

## **Epítomos imunodominantes de proteína putativa *Corynebacterium pseudotuberculosis* apresentam interações com TLR-2 *in silico***

### **Immunodominant epitopes of putative protein *Corynebacterium pseudotuberculosis* interacts with TLR-2 *in silico***

DOI:10.34117/bjdv7n3-605

Recebimento dos originais: 08/02/2021

Aceitação para publicação: 01/03/2021

#### **Daniela Droppa-Almeida**

Laboratório de Biomateriais, Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Universidade Tiradentes, Aracaju, Sergipe, Brazil.

#### **Felipe Santos Rocha**

Laboratório de Biomateriais, Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Universidade Tiradentes, Aracaju, Sergipe, Brazil.

#### **Tatiane Batista dos Santos**

Laboratório de Biomateriais, Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Universidade Tiradentes, Aracaju, Sergipe, Brazil.

#### **Bruna Mylena Alves de Souza**

Laboratório de Biomateriais, Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Universidade Tiradentes, Aracaju, Sergipe, Brazil.

#### **Glenda Amaral da Silva**

Laboratório de Biomateriais, Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Universidade Tiradentes, Aracaju, Sergipe, Brazil.

#### **Francine Ferreira Padilha**

Laboratório de Biomateriais, Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Universidade Tiradentes, Aracaju, Sergipe, Brazil.

E-mail: fpadilha@yahoo.com

## **RESUMO**

**INTRODUÇÃO:** A Linfadenite Caseosa (LC) é uma doença infecciosa causada pela bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* e vem ocasionando inúmeros prejuízos à indústria de carne ovinocaprina. Ela possui duas formas clínicas, a forma superficial, quando há a presença de abscessos em linfonodos periféricos ou forma visceral, quando esses abscessos encontram-se nos órgãos internos. A antibioticoterapia hoje existente se torna ineficaz por não conseguir cruzar essa barreira, como também, a vacina comercial hoje disponibilizada possui baixo poder de proteção, necessitando assim de uma nova dose a cada ano o que ocasiona um alto custo. **OBJETIVO:** realizar um desenho vacinal em busca de potenciais alvos proteicos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para formular uma vacina contra a Linfadenite Caseosa. **METODOLOGIA:** Para isso, análises *in silico* utilizando o Vaxign para busca de proteínas secretadas foram feitas e subsequentes análises relacionadas ao potencial antigênico, alergênico e caracterizações físico-químicas serviram

para filtrar as proteínas de interesse. Das proteínas selecionadas foram obtidos os epítomos imunodominantes e sua interação com o TLR-2 foi determinada. RESULTADOS: Foram encontradas pelo Vaxign um total de 26 proteínas putativas secretadas, sendo realizada as suas caracterizações a fim de selecionar as proteínas aptas para possível formulação de uma vacina. Destas, nove delas se mostraram antigênicas e não alergênicas e após análise físico-químicas apenas duas seguiram para análise dos epítomos imunodominantes de células B. As proteínas ADL20140.1 e ADL20298.1 apresentaram um total de 2 e 5 epítomos, respectivamente. Após determinação do potencial antigênico apenas os epítomos 4, 6 e 7 foram utilizados para o docking molecular com o TLR-2. Os epítomos 4 e 7 apresentaram possíveis interações através dos domínios LRR enquanto o epítomo 6 apresentou possível interação com o domínio TIR do TLR-2. CONCLUSÃO: Diante do uso de bioinformática é possível verificar previsões *in silico* que possam diminuir etapas dispendiosas experimentais. Com isso, nesse trabalho foi possível selecionar uma proteína com características importantes para compor uma vacina contra LC e até epítomos imunodominantes que podem servir para formular uma vacina peptídica, esses epítomos apresentaram potenciais interações com o TLR-2 indicando uma possível ativação da imunidade inata, importante passo para um alvo vacinal. Portanto, esse trabalho fornece informações importantes que podem servir para formular, de fato, uma vacina contra LC.

**Palavras-chaves:** Linfadenite caseosa, vacinas, LRR, TIR.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Caseous lymphadenitis (CLA) is an infectious disease caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* and has been causing numerous losses to the meat industry from sheep and goats. It has two clinical forms, the superficial form when abscesses are present in peripheral lymph nodes, or visceral form when these abscesses are found in internal lymph nodes. Nowadays antibiotic therapy is ineffective because it is unable to cross this barrier, as well as the current commercial vaccine available has low protective power, thus requiring a new dose every year, which causes a high cost. **OBJECTIVE:** To carry out a vaccine design in search of potential protein targets of *Corynebacterium pseudotuberculosis* to formulate a vaccine against Caseous Lymphadenitis. **METHODOLOGY:** For this, *in silico* analyzes using Vaxign to search for secreted proteins were made and subsequent analyzes related to the antigenic, allergenic potential and physicochemical characterizations served to filter the proteins of interest. Immunodominant epitopes were obtained from the selected proteins and their interaction with TLR-2 was determined. **RESULTS:** A total of 26 putative secreted proteins were found by Vaxign, and their characterizations were carried out to select the proteins suitable for a possible formulation of a vaccine. Of these, nine of them were antigenic and non-allergenic and after physical-chemical analysis, only two went on to analyze the immunodominant epitopes of B cells. The proteins ADL20140.1 and ADL20298.1 presented a total of 2 and 5 epitopes, respectively. After determining the antigenic potential, only epitopes 4, 6, and 7 were used for molecular docking with TLR-2. Epitopes 4 and 7 showed possible interactions across the LRR domains while epitope 6 showed possible interactions with the TLR-2 TIR domain. **CONCLUSION:** Because of the use of bioinformatics, it is possible to verify *in silico* predictions that can reduce expensive experimental steps. With that, in this work it was possible to select a protein with important characteristics to compose a vaccine against CLA and even immunodominant epitopes that can serve to formulate a peptide vaccine, these epitopes showed potential interactions with TLR-2 indicating a possible activation of innate immunity, an important step towards a

vaccine target. Therefore, this work provides important information that can be used to formulate, in fact, a vaccine against CLA.

