



## PROSPECÇÃO DE ANTÍGENOS DE ENTERITE NECRÓTICA AVIÁRIA FUSIONADOS À LECTINAS PARA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ADJUVANTE

**ISABELA ORTIZ DE TUNES RAMOS<sup>1</sup>**; **GUILHERME FEIJÓ DE SOUSA<sup>2</sup>**; **LUCIANO DA SILVA PINTO<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Universidade Federal de Pelotas – ortizrisabela@gmail.com*

<sup>2</sup>*Universidade Federal de Pelotas – guima.sousa07@gmail.com*

<sup>3</sup>*Universidade Federal de Pelotas – ls\_pinto@hotmail.com*

### 1. INTRODUÇÃO

Enterite necrótica (ENA) é uma doença aviária de extrema importância econômica causada pela bactéria *Clostridium perfringens* que afeta principalmente animais jovens a qual ainda não existem vacinas disponíveis. A bactéria produz toxinas no trato gastrointestinal das aves, resultando em lesões graves no intestino e sintomas prejudiciais para o rebanho, podendo haver a perda significativa do rebanho e consequentemente uma perda econômica para os produtores. Uma das formas de controle da doença é o uso de antibióticos, porém há preocupações em relação ao uso de tal prática, principalmente ao que se refere ao aumento da resistência a antibióticos em patógenos humanos (WILDE S, et al., 2019). Sendo assim, a vacinação dos animais é uma ótima alternativa à prática dos antibióticos. Para o controle da doença e desenvolvimento de vacinas, é necessária a compreensão dos antígenos que conferem patogenicidade ao *C. perfringens* (YUAN, B., et al., 2022).

No contexto de desenvolvimento de vacinas, os adjuvantes desempenham um papel crucial ao potencializar a resposta imune. Tais componentes são indispensáveis para a formulação de uma vacina, pois desencadeiam uma resposta intensa, rápida e duradoura (SOUZA et al., 2013). Alguns estudos têm demonstrado o poder adjuvante de lectinas (REYNA-MARGARITA et al., 2019). Estas proteínas são capazes de se ligar a glicocconjungados da membrana celular e desencadear uma resposta imune protetora. Por sua capacidade de interagir com estes glicanos nas células, podem ser utilizadas em estudos de *drug delivery*, aumentando a eficácia da vacina (GUPTA et al., 2011). Um exemplo de tais lectinas é a ricina B do organismo *Ricinus communis*, a qual demonstra eficiente indução de respostas sistêmicas e mucosas, podendo ser utilizada como ajudante e carreadora de antígenos para a mucosa, sendo que sua ligação a carboidratos é a galactose/N-acetilgalactosamina (MEDINA-BOLIVAR F et al., 2003).

Para a construção destas proteínas fusionadas, ferramentas de bioinformática têm sido utilizadas para o desenho racional de novos alvos vacinais e esta estratégia pode ser usada para *C. perfringens*, aumentando o potencial antigênico das proteínas e assim colaborando significativamente para o desenvolvimento eficaz de uma vacina contra a doença.

O seguinte trabalho tem, portanto, o objetivo de fusionar uma lectina potencial com um antígeno de ENA através de técnicas *in silico* para prospecção de moléculas com potencial adjuvante.

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1 Análise *in silico* das sequências e estruturas das lectinas

A fim de visualizar e analisar as estruturas das proteínas que fazem parte da construção química, as sequências foram submetidas a uma modelagem estrutural no webserver AlphaFold Colab e posteriormente avaliadas visualmente no software PyMol. O AlphaFold é um servidor web de alta precisão projetado para prever a estrutura de proteínas. Ele utiliza arquiteturas de rede neural avançadas e procedimentos de treinamento que levam em consideração as restrições evolutivas, físicas e geométricas associadas às estruturas das proteínas (JUMPER et al., 2021).

## 2.2 Análise das propriedades físico químicas

Foi utilizado o webserver ProtParam para calcular vários parâmetros físicos e químicos destas proteínas, como peso molecular, pl teórico, composição de aminoácidos, composição atômica, coeficiente de extinção, dentre outros, a fim de comparar essas quimeras em relação a sua constituição biológica. Além disso, foi utilizado o webserver Protein-Sol para a avaliação da solubilidade das proteínas.

## 2.3 Predição de antígenos protetores

Os modelos foram aplicados em um servidor chamado VaxiJen, que foi desenvolvido para prever antígenos protetores. O VaxiJen possibilita a classificação de antígenos unicamente com base nas características físico-químicas das proteínas, sem a necessidade de utilizar o alinhamento de sequências. O servidor é capaz de lidar tanto com proteínas individuais quanto com proteomas inteiros enviados em formato *fasta* (DOYTCHINOVA; FLOR, 2007).

# 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Até o momento, foram realizadas análises *in silico* dos três antígenos selecionados de ENA fusionados com a lectina escolhida para a avaliação dos parâmetros. Na análise de parâmetros físico-químicos, foi possível observar que as construções A1\_Lec têm propensão a ser insolúvel, enquanto as construções A2\_Lec e A3\_Lec tem propensão a serem solúveis utilizando o sistema de expressão de *Escherichia coli*. Parâmetros como massa molecular, ponto isoelétrico, índice alifático e índice de estabilidade também foram avaliados (Tabelas 1, 2 e 3)

