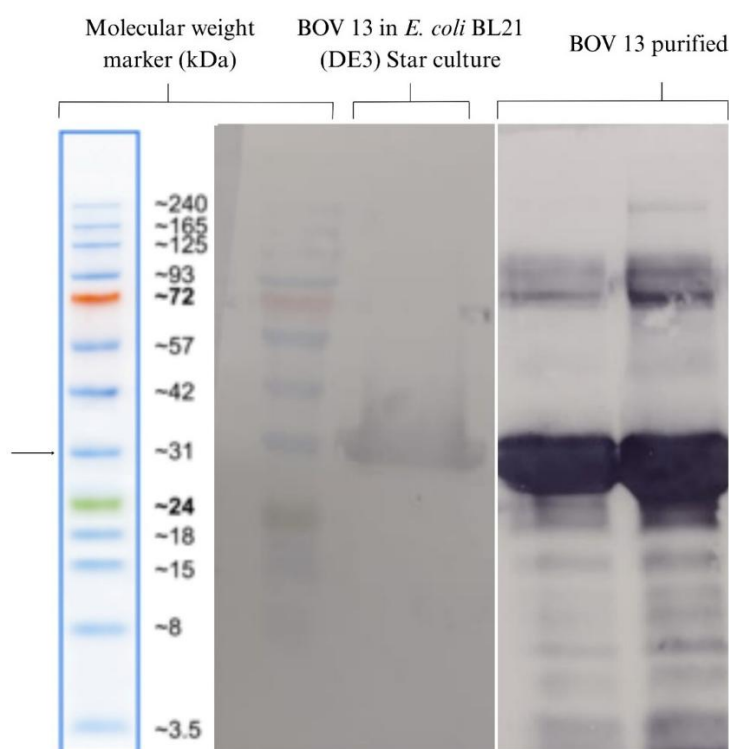


Figure 5. Confirmation of expression in the *E. coli* BL21 (DE3) Star strain and characterization of the BOV 13 multi-epitope protein by Western blotting. The BOV 13 multi-epitope protein has an approximate molecular weight of 33 kDa, positioned just above the molecular weight marker band (Bis-Tris 10% MES buffer) at ~31 kDa. The black arrow indicates the molecular weight marker band. The western blot was performed by Dr. Nadálin Yandra Botton. Figure 5 was created using Canva.com.

3.10. Antigenicity assessment of the multi-epitope protein by Indirect ELISA

Protein concentrations of 50, 100, 150, and 200 ng.well⁻¹ were evaluated for their ability to be recognized by bovine sera containing neutralizing antibody titers of 2, 16, 32, 64, and 256 against BoAHV-1/5. All tested concentrations of the multi-epitope protein were effectively recognized by sera with antibody titers of 32, 64, and 256. Sera with a titer of 16 showed reactivity only at concentrations of 150 ng.well⁻¹ or higher. No reactivity was observed with the serum sample presenting a titer of 2 at any protein concentration tested. Complete absorbance data, including positive and negative controls (expressed with standard deviation), as well as individual serum responses, are shown in Figure 6.

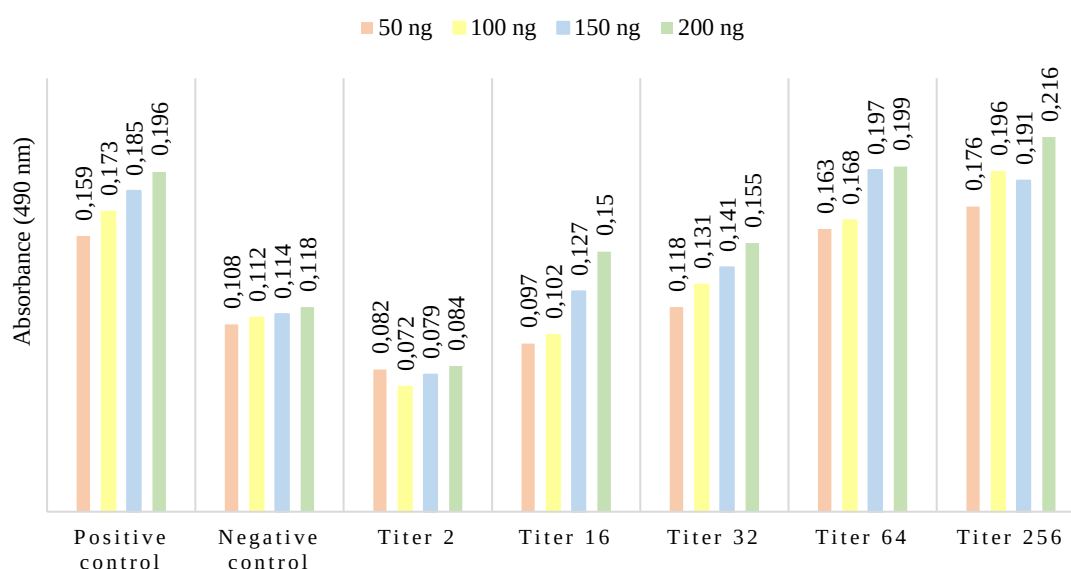


Figure 6. Antigenicity assessment of the BOV 13 multi-epitope protein by Indirect ELISA. Protein concentrations of 50 ng (orange bar), 100 ng (yellow bar), 150 ng (blue bar), and 200 ng (green bar) were tested for plate sensitization. A bovine serum sample with a neutralizing antibody titer of 128 against BoAHV-1/5 was used as the positive control, while fetal bovine serum (FBS) served as the negative control. The negative control is represented by its respective standard deviation. Figure 6 was created using Microsoft Word 360.

4. Discussion

Diseases caused by BoAHV-1 and BoAHV-5 represent a major challenge to the global livestock industry (Ostler and Jones 2023), particularly in Brazil, which holds the world's largest commercial cattle herd - approximately 238.6 million head (IBGE 2023) - and exhibits a high prevalence of these viral agents among animals (Hanzel et al. 2019; Silva et al. 2021). *Varicellovirus bovinealpha1* (BoAHV-1), the etiological agent of Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR), Infectious Pustular Balanoposthitis (IPB), and Infectious Pustular Vulvovaginitis (IPV), is closely associated with respiratory and reproductive disorders, leading to infertility,

abortion, and marked declines in productivity (Ostler and Jones 2023). *Varicellovirus bovinealpha1* (BoAHV-5), on the other hand, is known to cause meningoencephalitis, a severe and often fatal neurological disease, especially in calves (Zajac et al. 2010). Infections caused by these pathogens result in substantial losses to producers due to treatment costs, impaired reproductive performance, and mortality (Can et al. 2016; Silva et al. 2021).

From an economic perspective, the repercussions extend beyond individual farms to national and international trade levels, with potential implications for sanitary requirements and trade barriers. Importing markets such as the European Union may impose restrictions on Brazilian livestock products due to the presence of these and other pathogens within the national herd (Forbes 2024). Furthermore, disease outbreaks can lead to premature culling and reduced replacement capacity, directly affecting the competitiveness of Brazilian livestock production, particularly in meat and by-product exports.

Effective control strategies - including accurate viral diagnosis, sound biosecurity practices, and vaccination - are essential to curbing the spread of BoAHV-1 and BoAHV-5 and mitigating their associated economic impacts (Botton et al. 2022). In this context, immunoinformatic-driven methodologies offer valuable tools for the rational design of more effective, cost-efficient, and rapidly developed biotechnological products compared to traditional vaccine development pipelines (Martinelli 2022; Shawan et al. 2023). Computational platforms used in immunoinformatic allow for the identification of immunogenic regions within known protein sequences and enable predictions of structural, physicochemical, allergenic, and receptor-binding properties. These insights support the rational design and decision-making processes related to the production of immune biologicals (Parvizpour et al. 2020).

In the present study, we designed a multi-epitope protein derived from the conserved regions of glycoproteins B, C, and D of BoAHV-1 and BoAHV-5, performed in silico structural and functional characterization, and expressed the construct in an *Escherichia coli* system for subsequent immunogenic evaluation. For this purpose, we employed well-established immunoinformatic methodologies reported in the literature. The analyses presented here comprehensively assess the development, characterization, and predicted immunological response associated with the BOV 13 multi-epitope protein.

In a broader context, the global alignments performed between the amino acid sequences of glycoproteins B, C, and D revealed highly conserved regions across the same glycoproteins from both viral species. Rasheed et al. (2018), when conducting similar alignments including eight herpesvirus species - among them BoAHV-1 - also identified conserved sites, suggesting that these regions may play a critical role, particularly in the initial attachment of the virus to host cells. Moreover, since BoAHV-1 and BoAHV-5 are both genetically and

antigenically related, their glycoproteins exhibit high amino acid sequence homology, ranging from 75% to 98%, which further supports the presence of highly conserved regions between them (Denis et al. 1993; Marin et al. 2020; Rashmi et al. 2024).

When comparing the viral glycoprotein sequences with bovine host proteins, the results showed low identity scores ($< 35\%$, E-value 0.005), indicating that these viral proteins are not closely related to endogenous bovine proteins. This suggests that glycoproteins are likely to be recognized as heterologous antigens by the host immune system, thereby reducing the risk of autoimmune cross-reactivity (Naz et al. 2015; Zhang et al. 2024).

BoAHV glycoproteins play essential roles in the viral replication cycle and host immune interaction (Osterrieder 2017; Rashmi et al. 2024). Glycoprotein B (gB) is involved in viral attachment and membrane fusion with host cells, as well as facilitating cell-to-cell viral spread (Turner et al. 1998; Osterrieder 2017). Glycoprotein C (gC) is critical for initial contact, as it binds to heparan sulfate on the cell surface (Herold and WuDunn 1991; Spear et al. 1992). Meanwhile, glycoprotein D (gD) mediates specific interactions with host cell receptors and is indispensable for efficient viral entry (Turner et al. 1998; Dummer et al. 2014). These biological functions make viral glycoproteins prime targets for vaccine development strategies, as inducing a robust immune response against them may effectively reduce viral load and prevent disease onset in infected animals (Tizard 2020).

The prediction of epitopes binding to B-cell, CTL and HTL is a pivotal step in the rational design of vaccines. MHC-I presentations are key to activating CTLs, which are essential for eliminating infected cells, while MHC-II presentation activates HTLs, which are crucial for coordinating adaptive immunity. Additionally, epitopes recognized by B-cells play a central role in initiating antibody-mediated (humoral) responses that confer protection against infection (Abbas et al. 2023). Incorporating BoLA alleles (bovine MHC-I) into epitope prediction is particularly relevant due to the genetic diversity of cattle populations. Selecting epitopes with broad binding potential across different BoLA haplotypes ensures enhanced immunological coverage and improves vaccine efficacy across heterogeneous herds (Lewin 1989).