**Keywords:** Caseous lymphadenitis, vaccines, LRR, TRR,

## 1 INTRODUÇÃO

A Linfadenite Caseosa (LC) é uma enfermidade infectocontagiosa que acomete ovinos e caprinos, no entanto, o agente etiológico (AE) é capaz de infectar outros hospedeiros levando a quadros clínicos distintos (ALVES et al., 2020). A LC pode se apresentar em duas formas clínicas, a superficial, quando há a presença de abscessos em linfonodos periféricos ou pode ser classificada como visceral ou interna, quando esses abscessos encontram-se nos órgãos internos ou em linfonodos internos (JESSE et al., 2020; LACASTA et al., 2015; SHI et al., 2019; UMER et al., 2020; YAACOB et al., 2021) A LC vem ocasionando inúmeros prejuízos à indústria de carne ovinacaprina, decorrente da diminuição da produção de lã, condenação de carnes e carcaças. Seu AE é a bactéria Gram-positiva *Corynebacterium pseudotuberculosis* a qual consegue sobreviver por meses no ambiente e no organismo devido às diversas maneiras de evadir o sistema imunológico (FU et al., 2020).

O tratamento atual da LC é ineficiente, pois é baseado em antibioticoterapia e devido a formação dos granulomas, a barreira celular formada impossibilita a penetração dos fármacos (SOUZA DE OLIVEIRA et al., 2020). Diante disso, o método mais utilizado para eliminação da patogênese é a microcirurgia, apenas possível em casos de LC superficial, não garantindo que demais órgãos e linfonodos desse animal sejam acometidos. Em relação ao diagnóstico, o mesmo é clínico sendo possível diagnosticar apenas os casos com granulomas superficiais (visíveis). Com a presença do granuloma a microcirurgia é realizada e o material caseoso é utilizado para isolar a *C. pseudotuberculosis* e testes bioquímicos são realizados subsequentemente. Deste modo, os animais com a forma clínica visceral são considerados assintomáticos, sendo assim os principais disseminadores da doença no rebanho. Nesse cenário o melhor custo-benefício é a profilaxia.

Em relação à profilaxia para LC, ela é baseada na linhagem 1002 atenuada apresentando baixa proteção nos animais a qual necessita de reforços anuais, tornando deste modo uma estratégia dispendiosa e de alto custo para o ovinocaprinocultor (WINDSOR, 2011). Diante disso, a busca por uma vacina eficaz para LC é recorrente e diversas linhagens isoladas já tiveram seus genomas sequenciados no intuito de obter

informações pertinentes para gerar uma vacina eficaz, utilizando neste contexto a vacinologia reversa (ALMEIDA et al., 2016; ALVES et al., 2016; CAVALCANTE et al., 2015; HASSAN et al., 2012; SETTE; RAPPUOLI, 2010; SILVA et al., 2012; SOBRINHO SANTOS et al., 2018).

Das estratégias vacinais mais testadas no meio científico, destaca-se o uso de proteínas recombinantes. Para auxiliar na seleção de alvos potencialmente antigênicos, o uso da bioinformática é crescente, a qual utiliza softwares que possibilitam predição *in silico* algumas características básicas, porém essenciais para seleção de um alvo, minimizando os custos e o uso de animais durante o desenvolvimento de uma vacina, para isso chama-se de desenho vacinal (ARAÚJO et al., 2019; DOYTCHINOVA; FLOWER, 2007; DROPPA-ALMEIDA; FRANCESCHI; PADILHA, 2018; GARG et al., 2016; KHAN et al., 2014; SHARMA et al., 2021; ZHAO et al., 2011). Diante disso, o objetivo desse trabalho foi realizar um desenho vacinal em busca de potenciais alvos proteicos de *Corynebacterium pseudotuberculosis* para formular uma vacina contra a Linfadenite Caseosa.

## 2 METODOLOGIA

### SELEÇÃO DAS PROTEÍNAS

Para a seleção das proteínas de *C. pseudotuberculosis* foi utilizado o Vaxign - Vaccine Design (XIANG; HE, 2009) o qual possui um sistema de previsão e análise de alvos vacinais baseado no princípio da vacinologia reversa. A linhagem selecionada foi a 1002 e os alvos que apresentassem peptídeo sinal indicando endereçamento extracelular.

### CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS

#### Antigenicidade

Após a seleção das proteínas, as mesmas foram submetidas no VaxiJen para verificar seu potencial antigênico. O software VaxiJen30 v2.0 (DOYTCHINOVA; FLOWER, 2007) se baseia em uma previsão independente de alinhamento dos antígenos protetores. Foi desenvolvido para permitir a classificação de antígenos de acordo com suas propriedades físico-químicas sem recorrer ao alinhamento de sequências. A precisão do servidor varia de 70% a 89% com base nos organismos-alvo (DOYTCHINOVA; FLOWER, 2007).

