

## Prospecção de alvos antigênicos de *Clostridium perfringens* usando ferramentas de Bioinformática visando o desenvolvimento de vacina contra a enterite necrótica

JOÃO PEDRO GOMES GRECO<sup>1</sup>; FABRÍCIO ROCHEDO CONCEIÇÃO<sup>2</sup>,  
FREDERICO KREMER<sup>3</sup>, LUCIANO DA SILVA PINTO<sup>4</sup>

<sup>1</sup>*Laboratório de Bioinformática, Graduação em Biotecnologia, CD Tec, UFPel – joao.greco@ufpel.edu.br*

<sup>2</sup>*Laboratório de Imunologia aplicada, graduação em biotecnologia, CDTEec, UFPel – fabricio.rochedo@ufpel.edu.br*

<sup>3</sup>*Laboratório de bioinformática, Graduação em Biotecnologia, CD Tec, UFPel – fred.s.remer@gmial.com*

<sup>4</sup>*Laboratório de Proteômica e bioinformática, Graduação em Biotecnologia, CD Tec, UFPel – luciano.pinto@ufpel.edu.br*

### 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novas vacinas ou medicamentos para o combate a doenças veterinárias que causam grandes perdas econômicas vem utilizando estratégias de bioinformática. Essas estratégias têm ganhado espaço no desenvolvimento de vacinas multidomínios e multi-epítopos. Uma dessas doenças é causada pela *Clostridium perfringens*, uma bactéria responsável pela enterite necrótica (ENA). Essa doença ocorre quando há um desequilíbrio na microbiota intestinal do animal, levando à morte do animal em poucos dias após contrair a doença (CASAGRANDE, 2012). A ENA é uma doença clínica que afeta frangos de corte jovens com 2 a 6 semanas de vida, devido o aumento da proibição do uso de antibióticos sua ocorrência tem aumentado e se tornado cada vez mais frequente, gerando uma mortalidade de 50% dos animais infectados pela doença (Kyung-Woo Lee e Hyun S. Lillehoj, 2022).

Para combater essa doença sem o uso de antibióticos vem sendo utilizado a técnica de vacinologia reversa (VR) que busca analisar o genoma do microrganismo em uma tentativa de encontrar possíveis alvos vacinais, utilizando diversas ferramentas de bioinformática para a predição de epítopos, porém isso requer uma determinação do grau de conservação entre os genomas dos microrganismos selecionados para a análises; um meio de realizar isso é através da construção e análise de um pangenoma, utilizada primeiramente por Tettelin e colaboradores em 2005 (TETTELIN et all., 2005).

Com base no que foi dito, o objetivo desse trabalho foi a análise do pangenoma da *Clostridium perfringens* para prospectar alvos vacinais utilizando ferramentas de bioinformática para o desenvolvimento de uma vacina contra a ENA.

### 2. METODOLOGIA

O trabalho foi dividido nas seguintes etapas: 1º - construção do pangenoma com genomas de *C. perfringens* obtidos de isolados de animais

comprovadamente com a doença; 2º- realização das análises utilizando ferramentas de bioinformática para identificar todas as proteínas, sua localização subcelular, peptídeo sinal, probabilidade de ser transmembrana e antigenicidade.

A primeira etapa dessa abordagem inicia com a coleta dos genomas-alvo em bancos de dados do NCBI, de acordo com os seguintes requisitos: formato RefSeq, fasta e anotações no formato GBFF. Esses genomas, posteriormente, foram utilizados para a montagem do pangenoma, usando a ferramenta Roary (PAGE et al., 2015), visando analisar genes ortólogos e identificar quais genes eram mais comuns entre os genomas obtidos. As análises foram iniciadas utilizando as sequências desses genomas, que foram traduzidas para sequências de aminoácidos, a fim de possibilitar a análise das características de cada uma dessas sequências.

Essas análises foram divididas em duas etapas; a primeira inicial começou utilizando a ferramenta SignalP (TEUFEL et al., 2022), uma ferramenta responsável pela identificação dos peptídeos, após isso se utilizou a ferramenta PsortB (YU et al., 2010), destinado a prever a localização subcelular das proteínas visando de proteínas secretadas e proteínas transmembrana com o Deep TMHMM (KROGH et al., 2001). Após essas análises iniciais procedeu-se a uma seleção das sequências de aminoácidos que apresentaram a probabilidade de serem transmembrana, ambos com índices superiores a 95% e a probabilidade de terem a presença do peptídeo sinal.

