

PROSPECÇÃO IN SILICO DE POTENCIAIS ALVOS VACINAIS CONTRA PYTHIUM INSIDIOSUM

AUGUSTO DUARTE BROD¹; DÉBORAH TROTA FARIAS DE ALBERNAZ²;
CASSIANE BORGES DE SOUZA²; CAROLINE QUINTANA BRAGA²; DAIANE
HARTWIG DRAWANZ²; DANIELA ISABEL BRAYER PEREIRA³

¹Universidade Federal de Pelotas – adbrods@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – trotadeborah@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – casborges96@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – carolineqbraga@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – daianehartwig@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – danielabrayer@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O agente infeccioso *Pythium insidiosum* é um oomiceto aquático e patógeno para mamíferos, causador da pitiose, uma doença emergente, de rápida evolução, difícil tratamento e que oferece risco de vida aos indivíduos infectados (Mendoza; Vilela, 2013). Embora esta doença seja relatada em vários países, a maioria dos números de casos em seres humanos é relatado na Índia e Tailândia (YOLANDA & KRAJAEJUM, et al. 2022). Já em animais, incluindo equinos e caninos, a maioria dos casos são descritos nos EUA e no Brasil (YOLANDA & KRAJAEJUM, et al. 2022).

Em equinos, assim como na maioria dos hospedeiros afetados, o tratamento da enfermidade apresenta consideráveis desafios. Um dos principais fatores é a ausência de ergosterol na membrana plasmática dos oomicetos, o que contribui para a baixa eficácia dos antifúngicos que atuam na síntese dessa molécula (FOIL, 1996; GROOTERS, 2003). Além disso, há relatos de recidivas após intervenções cirúrgicas e de falhas na resposta à imunoterapia (GAASTRA et al., 2010).

Apesar de que com o passar do tempo várias pesquisas tenham demonstrado a ação de diferentes compostos sobre *P. insidiosum* (PEREIRA et al., 2007; LORETO et al., 2018; IANISKI et al., 2021; VALENTE et al., 2020; FONSECA et al., 2015; STIBBE et al., 2022; IANISKI et al., 2023), nota-se que é de extrema relevância estudar outras opções terapêuticas que possam ser integradas em protocolos a serem aplicados para o tratamento das diferentes formas clínicas da pitiose em animais e humanos.

Portanto, o desenvolvimento de uma vacina, a partir de dados genômicos que são encontrados em plataformas como o NCBI, pode ser uma estratégia inovadora e eficaz para combater essa doença. Ferramentas de bioinformática podem auxiliar a prospecção de possíveis alvos imunogênicos para selecionar os de maior potencial a fim de induzir uma resposta imunológica duradoura e eficiente.

Assim, o objetivo deste trabalho foi utilizar ferramentas de bioinformática para prospectar os melhores alvos de proteínas imunogênicas para desenvolver quimeras e quimeras multi-epítipo com intuito de desenvolver uma vacina contra a pitiose.

2. METODOLOGIA

Foram realizadas várias etapas: seleção, predição, anotação, análise do pangenoma, extração de clusters representativos, tradução das sequências e análises estruturais e funcionais. Os genomas de *P. insidiosum* foram coletados no NCBI datasets, priorizando isolados de equinos e humanos e descartando os genomas atípicos. Os arquivos foram baixados no formato FASTA e a anotação e

predição das sequências codificantes de DNA (CDS) foram realizadas através da ferramenta “Funannotate”. Estas, foram utilizadas para a construção do pangenoma por meio do “get_homologues-EST”, específico para o agrupamento de sequências homólogas de genes ou transcritos da mesma espécie.

Em seguida, utilizando a plataforma “Google Colab” e códigos em Python, elaborou-se um script para extrair as maiores sequências de cada cluster. Essas foram traduzidas em peptídeos com o “Emboss Transeq”, gerando proteínas submetidas às análises subsequentes. A localização subcelular, peptídeos sinal e domínios transmembrana foram identificados com os programas “DeepLoc”, “SignalP” e “DeepTMHMM”, sendo posteriormente filtradas no “Microsoft Excel” para remover proteínas que não pertenciam a essas categorias.