#### Alergenicidade

Para analisar a alergenicidade das proteínas selecionadas, o software AlgPred foi usado. O servidor executa a previsão com base em seis abordagens diferentes. Um ou uma combinação das seis abordagens podem ser utilizadas para prever proteínas alergênicas com uma alta precisão ((GASTEIGER E., HOOGLAND C., GATTIKER A., DUVAUD S., WILKINS M.R., APPEL R.D., 2005).

### **Análise Físico-química**

Para verificar diferentes propriedades físico-químicas para os alvos proteicos, incluindo índice de instabilidade, índice alifático e grande média de hidropaticidade (GRAVY) foi utilizado o ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>) (GASTEIGER E., HOOGLAND C., GATTIKER A., DUVAUD S., WILKINS M.R., APPEL R.D., 2005).

### **Blastp**

Para verificar possível homologia e similaridade das sequências primárias das proteínas selecionadas, foi feito o alinhamento utilizando o Blastp para possível identificação da família proteica das mesmas.

### **Obtenção dos epítomos de Células B**

Para verificar a presença de epítomos imunodominantes de células B nas proteínas selecionadas, o Immune Epitope Database and Analysis Resource (IEDB) (<http://www.iedb.org/>) foi utilizado. Para isso, foi selecionado a busca de epítomos lineares usando o método BepiPred 1.0. Após a seleção dos epítomos das proteínas, foram selecionados as sequências contendo entre 10 a 30 resíduos de aminoácidos e posteriormente e com o auxílio do VaxiJen tiveram seu potencial antigênico determinado. Os peptídeos com potencial antigênico foram desenhados com a utilização do PepDraw (<http://www.tulane.edu/~biochem/WW/PepDraw/>).

### **Interação – epítomos e receptor TLR2**

Para verificar a ancoragem entre os epítomos selecionados e o receptor TLR-2, foi utilizado o software Galaxy PepDock em (<http://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=PEPDOCK>). A proteína referente ao TLR-2 (5D3I) foi obtida pelo PDB e antes de ser utilizada para o docking o ligante foi retirado utilizando o software Discovery Studio. Para visualização do docking molecular previsto pelo PepDock foi utilizado o Pymol.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### SELEÇÃO DAS PROTEÍNAS E ANTIGENICIDADE E ALERGENICIDADE

O software Vaxign conferiu um total de 26 proteínas putativas identificadas como secretoras e estas estão descritas na (Tabela 1). Após a obtenção das estruturas primárias todas foram analisadas pelo VaxiJen e pelo AlgPred para verificar o seu potencial antigênico e alergênico, respectivamente, também presentes na tabela 1.

Tabela 1. Proteínas putativas encontradas pelo software Vaxign e as respectivas análises de antigenicidade e alergenidade pelos softwares VaxiJen e AlgPred.

ID	VaxiJen	AlgPred	ID	VaxiJen	AlgPred
ADL19973.1	0.5483	A	<b>ADL21376.1</b>	0.4987	n*
ADL20140.1	0.5227	n*	<b>ADL21554.1</b>	0.8488	a
ADL20287.1	0.6930	A	<b>ADL21610.1</b>	0.3746	n
ADL20298.1	0.5000	n*	<b>ADL21662.1</b>	0.5561	n*
ADL20304.1	0.5271	n*	<b>ADL21666.1</b>	0.3616	N
ADL20405.1	0.5873	a	<b>ADL21812.1</b>	0.4316	A
ADL20426.1	1.7430	a	<b>ADL21814.1</b>	0.5434	n*
ADL20536.1	0.7643	a	<b>ADL21821.1</b>	0.8643	A
ADL21030.1	1.0149	a	<b>ADL21849.1</b>	0.5678	A
ADL21148.1	0.3941	a	<b>QH71015.1</b>	0.7620	n*
ADL21215.1	0.4610	a	<b>QH71010.1</b>	0.4655	n*
ADL21293.1	0.4902	n*	<b>AKI58509.2</b>	0.1576	n*
ADL21294.1	0.6048	a			

Legenda: a – refere a alergenidade prevista pelo AlgPred; e n\* - a não alergenidade.  
Fonte: Autoria própria (2021).

De acordo com o VaxiJen o qual utiliza de um limiar de 0.4 para considerar uma proteína antigênica ou não, apresentou um total de 21 proteínas potencialmente antigênicas. Já em relação ao Algpred, para verificação da sua alergenidade, um total de 13 proteínas foram caracterizadas com o potencial em ativar um quadro de hipersensibilidade. Deste modo, apenas as proteínas com potenciais acima de 0.4 pelo VaxiJen que não apresentaram potencial alergênico foram selecionadas e seguiram para as demais análises, totalizando nove proteínas.

#### CARACTERIZAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS

As nove proteínas com características antigênicas e sem potencial alergênico foram submetidas no Blastp para verificar possível similaridade e/ou homologia com demais

proteínas para que sua possível família fosse prevista estão descritas na Tabela 2. Suas seqüências primárias foram analisadas em relação as suas caracterizações físico-químicas também descritas na tabela 2.

Tabela 2. Proteínas selecionadas na etapa anterior com Blastp para verificar sua homologia e caracterizações físico-químicas e o quantitativo de epítomos imunodominantes de células B.

