

BRUNO RIBEIRO PINTO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DIAGNÓSTICO DE UMA PROTEÍNA QUIMÉRICA
NO DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE BOVINA E MODELAGEM METABÓLICA EM
ESCALA-GENÔMICA DE *Brucella abortus***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Tiago Antônio de Oliveira
Mendes

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

P659a
2023
Pinto, Bruno Ribeiro, 1992-
Avaliação do potencial de uma proteína quimérica no diagnóstico de brucelose bovina e modelagem metabólica em escala-genômica de *Brucella abortus* / Bruno Ribeiro Pinto. – Viçosa, MG, 2023.

1 tese eletrônica (73 f.): il. (algumas color.).

Texto em português e inglês.

Orientador: Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.678>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Brucella abortus*. 2. Brucelose em bovinos. 3. Brucelose. 4. Sorodiagnóstico. 5. Proteínas recombinantes de fusão. 6. Biologia de sistemas. I. Mendes, Tiago Antônio de Oliveira, 1986-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 636.20896957


BRUNO RIBEIRO PINTO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DIAGNÓSTICO DE UMA PROTEÍNA QUIMÉRICA
NO DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE BOVINA E MODELAGEM METABÓLICA EM
ESCALA-GENÔMICA DE *Brucella abortus***


Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 18 de agosto de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 BRUNO RIBEIRO PINTO
Data: 30/10/2023 10:39:37-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Bruno Ribeiro Pinto
Autor

Documento assinado digitalmente
 TIAGO ANTONIO DE OLIVEIRA MENDES
Data: 30/10/2023 12:04:46-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Tiago Antônio de Oliveira Mendes
Orientador

*Dedico este trabalho aos meus pais e amigos
que sempre acreditaram em mim, mesmo
quando eu não acreditava.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Rejane e Janozik, que sempre foram meus pilares, acreditando e confiando em mim, quando nem mesmo eu acreditava. Que sempre vibraram por mim desde as menores conquistas e que com suas palavras simples e humildes acalmaram meu coração nos momentos mais difíceis. Para vocês, o meu eterno amor e gratidão como filho.

Ao meu amigo Jonatas, que sempre esteve me acompanhando durante esta etapa importante da minha vida. Sempre ao meu lado compartilhando os melhores momentos, me apoiando e incentivando nos momentos de crise sempre confiando em mim. Muito obrigado por tudo!

Ao meu amigo Lucas que sempre me acolheu e esteve ao meu lado nos momentos bons e ruins, me escutando sem julgar e me fazendo rir com seus memes e figurinhas.

À minha amiga Naraiane, mesmo longe sempre esteve torcendo por mim.

Aos meus amigos Zé e Vitor, que conheci durante o período de pandemia. Que nas noites sempre compartilharam, mesmo que distante, as suas companhias dando boas risadas durante as partidas de Overwatch e Dead by Daylight, trazendo um pouco de felicidade durante um período tão triste e solitário.

Ao Alex Ranieri, que mesmo sem me conhecer, me acolheu e me mostrou os caminhos da Biologia de Sistemas, sempre muito paciente confiando e acreditando em mim.

Ao Miquéias pela sua paciência e por sempre me ajudar nos apuros da programação. Tens minha gratidão.

Aos meus amigos Matheus, Lucas, e sua família que sempre me acolheram como um segundo lar. À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

PINTO, B. P., D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2023. **Avaliação do Potencial Diagnóstico de uma Proteína Quimérica no Diagnóstico de Brucelose Bovina e Modelagem Metabólica em Escala-genômica de *Brucella abortus***
Orientador: Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

A brucelose bovina é uma antropozoonose, causada pela bactéria *Brucella abortus*. Esta bactéria afeta principalmente bovinos e bubalinos. Também pode infectar outros hospedeiros mamíferos como os humanos. Esta antropozoonose é uma preocupação significativa na pecuária, devido aos prejuízos causados por esta bactéria. Causando aborto, infertilidade, perdas significativas na produção de leite, na produção de rebanho e no comércio de animais e seus produtos. A transmissão da brucelose bovina para humanos é uma preocupação da saúde pública. A doença pode ser adquirida através do consumo de produtos lácteos não pasteurizados e ou de carne contaminada. O estudo dessa doença é importante para o desenvolvimento de estratégias de prevenção, controle e erradicação visando minimizar os prejuízos econômicos na indústria pecuária. Além disso, ajudar a entender os mecanismos patogênicos, visando desenvolver novas estratégias terapêuticas no tratamento mais eficiente da brucelose humana. Uma das principais formas de controle desta doença é o diagnóstico preciso e precoce de animais infectados, para que possam ser isolados protegendo o rebanho e impedindo a disseminação desta doença. Abordagens de bioinformática como a imunoinformática, pode ajudar na descoberta de peptídeos antigênicos, que podem ser usados para construir proteínas quiméricas. Estas proteínas são ferramentas capazes de identificar de forma específica, e com alta sensibilidade anticorpos, sendo uma estratégia para o desenvolvimento de novos métodos de diagnósticos para brucelose bovina. Entender o metabolismo deste patógeno, pode nos ajudar a esclarecer mecanismo e adaptações da patogênese, permitindo desenvolver novas estratégias terapêuticas. A modelagem metabólica em escala-genômica é uma abordagem que reconstrói *in silico* redes metabólicas de um organismo. Permitindo realizar simulações em diferentes condições, predizendo fenótipos, genes essenciais, reprogramações metabólicas que podem ajudar a elucidar processos biológicos da patogênese. Neste trabalho foi avaliado o potencial de diagnóstico de

uma proteína quimérica desenvolvida para o diagnóstico de brucelose. Apesar de ser capaz de identificar anticorpos contra *Brucella*, os parâmetros sensibilidade e especificidade devem ser reavaliados em novos experimentos. Também foi desenvolvido o primeiro modelo metabólico em escala-genômica de *B. abortus* composto por 932 genes, 1140 reações e 999 metabólitos, capaz de prever *in silico*, genes essenciais com acurácia de 79% na condição meio rico 2YT assim como a predição de crescimento em diferentes fontes de carbono e nitrogênio. A partir deste modelo, foi possível identificar através de uma análise dos genes essenciais com base nos critérios: Não homologia com proteínas humanas, drogabilidade, fator de virulência e amplo espectro, quatro potenciais Drug Targets que podem ser validados como alvos antimicrobianos.

Palavras-chave: *Brucella abortus*. Diagnóstico Sorológico. Modelo Metabólico em Escala-genômica. Biologia de Sistemas, Brucelose.

ABSTRACT

PINTO, B. P., D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2023. **Assessment of the Potential of a Chimeric Protein in the Diagnosis of Bovine Brucellosis and Genome-scale Metabolic Modeling of *Brucella abortus***. Adviser: Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

Bovine brucellosis is an anthroozoonosis caused by the bacterium *Brucella abortus*. This bacterium primarily affects cattle and water buffalo. It can also infect other mammalian hosts, including humans. This anthroozoonosis is a significant concern in livestock farming due to the damages caused by this bacterium, including abortion, infertility, significant losses in milk production, herd production, and the trade of animals and their products. The transmission of bovine brucellosis to humans is a public health concern. The disease can be acquired through the consumption of unpasteurized dairy products and/or contaminated meat. Studying this disease is crucial for the development of prevention, control, and eradication strategies aimed at minimizing economic losses in the livestock industry. Additionally, it helps in understanding the pathogenic mechanisms to develop new therapeutic strategies for more efficient treatment of human brucellosis. One of the main ways to control this disease is the accurate and early diagnosis of infected animals, allowing for their isolation to protect the herd and prevent the spread of this disease. Bioinformatics approaches, such as immuno-informatics, can aid in the discovery of antigenic peptides that can be used to construct chimeric proteins. These proteins are tools capable of specifically and sensitively identifying antibodies, offering a strategy for the development of new diagnostic methods for bovine brucellosis. Understanding the metabolism of this pathogen can help clarify pathogenic mechanisms and adaptations, enabling the development of new therapeutic strategies. Genomic-scale metabolic modeling is an approach that *in silico* reconstructs metabolic networks of an organism, allowing simulations under different conditions, predicting phenotypes, essential genes, and metabolic reprogramming that can help elucidate biological processes of pathogenesis. In this study, the diagnostic potential of a chimeric protein developed for brucellosis diagnosis was evaluated. Despite its ability to identify antibodies against *Brucella*, sensitivity and specificity parameters should be reassessed in new experiments. Additionally, the first genome-scale metabolic model of *B. abortus* was developed, comprising 932 genes, 1140 reactions, and 999

metabolites, capable of *in silico* predicting essential genes with an accuracy of 79% under rich medium 2YT conditions, as well as growth predictions under different carbon and nitrogen sources. From this model, it was possible to identify four potential drug targets based on essential gene analysis criteria, including non-homology with human proteins, druggability, virulence factor, and broad-spectrum properties, which can be validated as antimicrobial targets.