Por fim, o potencial antigênico foi avaliado no “VaxiJen”, sendo descartadas proteínas com *threshold* < 0,6. As sequências restantes passaram por análise de alergenicidade no “AllerCatPro” para exclusão de possíveis alérgenos, e foram submetidas ao “BLASTp”, comparando-as com proteínas conhecidas de *Homo sapiens* e *Equus caballus*, a fim de evitar risco de resposta autoimune.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A consulta ao banco de genomas do NCBI identificou 15 genomas de *P. insidiosum*. Após a aplicação de filtros para a remoção de genomas atípicos e daqueles disponíveis apenas em *contigs*, restaram 11 genomas em *scaffolds*, que foram submetidos à anotação com a ferramenta “Funannotate”. Entretanto, devido a diferenças observadas entre os genomas durante as análises, utilizou-se a ferramenta “FastANI” para calcular a similaridade genômica entre o genoma de referência e os demais. Como resultado, apenas 5 genomas foram considerados por apresentarem maior consistência, originando o conjunto mais abundante de clusters, totalizando 1204, os quais foram traduzidos em sequências proteicas.

Essas proteínas passaram nas ferramentas “DeepLoc”, “SignalP” e “DeepTMHMM” para detecção de peptídeos sinais e domínios transmembrana que são os potenciais alvos para montagem de uma vacina onde foram obtidas 297 proteínas no total.

As proteínas resultantes passaram por análises de antigenicidade pelo software “Vaxijen”, resultando 173 proteínas com algum potencial de antigenicidade. Estas, foram submetidas a análises de similaridade pelo “BlastP” com genomas de equinos e humanos, onde 122 sequências apresentaram similaridade e, portanto, removidas do trabalho, resultando 51 proteínas que passaram pela ferramenta de alergenicidade. Apenas uma proteína foi apontada como potencial alérgico. Como o número de proteínas resultado dessas análises ainda era abundante, foram então analisadas por um critério mais rigoroso de antigenicidade, usando um limite de $\geq 0,6$ para ser incluído. Como resultado foram obtidas no total 26 proteínas alvo. Por fim, usando novamente a ferramenta “BlastP”, foi realizado um alinhamento para descobrir a origem e provável função dessas proteínas.

Esses achados demonstram, por mais que o número inicial de clusters tenha sido elevado, que o uso de diversos filtros permite reduzir o conjunto de proteínas para que sejam mais seguras e eficazes, compatíveis com estudos de vacinologia reversa em outros microrganismos (TETTELIN et al., 2005; DOYTCHINOVA; FLOWER, 2007). A identificação das proteínas transmembranares é importante uma vez que tais moléculas são mais frequentes associadas as respostas

protetoras como relatado em abordagens parecidas contra *Clostridium perfringens* e outros agentes infecciosos (PAGE et al., 2015; YU et al., 2010).

4. CONCLUSÕES

Com o estudo foi possível perceber que o uso da bioinformática com estratégias específicas demonstra um caminho relevante para o desenvolvimento de vacinas contra a pitiose. Com essa triagem preliminar, pôde-se identificar prováveis proteínas potenciais alvos vacinais contra *P. insidiosum*. Por fim, percebe-se a necessidade de mais análises para identificar os domínios e funções envolvidas nas proteínas hipotéticas para a montagem de quimeras e quimeras multi-epítomos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLERCATPRO 2.0: a web server for predicting protein allergenicity potential. NGUYEN, M. N.; KRUTZ, N. L.; LIMVIPHUADH, V.; LOPATA, A. L.; GERBERICK, G. F.; MAURER-STROH, S. *Nucleic Acids Research*, 2022. DOI: 10.1093/nar/gkac446.