Our epitope prediction analyses identified a higher number of candidate epitopes from gB, reinforcing its superior immunogenic potential compared to gC and gD (Quinteiro-Barbosa et al. 2024; Rashmi et al. 2024). Nonetheless, clustering epitopes among B-cell, CTL, and HTL predictions highlighted immunologically relevant peptides that are essential for designing a focused multi-epitope construct. The use of an antigenicity threshold (≥ 0.8000) ensured that only the most promising peptides were selected, resulting in an optimized set of 12 prioritized epitopes (Table 2), with a balanced distribution among glycoproteins B, C, and D.

To assemble the selected epitopes, the GGGGS and EAAAK linkers were employed. The GGGGS linker is a flexible polypeptide composed of hydrophilic amino acids such as glycine (G) and serine (S), which help prevent epitope dissociation and can enhance protein solubility (Patel et al. 2022). This linker was used between peptides derived from the same glycoprotein, as its flexibility allows for favorable interactions between adjacent epitopes. Conversely, the rigid EAAAK linker is a structured polypeptide composed of glutamate (E), alanine (A), and lysine (K), which typically adopts a hydrophilic α -helical conformation. This linker was strategically placed between epitopes derived from different glycoproteins, maintaining spatial separation and allowing each epitope to function independently of neighboring domains (Wu et al. 2009). Beyond improving solubility, these linkers can also enhance protein stability, expression efficiency, and biological activity (Wu et al. 2009; Patel et al. 2022).

Following epitope assembly, the multi-epitope protein BOV 13 underwent further analyses to evaluate its physicochemical properties, antigenicity, and allergenicity, yielding promising results for its application in immunology - particularly as a potential vaccine candidate (Table 3). Its molecular weight (33.24 kDa) and predicted half-life in *E. coli* (>10 h) are favorable for expression in heterologous systems, given the ease of expression and purification of smaller proteins, as well as the likelihood of sustained protein accumulation following induction (Rosano and Ceccarelli 2014). Furthermore, the protein's moderate thermostability, indicated by its aliphatic index, provides an additional advantage for production and storage. While BOV 13 appears capable of tolerating moderate temperature fluctuations, its stability under extreme conditions may be limited, necessitating care in scenarios requiring long-term transport or storage (Ikai 1980; Faustino et al. 2018)

The protein's solubility, reflected by its negative GRAVY score (-0.507), is also a significant advantage in the context of vaccine formulations. Soluble proteins are generally more stable in aqueous solutions, facilitating their handling during development and improving compatibility with adjuvants (Rosano and Ceccarelli 2014; Habib et al. 2024). The immunogenic potential of the construction - evidenced by high predicted antigenicity (1.1543 with threshold of ≥ 0.800), a prevalence of positively charged residues, and the absence of allergenic motifs - emerges as one of the most promising aspects of this study. This unique combination of features indicates the protein's capacity to elicit robust immune responses, supported by its favorable structural characteristics, which promote efficient interactions with immune cells such as lymphocytes and macrophages, while maintaining a safety profile appropriate for biological applications (Foged et al. 2005; Chang et al. 2008; Rosenberg and Sauna 2018).

Nonetheless, certain limitations were identified and must be considered during development. The instability index of 58.85 suggests that construction may be prone to degradation under adverse conditions. This

potential vulnerability could be mitigated through stabilization strategies, such as adding excipients or lyophilization, which help preserve protein integrity during storage and transportation (Gamage et al. 2019; Akbarian and Chen 2022). Additionally, the high theoretical isoelectric point (pI 9.88) indicates a predominance of basic residues (e.g., lysine and arginine), resulting in a net positive charge at physiological pH (~7.2). This feature may influence interactions with cellular components and affect solubility. To address this, pH adjustments in formulations containing BOV 13 may be necessary to improve solubility and reduce the risk of aggregation, thereby enhancing its stability and efficacy in practical applications (Lautenbach et al. 2021).

The predicted secondary structure of the engineered mRNA designed for expression of the novel multi-epitope protein revealed no inhibitory elements typically associated with impaired translation, supporting its potential for high-level expression. Detailed analysis of the BOV 13 mRNA secondary structure provided additional insights into its conformational stability and translational suitability. The minimum free energy (MFE) structure exhibited a ΔG of $-394.50 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Figure 1a), indicating a thermodynamically stable conformation. In contrast, the centroid structure showed a higher free energy of $-273.50 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Figure 1b), and the thermodynamic ensemble presented a diversity of 251.73, suggesting the presence of multiple coexisting conformations and significant structural flexibility. Notably, the MFE structure was not represented within the ensemble (0% frequency), implying that this specific conformation is unlikely to predominate under physiological conditions, reinforcing the importance of considering a range of potential structures when evaluating mRNA translation efficiency and functional dynamics (Zuker and Stiegler 1981).

Positional entropy analysis (Figure 1c) revealed notable discrepancies in the relative positioning of nucleotides across different conformations, indicating a high degree of structural disorder. Such variability may impact translational efficiency, as the conformation adopted by the mRNA directly influences ribosome accessibility and interaction with translation machinery. Although such structural flexibility is often associated with reduced expression levels, no negative impact on protein expression was observed in this study. On the contrary, the construction was efficiently expressed, suggesting that the observed disorder does not impair translation. Moreover, this conformational plasticity may provide biological advantages by allowing the mRNA to adapt to varying physiological conditions (Pritišanac et al. 2019).

Regarding the secondary structure prediction of the BOV 13 multi-epitope protein (Figure 2), a diversified composition of structural elements was observed, underscoring its immunological potential. The predominance of random coils (61.68%) suggests significant conformational flexibility, which may enhance the exposure of immunogenic epitopes to the immune system (Can et al. 2020). The presence of extended strands (20.87%), likely

associated with β -sheet formation, provides a stable structural scaffold that contributes to molecular interactions and protein integrity. Additionally, α -helices (17.45%) represent compact, functionally active regions that are critical for specific biomolecular interactions (Shaddel et al. 2018). This balanced combination of secondary structures suggests that the BOV 13 protein was rationally designed to optimize epitope presentation and support robust molecular interactions - essential features for effective immunobiological applications.

Molecular docking is a crucial tool for evaluating biomolecular interactions, particularly in the development of vaccine candidates or immunotherapeutic agents (Porter et al. 2019). In the case of human and bovine TLR-7, the observed RMSD value (0.91 Å) between their structures indicates a high degree of structural similarity, supporting the relevance of the bovine model for comparative studies (López-Camacho et al. 2016). This alignment allowed the identification of the interface between receptor dimers - a critical region for TLR-7's immunological functions (Figure 3). Moreover, the docking analysis demonstrated that the multi-epitope BOV 13 protein interacts with TLR-7 at a non-canonical site located at the lower region of the receptor (Figures 4a and 4b). This atypical interaction site, associated with a high binding energy ($-1264.7 \text{ kcal.mol}^{-1}$) and a cluster comprising 88 members, indicates strong molecular affinity, suggesting the construct's potential to trigger immune responses without interfering with the receptor's primary signaling functions (López-Camacho et al. 2016; Porter et al. 2019).

The high binding energy observed implies that BOV 13 can form stable interactions with TLR-7 - an essential feature for initiating receptor-mediated immune responses. Although TLR-7 primarily recognizes single-stranded RNA-associated molecular patterns (Abbas et al. 2023), it was selected for docking studies due to the availability of a well-modeled structure. Ideally, TLR-9 - which is directly involved in viral DNA recognition (Abbas et al. 2023) - would be more appropriate for this type of analysis. Nonetheless, the large number of cluster members (88) underscores the docking model's robustness and consistency, supporting the inference that similar interactions could occur with TLR-9.

To support the practical evaluation of BOV 13, the gene was cloned, propagated, and expressed in a heterologous system based on *Escherichia coli*. Preliminary Western blot analysis (Figure 5) confirmed the presence of the protein at the expected molecular weight, validating the efficiency of the bacterial expression system (Gonçalves et al. 2024). Following purification and dialysis, the structural integrity of the protein was preserved, as evidenced by detection with the anti-His6 antibody (Figure 5). Final quantification revealed a concentration of $520 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$, demonstrating the feasibility of producing the protein at viable yields for downstream immunological assays. A similar expression profile was reported by Gao et al. (2021), who produced a truncated form of hACE2 at a concentration of $500 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ using a pET28a(+) vector in an *E. coli* system. As

observed in the present study, their recombinant protein was initially expressed in an insoluble form and required subsequent solubilization. In *E. coli*, high-level recombinant expression frequently results in the accumulation of misfolded intermediates in the cytoplasm, forming insoluble aggregates known as inclusion bodies. These denatured protein aggregates lack biological activity and must therefore be solubilized and properly refolded to regain functionality (Kaur et al., 2018).

To confirm the functionality of the BOV 13 multi-epitope protein, its performance was evaluated using a previously standardized in-house indirect ELISA protocol (Fischer et al. 2007). The results demonstrated strong potential for applying BOV 13 in diagnostic assays to detect bovine IgG antibodies against BoAHV-1 and BoAHV-5 (Figure 6). The consistent recognition of the protein by sera with moderate to high neutralizing antibody titers, across all tested concentrations, supports its efficacy as an antigen (Xu et al. 2015). This broad reactivity highlights the ability of BOV 13 to detect robust IgG-mediated immune responses. Moreover, its recognition at low coating concentrations, such as 50 ng/well, reinforces its feasibility for cost-effective diagnostic use.

However, no reactivity was observed in sera with low neutralizing antibody titers (≤ 2), regardless of the protein concentration. This finding suggests the need for further optimization of assay conditions, potentially through the application of a checkerboard titration strategy to fine-tune the concentrations of all reagents involved, including sera, which in this study were tested at a fixed dilution of 1:200 (Berrizbeitia et al. 2012). Despite this limitation, detection by intermediate-titer sera (titer 16) at concentrations ≥ 150 ng indicates that the assay's sensitivity could be enhanced through minor adjustments. Altogether, these findings support the diagnostic potential of the BOV 13 protein and suggest its applicability in serological screening and surveillance of BoAHV-1 and BoAHV-5 infections.

Overall, the multi-epitope protein of BoAHV 1/5 (BOV 13) exhibits favorable structural and functional properties and a good expression rate in a prokaryotic system. This provides a solid foundation for further immunological investigations using the BOV 13 multi-epitope protein as a vaccine in animal models.

