

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

**Construção, caracterização, antigenicidade e imunogenicidade de proteína
multiepítipo dos Alphaherpesvirus bovinos 1 e 5**

Nadálín Yandra Botton

Pelotas, 2025

Nadálín Yandra Botton

**Construção, caracterização, antigenicidade e imunogenicidade de proteína
multiepítipo dos Alphaherpesvirus bovinos 1 e 5**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Saúde Única)

Orientador: Prof. Dr. Geferson Fischer

Pelotas, 2025

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

B751c Botton, Nadálin Yandra

Construção, caracterização, antigenicidade e imunogenicidade de proteína multiepítopo dos Alphaherpesvirus bovinos 1 e 5 [recurso eletrônico] / Nadálin Yandra Botton ; Geferson Fischer, orientador. — Pelotas, 2025.

87 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2025.

1. Hespesvirus bovinos. 2. Bioinformática. 3. Vacina multiepítopo. 4. Glicoproteínas. 5. Diagnóstico. I. Fischer, Geferson, orient. II. Título.

CDD 636.208979

Nadálin Yandra Botton

Construção, caracterização, antigenicidade e imunogenicidade de proteína
multiepítipo dos Alphaherpesvirus bovinos 1 e 5

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências,
Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade
Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 24/02/2025

Banca examinadora:

Prof. Dr. Geferson Fischer (Orientador)
Doutor em Biotecnologia Agrícola pela Universidade Federal de Pelotas

Dr^a Cristina Mendes Peter
Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Dr. Paulo Ricardo Centeno Rodrigues
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Dr. Amilton Clair Pinto Seixas Neto
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dr^a Silvia de Oliveira Hübner (Suplente)
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais Jaqueline Paula Seemann Botton e Silvar Antônio Botton pelo apoio, conforto e confiança.

A minha família, por sempre se fazerem presentes para mim.

Ao meu, hoje marido, Léo, por sempre estar por perto me incentivando, mesmo quando estávamos a um oceano de distância. É muito bom compartilhar a vida com você.

À Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária (PPGV), pela oportunidade de ingressar na Pós-Graduação.

Ao meu orientador, Dr. Geferson Fischer, que além de orientador, tornou-se um amigo durante esta caminhada. Obrigada por estar sempre ao meu lado e por me ensinar todos os dias sobre ciência, fé e vida. A sua integridade e ética são o melhor exemplo de sucesso, professor, e eu tenho muito orgulho de estar sendo formada por você.

Aos professores, Dr. Gilberto D'Ávila Vargas, Dr. Marcelo de Lima e Dra. Silvia de Oliveira Hübner, por estarem sempre dispostos a dialogarem sobre o projeto de pesquisa.

Ao professor Dr. Luciano da Silva Pinto, por auxiliar em todas as etapas desta pesquisa e por gentilmente abrir as portas do laboratório que está sob a sua supervisão para que este projeto pudesse ser desenvolvido.

Aos amigos do Laboratório de Virologia e Imunologia (Labvir) da UFPel, pelos seis anos de parceria; especialmente aos que me receberam neste laboratório, Dr. Paulo Ricardo Centeno Rodrigues, Dra. Cristina Mendes Peter e MsC Lariane da Silva Barcelos; para o meu colega de dia a dia e amigo de todas as horas, MsC Matheus Iuri Fhühauf; e para quem eu vou deixar minha “herança”, minha estagiária, parceira de bancada e fiel escudeira, Marina Sturbelle Garcia.

Aos amigos do Laboratório de Bioprospecção e Proteômica (BioProLab) da UFPel, pela calorosa acolhida e auxílio durante o desenvolvimento deste projeto, especialmente nas pessoas dos queridos MsC. Guilherme Feijó de Sousa e Dr. Amilton Clair Pinto Seixas Neto.

À coordenadora do PPGV-UFPel, Dra. Bruna da Rosa Curcio. Obrigada por ser inspiração de mulher e profissional, e por pensar tão à frente do seu tempo.