ID	Blastp	Índice de instabilidade	Índice alifático	GRAVY
ADL20140.1*	Esterase	Estável	77.3	-0.147
ADL20298.1*	Subtilisin-like serine protease	Estável	90.22	-0.003
ADL20304.1	Secretion target	Instável	86.24	-0.154
ADL21293.1	Peptidase da parede celular	Instável	81	-0.365
ADL21376.1	Ribonuclease	Instável	64.11	-0.626
ADL21662.1*	Carboxypeptidase	Estável	95.79	0.029
ADL21814.1*	Esterase	Estável	82.52	0.001
QHQ71015.1	Proteína contendo domínio de ligação de cálcio excalibur	Instável	55.2	-1.049
QHQ71010.1	Proteína putativa	Instável	42.86	0.19
AKI58509.2*	Proteína putativa	Estável	32.81	0.119

Legenda: A presença de (\*) representa as proteínas que seguiram para as próximas análises.  
Fonte: Autoria própria (2021).

As caracterizações físico-químicas mostraram que das nove proteínas, cinco foram indicadas como estáveis e se apresentaram um alto índice alifático, o qual indica termoestabilidade da proteína para a construção vacinal. Em relação ao índice de hidropaticidade (GRAVY), o valor negativo sendo indicativo de que a construção da vacina é hidrofílica (HOSSAIN et al., 2021). Os valores de GRAVY positivos indicam, por sua vez, uma hidrofobicidade. Diante das análises descritas na tabela 2, apenas duas proteínas seguiram para verificar seus epítomos imunodominantes pelo IEDB (tabela 3). Pois apenas duas proteínas (ADL20140.1 e ADL20298.1) apresentaram características potenciais, tanto pela antigenicidade quanto em relação as caracterizações físico-químicas.

### PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS DE CÉLULAS B

De acordo com os resultados tanto das caracterizações físico-químicas como de antigenicidade e alergenicidade, apenas duas proteínas (ADL20140.1 e ADL20298.1) tiveram seus epítomos imunodominantes preditos. O IEDB foi utilizado e um total de dois (2) epítomos foram encontrados para a proteínas ADL20140.1 e cinco (5) para ADL20298.1 (Tabela 3), os quais foram obtidos pelo BepiPred 1.0. Apenas os epítomos contendo entre 10 a 30 resíduos de aminoácidos foram selecionados, esse tamanho é o ideal para a fenda

das moléculas de MHC II. Essas sequências peptídicas foram analisadas pelo VaxiJen para verificar o seu potencial antigênico.

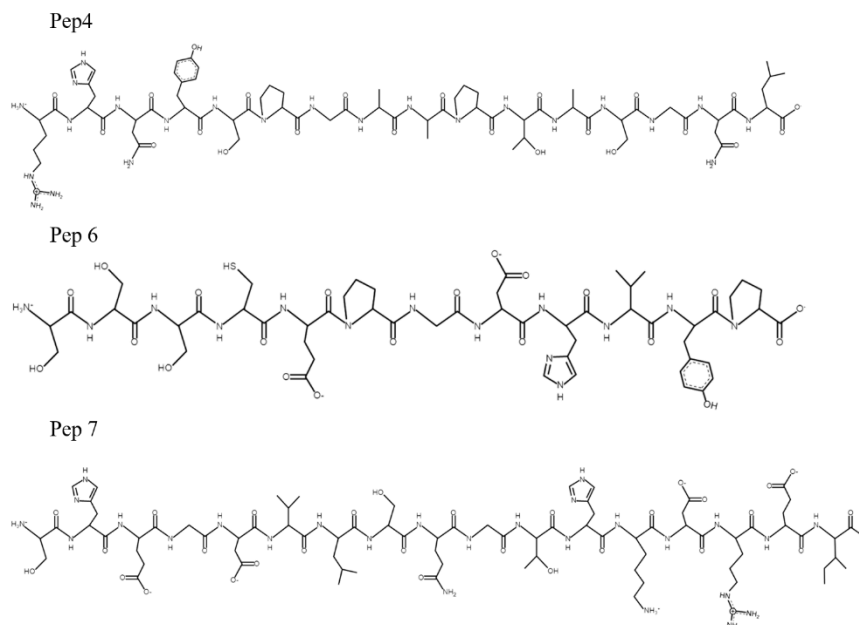
Tabela 3. Epítomos imunodominantes de células B e seus potenciais antigênicos das proteínas selecionadas de *C. pseudotuberculosis*.

Proteínas	Peptídeos	VaxiJen
ADL20140.1	1 SYYTDWVSDNAALGGKQK	na
	2 LQRGHATPEQMVGPMGSDYNRYND	na
ADL20298.1	3 HPRLGPVEDGGSFINDGMRRTGLYDC	Na
	4 RHNYSFGAAPTASGNL	0.9657
	5 CVRRDTVVDLSD	Na
	6 SSSCEPGDHVYP	0.7096
	7 SHEGDVLSQGTHKDREI	0.7829

Legenda: na – não antigênico. Fonte: autoria própria (2021)

Um total de três epítomos imunodominantes (4, 6 e 7) se apresentaram antigênicos de acordo com os resultados do VaxiJen e diante disso foram selecionados, suas estruturas químicas estão presentes na figura 1.

Figura 1. Estrutura química dos epítomos previstos da proteína ADL20298.1. Estrutura obtida a partir do software PepDraw.