Author Contributions:

Conceptualization: Nadálin Yandra Botton, Guilherme de Sousa Feijó, Luciano da Silva Pinto and Geferson Fischer; Methodology, investigation, formal analysis and data curation: Nadálin Yandra Botton, Guilherme de Sousa Feijó, Marina Sturbelle Garcia and Alessandra Neis; Writing – original draft preparation: Nadálin Yandra Botton and Guilherme de Sousa Feijó; Writing – review & editing: Nadálin Yandra Botton, Guilherme de Sousa Feijó, Marina Sturbelle Garcia, Matheus Iuri Frühauf, Lariane da Silva Barcelos, Alessandra Neis, Silvia de Oliveira Hübner, Marcelo de Lima, Luciano da Silva Pinto and Geferson Fischer. Project administration, resources and supervision: Luciano da Silva Pinto and Geferson Fischer. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments: We would like to thank the Laboratório de Bioinformática e Proteômica (BioPro_Lab.) from Universidade Federal de Pelotas for providing technical and material support to our research, as well as the CAPES for supporting this project.

Declarations

Ethical approval: Not applicable (no animal or human studies were made).

Funding: This research was funded by CAPES, under Grant Agreement No 88887.819180/2023-00.

Competing interests: The authors have no competing interests to declare that are relevant to the content of this article.

References

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S (2023) *Imunologia Celular e Molecular* 10th ed. GEN Guanabara Koogan, Brasil
- Akbarian M, Chen SH (2022) Instability challenges and stabilization strategies of pharmaceutical proteins. *Pharmaceutics* 14: 2533. doi: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14112533>
- Andey T, Soni S, Modi S (2024) Conventional vaccination methods: Inactivated and live attenuated vaccines. In: Chavda VP, Vora LK, Apostolopoulos V (ed) *Advanced Vaccination Technologies for Infectious and Chronic Diseases*, 1st edn. Elsevier, USA, pp 31-50
- Araujo IL, Dummer LA, Rodrigues PRC, Santos AGD, Fischer G, Cunha RC, Leite FPL (2018) Immune responses in bovines to recombinant glycoprotein D of bovine herpesvirus type 5 as vaccine antigen. *Vaccine* 36: 7708-7714. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.10.080>
- Babiuk LA, van Drunen Littel-van den Hurk S, Tikoo SK (1996) Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. *Vet Microb* 53: 31-42. doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(96\)01232-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(96)01232-1)
- Berrizbeitia M, Figueroa M, Ward BJ, Rodríguez J, Jorquera A, Figueroa MA, Romero L, Ndao M (2012) Development and application of an ELISA assay using excretion/secretion proteins from epimastigote forms of *T. cruzi* (ESEA antigens) for the diagnosis of Chagas disease. *J Trop Med* 2012: 875909. doi: <https://doi.org/10.1155/2012/875909>
- Borujeni MP, Hajikolaei MRH, Shapouri MRSA, Roshani F (2020) The role of sheep in the epidemiology of Bovine alphaherpesvirus 1 (BoHV-1). *J Pre Vet Med* 174: 104818. doi: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104818>
- Botton NY, de Freitas CP, Peter CM, Barcelos LdS, Ribeiro LC, Frühauf MI, Rodrigues PRC, Hübner SO, Lima M, Fischer G (2022) A infecção pelos Alphaherpesvirus bovinos 1 e 5 e a indução de imunidade de mucosa. *Res Soc* 11: e56311528739-e56311528739. doi: <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i5.28739>
- Can H, Köseoğlu AE, Erkunt AS, Güvendi M, Döşkaya M, Karakavuk M, Ün C (2020) In silico discovery of antigenic proteins and epitopes of SARS-CoV-2 for the development of a vaccine or a diagnostic approach for COVID-19. *Sci Rep* 10: 22387. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79645-9>
- Can MF, Ataseven VS, Yalçın C (2016) Estimation of production and reproductive performance losses in dairy cattle due to bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) infection. *Vet Arhiv* 86: 499-513

- Can-Sahna K, Abayli H, Ilgin M, Aksoy M (2024) Investigation of Some Neuroinfectious Viral Agents in Turkish Cattle: First Detection and Molecular Characterization of Bovine Herpesvirus Type 5 (BoHV-5). *Pak Vet J* 44: 896-902. doi: <https://doi.org/10.29261/pakvetj/2024.211>
- Chang DT, Jones JA, Meyerson H, Colton E, Kwon IK, Matsuda T, Anderson JM (2008) Lymphocyte/macrophage interactions: biomaterial surface-dependent cytokine, chemokine, and matrix protein production. *J Biomed Mater Res A* 87: 676-687. doi: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31630>
- Chen X, Zaro JL, Shen WC (2013) Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Adv Drug Deliv Rev* 65: 1357-1369. doi: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.039>
- Denis M, Slaoui M, Keil G, Babiuk LA, Ernst E, Pastoret PP, Thiry E (1993) Identification of different target glycoproteins for bovine herpes virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes depending on the method of in vitro stimulation. *Immunology* 78: 7
- Dhanda SK, Vaughan K, Schulten V, Grifoni A, Weiskopf D, Sidney J, Peters B, Sette A (2018) Development of a novel clustering tool for linear peptide sequences. *Immunology* 155: 331-345. doi: <https://doi.org/10.1111/imm.12984>
- Diel DG, Almeida SR, Brum MCS, Dezengrini R, Weiblen R, Flores EF (2007) Acute and latent infection by bovine herpesvirus type 5 in experimentally infected goats. *J Vet Mic* 121: 257-267. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.12.019>
- Doytchinova IA, Flower DR (2007) VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinformatics* 8: 1-7. doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-4>
- Dummer LA, Leite FPL, van Drunen Little van den Hurk S (2014) Bovine herpesvirus glycoprotein D: a review of its structural characteristics and applications in vaccinology. *Vet Res* 45: 111. doi: <https://doi.org/10.1186/s13567-014-0111-x>
- Edgar RC (2004) MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5: 1-19. doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-113>
- Emini EA, Hughes JV, Perlow D, Boger J (1986) Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *J Virol* 55: 836-839. doi: <https://doi.org/10.1128/jvi.55.3.836-839.1985>
- Engdawork A, Zewde D, Aydefruhim D, Negussie H (2024) Seroepidemiology of bovine alphaherpesvirus 1 (BoAHV-1) in commercial and smallholder dairy herds in north Shewa, central highlands of Ethiopia. *Res Vet Sci* 174: 105306. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2024.105306>

- Fadaka AO, Sibuyi NRS, Martin DR, Goboza M, Klein A, Madiehe AM, Meyer M (2021) Immunoinformatics design of a novel epitope-based vaccine candidate against dengue virus. *Sci Rep* 11: 19707. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99227-7>
- Faustino LP, Cunha AB, Barbosa CA, Machado AM, Pires DV, Ribeiro AF (2018) Caracterização estrutural in silico de proteínas recombinantes Neuraminidase-RFP. *Sinapse Multipla* 7: 81-94.
- Fischer G, Conceição FR, Leite FPL, Dummer LA, Vargas GDA, Hübner SO, Dellagostin OA, Paulino N, Paulino AS, Vidor T (2007) Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. *Vaccine* 25: 1250-1256. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.10.005>
- Foged C, Brodin B, Frokjaer S, Sundblad A (2005) Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model. *Int J Pharm* 298: 315-322. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.03.035>
- Forbes (2024) Barreiras contra produtos brasileiros aumentam sobretudo no agro. <https://forbes.com.br/forbesagro/2024/05/barreiras-contraproductos-brasileiros-aumentam-10-sobretudo-no-agro/>. Accessed 08 January 2025
- Gamage DG, Gunaratne A, Periyannan GR, Russell TG (2019) Applicability of instability index for in vitro protein stability prediction. *Protein Pep Lett* 26: 339-347. doi: <https://doi.org/10.2174/0929866526666190228144219>
- Gao X, Liang K, Mei S, Peng S, Vong EG, Zhan J (2021) An efficient system to generate truncated human angiotensin converting enzyme 2 (hACE2) capable of binding RBD and spike protein of SARS-CoV2. *Protein Expr. Purif.* 184: 105889. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2021.105889>
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker JM (ed) *The Proteomics Protocols Handbook*, 1st edn. Humana Press, UK, pp. 571-607.
- Gatherer D, Depledge DP, Hartley CA, Szpara ML, Vaz PK, Benk'o M, Brandt CR, Bryant NA, Dastjerdi A, Doszpoly A, Gompels UA, Inoue N, Jarosinski KW, Kaul R, Lacoste V, Norberg P, Origgi FC, Orton RJ, Pellett PE, Schmid DS, Spatz SJ, Stewart JP, Trimpert J, Waltzek TB, Davison AJ (2021) ICTV Virus Taxonomy Profile: Herpesviridae 2021. *J Gen Virol* 102: 1673
- Gonçalves AA, Ribeiro AJ, Resende CA, Couto CA, Gandra IB, dos Santos ICB, da Silva JO, Machado JM, Silva KA, Silva LS, dos Santos M (2024) Recombinant multiepitope proteins expressed in *Escherichia coli* cells

- and their potential for immunodiagnosis. *Microb Cell Fact* 23: 145. doi: <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02418-w>
- Habib A, Liang Y, Xu X, Zhu N, Xie J (2024) Immunoinformatic Identification of Multiple Epitopes of gp120 Protein of HIV-1 to Enhance the Immune Response against HIV-1 Infection. *Int J Mol Sci* 25: 2432. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms25042432>
- Hao J, Fu J, Yu K, Gao X, Zang K, Ma H, Xue H, Song Y, Zhu K, Yang M, Zhang Y (2024) Isolation of the Initial Bovine Alphaherpesvirus 1 Isolate from Yanbian, China. *Vet Sci* 11: 348. doi: <https://doi.org/10.3390/vetsci11080348>
- He J, Huang F, Zhang J, Chen Q, Zheng Z, Zhou Q, Chen D, Li J, Chen J (2021) Vaccine design based on 16 epitopes of SARS-CoV-2 spike protein. *J Med Virol* 93: 2115-2131. doi: <https://doi.org/10.1002/jmv.26596>
- Henzel A, Salla PF, Mascitti AK, Demoliner M, Solyman MC, Lunge VR, Spilki FR (2019) Bovine alphaherpesvirus 1 and 5 in semen from bulls presenting genital lesions under field conditions in Brazil. *Arq Bras Med Vet Zootec* 71: 197-203. doi: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10310>
- Hnasko TS, Hnasko RM (2015) The Western Blot. In: Hnasko RM (ed) *ELISA. Methods in Molecular Biology*, 1st edn. Humana Press, New York, pp. 87-96
- Herold BC, WuDunn DARRELL, Soltys N, Spear PG (1991) Glycoprotein C of herpes simplex virus type 1 plays a principal role in the adsorption of virus to cells and in infectivity. *J Virol* 65: 1090-1098. doi: <https://doi.org/10.1128/jvi.65.3.1090-1098.1991>
- Hoa NT, Afzal H, Gundegmaa U, Raadan O, Cheng LT, Chu CY, Thu DD, Chung YC (2024) Enhanced immune response with baculovirus-expressed BoHV-1 glycoprotein D in vaccine development. *Vet J* 308: 106228. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2024.106228>
- IBGE (2023) Produção agropecuária de bovinos. <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/bovinos/br>. Accessed 06 January 2025
- Ikai A (1980) Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *J Bioch* 88: 1895-1898
- Jespersen MC, Peters B, Nielsen M, Marcatili P (2017) BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Res* 45: W24-W29. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkx346>