Keywords: *Brucella abortus*. Serum Diagnosis. Genome-scale Metabolic Model. Systems Biology. Brucellosis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 <i>Brucella abortus</i> e Brucelose.....	12
2.2 Diagnóstico de Brucelose.....	14
2.2.1 Testes Sorológicos.....	15
2.2.2 Imuno-informática e Proteínas Quiméricas.....	17
2.3 Patogênese, Virulência e Metabolismo.....	18
2.3.1 Patogênese.....	18
2.4 Fatores de Virulência.....	20
2.4.1 Operon virB e Sistema de Secreção tipo IV.....	20
2.4.2 Sistema Regulador de Dois Componentes BvrS/BvrR.....	21
2.4.3 Lipopolissacarídeos.....	22
2.4.4 Glicanos $\beta \rightarrow 1,2$ Cíclicos (C β G).....	23
2.4.5 Metabolismo de Virulência.....	24
2.4.6 Metabolismo de Carboidratos e Nitrogênio.....	24
2.5 Biologia de Sistemas e Modelagem Metabólica em Escala-genômica.....	27
2.5.1 Reconstrução de Modelos Metabólicos em Escala-genômica.....	27
2.5.2 Modelagem Metabólica de Patógenos Bacterianos.....	30
JUSIFICATIVA E MOTIVAÇÃO.....	32
OBJETIVO GERAL.....	32
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
CAPÍTULO 1 - AVALIAÇÃO DE UMA PROTEÍNA QUIMÉRICA PARA O DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE BOVINA.....	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1 Seleção de Epítomos.....	34
3.2 Desenho da Proteína Quimérica e Gene Sintético.....	34
3.3 Clonagem, Expressão e Purificação.....	34
3.4 Teste de Imunoabsorção Enzimática (ELISA).....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	35
4.1 Expressão e Purificação da Proteína Quimérica.....	37
4.2 Análise de Sensibilidade e Especificidade da Proteína Quimérica no Diagnóstico de Animais Positivos para Brucelose Bovina.....	38
5. CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS.....	42
CAPÍTULO 2 - CONSTRUÇÃO E VALIDAÇÃO DO MODELO METABÓLICO EM ESCALA-GENÔMICA DE <i>Brucella abortus</i> E ANÁLISE <i>in silico</i> DE POTENCIAIS ALVOS TERAPÊUTICO.....	58

1. INTRODUÇÃO

A brucelose bovina, uma doença infecciosa de grande importância no contexto da pecuária, é causada pela bactéria *Brucella abortus*. Esta enfermidade afeta principalmente o gado bovino, mas também pode ser transmitida a outros animais, incluindo humanos, representando um sério risco para a saúde pública. A brucelose bovina é caracterizada por causar abortos e distúrbios reprodutivos em bovinos, resultando em perdas econômicas significativas para a indústria pecuária. Além disso, devido à sua capacidade de ser transmitida aos seres humanos, a doença é considerada uma zoonose, o que a torna uma preocupação para a saúde humana, com impactos potenciais na segurança alimentar. A compreensão e o manejo adequado dessa doença são fundamentais para garantir a sustentabilidade da indústria pecuária e a prevenção da disseminação da brucelose entre animais e humanos. O diagnóstico da brucelose bovina é um aspecto fundamental no controle e prevenção dessa doença, pois permite identificar animais infectados e tomar medidas apropriadas para evitar a disseminação. O diagnóstico preciso da brucelose bovina é essencial para a implementação de medidas de controle, como a segregação de animais infectados, o abate de animais positivos e a vacinação controlada. Essas ações são cruciais para prevenir a disseminação da doença e proteger a saúde do rebanho bovino e a segurança alimentar.

Os modelos metabólicos em escala genômica, também conhecidos como modelos de fluxo metabólico ou modelos de redes metabólicas, são ferramentas poderosas na biologia de sistemas que permitem a representação e análise dos processos metabólicos de um organismo com base em sua informação genética. Quando se trata de *Brucella abortus*, uma bactéria patogênica que causa a brucelose em bovinos e pode infectar humanos, esses modelos podem fornecer informações valiosas para entender seu metabolismo, fisiologia e potenciais alvos terapêuticos. Estes modelos desempenham um papel crucial na investigação da biologia, fisiologia e patogenicidade de *Brucella abortus*. Eles fornecem uma base sólida para a compreensão do metabolismo bacteriano e a identificação de oportunidades terapêuticas para combater essa patologia de importância econômica e de saúde pública.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Brucella abortus* e Brucelose

O gênero *Brucella* é composto por bactérias Gram-negativas que pertencem à classe α -proteobactérias (Batut et al., 2004). Essas bactérias são cocobacilos aeróbicos, não encapsulados, imóveis e facultativamente intracelulares, além de serem positivas para a enzima urease (Corbel e Hendry, 1985). O gênero *Brucella* inclui aproximadamente nove espécies, todas elas patogênicas para diferentes hospedeiros (Moreno e Moriyón, 2002). Algumas espécies também apresentam atividade positiva para oxidase, catalase e superóxido dismutase (Araj, 2010). O gênero *Brucella* é caracterizado pela presença de fatores de virulência, como um lipopolissacarídeo incomum, um sistema de secreção do tipo IV, a presença de β -1-2-glucanos cíclicos (C β G), o fator de virulência A de *Brucella* (BvfA) e o sistema BvrR/BvrS (Glowacka et al., 2018). Dentre as espécies da família *Brucella* spp., a *Brucella abortus* se destaca como o agente causador da brucelose bovina.

A Brucelose, é uma antropozoonose difundida mundialmente, que apresenta um impacto econômico significativo e representa um potencial desafio para a saúde pública, uma vez que os seres humanos podem entrar em contato com animais de produção e seus produtos contaminados (Papas et al., 2006). Apesar de ser difundida mundialmente, a brucelose, está erradicada em países desenvolvidos como Japão, Canadá, Suécia e Reino Unido entre outros países da União Europeia. Mas ainda permanece em outras regiões do globo como Estados Unidos, região do mediterrâneo, Oriente Médio, América Latina e partes da Ásia (Zhang et al., 2018). A brucelose bovina, presente em países como o Brasil, causa grande impacto econômico devido aos danos causados aos animais infectados com o patógeno *B. abortus* (Poester et al., 2002). Em vacas, *B. abortus* infecta principalmente o trato uterino causando complicações como aborto, nascimento de prole fraca, endometriose, retenção da membrana fetal e diminuição da produção de leite (Abdisa., 2018). Já em animais do sexo masculino, esta bactéria infecta principalmente trato reprodutivo causando orquite podendo levar a infertilidade nestes animais (Lage et al., 2008). A infecção destes animais por *B. abortus* pode ocorrer por meio de fetos abortados e membranas placentárias infectadas que possam disseminar este patógeno. A amamentação por animais infectados, assim como a inseminação artificial com semem contaminado são formas recorrentes de

infecção de bovinos com *B. abortus* (Acha and Szyfers., 2001). Animais contaminados são reservatórios do patógeno, podendo infectar o rebanho, portanto é de extrema importância como forma de controle, a identificação e isolamento e abate dos animais contaminados para evitar a disseminação da brucelose (Figura 1) (Gwida et al., 2010). Outra estratégia para controle da brucelose bovina é a vacinação compulsória de animais com as vacinas RB51 e S19 em regiões endêmicas da doença (Gheibi et al., 2018).