A obtenção desses epítomos imunodominantes nos possibilita formular algumas estratégias vacinais, uma vacina proteica, uma vacina peptídica e vacinas quiméricas. Recentemente, vacinas quiméricas construídas com múltiplos epítomos tornaram-se uma área de interesse devido à sua capacidade de amplificar respostas imunes contra um patógeno (HOSSAIN et al., 2021). Os resultados referentes a proteína, nos fornece que a proteína ADL20298.1, que de acordo com o Blastp apresenta homologia com enzimas



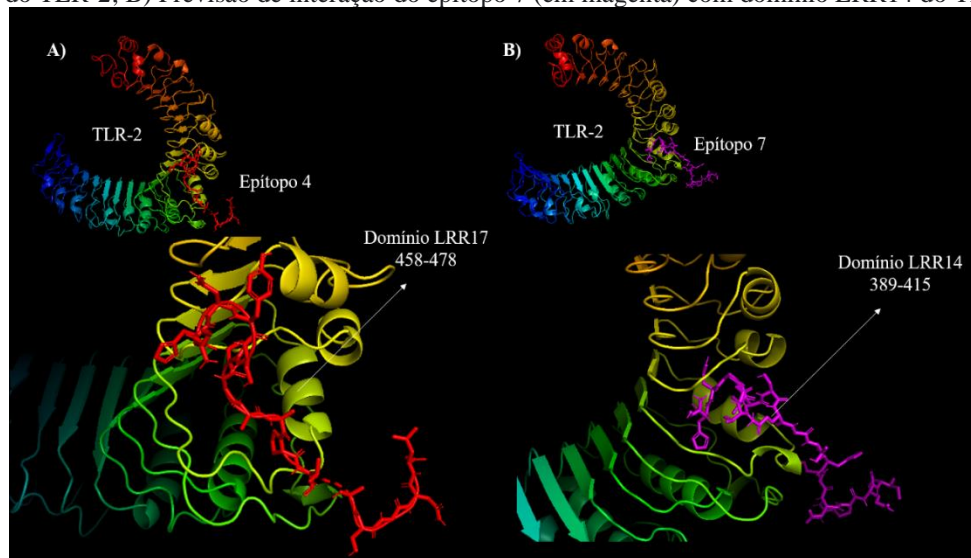
semelhantes à subtilisina, uma grande família de serina protease composta principalmente de endopeptidases secretadas (HOWELL et al., 2019). Há relatos que esse tipo de enzima é capaz de alterar a patogênese da doença. Além de indicar uma possível família, esta proteína ADL20298.1, apresentou possível antigenicidade e sem potencial alergênico. Apresentou também, caracterizações físico-químicas que indicam hidrofília e estabilidade. Ao utilizarmos softwares para prever epítomos, a mesma apresentou cinco (5) possíveis regiões de interação com o sistema imunológico. Mostrando que a construção vacinal aqui prevista possui epítomos suficientes para se ligar aos paratopos a fim de desencadear uma resposta imune adequada.

Sabe-se que as melhores respostas imunológicas são obtidas com antígenos proteicos, devido à obrigatoriedade dos linfócitos T CD4+ em ativar os linfócitos B e, conseqüentemente, levar a produção de anticorpos. Encontrar possíveis regiões que irão promover toda essa cascata é de suma importância para um alvo vacinal. Contudo, o uso crescente de peptídeos sintéticos torna a possibilidade dos epítomos selecionados comporem um imunógeno eficaz para uma vacina (ASHIK et al., 2020; CHAKRABORTY et al., 2021; FATOBA et al., 2021; SHARMA et al., 2021). Essas sequências de aminoácidos encontradas servirão como molde para a síntese de peptídeos que podem formular, separadamente, ou de maneira associada uma vacina peptídica. Nesse intuito, a interação com receptores imunológicos é importante.

#### INTERAÇÃO COM O RECEPTOR TLR-2

Os epítomos 4, 6 e 7 foram os que apresentam antigenicidade, segundo o VaxiJen, e diante desse resultado, essas sequências foram analisadas pelo PepDock para verificar uma possível interação do o TLR-2. A figura 2 e 4 é referente à interação do epítomo 4 e 7 com o TLR-2 e, de acordo com o docking molecular, ambos apresentam interação com a região LRR (sigla do inglês leucine-rich repeat), regiões ricas em leucina o que confere a estrutura em forma de fechadura da proteína TLR-2(KANG et al., 2009). Esse domínio é conservado e é o responsável pela interação com estruturas proteicas (KANG et al., 2009).

Figura 2. Docking molecular entre os epítomos imunodominantes 4 e 7 da proteína ADL20298.1 com o TLR-2. A predição do docking molecular foi realizado usando o software PepDock e a proteína TLR-2 foi obtida no PDB (5D3I) e foi preparada, anteriormente, para retirada do ligante pelo Discovery Studio. As imagens de interação foram obtidas pelo PyMOL. A) Previsão de interação do epítopo 4 (em vermelho) com domínio LRR17 do TLR-2; B) Previsão de interação do epítopo 7 (em magenta) com domínio LRR14 do TLR-2.