- Kaur J, Kumar A, Kaur J (2018) Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. *Int. J. Biol. Macromol.* 106: 803-822. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.080>
- Kolaskar AS, Tongaonkar PC (1990) A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Letters* 276: 172-174. doi: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80535-Q](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80535-Q)
- Kossack C, Fuentes N, Maisey K (2022) In silico prediction of B and T cell epitopes of infectious salmon anemia virus proteins and molecular modeling of T cell epitopes to salmon major histocompatibility complex (MHC) class I. *Fish Shellfish Immunol* 128: 335-347. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.08.002>
- Kozakov D, Hall DR, Xia B, Porter KA, Padhorny D, Yueh C, Beglov D, Vajda S (2017) The ClusPro web server for protein–protein docking. *Nat Protoc* 12: 255-278. doi: <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.169>
- Krishnagopal A, van Drunen Littel-van den Hurk, S (2024) The biology and development of vaccines for bovine alphaherpesvirus 1. *Vet J* 306: 106152. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2024.106152>
- Lautenbach V, Hosseinpour S, Peukert W (2021) Isoelectric point of proteins at hydrophobic interfaces. *Front Chem* 9: 712978. doi: <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.712978>
- Lensink MF, Velankar S, Wodak SJ (2017) Modeling protein–protein and protein–peptide complexes: CAPRI 6th edition. *Proteins* 85: 359-377. doi: <https://doi.org/10.1002/prot.25215>
- Lewin HA (1989) Disease resistance and immune response genes in cattle: strategies for their detection and evidence of their existence. *J Dairy Sci* 72: 1334-1348. doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(89\)79241-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79241-9)
- López-Camacho E, García-Godoy MJ, García-Nieto J, Nebro AJ, Aldana-Montes JF (2016) A new multi-objective approach for molecular docking based on RMSD and binding energy. In: Botón-Fernández M, Martín-Vide C, Santander-Jiménez S, Vega-Rodríguez MA (ed) *Algorithms for Computational Biology: Third International Conference*, 1st edn. Springer International Publishing, pp. 65-77
- Marin M, Burucúa M, Rensetti D, Rosales JJ, Odeón A, Pérez S (2020) Distinctive features of bovine alphaherpesvirus types 1 and 5 and the virus-host interactions that might influence clinical outcomes. *Arch Virol* 165: 285-301. doi: <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04494-5>
- Martinelli DD (2022) In silico vaccine design: A tutorial in immunoinformatics. *Healthc Anal* 2: 100044. doi: <https://doi.org/10.1016/j.health.2022.100044>
- Nandi S, Kumar M, Manohar M, Chauhan RS (2009) Bovine herpes virus infections in cattle. *Anim Health Res Rev* 10: 85-98. doi: <https://doi.org/10.1017/S1466252309990028>

- Naz A, Awan FM, Obaid A, Muhammad SA, Paracha RZ, Ahmad J, Ali A (2015) Identification of putative vaccine candidates against *Helicobacter pylori* exploiting exoproteome and secretome: a reverse vaccinology-based approach. *Infect Genet Evol* 32: 280-291. doi: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.03.027>
- Osterrieder K (2017) *Cell Biology of Herpesviruses*. Springer, Berlin
- Ostler JB, Jones C (2023) The bovine herpesvirus 1 latency-reactivation cycle, a chronic problem in the cattle industry. *Viruses* 15: 552. doi: <https://doi.org/10.3390/v15020552>
- Paredes-Galarza B, Oliceira MT, Timm FB, Stone NV, Violet-Lozano L, Salvato RS, Müller ND, Prandi BA, Gasparetto R, Gonçalves M, Teixeira MAS, Moura MAO, Riet-Correa G, Cerqueira VD, Bezerra PS, Campos FS, Franco AC, Roehe PM (2024) Bovine Alphaherpesvirus 1, Bovine Alphaherpesvirus 5 and Bubaline Alphaherpesvirus 1 in Palatine Tonsils from Water Buffaloes in Northern Brazil and Possible Links with the Origin of Bovine Alphaherpesvirus Type 5. *Viruses* 16: 1024. doi: <https://doi.org/10.3390/v16071024>
- Parvizpour S, Pourseif MM, Razmara J, Rafi MA, Omid Y (2020) Epitope-based vaccine design: a comprehensive overview of bioinformatics approaches. *Drug Discov Today* 25: 1034-1042. doi: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.03.006>
- Patel DK, Menon DV, Patel DH, Dave G (2022) Linkers: A synergistic way for the synthesis of chimeric proteins. *Protein Expr Purif* 191: 106012. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2021.106012>
- Petrini S, Curini V, Righi C, Cammà C, Di Lollo V, Tinelli E, Mincarelli LF, Rossi E, Costantino G, Secondini B, Pirani S, Giammarioli M, Feliziani F (2024) Genomic Characterization of a Wild-Type Bovine alphaherpesvirus 1 (BoAHV-1) Strain Isolated in an Outbreak in Central Italy. *Viruses* 16: 150. doi: <https://doi.org/10.3390/v16010150>
- Porter KA, Desta I, Kozakov D, Vajda S (2019) What method to use for protein–protein docking?. *Curr Opin Struct Biol* 55: 1-7. doi: <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2018.12.010>
- Pritišanac I, Vernon RM, Moses AM, Forman Kay JD (2019) Entropy and information within intrinsically disordered protein regions. *Entropy* 21: 662. doi: <https://doi.org/10.3390/e21070662>
- Pyasi S, Sharma V, Dipti K, Jonniya NA, Nayak D (2021) Immunoinformatics approach to design multi-epitope-subunit vaccine against bovine ephemeral fever disease. *Vaccines* 9: 925. doi: <https://doi.org/10.3390/vaccines9080925>

- Quintero-Barbosa JS, Alméciga-Díaz CJ, Pérez SE, Gutierrez MF (2023) Humoral immune response of mice against a vaccine candidate composed of a chimera of gB of bovine alphaherpesviruses 1 and 5. *Vaccines* 11: 1173. doi: <https://doi.org/10.3390/vaccines11071173>
- Raoufi E, Hemmati M, Eftekhari S, Khaksaran K, Mahmodi Z, Farajollahi MM, Mohsenzadegan M (2020) Epitope prediction by novel immunoinformatics approach: a state-of-the-art review. *Int J Pept Res Ther* 26: 1155-1163. doi: <https://doi.org/10.1007/s10989-019-09918-z>
- Rasheed MA, Ansari AR, Ihsan A, Navid MT, Raza S (2018) Prediction of conserved sites and domains in glycoproteins B, C and D of herpes viruses. *Microb Pathog* 116: 91-99. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.01.020>
- Rashmi L, Sharada R, Ratnamma D, Isloor S, Chandranaik BM, Patil SS (2024) Bovine Alphaherpesvirus-1 (BoHV-1) Infection in Cattle: An Overview of Epidemiology, Role of Envelope Proteins in Disease and Control. *Indian J Anim Res* 1: 1-12. doi: <https://doi.org/10.18805/IJAR.B-5136>
- Reynisson B, Alvarez B, Paul S, Peters B, Nielsen M (2020) NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data. *Nucleic Acids Res* 48: W449-W454. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa379>
- Rosano GL, Ceccarelli EA (2014) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol* 5: 172. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Rosenberg AS, Sauna ZE (2018) Immunogenicity assessment during the development of protein therapeutics. *J Pharm Pharmacol* 70: 584-594. doi: <https://doi.org/10.1111/jphp.12810>
- Roy A, Kucukural A, Zhang Y (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* 5: 725-738. doi: <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5>
- Saha S, Raghava GPS (2006) AlgPred: prediction of allergenic proteins and mapping of IgE epitopes. *Nucleic Acids Res* 34: W202-W209. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkl343>
- Shaddel M, Ebrahimi M, Tabandeh MR (2018) Bioinformatics analysis of single and multi-hybrid epitopes of GRA-1, GRA-4, GRA-6 and GRA-7 proteins to improve DNA vaccine design against *Toxoplasma gondii*. *J Parasit Dis* 42: 269-276. doi: <https://doi.org/10.1007/s12639-018-0996-9>
- Shawan MMAK, Sharma AR, Halder SK, Arian TA, Shuvo MN, Sarker SR, Hasan MA (2023) Advances in computational and bioinformatics tools and databases for designing and developing a multi-epitope-based peptide vaccine. *Int J Pept Res Ther* 29: 60. doi: <https://doi.org/10.1007/s10989-023-10535-0>