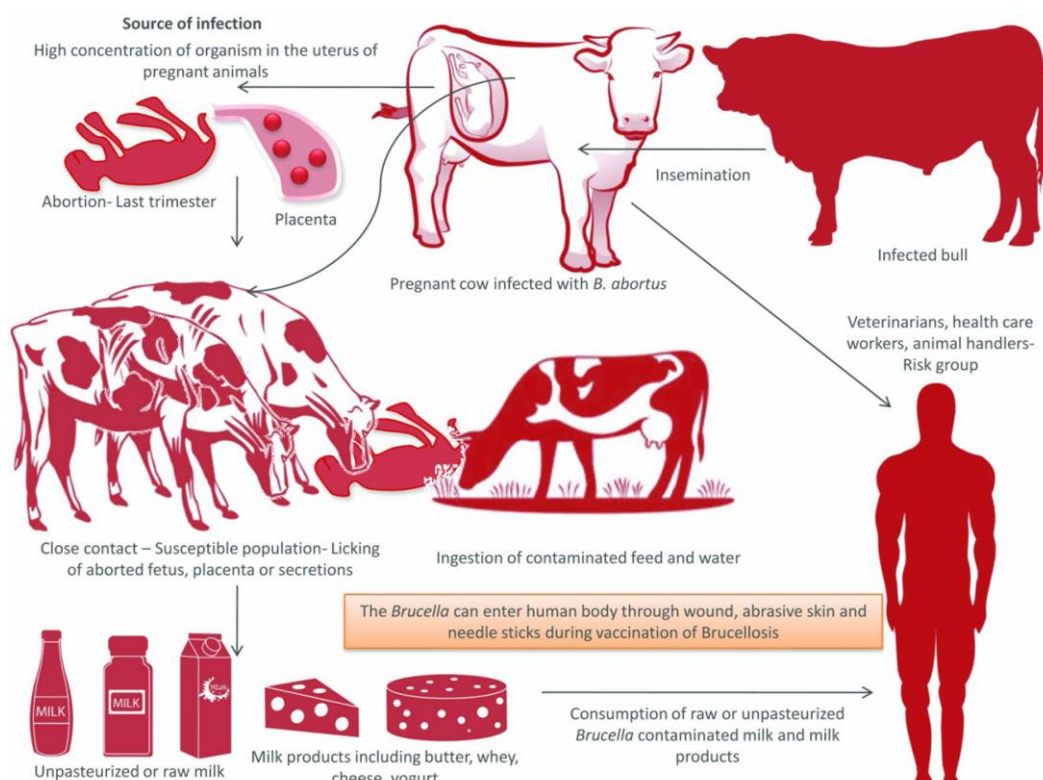


Figura 1 - Transmissão de Brucelose. Geralmente, vacas prenhas tendem a sofrer abortos no último trimestre de gestação. Os fetos abortados, assim como a placenta e as secreções do útero são fontes de infecção para outros animais. Leites e seus derivados, quando não pasteurizados, são fontes de infecção para humanos se consumidos. Touros infectados podem se tornar uma fonte de infecção contínua (Khurana et al., 2021).

Em humanos, uma das principais fontes de infecção de *B. abortus* são os animais infectados que são reservatórios do patógeno. O contato com derivados de animais contaminados como leites, queijos e carnes, caracteriza a forma oral de infecção por *B. abortus*. A brucelose, pode ser também considerada uma doença

ocupacional. Trabalhadores de frigoríficos, açougues e indústria de laticínios são alguns dos exemplos que podem ser infectados por *B. abortus* devido ao contato com mucosa ou feridas nas mãos com produtos de animais contaminados. Médicos veterinários podem se contaminar durante procedimentos das quais há contato com fetos abortados, placenta e secreções vaginais de animais infectados (Acha and Szyfers., 2001; Mukhtar., 2010). A transmissão também pode ocorrer em contatos humano-humano infectados com *B. abortus* por meio de relações sexuais, transfusão de sangue, transplante de medula óssea e aerossóis de pacientes infectados (Tuon et al., 2017). A brucelose em humanos é uma doença sistêmica, e pode ser dividida em três etapas, aguda, subaguda e crônica. Na fase aguda os principais sintomas são, dor de cabeça, dor nas costas, perda de peso, mialgia, artralgia, constipação e anorexia. A aparição de infecções localizadas como epididimite, orquite e osteoarticulares, caracterizam a forma subaguda. A forma crônica da brucelose em humanos possui características similares a síndrome de fadiga crônica e também é caracterizada por infecção nos ossos, rins, fígado e baço podendo afetar também outros sistemas como cardiovascular e nervoso (Kilic et al., 2013; Young et al., 2010; Reguera et al., 2003; Bodur et al., 2003). O tratamento de brucelose em humanos é prolongado e se utiliza de terapia combinada de pelo menos dois antibióticos (rifampicina e doxiciclina), pois a monoterapia pode levar a casos de recidiva (Villate and Casallas., 2020; Doganay and Aygen., 1992).

2.2 Diagnóstico de Brucelose

Uma das principais formas para se estabelecer o controle da Brucelose, é a identificação de animais infectados com *Brucella* por meio do diagnóstico. Uma das formas de se identificar o patógeno, é por meio do isolamento de amostras biológicas. Porém o longo tempo (em média duas semanas) necessário para a identificação *da Brucella*, nestes materiais, torna o diagnóstico difícil e demorado (Radostits et al., 2000). A viabilidade da bactéria isolada é crucial para a sua identificação. Geralmente sendo isolada de órgãos como baço e linfonodo de animais post mortem ou fetos abortados (Yagupsky., 1999). As bactérias isoladas podem ser cultivadas em meios sólidos como por exemplo, tryptose-soy agar, Blood agar, Columbia agar, Serum-dextrose ágar entre outros (Alton et al. 1988). No Brasil, o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal

(PNCEBT), no qual prevê medidas de controle com base no diagnóstico e vacinação dos animais (Bartoli and Mathias., 2020). Dentre os testes utilizados para o diagnóstico de Brucelose, destacam-se os testes sorológicos tanto para triagem quanto para confirmação empregados nas estratégias de controle da Brucelose (Khurana et al., 2021).

2.2.1 Testes Sorológicos

Testes sorológicos se baseiam na detecção de anticorpos em amostras de soro de animais contaminados. Anticorpos IgM contra *B. abortus*, causadora da brucelose bovina, podem ser detectados inicialmente a partir de uma semana após a infecção (Lucero et al., 2003). Os protocolos de testagem de animais devem obedecer às seguintes diretrizes: fêmeas com idade igual ou superior a 24 meses que foram vacinadas com a vacina B19; fêmeas não vacinadas ou vacinadas com a RB51, cujos testes devem ser realizados com idade igual ou superior a 8 meses; e animais machos devem ser testados a partir dos 8 meses de idade (MAPA, 2017). No Brasil, de acordo com o PNCEBT, são empregados testes sorológicos para triagem de brucelose, incluindo o Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), o Anel em Leite (TAL), bem como os testes 2-Mercaptoetanol (2-ME) e Fixação de Complemento (FC) como confirmatórios (PNCEBT, 2006). Os testes de ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) representam uma alternativa viável, capazes de detectar tanto IgG quanto IgM com elevada sensibilidade e especificidade (Al-Shamahy e Wright, 1998). Uma análise comparativa de sensibilidade entre a cultura bacteriana e os testes sorológicos foi conduzida para a detecção de brucelose bovina em rebanhos. Os resultados indicaram que os testes AAT e ELISA foram os mais indicados para a confirmação de infecção por *Brucella* (Gurbilek et al., 2017). Um teste de ELISA utilizando anticorpos monoclonais para a detecção do LPS, desenvolvido com a finalidade de diagnosticar brucelose bovina, apresentou sensibilidade superior aos testes comerciais e ao teste AAT (Wang et al., 2015).

