

SELEÇÃO E ANÁLISE *IN SILICO* DE PROTEÍNAS PUTATIVAS DE *CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS*

Bruna Mylena Alves de Souza^{1,3} (Tema livre), e-mail: bruna.mylena@souunit.com.br;
Felipe Santos Rocha^{1,3}, e-mail: felipe.srocha@souunit.com.br
Tatiane Batista dos Santos^{1,3}, e-mail: tatiane.bdos@souunit.com.br;
Glenda Amaral da Silva³, e-mail: glendaamaral7@gmail.com;
Daniela Droppa-Almeida^{2,3} (co-orientador), e-mail: danieladroppa@gmail.com;
Francine Ferreira Padilha^{2,3} (Orientador), e-mail: fpadilha@yahoo.com.br.

¹Universidade Tiradentes/Enfermagem/Aracaju/SE.

²Universidade Tiradentes/Pós-Doc em Saúde e Ambiente/Aracaju/SE.

³Instituto de Tecnologia e Pesquisa/Aracaju/SE

Exemplo: 2.00.00.00-6 - Ciências Biológicas 2.12.00.00-9 – Microbiologia

Introdução: Introdução: *Corynebacterium pseudotuberculosis* é uma bactéria classificada como Gram-positiva e é o agente etiológico da Linfadenite Caseosa (LC), enfermidade que acomete ovinos e caprinos. Esta enfermidade se apresenta em duas formas clínicas com formação de piogranulomas, podendo ser classificada como: LC interna (granulomas internos e demais órgãos) e a LC superficial (linfonodos superficiais). Devido a formação desses granulomas o uso de antibióticos se torna ineficaz por não conseguirem ultrapassar a barreira de células, diante disso o método mais utilizado para eliminação é a microcirurgia e apenas possível em casos de LC superficial. A LC interna é dita como assintomática visto que o diagnóstico é a presença de granulomas, além disso, atualmente a vacina comercial apresenta baixa proteção e necessita de reforços anuais, por esses fatores a LC acarreta grandes perdas econômicas na ovinocaprinocultura. Diante disso busca-se antígenos que tenham potencial para formular um diagnóstico sorológico ou mesmo uma vacina eficaz. Com inúmeros genomas já sequenciados dessa bactéria há uma diversidade de proteínas putativas que podem ser potencialmente viáveis e com o advento da bioinformática torna-se possível selecioná-las *in silico* [1,2,3].

Objetivo: Selecionar antígenos que apresentem potencial para compor um teste diagnóstico ou uma vacina recombinante contra LC. **Metodologia:** Para isso acessou-se o GenPept em busca de proteínas de *C. pseudotuberculosis* para seleção e subsequente análises de bioinformática para verificar sua localização subcelular com o uso do ProtCompB, alinhamento via Blastn, antigenicidade pelo VaxyJen 2.0, alergenicidade pelo AlgPred e presença de epítomos imunodominantes de células B pelo IEDB. Resultados: Um total de 4 proteínas foram selecionadas a CP1 (AKI59415.2), CP2 (AKI58509.2), CP3 (ADL09665.2) e CP4 (ADL09673.2). Após a obtenção das sequências primárias as mesmas foram analisadas no ProtCompB para verificar sua localização subcelular, onde a CP1 e CP2 apresentaram peptídeo sinal como proteína secretada e as CP3 e CP4 classificadas como citoplasmática sendo excluídas das próximas análises. Com o uso do Blastn foi possível verificar que a CP1 possuía homologia com uma provável lipoproteína e CP2 continuou como proteína putativa, ou seja, sem função estabelecida. Pelo VaxyJen apenas a CP1 apresentou-se antigênica com um score de 0.57. Com o resultado do VaxyJen a CP2 foi descartada e apenas a CP1 seguiu com as demais análises, se apresentando não alergênica segundo o AlgPred. No IEDB a CP1 apresentou 10 epítomos

imunodominantes para células B. **Conclusão:** A busca de potenciais antígenos através da bioinformática tem sido amplamente utilizada devido a especificidade dos softwares e o baixo custo dos mesmos ao comparar com as etapas experimentais que muitas vezes podem ser suprimidas. Diante dos resultados apresentados foi possível selecionar a CP1 que segundo o alinhamento via Blastn possui homologia com lipoproteínas, as quais vem apresentando um papel direto nas funções associadas à virulência. Na sequência das análises a CP1 foi antigênica e não alergênica, e com 10 regiões capazes de interagir com anticorpos, sendo deste modo um alvo potencial para obtenção de sua versão recombinante para ser usado como antígeno em diagnóstico sorológico por ELISA ou para compor uma formulação vacinal.