- Silva BP, Aragão BB, Pinheiro Júnior JW (2021) Economic impacts of Bovine alphaherpesvirus 1 infection in Brazil: Meta-analysis based on epidemiological indicators. *Semina: Cie Agr Lon* 42: 3355-3378. doi: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2021v42n6p3355>
- Spear PG, Shieh MT, Herold BC, WuDunn D, Koshy TI (1992) Heparan sulfate glycosaminoglycans as primary cell surface receptors for herpes simplex virus. *Adv Exp Med Biol* 1992: 341-353. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4899-2444-5_33
- Tizard IR (2020) *Vaccines for Veterinarians*. Elsevier, USA
- Turner A, Bruun B, Minson T, Browne H (1998) Glycoproteins gB, gD, and gHgL of herpes simplex virus type 1 are necessary and sufficient to mediate membrane fusion in a Cos cell transfection system. *J Virol* 72: 873-875. doi: <https://doi.org/10.1128/jvi.72.1.873-875.1998>
- Varadi M, Anyango S, Deshpande M, Nair S, Natassia C, Yordanova G, Yuan D, Stroe O, Wood G, Laydon A, Židek A, Verde T, Tunyasuvunakool K, Petersen S, Jumper J, Clancy E, Verde R, Vora A, Lutfi M, Figurnov M, Cowie A, Hobbs N, Kohli P, Kleywegt G, Birney E, Hassabis D, Velankar S (2022) AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res* 50: D439-D444. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>
- Verma A, Kamboj H, Khandelwal N, Kumar R, Riyesh T, Kumar N (2024) Genome sequence of bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) isolate from India. *Microbiol Resour Announc* 14: e0095024. doi: <https://doi.org/10.1128/mra.00950-24>
- Wen X, Tong X, Wang M, Wang J, Ni H, Ran X (2020) Protective immunity following vaccination with a recombinant multiple-epitope protein of bovine herpesvirus type I in a rabbit model. *Appl Microbiol Biotechnol* 104: 3011-3023. doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10420-6>
- Wu YJ, Fan CY, Li YK (2009) Protein purification involving a unique auto-cleavage feature of a repeated EAAAK peptide. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877: 4015-4021. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.10.009>
- Xu Q, Ma X, Wang F, Li H, Xiao Y, Zhao X (2015) Design and construction of a chimeric multi-epitope gene as an epitope-vaccine strategy against ALV-J. *Protein Expr Purif* 106: 18-24. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2014.10.007>
- Zajac MPDM, Ladelfa MF, Kotsias F, Muylkens B, Thiry J, Thiry E, Romera SA (2010) Biology of bovine herpesvirus 5. *Vet J* 184: 138-145. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.03.035>

- Zhang J, Yang Y, Wang B, Qiu W, Zhang H, Qiu Y, Yuan J, Dong R, Zha Y (2024) Developing a universal multi-epitope protein vaccine candidate for enhanced borna virus pandemic preparedness. *Front Immunol* 15: 1427677. doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1427677>
- Zheng W, Zhang C, Li C, Pearce R, Bell EW, Zhang Y (2021) Folding non-homologous proteins by coupling deep-learning contact maps with I-TASSER assembly simulations. *Cell Rep Methods* 1: 100014. doi: <https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2021.100014>
- Zhou X, Zheng W, Li Y, Pearce R, Zhang C, Bell EW, Zhang G, Zhang Y (2022) I-TASSER-MTD: a deep-learning-based platform for multi-domain protein structure and function prediction. *Nat Protoc* 17: 2326-2353. doi: <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00728-0>
- Zuker M, Stiegler P (1981) Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucleic Acids Res* 9: 133-148. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/9.1.133>

4 Considerações Finais

A proteína construída neste estudo representa uma abordagem inovadora e promissora no campo das vacinas veterinárias. A BOV 13 exemplifica de forma robusta como a integração da bioinformática, biotecnologia e imunologia aplicada pode impulsionar o desenvolvimento de vacinas de nova geração. Além disso, sua capacidade de combinar diferentes epítomos conservados para otimizar a resposta imune, promovendo cobertura contra diferentes agentes virais, constitui um avanço significativo em relação às estratégias de desenvolvimento de vacinas convencionais.

Essa abordagem não apenas amplia as possibilidades para o controle efetivo de doenças virais em animais, mas também apresenta um potencial translacional, sendo adaptável para o combate a outros agentes patogênicos, tanto na saúde animal quanto na humana, reforçando o caráter inovador e multidisciplinar deste estudo.

Ainda, a proteína foi reconhecida por anticorpos anti-BoAHV, e o protótipo vacinal foi capaz de gerar imunidade a nível de anticorpos totais nos animais imunizados, o que comprova o conceito estabelecido através das análises *in silico* realizadas.

Referências

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. GEN Guanabara Koogan: Brasil, 2023, 632 p.
- ABDELMAGID, O. Y. et al. Fine mapping of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) glycoprotein D (gD) neutralizing epitopes by type-specific monoclonal antibodies and sequence comparison with BHV-5 gD. **Virology**, v. 206, n. 1, p. 242-253, 1995.
- AKBARIAN, M.; CHEN, S. Instability challenges and stabilization strategies of pharmaceutical proteins. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 11, p. 2533, 2022.
- AMADORI, M. et al. Role of a distinct population of bovine $\gamma\delta$ T cells in the immune response to viral agents. **Viral Immunology**, v. 8, n. 2, p. 81-91, 1995.
- ANDEY, T.; SONI, S.; MODI, S. Conventional vaccination methods: Inactivated and live attenuated vaccines. **Advanced Vaccination Technologies for Infectious and Chronic Diseases**, p. 37-50, 2024.
- ARAÚJO, I. L. et al. Immune responses in bovines to recombinant glycoprotein D of bovine herpesvirus type 5 as vaccine antigen. **Vaccine**, v. 36, n. 50, p. 7708-7714, 2018.
- ARAÚJO, I. L. et al. Recombinant BoHV-5 glycoprotein (rgD5) elicits long-lasting protective immunity in cattle. **Virology**, v. 584, p. 44-52, 2023.
- ATANASIU, D. et al. Cascade of events governing cell-cell fusion induced by herpes simplex virus glycoproteins gD, gH/gL, and gB. **Journal of virology**, v. 84, n. 23, p. 12292-12299, 2010.
- BABIUK, L. A. et al. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. **Veterinary microbiology**, v. 53, n. 1-2, p. 31-42, 1996.
- BABIUK, L. A. et al. Protection of cattle from bovine herpesvirus type I (BHV-1) infection by immunization with individual viral glycoproteins. **Virology**, v. 159, n. 1, p. 57-66, 1987.
- BAGAL, A. et al. Molecular docking—useful tool in drug discovery. **Indian Journals**, v. 15, n. 2, p. 129-132, 2022.
- BAHRAMI, A. A. et al. Immunoinformatics: in silico approaches and computational design of a multi-epitope, immunogenic protein. **International reviews of immunology**, v. 38, n. 6, p. 307-322, 2019.
- BALDWIN, C. L. et al. Special features of $\gamma\delta$ T cells in ruminants. **Molecular immunology**, v. 134, p. 161-169, 2021.

- BERRIZBEITIA, M. et al. Development and application of an ELISA assay using excretion/secretion proteins from epimastigote forms of *T. cruzi* (ESEA antigens) for the diagnosis of Chagas disease. **Journal of tropical medicine**, v. 2012, n. 1, p. 875909, 2012.
- BILGE-DAGALP, S. et al. Development of a BoHV-4 viral vector expressing tgD of BoHV-1 and evaluation of its immunogenicity in mouse model. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 1119-1133, 2021.
- BORUJENI, M. P. et al. The role of sheep in the epidemiology of Bovine alphaherpesvirus 1 (BoHV-1). **Preventive veterinary medicine**, v. 174, p. 104818, 2020.
- BOTTON, N. Y. et al. A infecção pelos Alphaherpesvirus bovinos 1 e 5 e a indução de imunidade de mucosa. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 5, p. e56311528739-e56311528739, 2022.
- BRAKE, F.; STUDDERT, M. I. Molecular epidemiology and pathogenesis of ruminant herpesviruses including bovine, buffalo and caprine herpesviruses 1 and bovine encephalitis herpesvirus. **Australian veterinary journal**, v. 62, n. 10, p. 331-334, 1985.
- BÜCHNER, R.; TROMMSDORF, J. J. Bujatrik oder systematisches handbuch der äusserlichen und innerlichen krankheiten des rindviehes. **Aufl Chr Fischer Verlag Bern**, v. 2, p. 514-517, 1841.
- CAIRNS, T. M. et al. Mechanism of neutralization of herpes simplex virus by antibodies directed at the fusion domain of glycoprotein B. **Journal of virology**, v. 88, n. 5, p. 2677-2689, 2014.
- CAMPADELLI-FIUME, G. et al. The novel receptors that mediate the entry of herpes simplex viruses and animal alphaherpesviruses into cells. **Reviews in medical virology**, v. 10, n. 5, p. 305-319, 2000.
- CAN, H. et al. In silico discovery of antigenic proteins and epitopes of SARS-CoV-2 for the development of a vaccine or a diagnostic approach for COVID-19. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 22387, 2020.
- CAN, M. F.; ATASEVEN, V. S.; YALÇIN, C. Estimation of production and reproductive performance losses in dairy cattle due to bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) infection. *Veterinarski Arhiv*, v. 86, n. 4, p. 499-513, 2016.
- CAN-SAHNA, K. et al. Investigation of Some Neuroinfectious Viral Agents in Turkish Cattle: First Detection and Molecular Characterization of Bovine Herpesvirus Type 5 (BoHV-5). **Pakistan Veterinary Journal**, v. 44, n. 3, 2024.
- CASELLI, E. et al. A combined bovine herpesvirus 1 gB-gD DNA vaccine induces immune response in mice. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 28, n. 2, p. 155-166, 2005.

CHANG, D. T. et al. Lymphocyte/macrophage interactions: biomaterial surface-dependent cytokine, chemokine, and matrix protein production. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 87, n. 3, p. 676-687, 2008.

CHEN, X.; ZARO, J. L.; SHEN, W. Fusion protein linkers: property, design and functionality. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 10, p. 1357-1369, 2013.

CHOWDHURY, S. I. Molecular basis of antigenic variation between the glycoproteins C of respiratory bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurovirulent BHV-5. **Virology**, v. 213, n. 2, p. 558-568, 1995.

CHOWDHURY, S. I. et al. Neurovirulence of glycoprotein C (gC)-deleted bovine herpesvirus type-5 (BHV-5) and BHV-5 expressing BHV-1 gC in a rabbit seizure model. **Journal of neurovirology**, v. 6, n. 4, p. 284-295, 2000.

CONNOLLY, S. A.; JARDETZKY, T. S.; LONGNECKER, R. The structural basis of herpesvirus entry. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 2, p. 110-121, 2021.

DELHON, G. et al. Genome of bovine herpesvirus 5. **Journal of virology**, v. 77, n. 19, p. 10339-10347, 2003.

DENIS, M. et al. Identification of different target glycoproteins for bovine herpes virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes depending on the method of in vitro stimulation. **Immunology**, v. 78, n. 1, p. 7, 1993.

DHANDA, S. K. et al. Development of a novel clustering tool for linear peptide sequences. **Immunology**, v. 155, n. 3, p. 331-345, 2018.