Os testes rápidos imunocromatográficos de fluxo lateral consistem em dispositivos em que a amostra (soro ou sangue total) é aplicada em um poço no dispositivo, onde ocorre a extração do analito e este percorre uma membrana de nitrocelulose por fluxo lateral. Na faixa de teste, o antígeno é imobilizado e sua interação com o anticorpo presente na amostra emite um sinal que indica um

resultado positivo. Isso permite o diagnóstico pela identificação do anticorpo específico para o patógeno de interesse na amostra (conforme Figura 2) (Sajid et al., 2014). Testes rápidos utilizando o antígeno MM101 de *Brucella abortus* possibilitaram a detecção tanto de IgM quanto IgG no diagnóstico de brucelose (Irmak et al., 2004). Outro teste de fluxo lateral utilizando o antígeno S-LPS demonstrou uma sensibilidade de 89% e especificidade de 99%, comparados ao teste de ELISA competitivo, para o diagnóstico de brucelose (Manasa et al., 2018).

Um fator determinante nos testes sorológicos é a escolha do antígeno empregado para a detecção dos anticorpos. Alguns métodos de diagnóstico de brucelose utilizam o antígeno lipopolissacarídeo de *Brucella* purificado, que apresenta limitações devido a reações cruzadas com outras bactérias (Palmer e Douglas, 1989). A utilização de antígenos recombinantes representa uma alternativa aos antígenos nativos. Eles são facilmente produzidos em larga escala e demonstram resultados significativos em termos de sensibilidade e especificidade, podendo ser facilmente padronizados em testes sorológicos como ELISA e testes de fluxo lateral (Moraveji et al., 2012; Liao et al., 2005).

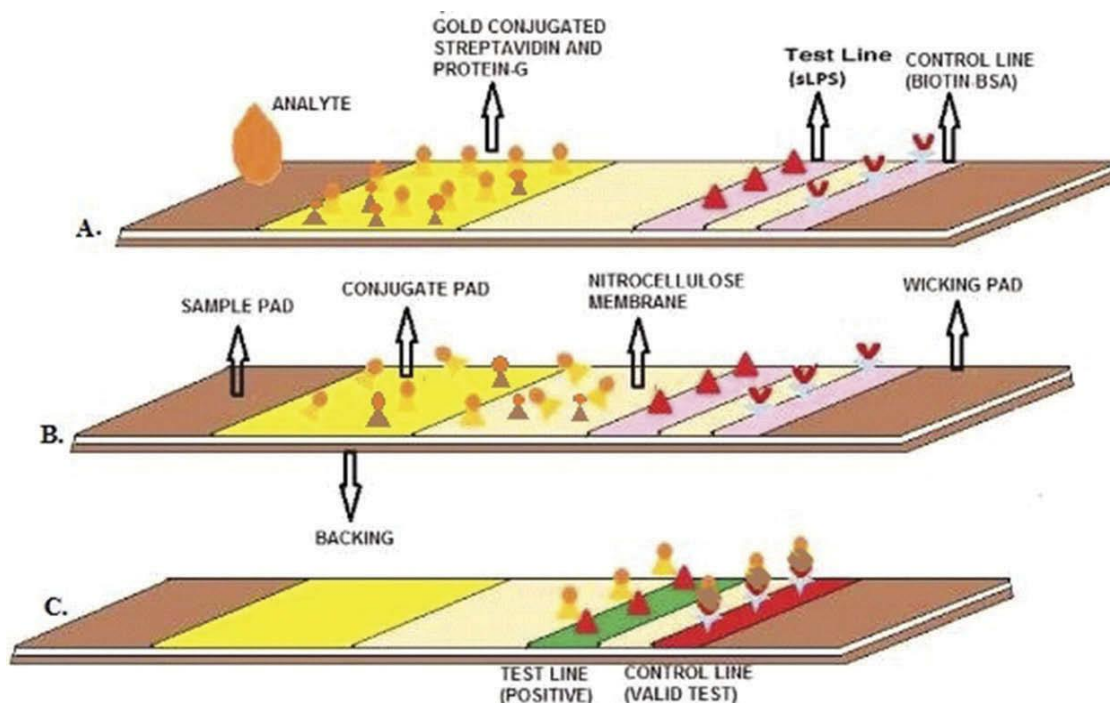


Figura 2 - Exemplo teste diagnóstico de fluxo lateral. A) A amostra de soro é depositada para análise no dispositivo. B) Os anticorpos presentes na amostra são conjugados com proteína G e migram até a linha de teste. C) A interação do anticorpo específico contra o antígeno de interesse, é detectada emitindo o sinal positivo (Manasa et al., 2018).

2.2.2 Imuno-informática e Proteínas Quiméricas

A imuno-informática é um campo interdisciplinar que combina princípios da imunologia e bioinformática para investigar e compreender o sistema imunológico. Utiliza ferramentas computacionais para análise de dados e modelagem computacional, visando explorar respostas imunológicas, interações antígeno-anticorpo, bem como a identificação e previsão de epitopos (De Groot et al., 2002). Epitopos são fragmentos específicos de proteínas ou peptídeos reconhecidos por anticorpos, desempenhando um papel crucial no desencadeamento da resposta imunológica (Valente and Monzano-Rendeiro, 2021). A identificação *in silico* de epitopos que interagem com células do sistema imune possibilita a criação de proteínas multi-epitopos, que podem ser empregadas no desenvolvimento de vacinas (Kar and Srivastava, 2018). Esses epitopos também podem servir como antígenos para detecção de anticorpos contra patógenos, viabilizando a elaboração de novos testes de diagnóstico (Pereira et al., 2020).

A abordagem de imuno-informática, usando sequências de proteínas de superfície de *Leishmania infantum*, foi empregada na criação de uma proteína multi-epitopos capaz de identificar anticorpos contra o *L. infantum*. O teste de ELISA desenvolvido nesse estudo alcançou uma sensibilidade de 98% e uma especificidade de 95,31% na detecção de animais infectados (Yaghubi et al., 2021). Além disso, a construção de uma proteína contendo epítopos de proteínas de membrana BP26, Omp23, Omp16, Omp25 e Omp31 de *Brucella* foi utilizada no desenvolvimento de um teste de ELISA para avaliar o potencial de diagnóstico da brucelose humana. Os resultados mostraram uma maior especificidade em comparação com o uso do antígeno lipopolissacarídeo (Yin et al., 2021).

A aplicação da imuno-informática na criação de proteínas quiméricas multi-epitopos tem o potencial de impulsionar o desenvolvimento de novas tecnologias biotecnológicas para testes sorológicos mais sensíveis e específicos. Após a

padronização e validação adequadas, esses testes podem ser incorporados nos protocolos de diagnóstico da brucelose bovina, incluindo a possibilidade de desenvolver testes rápidos de fluxo lateral.

2.3 Patogênese, Virulência e Metabolismo

2.3.1 Patogênese

B. abortus é uma bactéria que possui um estilo de vida intracelular, replicando-se principalmente no interior de vacúolos de macrófagos, células dendríticas e trofoblastos placentários (Celli., 2019). Esta bactéria possui também tropismo para diversos outros tecidos, o que permite a sua disseminação sistêmica (Carvalho et al., 2023). O seu estilo de vida intracelular, a protege das defesas do sistema imune do hospedeiro, assim como dificulta a ação dos antibióticos (Martirosyan and Gorvel., 2013). Anterior a fase aguda da brucelose, há o período de incubação onde ocorre a replicação intracelular de *B. abortus* no qual há ausência de sintomas clínicos. Na fase aguda, ocorre a disseminação e invasão do patógeno para os demais tecidos do organismo, levando à falência de órgãos e morte do hospedeiro na fase crônica da doença (Shakir., 2021).