A todos aqueles que contribuíram para o meu aprimoramento pessoal e profissional.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Resumo

BOTTON, Nadálin Yandra. **Construção, caracterização, antigenicidade e imunogenicidade de proteína multiepítopo dos Alphaherpesvirus bovinos 1 e 5.** 2024. 87f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2024.

Os herpesvirus bovinos são importantes microrganismos causadores de distúrbios respiratórios, reprodutivos e encefálicos que ainda acometem as criações de bovinos em todo o mundo, podendo também afetar bubalinos, ovinos e caprinos. A vacinação é o método mais efetivo de controle e redução das doenças provocadas por esses microrganismos, e nesse âmbito, diferentes plataformas vacinais têm sido desenvolvidas ao longo dos anos com essa finalidade. O objetivo deste estudo foi o desenvolvimento de uma proteína multiepítopo a partir da união de epítomos imunodominantes das glicoproteínas B, C e D dos BoAHVs 1 e 5, e sua avaliação para utilização em teste diagnóstico e vacinação de bovinos sob condições de campo. Inicialmente foi realizada a recuperação (NCBI) e curadoria (MUSCLE e BLASTp) das sequências das glicoproteínas dos organismos de interesse, para posterior predição de epítomos reconhecidos por linfócitos B (BepiPred 2.0), células T citotóxicas (NetMHCpan EL 4.1) e células T *helper* (NetMHCIIpan 4.0). Posteriormente à análise de antigenicidade (VaxiJen 2.0), a proteína multiepítopo, que daria origem à vacina multiepítopo, foi montada utilizando os ligantes GGGGS e EAAAK entre os epítomos de uma mesma glicoproteína ou entre os epítomos de glicoproteínas diferentes, respectivamente. Após, as análises de parâmetros físico-químicos e perfil de alergenicidade, foram realizadas através dos servidores ProtParam e AlgPred seguida de uma nova análise de antigenicidade (VaxiJen 2.0). A modelagem e o docking molecular foram realizados através dos servidores I-TESSER e ClusPro, respectivamente, com o modelo do receptor TLR bovino obtido através do banco de dados AlphaFoldDB. Para a expressão da proteína multiepítopo o vetor pET24a contendo o gene de interesse foi utilizado para transformar a cepa de *E. coli* BL21 (DE3) Star por choque térmico. O cultivo foi realizado em 500 mL de meio LB líquido sob condições ideais para o seu crescimento e expressão da proteína multiepítopo. Em seguida a amostra foi processada e em sequência purificada por cromatografia de afinidade no equipamento AKTA Purifier, para posterior diálise e quantificação por BCA. A caracterização foi realizada por Western blotting e a antigenicidade por teste de ELISA indireto com protocolo *in house*. A imunogenicidade foi avaliada a partir da imunização de 5 bovinos com 400 µg da proteína multiepítopo conjugada com o adjuvante Montanide™ ISA 50 V2, pela via intramuscular (vacina multiepítopo). O grupo placebo foi inoculado com solução salina tamponada (PBS). Para determinação do nível de anticorpos totais IgG, o teste de ELISA indireto, com protocolo *in house*, foi empregado. A proteína multiepítopo apresenta 321 aminoácidos, peso molecular

de 33.24 kDa, pI teórico de 9.88, estimativa de meia vida em *E. coli* de >10 horas, GRAVY de -0,507, antigenicidade de 1.1543 e se caracteriza como instável e sem potencial alergênico. A proteína multiepítopo também é capaz de interagir com alta energia de interação (-1264.7 kcal/mol) com 88 membros do cluster. Suas frações solúvel e insolúvel foram reconhecidas pelo anti-HIS6x em um Western blotting, caracterizando-a pelo seu peso molecular de ~33 kDa. A proteína multiepítopo foi fortemente reconhecida pelos anticorpos IgG-anti-alphaherpesvirus dos soros bovinos, demonstrando sua antigenicidade. A vacina multiepítopo foi capaz de induzir uma resposta imunológica humoral a nível de IgG total. A proteína multiepítopo pode ser utilizada em testes diagnósticos e em vacinas contra os Alphaherpesvirus bovinos 1 e 5.