Posteriormente, essas proteínas selecionadas foram comparadas com o Virulence Factor DataBase (VFDB) (Chen et al., 2005) para identificar proteínas associadas a fatores de virulência já conhecidos. Ao final dessa comparação, as proteínas foram mais uma vez selecionadas, utilizando o critério de ter mais de 90% de similaridade para a seleção das proteínas identificadas. Por fim foi comparada as proteínas obtidas com o genoma de referência obtido do NCBI da galinha para identificar proteínas que sejam exógenas devido elas serem as prováveis causadoras da doença, e foram submetidas para a previsão do potencial antigênico usando o Vaxijen (DOYTCHINOVA; FLOWER, 2007). Ao final dessas análises essas proteínas foram identificadas utilizando a ferramenta blast (McGinnis et al., 2004) e anotadas de acordo com seu grau de antigenicidade.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 45 genomas de isolados clínicos de animais coentes para a construção do pangenoma. A construção do pangenoma resultou em 2.270 genes pertencentes ao genoma núcleo e 6.508 genes do genoma acessório, totalizando 8.778 genes obtidos na montagem. Do total de genes obtidos com a análise pangenômica e após triagem usando ferramentas de predição, obteve-se 627 proteínas com peptídeo sinal, 1509 proteínas com características subcelular e 1449 proteínas transmembranares (Tabela 1).

Tabela 1: Resultados obtidos com as análises do pangenoma.

Pangenoma	Número de proteínas encontradas
Peptídeo sinal	627
Citoplasmática	1.509
Hélice transmembrana	1.449
Total de genes	3.585

As proteínas resultantes dos 3.585 genes foram comparadas com uma lista de proteínas previamente caracterizadas como virulentas a partir do programa VFDB, e posteriormente as proteínas resultantes desta filtragem (169) foram comparadas com o genoma da galinha (GCA\_016699485.1) e o software Vaxijen para identificar o potencial antigênico dessas. A triagem após esta última filtragem, usando um ponto de corte acima de 0,7, obteve 25 potenciais proteínas antigênicas. 7 delas demonstraram um alto valor antigênico, e já foram descritas anteriormente como potenciais para o desenvolvimento de vacinas para outras doenças (Tabela 2).

Tabela 2: Anotação das proteínas e antigenicidade prevista usando o software Vaxijen 2.0.

Anotação	Função	Antigenicidade
1	Proteína de montagem de pilus tipo IV PilO	0,99
2	Proteína A dependente de peptidase de prepilina	0,99
3	Proteína regulatória MsrR	0,80
4	Proteína do sistema de secreção tipo II	0,79
5	Proteína contendo domínio de ligação isopeptídica de pilina	0,72
6	Proteína contendo domínio tipo B da proteína Cna	0,72
7	Adesina de colágeno	0,71

#### 4. CONCLUSÕES

A estratégia abordada apresenta grande potencial para a descoberta de novas proteínas antigênicas que devem auxiliar na promoção do desenvolvimento de novos medicamentos para o combate à enterite necrótica. Para isso, os próximos passos de nosso trabalho serão testar a melhor estratégia para o uso destas proteínas, individualmente ou em construções engenheiradas como quimeras e quimeras multiepitopos.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CASAGRANDE, Mariana Fröner. *Clostridium perfringens* em ingredientes para ração de aves e controle da presença do agente utilizando tratamento químico. 2012. 38 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012.

LEE, K.-W.; LILLEHOJ, H. S. Role of *Clostridium perfringens* Necrotic Enteritis B-like Toxin in Disease Pathogenesis. *Vaccines*, 2022, v. 10, p. 61. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/vaccines10010061>.

Tettelin H, Maignani V, Cieslewicz MJ, et al. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial "pan-genome." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(39):13950-13955. doi:10.1073/pnas.0506758102. (Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Nov 8;102(45):16530.)

PAGE, A. J., CUMMINS, C. A., HUNT, M., WONG, V. K., REUTER, S., HOLDEN, M. T. G., FOOKES, M., FALUSH, D., KEANE, J. A., PARKHILL, J. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*, v. 31, n. 22, p. 3691-3693, novembro de 2015. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv421.

TEUFEL, F.; ALMAGRO ARMENTEROS, J. J.; JOHANSEN, A. R.; et al. SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. *Nature Biotechnology*, v. 40, n. 7, p. 1023-1025, 2022. DOI: 10.1038/s41587-021-01156-3.

YU, N. Y.; WAGNER, J. R.; LAIRD, M. R.; et al. PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics*, v. 26, n. 13, p. 1608-1615, 2010. DOI: 10.1093/bioinformatics/btq249.

KROGH, A.; LARSSON, B.; VON HEIJNE, G.; SONNHAMMER, E. L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, v. 305, n. 3, p. 567-580, 2001. DOI: 10.1006/jmbi.2000.4315.

DOYTCHINOVA, I. A.; FLOWER, D. R. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinformatics*, v. 8, p. 4, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-4>.

CHEN, L.; YANG, J.; YU, J.; et al. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Research*, 2005, v. 33, p. D325-D328. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gki008>.

MCGINNIS, S.; MADDEN, T. L. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 2004, v. 32, p. W20-W25. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkh435>.