Ao entrar em contato com o hospedeiro, *B. abortus* precisa se translocar pela camada epitelial de mucosa, sendo endocitada por macrófagos e células dendríticas de mucosa (Rossetti et al., 2013). No interior destas células o patógeno é capaz de sobreviver e se replicar, se evadindo do sistema imune e disseminando para diversos outros tecidos como trofoblastos placentários em fêmeas grávida, trato reprodutivo e o sistema reticuloendotelial (Adams., 2002) Figura 3. *B. abortus* utiliza de receptores de membrana contendo resíduos de ácidos siálico sulfatado para aderir em células epiteliais e macrófagos (Castañeda-Roldán et al., 2004). A interação deste patógeno com estes receptores desencadeia uma cascata de sinalização por meio de GTPases, que leva a uma reorganização do citoesqueleto de actina. Este rearranjo causa alterações na conformação da membrana da célula do hospedeiro, que favorece a internalização do patógeno (Rossetti et al., 2012). Após ser internalizada, *Brucella* transloca pelo epitélio e é envolvida por células fagocitárias de mucosa, e no interior destas células passa por um processo de adaptação e sobrevivência e durante este período, o patógeno escapa do sistema

imune, alterando seus padrões moleculares associados a patógenos (Barquero-Calvo et al., 2007). *Brucella* ao adentrar no interior das células fagocitárias, reside no endossomo formado durante sua interação com as células do hospedeiro. Este compartimento também chamado de BCV, (Da sigla em inglês *Brucella*-containing vacuole) contém um microambiente pobre em nutrientes e oxigênio, no qual o patógeno precisa se adaptar. *B. abortus* nestas condições, utiliza de vias metabólicas como síntese de aminoácidos e nucleotídeos, metabolismo de carboidratos, biossíntese de LPS, metabolismo de nitrogênio para se adaptar (Kohler et al., 2002).

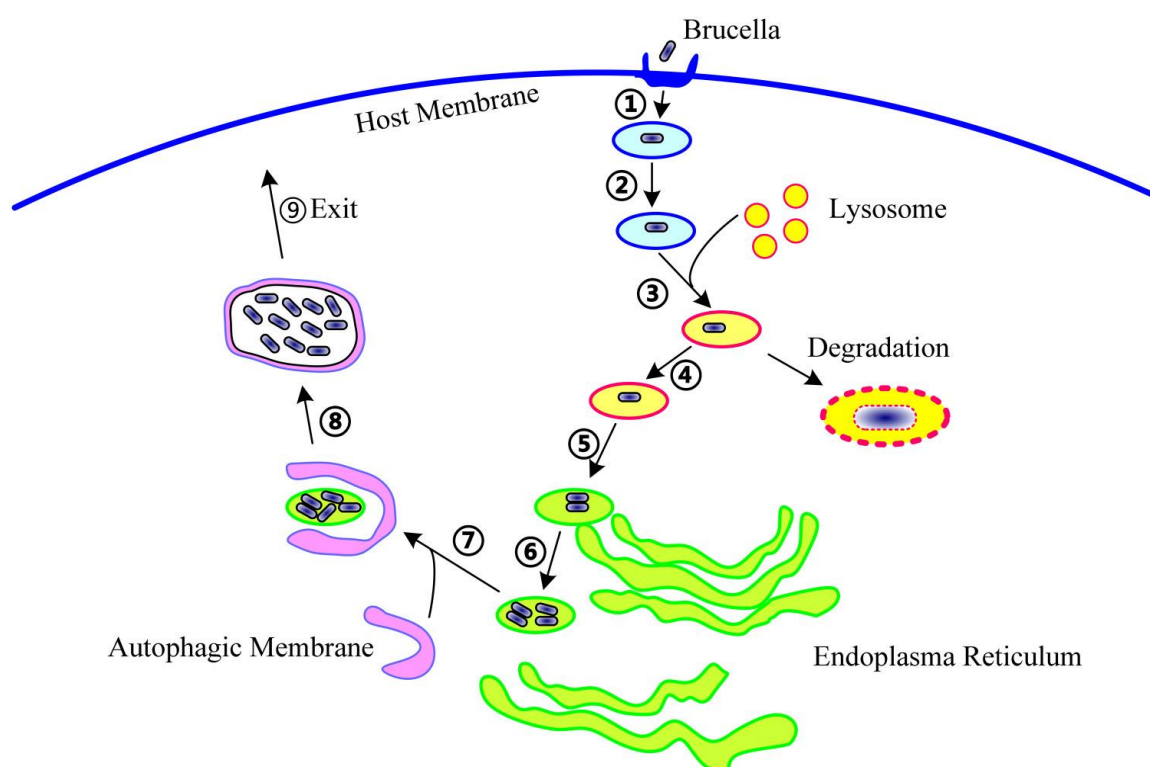


Figura 3 - Tráfego intracelular de *Brucella*. Durante a infecção, a *Brucella* primeiro invade as células hospedeiras (①), forma vacúolos contendo Brucella (BCVs) (②) e sofre fusão com o lisossoma de maneira controlada (③). Nesta etapa, cerca de 90% da Brucella são degradados e os 10% restantes sobrevivem (④). Em seguida, o BCV trafega para e atinge o retículo endoplasmático (RE) (⑤) e estabelece o sítio replicativo (⑥). Após a replicação do RE, o tráfego de Brucella em direção aos vacúolos semelhantes à autofagia (⑦), sobrevive dentro desses compartimentos (⑧) e, finalmente, deixa as células hospedeiras para disseminando para outros tecidos (⑨) (Ke et al., 2015).

O Endossomos contendo microorganismo, geralmente são fusionados com lisossomos e degradados. O BCV protege a *Brucella* da ação das enzimas lisossomais (Pizarro-Cerdá., et al 1998). Este vacúolo contendo a bactéria, passa pela via endocítica, interagindo com os compartimentos intermediários desta via, evitando a degradação pelo lisossomo e se fundindo ao retículo endoplasmático (RE) formando os BCVs replicativos, onde ocorre a replicação celular (Starr et al., 2008). Ainda no meio intracelular, *Brucella* necessita sobreviver e burlar as reações do sistema imune para garantir sua sobrevivência e completar o seu ciclo celular, para que possa se disseminar para outros tecidos. *Brucella* possui em seu genoma, diversos genes que codificam fatores de virulência que contribuem para sua infecção intracelular (Roop et al., 2021).

2.4 Fatores de Virulência

2.4.1 Operon *virB* e Sistema de Secreção Tipo IV

O Sistema de secreção tipo IV é um complexo multiproteico capaz de secretar macromoléculas e proteínas bacterianas no interior do citoplasma do hospedeiro, codificado pelo operon *virB* composto por doze fases de leitura (*virB1-virB12*) (O'Callaghan et al., 1999). Este complexo macromolecular é dividido em cinco partes, o complexo de agulhas de alongamento (*virB2*), complexo núcleo/membrana externa (*virB7*, *virB9* e *virB10*) talo de ligação (*virB5* ou *virB10*), complexo de membrana interna (*virB3*, *virB4*, *virB6*, *virB8* e *virB10*) e porção ATPase (*virB4* e *virB11*) (Figura 4) (Xiong et al., 2021). Este sistema possui um papel crucial na infecção intracelular de *Brucella*, por estar envolvido principalmente nos processos de inibição da resposta imune inata do hospedeiro através da secreção de efetores que inibem a resposta imune e na sobrevivência intracelular durante a infecção (Ke et al., 2015). Estudos mostraram que o T4SS é determinante para a virulência e persistência da fase crônica da doença (Hong et al., 2000). Experimentos utilizando signature-tagger transposon mutagenesis mostraram que este sistema é essencial para o crescimento intracelular de *Brucella* durante a infecção em macrófagos THP1 e células HeLa (Foulongne et al., 2000). Bactérias deficientes em T4SS ainda são capazes de invadir as células do hospedeiro, adquirem os marcadores endossomais (LAMP1 e EEA1) pelo BCV, porém não resistem à degradação pelos lisossomos

devido a incapacidade de excluir o marcador LAMP1 (Proteína associada a membrana lisossomal 1), permitindo a fusão do BCV com o lisossomo (Delrue et al., 2001; Comerci et al., 2001).