DHANDA, S. K. et al. Prediction of IL4 inducing peptides. **Journal of Immunology Research**, v. 2013, n. 1, p. 263952, 2013.

DIEL, D. G. et al. Acute and latent infection by bovine herpesvirus type 5 in experimentally infected goats. **Veterinary microbiology**, v. 121, n. 3-4, p. 257-267, 2007.

D'OFFAY, J. M.; FULTON, R. W.; EBERLE, R. Complete genome sequence of the NVSL BoHV-1.1 Cooper reference strain. **Archives of virology**, v. 158, p. 1109-1113, 2013.

DOYTCHINOVA, I. A.; FLOWER, D. R. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. **BMC bioinformatics**, v. 8, p. 1-7, 2007.

DUMMER, L. A. et al. Immune responses of mice against recombinant bovine herpesvirus 5 glycoprotein D. **Vaccine**, v. 32, n. 21, p. 2413-2419, 2014.

DURASAMY, N. et al. Machine learning tools used for mapping some immunogenic epitopes within the major structural proteins of the bovine coronavirus (BCoV) and for the in silico design of the multiepitope-based vaccines. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 11, p. 1468890, 2024.

EDGAR, R. C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. **BMC bioinformatics**, v. 5, p. 1-19, 2004.

EMINI, E. A. et al. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. **Journal of virology**, v. 55, n. 3, p. 836-839, 1985.

ENDSLEY, J. J. et al. BHV-1-Specific CD4+, CD8+, and $\gamma\delta$ T cells in calves vaccinated with one dose of a modified live BHV-1 vaccine. **Viral immunology**, v. 15, n. 2, p. 385-393, 2002.

ENGDAWORK, A. et al. Seroepidemiology of bovine alphaherpesvirus 1 (BoAHV-1) in commercial and smallholder dairy herds in north Shewa, central highlands of Ethiopia. **Research in Veterinary Science**, v. 174, p. 105306, 2024.

ENGELS, M.; ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. **Veterinary microbiology**, v. 53, n. 1-2, p. 3-15, 1996.

ENGELS, M. et al. The genome of caprine herpesvirus 1: genome structure and relatedness to bovine herpesvirus 1. **Journal of general virology**, v. 68, n. 7, p. 2019-2023, 1987.

FADAKA, A. O. et al. Immunoinformatics design of a novel epitope-based vaccine candidate against dengue virus. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 19707, 2021.

FAUSTINO, L. P. et al. Caracterização estrutural in silico de proteínas recombinantes Neuraminidase-RFP. **Sinapse Múltipla**, v. 7, n. 2, p. 81-94, 2018.

FERRER, M. F. et al. Recombinant MVA expressing secreted glycoprotein D of BoHV-1 induces systemic and mucosal immunity in animal models. **Viral immunology**, v. 24, n. 4, p. 331-339, 2011.

FISCHER, G. et al. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. **Vaccine**, v. 25, n. 7, p. 1250-1256, 2007.

FITZPATRICK, D. R.; BABIUK, L. A.; ZAMB, T. J. Nucleotide sequence of bovine herpesvirus type 1 glycoprotein gIII, a structural model for gIII as a new member of the immunoglobulin superfamily, and implications for the homologous glycoproteins of other herpesviruses. **Virology**, v. 173, n. 1, p. 46-57, 1989.

FOGED, C. et al. Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model. **International journal of pharmaceuticals**, v. 298, n. 2, p. 315-322, 2005.

FORBES. Barreiras contra produtos brasileiros aumentam, sobretudo no agro, 2024. Disponível em: <https://forbes.com.br/forbesagro/2024/05/barreiras-contra-produtos-brasileiros-aumentam-10-932-sobretudo-no-agro/>. Acesso em: 08/01/2025.

FRANCO, A.C. et al. Herpesviridae. In: FLORES, E.F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2017, 1136 p.

GAAFAR, B. B. M. et al. Immunoinformatics approach for multiepitope vaccine prediction from H, M, F, and N proteins of Peste des Petits ruminants virus. **Journal of Immunology Research**, v. 2019, n. 1, p. 6124030, 2019.

GABEV, E. et al. Glycoprotein D of bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) confers an extended host range to BoHV-1 but does not contribute to invasion of the brain. **Journal of virology**, v. 84, n. 11, p. 5583-5593, 2010.

GALLAGHER, J. R. et al. O deslocamento do terminal C do vírus herpes simplex gD é suficiente para expor as interfaces de ativação de fusão em gD. **Journal of virology**, v. 87, n. 23, p. 12656-12666, 2013.

GAMAGE, D. G. et al. Applicability of instability index for in vitro protein stability prediction. **Protein and peptide letters**, v. 26, n. 5, p. 339-347, 2019.

GASTEIGER, E. et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. **The proteomics protocols handbook**, p. 571-607, 2005.

GATHERER, D. et al. ICTV virus taxonomy profile: Herpesviridae 2021. **Journal of General Virology**, v. 102, n. 10, p. 001673, 2021.

GERWIG, G. J. Basic Knowledge of Glycobiology. In: GERWIG, G. J. **The Art of Carbohydrate Analysis**, Switzerland: Springer, 2021. p. 11-50.

GIANNI, T.; AMASIO, M.; CAMPADELLI-FIUME, G. Herpes simplex virus gD forms distinct complexes with fusion executors gB and gH/gL in part through the C-terminal profusion domain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 26, p. 17370-17382, 2009.

GIFFORD, G. A. et al. Epitope specificity of the protective immune response induced by individual bovine herpesvirus-1 glycoproteins. **Vaccine**, v. 8, n. 4, p. 358-368, 1990.

GIULIANI, M. M. et al. A universal vaccine for serogroup B meningococcus. **PNAS**, v. 103, n. 29, p. 10834-10839, 2006.

GOGEV, S. et al. Glycol chitosan improves the efficacy of intranasally administrated replication defective human adenovirus type 5 expressing glycoprotein D of bovine herpesvirus 1. **Vaccine**, v. 22, n. 15-16, p. 1946-1953, 2004.

GONÇALVES, A. A. M. et al. Recombinant multiepitope proteins expressed in Escherichia coli cells and their potential for immunodiagnosis. **Microbial Cell Factories**, v. 23, n. 1, p. 145, 2024.

GUPTA, P. K. et al. Induction of immune responses in cattle with a DNA vaccine encoding glycoprotein C of bovine herpesvirus-1. **Veterinary Microbiology**, v. 78, n. 4, p. 293-305, 2001.

HABIB, A. et al. Immunoinformatic identification of multiple epitopes of gp120 protein of HIV-1 to enhance the immune response against HIV-1 infection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 4, p. 2432, 2024.

HAO, J. et al. Isolation of the Initial Bovine Alphaherpesvirus 1 Isolate from Yanbian, China. **Veterinary Sciences**, v. 11, n. 8, p. 348, 2024.

HE, J. et al. Vaccine design based on 16 epitopes of SARS-CoV-2 spike protein. **Journal of medical virology**, v. 93, n. 4, p. 2115-2131, 2021.

HEGDE, N. R. et al. The use of databases, data mining and immunoinformatics in vaccinology: where are we?. **Expert opinion on drug discovery**, v. 13, n. 2, p. 117-130, 2018.

HENZEL, A. et al. Bovine alphaherpesvirus 1 and 5 in semen from bulls presenting genital lesions under field conditions in Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, n. 01, p. 197-203, 2019.

HEROLD, B. C. et al. Glycoprotein C of herpes simplex virus type 1 plays a principal role in the adsorption of virus to cells and in infectivity. **Journal of virology**, v. 65, n. 3, p. 1090-1098, 1991.

HILTERBRAND, A. T.; DALY, R. E.; HELDWEIN, E. E. Contributions of the four essential entry glycoproteins to HSV-1 tropism and the selection of entry routes. **mbio**, v. 12, n. 2, p. 10.1128/mbio. 00143-21, 2021.

HNASKO, T.S.; HNASKO, R.M. The Western Blot. In: HNASKO, R. **Methods in Molecular Biology**. Humana Press: New York, 2015. pp. 87-96.

HOA, N. et al. Enhanced immune response with baculovirus-expressed BoHV-1 glycoprotein D in vaccine development. **The Veterinary Journal**, v. 308, p. 106228, 2024.

HUNG, S. et al. The interaction of glycoprotein C of herpes simplex virus types 1 and 2 with the alternative complement pathway. **Virology**, v. 203, n. 2, p. 299-312, 1994.

IBRAHIM, E. E. et al. Comparative study on the immunopotentiator effect of ISA 201, ISA 61, ISA 50, ISA 206 used in trivalent foot and mouth disease vaccine. **Veterinary world**, v. 8, n. 10, p. 1189, 2015.

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rebanho de Bovinos (Bois e Vacas), 2023. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/bovinos/br>. Acesso em: 06/01/2025.

IKAI, A. Thermostability and aliphatic index of globular proteins. **The Journal of Biochemistry**, v. 88, n. 6, p. 1895-1898, 1980.

IOANNOU, X. P. et al. The immunogenicity and protective efficacy of bovine herpesvirus 1 glycoprotein D plus Emulsigen are increased by formulation with CpG oligodeoxynucleotides. **Journal of virology**, v. 76, n. 18, p. 9002-9010, 2002.

JESPERSEN, M. C. et al. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. **Nucleic acids research**, v. 45, n. W1, p. W24-W29, 2017.

JIANG, Q. et al. Screening of Bovine Coronavirus Multiepitope Vaccine Candidates: An Immunoinformatics Approach. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 2024, n. 1, p. 5986893, 2024.

JOHNSTON, L. A. Y.; SIMMONS, G. C.; MCGAVIN, M. D. A viral meningo-encephalitis in calves. **Australian Veterinary Journal**, v. 38, n. 4, p. 207-215, 1962.

KAASHOEK, M. J. et al. Virulence, immunogenicity and reactivation of bovine herpesvirus 1 mutants with a deletion in the gC, gG, gI, gE, or in both the gI and gE gene. **Vaccine**, v. 16, n. 8, p. 802-809, 1998.

KARMACHARYA, D. et al. Shared infections at the wildlife–livestock interface and their impact on public health, economy, and biodiversity. **Animal Frontiers**, v. 14, n. 1, p. 20-29, 2024.

KOLASKAR, A. S.; TONGAONKAR, P. C. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. **FEBS letters**, v. 276, n. 1-2, p. 172-174, 1990.