Palavras-chave: herpesvirus bovinos; bioinformática; vacina multiepítopo; diagnóstico; glicoproteínas.

Abstract

BOTTON, Nadálin Yandra. **Construction, characterization, antigenicity and immunogenicity of multiepitope protein of Bovine alphaherpesvirus 1 and 5.** 2024. 87f. Thesis (Doctor degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2024.

Bovine herpesviruses are significant microorganisms responsible for respiratory, reproductive, and encephalic disorders that continue to affect cattle farming worldwide, with potential impacts on buffaloes, sheep, and goats as well. Vaccination is the most effective method for controlling and reducing diseases caused by these microorganisms. In this context, various vaccine platforms have been developed over the years to achieve this goal. The objective of this study was the development of a multiepitope protein derived from the union of immunodominant epitopes of glycoproteins B, C, and D of BoAHVs 1 and 5, and its evaluation for use in diagnostic tests and vaccination of cattle under field conditions. Initially, the retrieval (NCBI) and curation (MUSCLE and BLASTp) of the glycoprotein sequences of the target organisms were performed, followed by the prediction of epitopes recognized by B lymphocytes (BepiPred 2.0), cytotoxic T cells (NetMHCpan EL 4.1), and helper T cells (NetMHCIIpan 4.0). Subsequently, after the antigenicity analysis (VaxiJen 2.0), the multiepitope protein, which would serve as the basis for the multiepitope vaccine, was constructed using GGGGS and EAAAK linkers between epitopes of the same glycoprotein or between epitopes of different glycoproteins, respectively. Following this, analyses of physicochemical parameters and allergenicity profiles were conducted using ProtParam and AlgPred servers, respectively, followed by another antigenicity analysis (VaxiJen 2.0). Protein modeling and molecular docking were performed using the I-TASSER and ClusPro servers, respectively, with the bovine TLR-7 receptor model obtained from the AlphaFoldDB database. For the expression of the multiepitope protein, the pET24a vector containing the gene of interest was used to transform the E. coli BL21 (DE3) Star strain via heat shock. Cultivation was carried out in 500 mL of liquid LB medium under optimal conditions for growth and expression of the multiepitope protein. The sample was then processed and subsequently purified using affinity chromatography on an ÄKTA Purifier system, followed by dialysis and quantification using the BCA method. Characterization was performed through Western blotting, and antigenicity was evaluated via indirect ELISA using an in-house protocol. Immunogenicity was assessed by immunizing five cattle with 400 µg of the multiepitope protein conjugated with Montanide™ ISA 50 V2 adjuvant, administered intramuscularly (multiepitope vaccine). The placebo group was inoculated with phosphate-buffered saline (PBS). To determine total IgG antibody levels, an indirect ELISA test using an in-house protocol was employed. The multiepitope protein consists of 321 amino acids, has a molecular weight of 33.24 kDa, a theoretical pI of

9.88, an estimated half-life in *E. coli* of >10 hours, a GRAVY score of -0.507, antigenicity of 1.1543, and is characterized as unstable and non-allergenic. The multiepitope protein was also capable of interacting with a high binding energy (-1264.7 kcal/mol) with 88 cluster members. Its soluble and insoluble fractions were recognized by anti-HIS6x antibodies in a Western blotting assay, confirming its molecular weight of approximately ~33 kDa. The multiepitope protein was strongly recognized by IgG anti-Alphaherpesvirus antibodies from bovine sera, demonstrating its antigenicity. The multiepitope vaccine successfully induced a humoral immune response at the total IgG level. The multiepitope protein can be employed in diagnostic tests and vaccines against bovine Alphaherpesviruses 1 and 5.

Keywords: bovine herpesviruses; bioinformatics; multiepitope vaccine; diagnosis; glycoproteins.