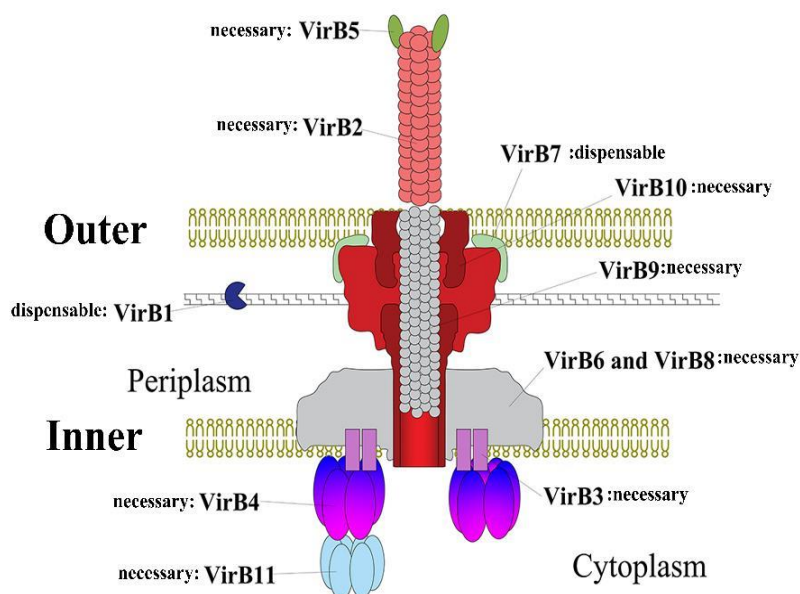


Figura 4 - Estrutura do Sistema de Secreção Tipo IV. Complexo de membrana interior (virB3, virB4, virB6 e virB8), complexo de membrana exterior (virB7, virB9 e virB10) e pilus externo (virB2 e virB5). As porções ATPases (virB4 e virB11) fornecem energia para a transferência de substratos. (Xiong et al., 2021).

2.4.2 Sistema Regulador de Dois Componentes *BvrS/BvrR*

O sistema *BvrS/BvrR* em *Brucella*, é responsável principalmente pela regulação de genes essenciais para a sobrevivência. Desligando genes desnecessários e ativando genes necessários para invasão e sobrevivência intracelular (López-Goñi et al., 2002). Este sistema é similar às proteínas sensores e regulatórias ChvI-ExoS e ChvI/ChvG de *Sinorhizobium meliloti* e *Agrobacterium tumefaciens* respectivamente, importantes para a simbiose e patogênese em plantas (Sola-Landa et al., 1998). Bactérias com deleções nos genes do sistema *BvrS/BvrR*, possuem deficiência da síntese das proteínas Omp25 e Omp22, tornando a *Brucella* mais suscetível a polications bacterianos e aumentando a permeabilidade de surfactantes na membrana (Guzman-Verri et al., 2002). A proteína Omp25 de *Brucella* a protege de sistema imune por meio de um mecanismo que suprime a fosforilação de genes estimuladores de interferon (STING), do fator regulador 3 de

interferon (IRF3) e a translocação nuclear do fator 3 do interferon em diversos tipos celulares a protegendo da ação de INF- β (Li et al., 2021). Mesmo com a deleção dos genes das proteínas Omp25 e Omp22, *B. abortus* ainda é capaz de sobreviver em camundongos BALB/c, mostrando que o sistema *BvrS/BvrR* ativo é capaz de manter a virulência desta bactéria (Manterola et al., 2007).

2.4.3 Lipopolissacarídeos

As bactérias do gênero *Brucella* destacam-se pelo seu Lipopolissacarídeo (LPS) presente na sua membrana exterior, composta por um lipídio A, core oligossacarídeo e uma cadeia antigênica O-polissacarídica (OPS) (Figura 5). Bactérias com a estrutura completa da LPS são denominadas LPS-S (S do inglês, smooth) e LPS-R (R do inglês, rough) quando apresentam uma redução ou ausência completa da cadeia OPS (Moreno et al., 1981; Caroff et al., 1984). A OPS das espécies S, possuem em sua estrutura um homopolímero linear composto por 4,6 didesoxi-4-formamido- β -D-manopiranosil com ligações do tipo $\beta \rightarrow 1,2$ e o core composto por manose, glicose, quinovosamina, glucosamina e ácido 3-deoxi-D-mano-2-octulosônico (KDO) (Cardoso et al., 2006). O lipídio A presente na LPS de *Brucella* possui em sua estrutura ácidos graxos de cadeias muito longas (VLCFAs). A presença dos VLCFA causam uma interação mais fraca com os TLR4, diferente do lipídio A de outras bactérias, gerando uma resistência frente a indução da resposta anti-inflamatória do hospedeiro (Ferguson et al., 2004; Lapaque et al., 2006). O core da LPS funciona principalmente como um link estrutural entre a OPS e o lipídio A (Monreal et al., 2003). Porém em *Brucella* a estrutura do core também protege a OPS e o lipídio A em inibir a ligação com o TLR4 e macrófagos e células dendríticas do hospedeiro (Conde-Álvarez et al., 2012).

A LPS-S é um fator de virulência que está envolvido na inibição da fusão precoce de fagossomos contendo *Brucella suis* com lisossomos em células de macrófagos. Bactérias com LPS-R são degradadas rapidamente nos lisossomos (Porte et al., 2003). A atividade de respostas anti-microbianas do hospedeiro como o complemento, peptídeos antibacterianos e a síntese de mediadores do sistema imune, são impedidos pela LPS de *Brucella* (Lapaque et al., 2005). Uma análise comparativa da indução da produção de TNF- α e óxido nítrico em células de macrófago RAW 264.7, foi demonstrado que LPS de *Escherichia coli* possui um

estímulo maior do que LPS de *B. melitensis* na indução destes fatores, assim como também possui uma alta atividade antissistema do complemento do que a de *E. coli* (Tumurkhuu et al., 2005).