PALAVRAS-CHAVE: Bioinformática, Linfadenite Caseosa, Lipoproteína.

AGRADECIMENTOS: Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo auxílio financeiro que possibilitou a dedicação integral ao Programa de Iniciação Científica – IC.

ABSTRACT:

Introduction: *Corynebacterium pseudotuberculosis* is a bacterium classified as Gram-positive and is the etiological agent of Caseous Lymphadenitis (LC), a disease that affects sheep and goats. This disease presents itself in two clinical forms with formation of pyogranulomas and can be classified as: internal LC (internal granulomas and other organs) and superficial LC (superficial lymph nodes). Due to the formation of these granulomas the use of antibiotics becomes ineffective because they can't overcome the barrier of cells, therefore the most used method for elimination is microsurgery and only possible in cases of superficial LC. The internal LC is said to be asymptomatic since the diagnosis is the presence of granulomas, besides that currently the commercial vaccine presents low protection and needs annual reinforcement, because of these factors the LC causes great economic losses in sheep and goat farming. In view of this, we are looking for antigens that have potential to formulate a serological diagnosis or even an effective vaccine. With numerous genomes already sequenced from this bacterium there is a diversity of putative proteins that can be potentially viable and with the advent of bioinformatics it becomes possible to select them in silico [1,2,3]. **Objective:** To select antigens that have the potential to compose a diagnostic test or a recombinant vaccine against LC. **Methodology:** GenPept was accessed in search of *C. pseudotuberculosis* proteins for selection and subsequent bioinformatics analysis to verify their subcellular location with the use of ProtCompB, alignment via Blastn, antigenicity via VaxyJen 2.0, allergenicity via AlgPred and presence of immunodominant epitopes of B cells by IEDB. **Results:** A total of 4 proteins were selected at CP1 (AKI59415.2), CP2 (AKI58509.2), CP3 (ADL09665.2) and CP4 (ADL09673.2). After obtaining the primary sequences they were analyzed in ProtCompB to verify their subcellular location, where CP1 and CP2 presented signal peptide as secreted protein and CP3 and CP4 classified as cytoplasmic being excluded from the next analyses. With the use of Blastn it was possible to verify that CP1 had homology with a probable lipoprotein and CP2 continued as putative protein, that is, without established function. By VaxyJen only CP1 was antigenic with a score of 0.57. With the result of VaxyJen CP2 was discarded and only CP1 followed with the other analyses, being non-allergenic according to AlgPred. In IEDB CP1 presented 10 immunodominant epitopes for B cells.

Conclusion: The search for potential antigens through bioinformatics has been widely used due to the specificity of the software and its low cost when compared to experimental steps that can often be suppressed. In view of the results presented it was possible to select the CP1 that according to the alignment via Blastn has homology with lipoproteins, which have a direct role in the functions associated with virulence. Following the analysis, CP1 was antigenic and non-allergenic, and with 10 regions capable of interacting with antibodies, thus being a potential target for obtaining its recombinant version to be used as an antigen in serological diagnosis by ELISA or to compose a vaccine formulation.

Keywords: Bioinformatics, Caseous Lymphadenitis, vaccine.

Acknowledgements: To the National Council for Scientific and Technological Development - CNPq for the financial support that enabled full dedication to the Scientific Initiation Program - IC

Referências/references:

1. DE OLIVEIRA SILVA, Mara Thais *et al.* Establishment of an objective endpoint in mice model for caseous lymphadenitis vaccine trials. **Veterinary microbiology**, v. 230, p. 86-89, 2019.
2. DOMENIS, L. *et al.* Caseous lymphadenitis caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* in alpine chamois (*Rupicapra r. rupicapra*): a review of 98 cases. **Journal of comparative pathology**, v. 161, p. 11-19, 2018.
3. DROPPA-ALMEIDA, Daniela *et al.* Recombinant CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* confers protection in mice after challenge with a virulent strain. **Vaccine**, v. 34, n. 8, p. 1091-1096, 2016.