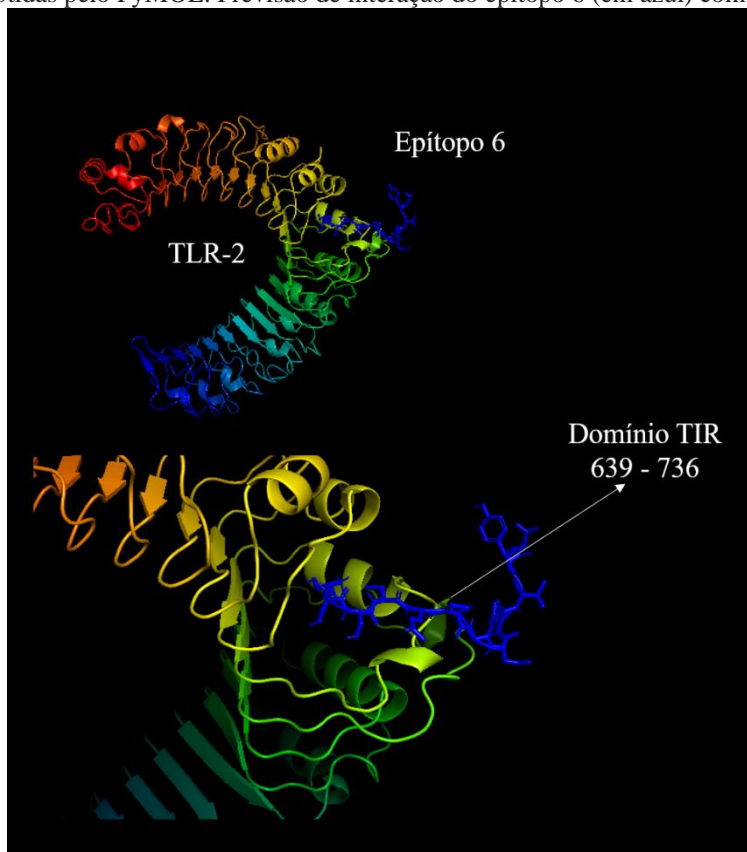


Já a figura 3 apresenta a interação do epítopo 6 com o TLR-2 nas proximidades do domínio TIR (sigla em inglês Toll/interleukin-1 receptor) o qual inicia a ativação de adaptadores que contem esse mesmo domínio, como: MyD88, TIRAP e TRIF, esses adaptadores levam à ativação da imunidade inata e a produção de citocinas pró inflamatórias (RODRIGUEZ-MIGUELEZ et al., 2014).

A família de receptores Toll-Like é amplamente estudada e importante na imunidade inata, primeira linha de defesa que, quando devidamente ativada levará a ativação da resposta imune adaptativa. Esses receptores fazem parte do grande grupo de Receptores de Reconhecimento de Padrões (RRP – PRR em inglês Pattern recognition receptors). Os receptores TLRs merecem destaque por serem o grupo que possui maior diversidade de reconhecimento de padrões, apresentando um papel crucial para defesa do organismo. Os receptores TLRs são divididos em dois grupos, os receptores expressos na superfície celular como: TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-6 e TLR-11; e o grupo de receptores expressos em endossomos ou lisossomos, composto por TLR-3, TLR-7, TLR-8 e TLR-9 (KAWAI; AKIRA, 2010). O primeiro grupo é importante por ser responsável pelo reconhecimento da maior parte dos patógenos, devido sua capacidade de reconhecer antígenos de membrana. O reconhecimento dos PAMPs (sigla do inglês para Pathogen-associated molecular pattern) pelos TLRs levam a ativação de diversos fatores de transcrição AP-1 (ativador proteico -1) e NF-KB (fator nuclear kappa B) que expressam

genes envolvidos na resposta inflamatória em resposta à infecção, exercendo influência fundamental na amplificação da resposta imune celular (DEHGHAN et al., 2018; KANG, J.Y., NAN, X., JIN, M.S., YOUN, S.J., RYU, Y.H., MAH, S., HAN, S.H., LEE, H., PAIK, S.G.; J.O., 2009).

Figura 3. Docking molecular entre o epítipo imunodominante 6 da proteína ADL20298.1 com o TLR-2. A predição do docking molecular foi realizado usando o software PepDock e a proteína TLR-2 foi obtida no PDB (5D3I) e foi preparada anteriormente para retirada do ligante pelo Discovery Studio. As imagens de interação foram obtidas pelo PyMOL. Previsão de interação do epítipo 6 (em azul) com domínio TIR.



Os receptores TLRs são divididos em dois grupos, os receptores expressos na superfície celular como: TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-6 e TLR-11; e o grupo de receptores expressos em endossomos ou lisossomos, composto por TLR-3, TLR-7, TLR-8 e TLR-9 (KAWAI; AKIRA, 2010). O primeiro grupo é importante por ser responsável pelo reconhecimento da maior parte dos patógenos, devido sua capacidade de reconhecer antígenos de membrana. O reconhecimento dos PAMPs (sigla do inglês para Pathogen-associated molecular pattern) pelos TLRs levam a ativação de diversos fatores de transcrição AP-1 (ativador proteico -1) e NF-KB (fator nuclear kappa B) que expressam genes envolvidos na resposta inflamatória em resposta à infecção, exercendo influência fundamental na amplificação da resposta imune celular (DEHGHAN et al., 2018; KANG,

J.Y., NAN, X., JIN, M.S., YOUN, S.J., RYU, Y.H., MAH, S., HAN, S.H., LEE, H., PAIK, S.G.; J.O., 2009).

Após a ativação via TLR, ocorre o aumento na expressão de moléculas coestimuladoras (CD80 e CD86), que são importantes no início da resposta imune adaptativa e na produção de citocinas. No estudo desenvolvido por Vu et al., (2017) relatam que o envolvimento do receptor TLR-2 contribui para a secreção pró-inflamatória em resposta a micobactérias. Dey; De; Nandy, (2016), por sua vez, relataram que na fase inicial da infecção, o TLR-2 participa da resposta imune inata que pode ser um fator importante para diminuição da infecção por *Staphylococcus aureus*. Diante disso, a interação antígeno-TLR é de suma importância para o desenho vacinal, pois prediz a possibilidade de a vacina em questão interagir com o receptor e ativar a cascata responsável pela ativação da célula de defesa e, conseqüentemente, ativação da imunidade adaptativa. De acordo com a patogênese da LC a estratégia vacinal buscando concatenar as respostas mediadas por células B e T é a mais eficaz, visto que a *C. pseudotuberculosis* é um patógeno intracelular facultativo.