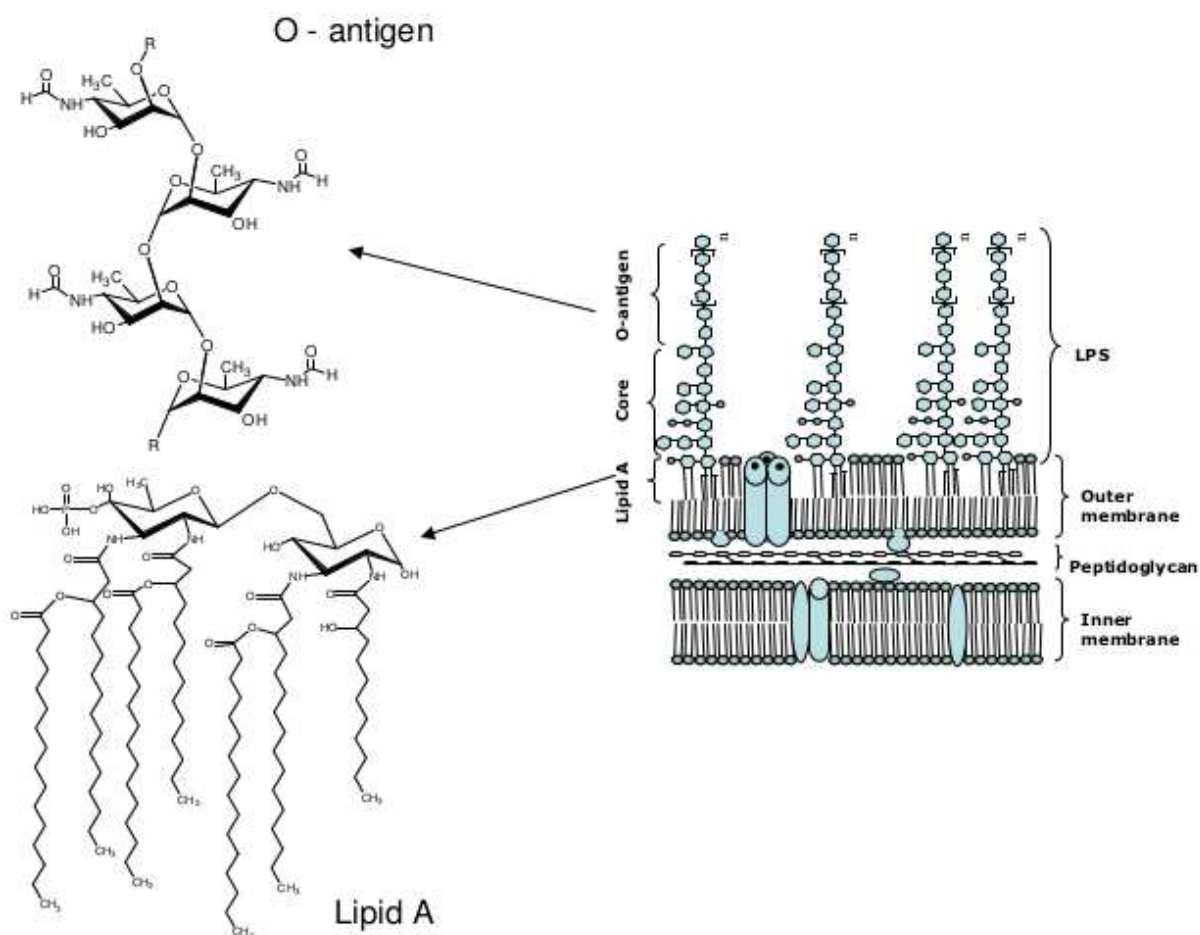


Figura 5 - Estrutura LPS de *B. abortus* (Cardoso et al., 2006)

2.4.4 Glicanos $\beta \rightarrow 1,2$ Cíclicos (C β G)

Alfa proteobactérias assim como *Brucella*, secretam em seu periplasma um polímero composto por 17 a 20 resíduos de glicose conhecido como glicanos $\beta \rightarrow 1,2$ cíclicos (C β G) (Lannino et al., 1998). Em bactérias como *S. meliloti* e *A. tumefaciens*, este polímero pode estar ligado à osmoproteção, devido sua produção ser regulada por condições osmóticas (Lannino et al., 2000). *Brucella* mutantes para a enzimas C β G sintase, são incapazes de impedir a fusão do fagossomo com o lisossomo, e há o indicativo de que esta molécula rompe as balsas lipídicas no BCV prejudicando a interação deste vacúolo com os lisossomos (Arellano-Reynoso et al., 2005). O C β G

parece possuir um papel duplo na virulência de *Brucella* pois participa tanto no tráfego intracelular desde entrada na célula até o nicho replicativo, quanto no ajuste da resposta imune do hospedeiro (Degos et al., 2015). Curiosamente a enzima C β G sintase e o transportar de C β G, possui uma localização polar na membrana da bactéria, embora a natureza dessa polarização ainda é desconhecida (Guidolin et al., 2015).

2.4.5 Metabolismo

O microambiente no qual *Brucella* sobrevive no interior das células do hospedeiro possui uma baixa concentração de oxigênio. Portanto a virulência dessa bactéria é extremamente dependente de proteínas que possuem uma alta afinidade com oxigênio como por exemplo, as citocromo oxidases tipo bd e cbb₃ (Bagues et al., 2007). Assim como *S. meliloti*, as principais cepas do gênero *Brucella* possuem as vias enzimáticas necessárias para a redução completa de NO₃ a N₂ (Heine et al., 2006). Estas vias metabólicas permitem que estas bactérias utilizem o NO₃ como um aceptor de elétrons alternativo na cadeia respiratória, mantendo as condições necessárias para sua sobrevivência nestes microambientes (Kim et al., 2012). Uma das defesas dos macrófagos frente a patógenos intracelulares, é a produção de óxido nítrico (NO) (MacMicking et al., 1997). Deste modo, enzimas da via de desnitrificação permitem que *Brucella* neutralize a ação do NO utilizado pelos macrófagos, protegendo a célula de apoptose e permitindo sua permanência intracelular (Wang et al., 2001).

2.4.6 Metabolismo de Carboidratos e Nitrogênio

A disponibilidade limitada de nutrientes no interior das células do hospedeiro, é uma condição adversa do qual patógenos precisam lidar durante seu processo de adaptação. A capacidade de patógenos em adaptar seu metabolismo central para utilizar de forma mais otimizada possível as fontes de energia disponíveis, é de certa forma um fator determinante em seu processo de virulência (Eisenreich et al., 2010). A interação patógeno-hospedeiro ocasiona reprogramações metabólicas tanto no hospedeiro quanto no patógeno, que se beneficia destas reprogramações para sua permanência intracelular (Eisenreich et al., 2017). Foi observado alterações no

metabolismo do ácido tricarbóxico, diminuição no consumo de aminoácidos, alteração da localização da mitocôndria e aumento da produção lactato em macrófagos infectados por *B. abortus*, assim como uma dependência da enzima lactato desidrogenase para a sua sobrevivência intracelular (Czyz et al., 2017).

Brucella parece depender essencialmente de vias do metabolismo de glicose para manter seu crescimento no interior do hospedeiro (Zúñiga-Ripa et al., 2014). Deficiência na enzima fosfofrutoquinase (PFK), impede que em a glicose seja metabolizada pela glicólise em bactérias deste gênero (Essenberg et al., 2002). Contudo, diversas espécies utilizam de forma dinâmica a via das pentoses fosfato para metabolizar a glicose (Machelart et al., 2020). As enzimas envolvidas na gliconeogênese, piruvato quinase e piruvato fosfato diquinase, desempenham um papel fundamental na virulência de *Brucella* em camundongos (Pitzer et al., 2018; Vizcaíno et al., 2020). Além de ser capaz de utilizar a glicose, *Brucella* se destaca pela sua capacidade de metabolizar eritritol, (Figura 6) um carboidrato de 4C, utilizando-o principalmente como fonte de carbono em tecidos embrionários em vacas (Anderson and Smith., 1965).

O Eritritol estimula o crescimento de *Brucella spp*, e a presença deste poliol está relacionada à preferência dos tecidos infectados (Keppie et al., 1964). A presença do eritritol em tecidos placentários, resulta em uma alta proliferação de *Brucella* ocasionando aborto. Destacando o metabolismo deste poliol como potencial fator de virulência na patogênese da brucelose (Meador and Deyoe 1989). A cepa vacinal de *Brucella abortus* US-19 é incapaz de metabolizar eritritol e portanto, incapaz de causar aborto em bovinos (Sperry and Robertson 1975). A princípio, o catabolismo do eritritol foi elucidado sendo este metabólito convertido a 3-ceto-L-eritrose-4-fosfato por meio de três enzimas principais. Uma kinase e duas desidrogenases e posteriormente convertido a dihidroxiacetona fosfato alimentando a via glicolítica (Sperry and Robertson 1975). Estudos posteriores mostraram que o operon responsável pelo metabolismo do eritritol é formado por *eryA*, codificando uma kinase, *eryB* e *eryC* codificando duas desidrogenases, genes reguladores *eryD* e *eryR*, seguidos de *eryH* e *eryI* codificadores de isomerases seguido de genes da via glicolítica *fbaA* e *fbp*. O eritritol é convertido a D-3-tetose-4-fosfato e seguido de duas reações de isomerização gerando D-eritrose-4-fosfato sendo convertido a Frutose-6-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato permitindo a síntese de hexoses

monofosfatada e crescimento via alimentação da via das pentoses fosfato (Figura 6) (Sangari et al., 2000; Barbier; et al 2014).