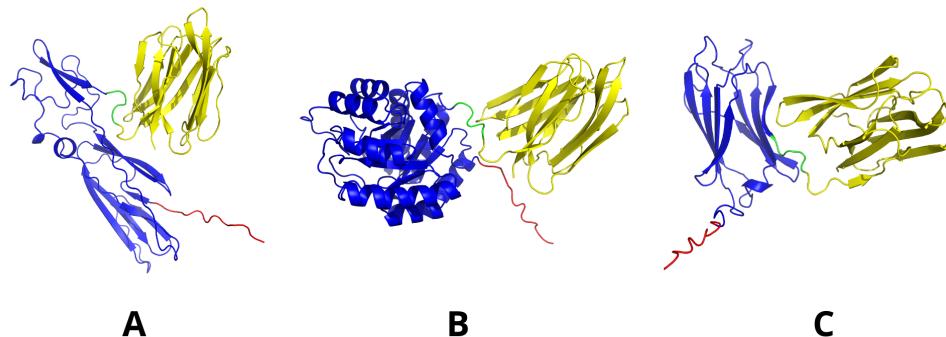
A modelagem computacional das quimeras foi realizada usando o servidor AlphaFold Colab, o qual gerou cinco estruturas para cada quimera (Figuras 1, 2 e 3). Essas estruturas foram classificadas com base na pontuação pLDDT (Teste de Diferença de Distância Local Preditiva), uma métrica de confiabilidade que avalia as diferenças nas distâncias locais entre todos os átomos em um modelo. Essa pontuação varia de 0 a 100, sendo que modelos que apresentam pontuação próxima de 100, foram modelados com alta precisão. É possível observar nas tabelas 1, 2 e 3 que as estruturas A1\_Lec, A2\_Lec e A3\_Lec foram modeladas com alta precisão de confiança, apresentando uma pontuação pLDDT 80.8, 91.9 e 88.4, respectivamente. A previsão da estrutura 3D das quimeras nos permite entender melhor como funciona sua atividade biológica e também a possível interação da lectina com receptores celulares glicoconjugados. Algumas dessas lectinas são capazes de induzir citocinas Th1 após interação com receptores glicosilados em macrófagos e/ou células dendríticas, como os receptores *Toll-like* tipo 2 e 4 (TLR2 e TLR4) (SOUZA et al., 2013).

No que diz respeito à avaliação do potencial protetor das quimeras, de acordo com os resultados fornecidos pelo VaxiJen, as três construções foram identificadas como alvos potenciais com probabilidades significativas de serem antígenos. As

pontuações foram de 0,5752 para A1\_Lec, 0,4659 para A2\_Lec e 0,5885 para A3\_Lec. O servidor utilizou um limite (*threshold*) de 0,4 como critério, onde moléculas com pontuações abaixo desse limite indicam uma baixa probabilidade de serem consideradas prováveis antígenos, enquanto pontuações acima desse limite indicam uma alta probabilidade de serem prováveis antígenos.

	Massa Molecular(kDa)	Ponto Isoelétrico	Nº de aminoácidos	Índice alifático	Índice de estabilidade	Solubilidade	VaxiJen	pLDDT
A1_Lec	34.8	6.55	322	70.90	16.97	0.369 (insolúvel)	0.5752	80.8
A2_Lec	46.7	5.72	446	85.36	27.88	0.452 (solúvel)	0.4659	91.9
A3_Lec	30.5	6.51	282	65.35	12.46	0.497 (solúvel)	0.5885	88.4

**Tabela 1.** Parâmetros referentes às construções A1\_Lec, A2\_Lec e A3\_Lec.



**Figura 1.** Predição estrutural referente às construções A) A1\_Lec, B) A2\_Lec e C) A3\_Lec, respectivamente.

#### 4. CONCLUSÕES

Pode-se afirmar, portanto, que as três construções, após a avaliação dos parâmetros físico-químicos, obtiveram possível potencial adjuvante para o desenvolvimento de vacinas contra ENA. Sendo assim, tais expectativas serão confirmadas somente quando as proteínas forem produzidas *in vitro*.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DOYTCHINOVA, Irini A et al. **VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines.** BMC Bioinformatics, p. 1-7, 7 jan. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1186%2F1471-2105-8-4>.



GUPTA, P. N. et al. **Investigation of lectinized liposomes as M-cell targeted carrier-adjuvant for mucosal immunization.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* v. 82, n. 1, p. 118–125, 1 jan. 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0927776510004856?via%3Dihub>>.

JUMPER, J. et al. **Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold.** *Nature* 596, 583–589 (2021). Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.

KENNEDY, J.F. et al. **Lectins, versatile proteins of recognition: a review.** *Carbohydrate Polymers*, v. 26, n. 3, p. 219–230, 1995. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(94\)00091-7](https://doi.org/10.1016/0144-8617(94)00091-7).

MEDINA-BOLIVAR F et al. **A non-toxic lectin for antigen delivery of plant-based mucosal vaccines.** *Vaccine* v. 21, n. 9-10, p. 997–1005, 1 fev. 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12547614/>>.

REYNA-MARGARITA et al. **Plant Phenolics and Lectins as Vaccine Adjuvants.** *Current Pharmaceutical Biotechnology* v. 20, n. 15, p. 1236–1243, 2023. Disponível em: <<https://www.eurekaselect.com/article/99653>>.

SOUZA, MA et al. **The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties.** *Glycoconjugate Journal* v. 30, n. 7, p. 641–657, 9 jan. 2013. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10719-012-9464-4>.

WILDE S, et al. (2019) **Salmonella-Vectored vaccine delivering three *Clostridium perfringens* antigens protects poultry against necrotic enteritis.** *PLoS ONE* 14(2): e0197721. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197721>.

YUAN, B. et al. **Immunization with Pooled Antigens for *Clostridium perfringens* Conferred Partial Protection against Experimental Necrotic Enteritis in Broiler Chickens.** *Vaccines*, v. 10, n. 6, p. 979–979, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/vaccines10060979>.