



PREDIÇÃO *IN SILICO* DE ALVOS VACINAIS PROTEICOS PARA O SOROVAR HARDJO GENÓTIPOS HARDJOBOWIS E HARDJOPRAJITNO

Chideroli, R.T.¹; Facimoto, C.T.¹; Mainardi, R.M.¹; Teixeira, S.K.R.¹; Alfieri, A.F.¹; Pereira, U.P.^{1*}

¹Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil. *e-mail: upaduapereira@uel.br

Saúde Única

Palavras-chave: leptospira, bioinformática, vacina.

Introdução

A leptospirose bovina é uma doença endêmica nos rebanhos brasileiros e os bovinos considerados hospedeiros de manutenção do sorovar Hardjo que possui dois genótipos distintos: Hardjobovis e Hardjoprajitno. O genótipo Hardjobovis pertence à espécie *Leptospira borgpetersenii* e o genótipo Hardjoprajitno à espécie *Leptospira interrogans*. Apesar de ambos causarem problemas reprodutivos nos rebanhos bovinos de todo mundo, existem diferenças epidemiológicas e certamente antigênicas entre eles (BULACH et al., 2006). A vacina contra a leptospirose bovina ainda apresenta sérias limitações, pois as preparações vacinais disponíveis são bacterinas, as quais são sorovar-específica com proteção apenas para os sorovares presentes na vacina (KO et al., 2009) e pouco se sabe se existe proteção cruzada entre estes dois genótipos. Esses antígenos estimulam uma resposta timo independente, não induzindo, portanto, proteção a longo prazo contra infecção o que torna necessária sua administração anual ou semestral. Além disso, essas vacinas disponíveis comercialmente são constituídas por cepas isoladas em outros países, com fauna e ecossistemas diferentes das existentes em nosso país (LILENBAUM, 1996). Essa diversidade antigênica observada entre os sorovares de *Leptospira* spp. ocorre devido às variações de carboidratos na cadeia lateral do LPS, dificultando a elaboração de uma vacina multivalente. A genômica comparativa e estudos *in silico* de sequências genômicas nos últimos anos possibilitaram a predição de genes candidatos vacinais (vacinologia reversa) (SANTOS, et al., 2011). O objetivo deste estudo é predizer alvos vacinais protéicos conservados nos dois genótipos do sorovar Hardjo (Hardjobovis e Hardjoprajitno) utilizando ferramentas *in silico* de vacinologia reversa.

Material e métodos

Para a predição de genes à vacinologia reversa, foram utilizados os genomas completos das cepas *Leptospira interrogans* genótipo Hardjoprajitno (NZ_CP012603. 1) e *Leptospira borgpetersenii* genótipo Hardjobovis



(NC_008508.1) obtidos através do banco de dados *GenBank*. Os genomas completos Ferreira, G. A. S.¹ foram transportados no formato GBK para a ferramenta ARTEMIS (*Sanger Institute*) para a identificação da sequência de nucleotídeos dos genes de interesse.

Para a busca por alvos vacinais protéicos foram considerados os 30 maiores valores de *Maturity Epitope Density* (*MED scores*). Posteriormente, através da ferramenta BLAST, foi realizada a busca por alvos vacinais conservados utilizando a sequência de aminoácidos das proteínas escolhidas previamente. As proteínas que apresentaram potencial de provocar atividade imunogênica nas duas cepas foram consideradas potenciais alvos vacinais.

Resultados e Discussão

Neste estudo, a predição *in silico* de potenciais candidatos genes vacinais para o genótipo Hardjobovis resultou em um total de 354 proteínas identificadas como possivelmente expostas na superfície (PSE) e 87 secretadas com os 30 melhores *MED scores* variando de 53 a 16. Já no Hardjoprajitno foram encontradas 781 proteínas PSE e 181 secretadas com os 30 melhores *MED scores* variando de 84 a 23. Os valores foram obtidos através do *MED scores 1.0 Server* (<http://med.compbio.sdu.dk/>). E conforme descrito por Santos et al., (2013), os *MED scores* apresentam boa eficácia na identificação de alvos de vacina.

Após a análise estatística pelo *MED scores* foram selecionados quatro genes com alto valor de score presente no genótipo Hardjobovis e presente com identidade maior que 80% na Hardjoprajitno. Esses genes selecionados representam quatro proteínas do grupo PSE e apresentam as seguintes funções: proteína translocase SecE, transporte de proteína intracelular; proteína hipotética com função desconhecida; proteína de membrana com função enzimática, de transporte, estrutural, e de recepção; flipase, translocação de lipopolissacarídeo da membrana.

Esta predição baseia-se nas proteínas exportadas, por estas estarem fortemente relacionadas com a interação patógeno-hospedeiro (SANTOS et al., 2011). A vacinologia reversa tem como vantagem a utilização de todos os genes do genoma do organismo, e como limitações a incapacidade de predizer antígenos não protéicos; se os alvos selecionados são imunogênicos ou não e o grande número de alvos normalmente gerados pela predição (RAPPUOLI, 2000). As lipoproteínas de espiroquetas têm sido consideradas antígenos capazes de induzir resposta imune protetora. Nestes micro-organismos, as lipoproteínas são comprovadamente, as mais importantes proteínas que compõem a membrana celular, entretanto apenas um número pequeno destas é caracterizado funcionalmente (HAAKE, 2000). Neste estudo, para os dois genótipos do sorovar Hardjo, foram encontradas proteínas possivelmente expostas na membrana com alto *MED scores* e nenhuma delas são lipoproteínas. Devido à variedade genotípica deste micro-organismo há uma grande



quantidade de proteínas que podem ser avaliadas como promissores de antígenos vacinais para a leptospira.

Conclusões

Neste estudo de predição de alvos vacinais *in silico*, foram encontradas quatro proteínas conservadas dentre as 30 analisadas com maior MED scores. Logo, é possível criar uma vacina bivalente (com proteção para os dois genótipos do sorovar Hardjo) para a espécie bovina. Entretanto, ainda são necessários mais estudos incluindo testes *in vivo* para validação da eficiência da vacina.

Suporte financeiro

CAPES, CNPq, Fundação Araucária.

Referências

- BULACH, D. M.; ZUERNER, R. L.; WILSON, P.; SEEMANN, T.; MCGRATH, A.; CULLEN, P. A.; DAVIS, J.; JOHNSON, M.; KUCKZEK, E.; ALT, D. P.; PETERSON-BURCH, B.; COPPEL, R. L.; ROOD, J. I.; DAVIES, J. K.; ADLER, B. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Ames, v.103, p.14560-14565, set.2006.
- HAAKE, D. A. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. **Microbiology**, v.146, p.1491-1504, jul. 2000.
- KO, A.I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v.7, n.10, p.736-747, out.2009.
- LILENBAUM, W. Bovine Leptospirosis in Brazil: A Review. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, Rio de Janeiro, v.18, n.1, p.9-13, 1996.
- RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v.3, n.5, p.445-450, out.2000.
- SANTOS, A.; ALI, A.; BARBOSA, E.; SILVA, A.; MIYOSHI, A.; BARH, D.; AZEVEDO, V. The reverse vaccinology- A contextual overview. **The IIOAB Journal**, v.2, n.4, p.8-15, maio 2011.
- SANTOS, A. R.; PEREIRA, V. B.; BARBOSA, E.; BAUMBACH, J.; PAULING, J.; ROTTGER, R.; TURK, M. Z.; SILVA, A.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. Mature Epitope Density - A strategy for target selection based on immune informatics and exported prokaryotic proteins. **BMC Genomics**, Campinas, v.14, n.6, out. 2013.