#### 4 CONCLUSÃO

As análises de bioinformática tem sido uma ferramenta importante na seleção de possíveis alvos vacinais, principalmente para doenças infecciosas como a LC. A corrida para obtenção de uma estratégia vacinal que seja de fato protetora para os ovinocaprino cultores é grande e com o uso da bioinformática muitas etapas podem ser puladas quando se já prevê alvos potenciais *in silico*. Inúmeros estudos utilizando essas predições têm sido realizados e os resultados positivos, quando de fato esses epítomos são testados *in vitro* ou *in vivo* revelam a eficiência desses softwares. Primeiramente, foi utilizado nesse trabalho o Vaxign, que é um software voltado para desenho vacinal, onde é possível selecionar as linhagens já conhecidas do patógeno em questão e, de uma única vez, diante da seleção prévia da localização subcelular, diversos potenciais alvos expostos são identificados. Com base nessas proteínas encontradas de uma única vez, outras análises como o potencial antigênico, somam na seleção de alvos com maior potencial em formular uma vacina eficaz.

O VaxiJen utilizado para verificar o potencial antigênico, utiliza um alinhamento de sequências diferentes na tentativa de garantir que proteínas que possuam uma antigenicidade mais sutil não sejam descartadas. Nesse software é possível selecionar o organismo alvo e o score desejado, quando não se seleciona o score, o padrão indicado pelo

software é de 0.4. A antigenicidade é uma das primeiras etapas a ser analisada num alvo proteico, pois é de extrema importância que o alvo tenha capacidade de ser reconhecido pelo sistema imunológico. O potencial alergênico indica a probabilidade daquela proteína em ocasionar um processo alérgico, seja por interação com receptores que ativarão eosinófilos e mastócitos ou até na possibilidade de serem reconhecidos pelas Imunoglobulinas E (IgE), grupo de anticorpos presentes em reações alérgicas. Um alvo potencialmente alergênico é prejudicial e não possui benefícios para se formular uma vacina eficaz.

Após a seleção das nove proteínas potencialmente antigênicas e sem capacidade em causar alergias preditas *in silico*, caracterizações físico-químicas relacionadas à estabilidade, índice alifático e índice de hidropaticidade (GRAVY) são importantes, pois trazem informações pertinentes na hora do desenvolvimento da formulação vacinal. Após as caracterizações foi possível selecionar dois potenciais alvos proteicos e estes foram analisados em relação a predição de epítomos imunodominantes de células B, os quais foram após analisados quanto a antigenicidade, fornecendo um total de 3 epítomos. Esses epítomos finalmente tiveram sua predição em relação a uma possível interação com o TLR-2, receptor importante para ativação da imunidade inata e os três apresentaram interações com regiões ligadas a essa ativação, demonstrando serem importantes alvos, seja para formulação de uma vacina peptídica ou para o uso da proteína analisada como vacina proteica. Com isso, esse trabalho trouxe importantes perspectivas para vacinas contra LC.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, S. et al. The genome anatomy of *Corynebacterium pseudotuberculosis* VD57 a highly virulent strain causing Caseous lymphadenitis. **Standards in Genomic Sciences**, v. 11, n. 1, p. 29, 2016.
- ALVES, J. R. A. et al. Factors associated with the seroprevalence of caseous lymphadenitis in sheep from Northeastern Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 182, p. 105098, 1 set. 2020.
- ALVES, J. T. C. et al. Complete Genome Sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Strain PA01, Isolated from Sheep in Pará, Brazil. **Genome Announcements**, v. 4, n. 1, p. e01664-15, 2016.
- ARAÚJO, C. L. et al. Prediction of new vaccine targets in the core genome of *Corynebacterium pseudotuberculosis* through omics approaches and reverse vaccinology. **Gene**, v. 702, jun. 2019.
- ASHIK, A. I. et al. An immunoinformatics study on the spike protein of SARS-CoV-2 revealing potential epitopes as vaccine candidates. **Heliyon**, v. 6, n. 9, 1 set. 2020.
- CAVALCANTE, A. L. Q. et al. Complete Genome Sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Strain E19, Isolated from a Horse in Chile. **Genome Announcements**, v. 3, n. 6, p. e01385-15, 2015.
- CHAKRABORTY, C. et al. Immunoinformatics Approach for the Identification and Characterization of T Cell and B Cell Epitopes towards the Peptide-Based Vaccine against SARS-CoV-2. **Archives of Medical Research**, 29 jan. 2021.
- DEGHAN, P. et al. TLR-2, IL-10 and IL-17-mediated immunity in experimental chemotherapy murine model of systemic candidiasis; cyclophosphamides' impact and roles. **Microbial Pathogenesis**, v. 119, n. April, p. 183–192, 2018.
- DEY, S.; DE, A.; NANDY, A. Rational Design of Peptide Vaccines Against Multiple Types of Human Papillomavirus. v. 15, p. 1–16, 2016.
- DOYTCHINOVA, I. A.; FLOWER, D. R. VaxiJen: A server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. **BMC Bioinformatics**, v. 8, n. 1, p. 4, 5 jan. 2007.
- DROPPA-ALMEIDA, D.; FRANCESCHI, E.; PADILHA, F. F. Immune-informatic analysis and design of peptide vaccine from multi-epitopes against *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Bioinformatics and Biology Insights**, v. 12, 2018.
- FATOBA, A. J. et al. Immunoinformatics prediction of overlapping CD8<sup>+</sup> T-cell, IFN- $\gamma$  and IL-4 inducer CD4<sup>+</sup> T-cell and linear B-cell epitopes based vaccines against COVID-19 (SARS-CoV-2). **Vaccine**, v. 39, n. 7, p. 1111–1121, 12 fev. 2021.
- FU, M. et al. Transcriptome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis*-infected spleen of dairy goats. **Microbial Pathogenesis**, v. 147, p. 104370, 1 out. 2020.