KOLLA, H. B. et al. Immuno-informatics study identifies conserved T cell epitopes in non-structural proteins of Bluetongue virus serotypes: formulation of a computationally optimized next-generation broad-spectrum multi-epitope vaccine. **Frontiers in Immunology**, v. 15, p. 1424307, 2024.

KORBER, B.; LABUTE, M.; YUSIM, K. Immunoinformatics comes of age. **PLoS Computational Biology**, v. 2, n. 6, p. e71, 2006.

KORNUTA, C. A. et al. A plasmid encoding the extracellular domain of CD40 ligand and Montanide™ GEL01 as adjuvants enhance the immunogenicity and the protection induced by a DNA vaccine against BoHV-1. **Vaccine**, v. 39, n. 6, p. 1007-1017, 2021a.

KORNUTA, C. A. et al. MAN α 1-2MAN decorated liposomes enhance the immunogenicity induced by a DNA vaccine against BoHV-1. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 68, n. 2, p. 587-597, 2021b.

KOSSACK, C.; FUENTES, N.; MAISEY, K. In silico prediction of B and T cell epitopes of infectious salmon anemia virus proteins and molecular modeling of T cell epitopes to salmon major histocompatibility complex (MHC) class I. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 128, p. 335-347, 2022.

KOZAKOV, D. et al. The ClusPro web server for protein–protein docking. **Nature protocols**, v. 12, n. 2, p. 255-278, 2017.

KRISHNAGOPAL, A.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. et al. The biology and development of vaccines for bovine herpesvirus 1. **The Veterinary Journal**, v. 306, n. 106152, p. 106152, 2024.

LAUTENBACH, V.; HOSSEINPOUR, S.; PEUKERT, W. Isoelectric point of proteins at hydrophobic interfaces. **Frontiers in chemistry**, v. 9, p. 712978, 2021.

LENSINK, M. F.; VELANKAR, S.; WODAK, S. J. Modeling protein–protein and protein–peptide complexes: CAPRI 6th edition. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 85, n. 3, p. 359-377, 2017.

LEVINGS, R. L. et al. Virus, strain, and epitope specificities of neutralizing bovine monoclonal antibodies to bovine herpesvirus 1 glycoproteins gB, gC, and gD, with sequence and molecular model analysis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 164, n. 3-4, p. 179-193, 2015.

LEWIN, H. A. Disease resistance and immune response genes in cattle: strategies for their detection and evidence of their existence. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 5, p. 1334-1348, 1989.

LIANG, X.; BABIUK, L. A.; ZAMB, T. J. An in vivo study of a glycoprotein gIII-negative bovine herpesvirus 1 (BHV-1) mutant expressing β -galactosidase: evaluation of the role of gIII in virus infectivity and its use as a vector for mucosal immunization. **Virology**, v. 189, n. 2, p. 629-639, 1992.

LI, Y. et al. Characterization of cell-binding properties of bovine herpesvirus 1 glycoproteins B, C, and D: identification of a dual cell-binding function of gB. **Journal of virology**, v. 69, n. 8, p. 4758-4768, 1995.

LIU, X. et al. Intranasal delivery of plasmids expressing bovine herpesvirus 1 gB/gC/gD proteins by polyethyleneimine magnetic beads activates long-term immune responses in mice. **Virology Journal**, v. 18, p. 1-10, 2021.

LÓPEZ-CAMACHO, E. et al. A new multi-objective approach for molecular docking based on RMSD and binding energy. **Springer International Publishing**, p. 65-77, 2016.

LUBINSKI, J. M. et al. Herpes simplex virus type 1 glycoprotein gC mediates immune evasion in vivo. **Journal of virology**, v. 72, n. 10, p. 8257-8263, 1998.

MACKENZIE-DYCK, S. et al. Inclusion of the bovine neutrophil beta-defensin 3 with glycoprotein D of bovine herpesvirus 1 in a DNA vaccine modulates immune responses of mice and cattle. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 21, n. 4, p. 463-477, 2014.

MANOJ, S. et al. Modulation of immune responses to bovine herpesvirus-1 in cattle by immunization with a DNA vaccine encoding glycoprotein D as a fusion protein with bovine CD154. **Immunology**, v. 112, n. 2, p. 328-338, 2004.

MARAWAN, M. A. et al. Characterization of BOHV-1 gG-/tk-/gE-mutant in differential protein expression, virulence, and immunity. **Veterinary Sciences**, v. 8, n. 11, p. 253, 2021.

MARIN, M. et al. Distinctive features of bovine alphaherpesvirus types 1 and 5 and the virus-host interactions that might influence clinical outcomes. **Archives of Virology**, v. 165, p. 285-301, 2020.

MARSHALL, R. L.; ISRAEL, B. A.; LETCHWORTH III, G. J. Monoclonal antibody analysis of bovine herpesvirus-1 glycoprotein antigenic areas relevant to natural infection. **Virology**, v. 165, n. 2, p. 338-347, 1988.

MARTINELLI, D. D. In silico vaccine design: A tutorial in immunoinformatics. **Healthcare Analytics**, v. 2, p. 100044, 2022.

MCLELLAN, J. S. et al. Structure-based design of a fusion glycoprotein vaccine for respiratory syncytial virus. **Science**, v. 342, n. 6148, p. 592-298, 2013

MEHMOOD, I. et al. Immunoinformatics and its Role in Vaccine Development. In: **Frontiers in Molecular Pharming**. Bentham Science Publishers, 2021. p. 30-65.

METZLER, A. E.; SCHUDEL, A. A.; ENGELS, M. Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. **Archives of virology**, v. 87, p. 205-217, 1986.

MORRIS, C. J.; CORTE, D. D. Using molecular docking and molecular dynamics to investigate protein-ligand interactions. **Modern Physics Letters B**, v. 35, n. 08, p. 2130002, 2021.

MUYLKENS, B. et al. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary research**, v. 38, n. 2, p. 181-209, 2007.

NAGPAL, G. et al. Computer-aided designing of immunosuppressive peptides based on IL-10 inducing potential. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 42851, 2017.

NANDI, S. et al. Bovine herpes virus infections in cattle. **Animal Health Research Reviews**, v. 10, n. 1, p. 85-98, 2009.

NAZ, A. et al. Identification of putative vaccine candidates against Helicobacter pylori exploiting exoproteome and secretome: a reverse vaccinology based approach. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 32, p. 280-291, 2015.

OHMANN, H. B.; BABIUK, L. A. Viral-bacterial pneumonia in calves: Effect of bovine herpesvirus-1 on immunologic functions. **Journal of Infectious Diseases**, v. 151, n. 5, p. 937-947, 1985.

OKAZAKI, K. et al. The amino-terminal residue of glycoprotein B is critical for neutralization of bovine herpesvirus 1. **Virus research**, v. 115, n. 2, p. 105-111, 2006.

OKAZAKI, K.; HONDA, E.; KONO, Y. Heparin-binding domain of bovid herpesvirus 1 glycoprotein gIII. **Archives of virology**, v. 134, p. 413-419, 1994.

OLADIPO, E. K. et al. Immunoinformatics approach to Rift Valley fever virus vaccine design in ruminants. **Biomedical Research and Therapy**, v. 11, n. 2, p. 6233-6247, 2024.

OSTERRIEDER, K. **Cell Biology of Herpesviruses**. Springer: Berlin, Germany, 2017, 226 p.

OSTLER, J. B.; JONES, C. The bovine herpesvirus 1 latency-reactivation cycle, a chronic problem in the cattle industry. **Viruses**, v. 15, n. 2, p. 552, 2023.

PAREDES-GALARZA, B. et al. Bovine Alphaherpesvirus 1, Bovine Alphaherpesvirus 5 and Bubaline Alphaherpesvirus 1 in Palatine Tonsils from Water Buffaloes in Northern Brazil and Possible Links with the Origin of Bovine Alphaherpesvirus Type 5. **Viruses**, v. 16, n. 7, p. 1024, 2024.

PATEL, D. K. et al. Linkers: A synergistic way for the synthesis of chimeric proteins. **Protein Expression and Purification**, v. 191, p. 106012, 2022.

PATHAK, R. K.; SEO, Y.; KIM, J. Vetinformatics Approaches in Veterinary Medicine. In: KIM, J.; PATHAK, R.K. **Bioinformatics in Veterinary Science: Vetinformatics**. Springer Nature Singapore: Singapore, 2025, pp. 185-205.

PARVIZPOUR, S. et al. Epitope-based vaccine design: a comprehensive overview of bioinformatics approaches. **Drug Discovery Today**, v. 25, n. 6, p. 1034-1042, 2020.

PAWAR, P. S. et al. Comparative performance of foot-and-mouth disease vaccine prepared using different adjuvants and payloads. **Veterinary Journal**, p. 8-15, 2014.

PETRINI, S. et al. Genomic Characterization of a Wild-Type Bovine alphaherpesvirus 1 (BoAHV-1) Strain Isolated in an Outbreak in Central Italy. **Viruses**, v. 16, n. 1, p. 150, 2024.

PIZZA, M. et al. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. **Science**, v. 287, n. 5459, p. 1816-1820, 2000.

PORTER, K. A. et al. What method to use for protein–protein docking?. **Current opinion in structural biology**, v. 55, p. 1-7, 2019.

PRITIŠANAC, I. et al. Entropy and information within intrinsically disordered protein regions. **Entropy**, v. 21, n. 7, p. 662, 2019.

PUENTES, R. et al. Comparison between DNA detection in trigeminal nerve ganglia and serology to detect cattle infected with bovine herpesviruses types 1 and 5. **PLoS One**, v. 11, n. 5, p. e0155941, 2016.

PYASI, S. et al. Immunoinformatics approach to design multi-epitope-subunit vaccine against bovine ephemeral fever disease. **Vaccines**, v. 9, n. 8, p. 925, 2021.

QUATTROCCHI, V. et al. A DNA vaccine formulated with chemical adjuvant provides partial protection against bovine herpes virus infection in cattle. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 37, 2017.

QUINTERO-BARBOSA, J. S. et al. Characterization and expression of domains of Alpha herpesvirus bovine 1/5 envelope glycoproteins B in Komagataella phaffii. **BMC Veterinary Research**, v. 19, n. 1, p. 28, 2023a.

QUINTERO-BARBOSA, J. S. et al. Humoral immune response of mice against a vaccine candidate composed of a chimera of gB of bovine alpha herpesviruses 1 and 5. **Vaccines**, v. 11, n. 7, p. 1173, 2023b.