CONTRERAS-MOREIRA, B.; VINUESA, P. GET_HOMOLOGUES, a versatile software package for scalable and robust microbial pangenome analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 79, n. 24, p. 7696–7701, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.02411-13>.

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://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-8-4>
Acesso em: 28 ago. 2025.

FONSECA, A. O. Treatment of experimental pythiosis with essential oils of *Origanum vulgare* and *Mentha piperita* singly, in association and in combination with immunotherapy. *Veterinary Microbiology*, v. 178, p. 265–269, 2015.

GAASTRA, W. et al. *Pythium insidiosum*: an overview. *Veterinary Microbiology*, v. 146, n. 1–2, p. 1–16, 2010.

HALLGREN, J.; TSIRIGOS, K. D.; PEDERSEN, M. D.; ALMAGRO ARMENTEROS, J. J.; MARCATILI, P.; NIELSEN, H.; KROGH, A.; WINTHER, O. DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1101/2022.04.08.487609>.

IANISKI, L. B. et al. In vitro anti-*Pythium insidiosum* activity of amorolfine hydrochloride and azithromycin, alone and in combination. *Medical Mycology*, v. 59, n. 1, p. 67–73, 2021.

IANISKI, L. B. et al. Oomycidal activity of polypyrrole nanoparticles against *Pythium insidiosum*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 23, n. 1, 2023.

LORETO, E. S. et al. Efficacy of azithromycin and miltefosine in experimental systemic pythiosis in immunosuppressed mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 63, n. 1, p. e01385-18, 2018.

MADEIRA, F.; MADHUSOODANAN, N.; LEE, J.; et al. The EMBL-EBI Job Dispatcher sequence analysis tools framework in 2024. *Nucleic Acids Research*, v. 52, n. W1, p. W521–W525, 2024. DOI: [10.1093/nar/gkac241](https://doi.org/10.1093/nar/gkac241).

PAGE, A. J. et al. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*, v. 31, n. 22, p. 3691-3693, 2015. Disponível em: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/31/22/3691/219253> Acesso em: 28 ago. 2025.

PALMER, J. M.; STAJICH, J. E. Funannotate v1.8.1: Eukaryotic genome annotation pipeline. *Zenodo*, 2020. DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.4054262>.

PEREIRA, D. I. B. et al. Zoosporogênese in vitro entre isolados do oomiceto *Pythium insidiosum*. *Ciência Rural*, v. 38, p. 143–147, 2007.

STIBBE, P. C. Mefenoxam and pyraclostrobin: toxicity and in vitro inhibitory activity against *Pythium insidiosum*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 75, n. 5, p. 1383–1388, 2022.

TETTELIN, H. et al. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial "pan-genome." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 102, n. 39, p. 13950-13955, 2005. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/102/39/13950> Acesso em: 28 ago. 2025.

TEUFEL, F. 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: <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01156-3>.

THUMULURI, V. et al. DeepLoc 2.0: multi-label subcellular localization prediction using protein language models. *Nucleic Acids Research*, v. 50, n. W1, p. W228–W234, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkac278>.

VALENTE, J. S. S. et al. Biogenic silver nanoparticles in the treatment of experimental pythiosis Bio-AgNP in pythiosis therapy. *Medical Mycology*, v. 0, p. 1–6, 2020.

VINUESA, P.; CONTRERAS-MOREIRA, B. GET_HOMOLOGUES-EST, a clustering solution for transcriptome-based pangenomics. *Current Bioinformatics*, v. 10, n. 6, p. 551–561, 2015. DOI: <https://doi.org/10.2174/1574893610666150813220656>.

YOLANDA, H.; KRAJAEJUN, T. Global distribution and clinical features of pythiosis in humans and animals. *Journal of Fungi*, v. 8, n. 182, 2022.

YU, N. Y. 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. Disponível em: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/26/13/1608/216204>. Acesso em: 28 ago. 2025.