GARG, N. et al. Immunoprotective potential of in silico predicted *Acinetobacter baumannii* outer membrane nuclease, NucAb. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 306, n. 1, p. 1–9, 2016.

GASTEIGER E., HOOGLAND C., GATTIKER A., DUVAUD S., WILKINS M.R., APPEL R.D., B. A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; **John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press .**, p. 571–607, 2005.

HASSAN, S. S. et al. Whole-genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strain Cp162, isolated from camel. **J Bacteriol**, v. 194, 2012.

HOSSAIN, M. S. et al. Immunoinformatics approach to designing a multi-epitope vaccine against Saint Louis Encephalitis Virus. **Informatics in Medicine Unlocked**, v. 22, p. 100500, 1 jan. 2021.

HOWELL, M. et al. Functional characterization of a subtilisin-like serine protease from *Vibrio cholerae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 25, p. 9888–9900, 21 jun. 2019.

JESSE, F. F. A. et al. Responses of female reproductive hormones and histopathology in the reproductive organs and associated lymph nodes of Boer does challenged with *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its immunogenic corynomycolic acid extract. **Microbial Pathogenesis**, v. 139, p. 103852, 1 fev. 2020.

KANG, J. Y. et al. Recognition of Lipopeptide Patterns by Toll-like Receptor 2-Toll-like Receptor 6 Heterodimer. **Immunity**, v. 31, n. 6, p. 873–884, 18 dez. 2009.

KANG, J.Y., NAN, X., JIN, M.S., YOUN, S.J., RYU, Y.H., MAH, S., HAN, S.H., LEE, H., PAIK, S.G., L.; J.O. Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer. **Immunity**, v. 31, p. 873–884, 2009.

KAWAI, T.; AKIRA, S. **The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors** *Nature Immunology*, 2010.

KHAN, M. K. et al. In silico predicted mycobacterial epitope elicits in vitro T-cell responses. **Molecular Immunology**, v. 61, n. 1, p. 16–22, 2014.

LACASTA, D. et al. Vaccination schedules in small ruminant farms. **Veterinary Microbiology**, v. 181, n. 1–2, p. 34–46, 2015.

RODRIGUEZ-MIGUELEZ, P. et al. Role of Toll-like receptor 2 and 4 signaling pathways on the inflammatory response to resistance training in elderly subjects. **Age**, v. 36, n. 6, 21 nov. 2014.

SETTE, A.; RAPPUOLI, R. **Reverse vaccinology: Developing vaccines in the era of genomics** *Immunity*, 2010.

SHARMA, S. et al. Immunoinformatics approach for a novel multi-epitope subunit vaccine design against various subtypes of Influenza A virus. **Immunobiology**, v. 226, n. 2, 1 mar. 2021.

SHI, J. et al. Cofilin-1, peroxiredoxin-1, and galectin-3: Major proteins released by macrophages infected with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Veterinary Microbiology**, v. 239, dez. 2019.

SILVA, A. et al. Complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Cp31, isolated from an Egyptian buffalo. **Journal of Bacteriology**, v. 194, p. 6663–6664, 2012.

SOBRINHO SANTOS, E. M. et al. Leader gene of *Corynebacterium pseudotuberculosis* may be useful in vaccines against caseous lymphadenitis of goats: A bioinformatics approach. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 80, n. 8, p. 1317–1324, 1 ago. 2018.

SOUZA DE OLIVEIRA, V. et al. Can vaccinating sheep reduce the occurrence of caseous lymphadenitis? **veterinaryevidence.org**, v. 5, n. 1, 2020.

UMER, M. et al. Histopathological changes of reproductive organs of goats immunized with *Corynebacterium pseudotuberculosis* killed vaccine. **Microbial Pathogenesis**, v. 149, p. 104539, 1 dez. 2020.

VU, A. et al. Toll-like receptors in mycobacterial infection. **European Journal of Pharmacology**, v. 808, p. 1–7, 2017.

WINDSOR, P. A. Control of Caseous Lymphadenitis. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 27, n. 1, p. 193–202, 2011.

XIANG, Z.; HE, Y. Vaxign: a web-based vaccine target design program for reverse vaccinology. **Procedia in Vaccinology**, v. 1, n. 1, 2009.

YAACOB, M. F. et al. Biochemical composition, morphology and antimicrobial susceptibility pattern of *Corynebacterium pseudotuberculosis* biofilm. **Journal of King Saud University - Science**, v. 33, n. 1, p. 101225, 1 jan. 2021.

ZHAO, B. P. et al. In silico prediction of binding of promiscuous peptides to multiple MHC class-II molecules identifies the Th1 cell epitopes from secreted and transmembrane proteins of *Schistosoma japonicum* in BALB/c mice. **Microbes and Infection**, v. 13, n. 7, p. 709–719, 2011.