RAAPERI, K.; ORRO, T.; VILTROP, A. Epidemiology and control of bovine herpesvirus 1 infection in Europe. **The Veterinary Journal**, v. 201, n. 3, p. 249-256, 2014.

RAMAN, M.; RAMADASS, P.; RAJAVELU, G. Evaluation of Saponin and Montanide ISA 50 adjuvants for their immunopotency and effect on humoral immune response of calves to purified midgut antigen of *Boophilus microplus*. **Veterinarski arhiv**, v. 74, n. 2, p. 129-140, 2004.

RAOUFI, E. et al. Epitope prediction by novel immunoinformatics approach: a state-of-the-art review. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 26, p. 1155-1163, 2020.

RASHEED, M. A. et al. Prediction of conserved sites and domains in glycoproteins B, C and D of herpes viruses. **Microbial Pathogenesis**, v. 116, p. 91-99, 2018.

RASHMI, L. et al. Bovine Alpha herpesvirus-1 (BoHV-1) Infection in Cattle: An Overview of Epidemiology, Role of Envelope Proteins in Disease and Control. **Indian J. Anim. Res**, v. 1, p. 1-12, 2024.

REISINGER, L.; REIMANN, H. Beitrag zur Ätiologie des Blaschenaussschlages der Rinder, Wien. **Tieraerztl. Monatsschr**, v. 15, p. 249, 1928.

REYNISSON, B. et al. NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data. **Nucleic acids research**, v. 48, n. W1, p. W449-W454, 2020.

RIAZ, R.; ZAHID, S.; KHAN, M. S. Designing an Epitope-Based Vaccine against Bovine Viral Diarrhea using Immuno-informatics. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 44, n. 2, p. 465-475, 2024.

RIBEIRO, B. F. S. et al. Bioinformatics approach to design peptide vaccines for viruses. In: **Reverse Vaccinology**. Academic Press, 2024. p. 265-287.

- RIGHI, C. et al. The cell-mediated immune response against Bovine alphaherpesvirus 1 (BoHV-1) infection and vaccination. **Vaccines**, v. 11, n. 4, p. 785, 2023.
- ROBINSON, K. E. et al. The essential and non-essential genes of Bovine herpesvirus 1. **Journal of General Virology**, v. 89, n. 11, p. 2851-2863, 2008.
- ROIZMAN, B.; DESROSIERS R. C.; FLECLTELLSTEIN, B. The family herpesviridae: an update. **Arc11 Viroll23**, p. 425-449, 1992.
- ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 172, 2014.
- ROSENBERG, A. S.; SAUNA, Zuben E. Immunogenicity assessment during the development of protein therapeutics. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 70, n. 5, p. 584-594, 2018.
- ROY, A.; KUCUKURAL, A.; ZHANG, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. **Nature protocols**, v. 5, n. 4, p. 725-738, 2010.
- SAHA, S.; RAGHAVA, G. P. S. AlgPred: prediction of allergenic proteins and mapping of IgE epitopes. **Nucleic acids research**, v. 34, n. 2, p. W202-W209, 2006.
- SALAUDDIN, M. et al. Development of membrane protein-based vaccine against lumpy skin disease virus (LSDV) using immunoinformatic tools. **Veterinary Medicine and Science**, v. 10, n. 3, p. e1438, 2024.
- SAMAD, A. et al. Immune epitopes identification and designing of a multi-epitope vaccine against bovine leukemia virus: a molecular dynamics and immune simulation approaches. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 71, n. 10, p. 2535-2548, 2022.
- SANTHOSHKUMAR, R.; YUSUF, A. In silico structural modeling and analysis of physicochemical properties of curcumin synthase (CURS1, CURS2, and CURS3) proteins of Curcuma longa. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 24, 2020.
- SANTOS, F. D. S. et al. Bacillus toyonensis improves immune response in the mice vaccinated with recombinant antigen of bovine herpesvirus type 5. **Beneficial Microbes**, v. 9, n. 1, p. 133-142, 2018.
- SCARSELLI, M. et al. Rational design of a meningococcal antigen inducing broad protective immunity. **Science Translational Medicine**, v. 3, n. 91, p. 91ra62-91ra62, 2011.
- SCHROEDER, R. J.; MOVES, M. D. An acute upper respiratory infection of dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 125, p. 471-472, 1954.

SEEPIC. Montanide ISA 50 V2. Disponível em:
<https://www.seppic.com/en/montanide-isa-w-o>. Acesso em: 09/01/2025.

SHADDEL, M.; EBRAHIMI, M.; TABANDEH, M. R. Bioinformatics analysis of single and multi-hybrid epitopes of GRA-1, GRA-4, GRA-6 and GRA-7 proteins to improve DNA vaccine design against *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 42, p. 269-276, 2018.

SHAHAB, M. et al. An immunoinformatics approach to design novel and potent multi-epitope-based vaccine to target lumpy skin disease. **Biomedicines**, v. 11, n. 2, p. 398, 2023.

SHAHZAD, W. et al. Preparation and evaluation of haemorrhagic septicaemia oil adjuvanted vaccine with a new ready to use oil adjuvant for cattle and buffaloes. **Buffalo Bulletin**, v. 38, n. 4, p. 605-612, 2019.

SHAWAN, M. M. A. K. et al. Advances in computational and bioinformatics tools and databases for designing and developing a multi-epitope-based peptide vaccine. **International journal of peptide research and therapeutics**, v. 29, n. 4, p. 60, 2023.

SILVA, B. P. et al. Economic impacts of bovine alphaherpesvirus 1 infection in Brazil: meta-analysis based on epidemiological indicators. **Sêmia Ciências Agrárias**, v. 42, p. 3355-3378, 2021.

SINGH, N. et al. In silico analysis of protein. **J Bioinform Genomics Proteomics**, v. 1, n. 2, p. 1007, 2016.

SINGH, S.; BAKER, Q. B.; SINGH, D. B. Molecular docking and molecular dynamics simulation. In: **Bioinformatics**. Academic Press, 2022. p. 291-304.

SNIDER, M. et al. Strategies for induction of protective immunity to bovine herpesvirus-1 in newborn calves with maternal antibodies. **Vaccine**, v. 26, n. 25, p. 3103-3111, 2008.

SPEAR, P. G. et al. Heparan sulfate glycosaminoglycans as primary cell surface receptors for herpes simplex virus. **Heparin and related polysaccharides**, p. 341-353, 1992.

SPEAR, P. G. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. **Cellular microbiology**, v. 6, n. 5, p. 401-410, 2004.

SPEAR, P. G.; EISENBERG, R. J.; COHEN, G. H. Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. **Virology**, v. 275, n. 1, p. 1-8, 2000.

SPICKLER, A. R.; ROTH, J. A. Adjuvants in veterinary vaccines: modes of action and adverse effects. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 17, n. 3, p. 273-281, 2003.

TETTELIN H. et al. Complete Genome Sequence of *Neisseria meningitidis* Serogroup B Strain MC58. **Science**, v. 287, n. 5459, p. 1809-1815, 2000.

TIKOO, S. K. et al. Lymphocyte proliferative responses to recombinant bovine herpes virus type 1 (BHV-1) glycoprotein gD (gIV) in immune cattle: identification of a T cell epitope. **Viral immunology**, v. 8, n. 1, p. 19-25, 1995.

TIKOO, S. K. et al. Molecular cloning, sequencing, and expression of functional bovine herpesvirus 1 glycoprotein gIV in transfected bovine cells. **Journal of Virology**, v. 64, n. 10, p. 5132-5142, 1990.

TIZARD, I.R. **Vaccines for Veterinarians**. Elsevier: United States of America, 2020, 324 p.

TOUSSAINT, J. et al. Genetic immunisation of cattle against bovine herpesvirus 1: glycoprotein gD confers higher protection than glycoprotein gC or tegument protein VP8. **Veterinary research**, v. 36, n. 4, p. 529-544, 2005.

TURNER, A. et al. Glycoproteins gB, gD, and gHgL of herpes simplex virus type 1 are necessary and sufficient to mediate membrane fusion in a Cos cell transfection system. **Journal of virology**, v. 72, n. 1, p. 873-875, 1998.

UJVARI, S. C. **A história da humanidade contada pelos vírus**. São Paulo: Contexto, 2008. 208 p.

VAN DONKERSGOED, J. et al. A subunit gIV vaccine, produced by transfected mammalian cells in culture, induces mucosal immunity against bovine herpesvirus-1 in cattle. **Vaccine**, v. 12, n. 14, p. 1295-1302, 1994.

VARADI, M. et al. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. **Nucleic acids research**, v. 50, n. D1, p. D439-D444, 2022.

VERMA, A. et al. Genome sequence of bovine herpesvirus 5 (BoHV-5) isolate from India. **Microbiology Resource Announcements**, p. e00950-24, 2024.

WANG, P. et al. A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach. **PLoS computational biology**, v. 4, n. 4, p. e1000048, 2008.

WEI, M. et al. Design and assessment of two broad-spectrum multi-epitope vaccine candidates against bovine viral diarrhea virus based on the E0 or E2 envelope glycoprotein. **The Veterinary Journal**, v. 309, p. 106296, 2025.

WEN, X. et al. Protective immunity following vaccination with a recombinant multiple-epitope protein of bovine herpesvirus type I in a rabbit model. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 104, p. 3011-3023, 2020.

WHITE, J. M. et al. Structures and mechanisms of viral membrane fusion proteins: multiple variations on a common theme. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v. 43, n. 3, p. 189-219, 2008.

WU, Y.; FAN, C.; LI, Y. Protein purification involving a unique auto-cleavage feature of a repeated EAAAK peptide. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 31, p. 4015-4021, 2009.

XU, Q. et al. Design and construction of a chimeric multi-epitope gene as an epitope-vaccine strategy against ALV-J. **Protein Expression and Purification**, v. 106, p. 18-24, 2015.

YUE, D. et al. Crystal structure of bovine herpesvirus 1 glycoprotein D bound to nectin-1 reveals the basis for its low-affinity binding to the receptor. **Science Advances**, v. 6, n. 20, p. eaba5147, 2020.

ZAJAC, M. P. Del Médico et al. Biology of bovine herpesvirus 5. **The Veterinary Journal**, v. 184, n. 2, p. 138-145, 2010.

ZHANG, J. et al. Developing a universal multi-epitope protein vaccine candidate for enhanced borna virus pandemic preparedness. **Frontiers in Immunology**, v. 15, p. 1427677, 2024.

ZUKER, M.; STIEGLER, P. Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. **Nucleic acids research**, v. 9, n. 1, p. 133-148, 1981.