

## Desenvolvimento *in silico* de uma vacina multi-epítopo contra *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* através de vacinologia reversa

Marta Filipa Silva<sup>1</sup>, Gonçalo Pereira<sup>2,3</sup>, Luísa Mateus<sup>2,3</sup>, Luís Lopes da Costa<sup>2,3</sup>, Elisabete Silva<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Investigação em Medicina Veterinária (I-MVET), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Lusófona, Centro Universitário de Lisboa, Portugal.

<sup>2</sup>CIISA – Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.

<sup>3</sup>Laboratório associado para a Ciência Animal e Veterinária (AL4AnimalS), Lisboa, Portugal.

**Objectivos:** Este estudo *in silico* teve como objetivo construir uma vacina multi-epítopo contra *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* (*Cfv*), o agente etiológico da Campilobacteriose Genital Bovina (CGB), utilizando uma abordagem de vacinologia reversa.

**Material e métodos:** O proteoma da estirpe de referência *Cfv* NCTC 10354 foi analisado com o objetivo de identificar proteínas extracelulares e da membrana externa, potencialmente envolvidas na virulência. Estas proteínas foram avaliadas quanto à sua antigenicidade, alergenicidade, propriedades físico-químicas e homologia com proteínas de origem bovina. As proteínas mais promissoras foram selecionadas para predição de epítomos de linfócitos B e T. A conservação dos epítomos selecionados foi verificada com base no genoma de 31 estirpes de *Cfv*. Os epítomos conservados e com melhor classificação foram usados para desenhar uma vacina multi-epítopo, cuja resposta imunitária foi simulada *in silico*. Após a otimização de codões para expressão em *Escherichia coli*, a sequência da vacina foi clonada *in silico* num vetor plasmídico pET-30a(+).

**Resultados:** Foram identificadas nove proteínas adequadas para o desenvolvimento de uma vacina contra *Cfv*. Entre elas, a proteína da membrana externa OmpA e a proteína flagelar FliK foram selecionadas para a predição de epítomos. Para contruir a vacina candidata, foram selecionados 2 epítomos de OmpA e 13 epítomos de FliK, unidos por sequências espaçadoras GPGPG para formar um fragmento multi-epítopo de 241 aminoácidos, conectado à subunidade B da toxina colérica através de uma sequência espaçadora EAAAK. A vacina candidata foi prevista como antigénica, não tóxica e não alérgica e a sua sequência nucleotídica foi otimizada e clonada *in silico* com sucesso no vetor pET-30a(+). As simulações imunológicas demonstraram a capacidade da vacina candidata para estimular uma resposta imunitária.

**Conclusão:** Através da aplicação da metodologia de vacinologia reversa foi construída uma vacina contra *Cfv*, adequada para subsequente validação experimental *in vitro* e *in vivo*, com potencial de ser utilizada no controlo da CGB.

**Palavras-chave:** Campilobacteriose genital bovina, *Campylobacter fetus* subsp. *Venerealis*, Vacinologia reversa, Vacina.

**Financiamento:** Este estudo foi financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) e pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), no âmbito dos projetos PTDC/CVT-CVT/30145/2017 e VITINDEME (PDR2020-101-031789). Este estudo também foi financiado pelo Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal – CIISA (Project UIDB/00276/2020, financiado pela FCT) e pelo Laboratório Associado para a Ciência Animal e Veterinária (LA/P/0059/2020 – AL4AnimalS).