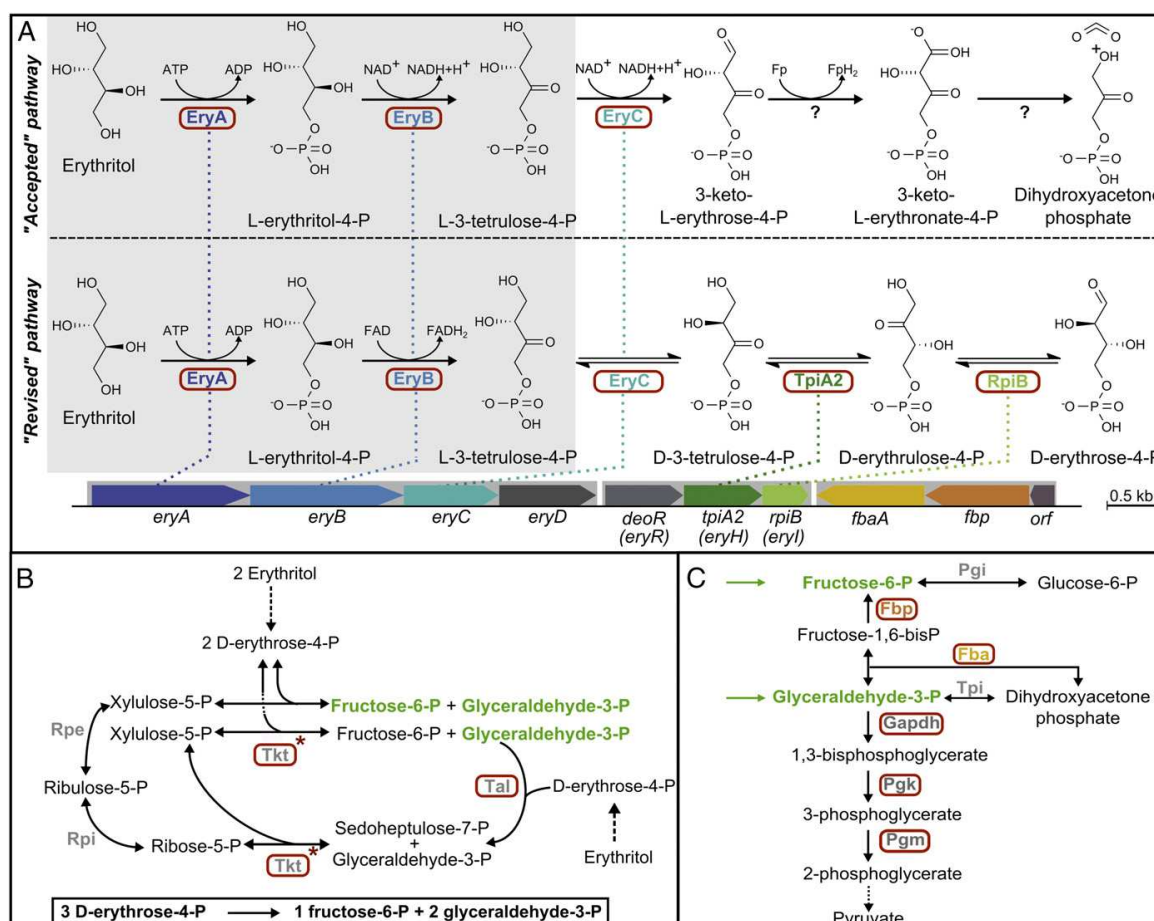


Figura 6 – Metabolismo Eritritol em *B. abortus*. A) Reações enzimáticas da vida de degradação de eritritol por *B. abortus* B e C) A D-erythrose-4-phosphato gerada no catabolismo do eritritol é posteriormente processada pelas vias das pentoses fosfato, gerando os intermediários a glicólise/gliconeogênese, frutose-6-P e gliceraldeído-3-P (Barbier et al., 2018).

Além das fontes de carbono, como os carboidratos, no interior das células do hospedeiro, *Brucella* necessita de fontes de nitrogênio para a síntese de aminoácidos e bases nitrogenadas. As necessidades fisiológicas destes nutrientes no interior da célula do hospedeiro são fornecidas principalmente por aminoácidos e NH_4 (Ronneau et al., 2016). *Brucella* é capaz de utilizar diversos aminoácidos como fonte de nitrogênio, mas somente o glutamato pode ser utilizado tanto como fonte de carbono, nitrogênio e energia (Gerhardt et al., 1950). As enzimas que regulam a interconversão do glutamato a α -cetoglutarato, assim como a glutamina para a

assimilação de NH_4 , são de extrema importância para a virulência (Ronneau et al., 2016). Bactérias mutantes para as enzimas reguladoras *GlnD* e *GlnE* são incapazes de manter sua sobrevivência intracelular, tanto em macrófagos quanto em camundongos (Hong et al., 2000; Wu et al., 2006). Além dos aminoácidos patogênicos, como a bactéria *B. abortus* utiliza a poliamina putrescina como fonte de nitrogênio em macrófagos. Tanto a inibição da síntese de poliaminas em macrófagos assim como a inibição do transportador de putrescina em *Brucella* diminuem a sobrevivência desta bactéria em macrófagos e camundongos (Kerrinnes et al., 2018).

2.5 Biologia de Sistemas e Modelagem Metabólica em Escala-genômica

A biologia de sistemas é um campo interdisciplinar da bioinformática que busca compreender os sistemas biológicos como um todo, em vez de estudar apenas seus componentes isolados (Kitano., 2002). Ela se concentra na análise e modelagem computacional de processos biológicos complexos, considerando as redes de interações entre genes, proteínas, células, tecidos e organismos, bem como as influências do ambiente (Likić et al., 2010). A modelagem metabólica em escala-genômica, é uma abordagem da biologia de sistemas que consiste na reconstrução da rede de reações metabólicas que um organismo potencialmente pode realizar, tendo como base as enzimas anotadas em seu genoma (Nielsen., 2017). A partir da construção de modelos metabólicos em escala-genômica (GEM), é possível prever fenótipos e analisar de forma sistêmica, o fluxo metabólico de um determinado organismo em condições diferentes, com base em análises de balanço de fluxo (FBA) (Orth et al., 2010). A aplicação de GEMs de patógenos bacterianos, permite analisar diversos aspectos da biologia da bactéria em estudo. Como por exemplo, genes essenciais, interação patógenos-hospedeiro, reprogramação metabólica, resistência a antibióticos, formulação de meios de cultivo (Sertbas and Ulgen., 2020).

2.5.1 Reconstrução de Modelos Metabólicos em Escala-genômica

A construção de um modelo metabólico consiste em diferentes etapas: reconstrução da rede metabólica, formulação da equação de biomassa, formulação

das condições a serem simuladas e por último a análise do fluxo metabólico (Bernstein et al., 2021). A anotação genômica é fundamental para identificar corretamente as enzimas metabólicas presentes no genoma, deste modo, associando corretamente os genes com as vias metabólicas das quais estão relacionados (Seaver et al., 2021). A relação gene-proteína-reação (GPR) utilizada nos GEMs permite associar corretamente a reação catalisada pela enzima ao seu gene, tornando possível reconstruir *in silico* as vias metabólicas, assim como realizar simulações de gene knock out (Machado et al., 2016). A partir das sequências das proteínas anotadas no genoma de um organismo, é possível iniciar a reconstrução do draft (rascunho) da rede metabólica composta pelos genes, reações e os metabólitos do organismo de interesse (Fondi and Liò., 2015). A reconstrução do draft, pode ser realizada de forma manual como também automatizada. Há disponível diversos softwares para reconstrução automatizada de GEMs porém, a etapa de curadoria manual utilizando dados presentes em bancos de dados e na literatura, se torna indispensável para a reconstrução de GEMs de alta qualidade (Mendonza et al., 2019; Thiele and Palsson., 2010).

Após a reconstrução e curadoria do modelo metabólico, é necessário construir uma equação de biomassa. Esta equação deve possuir todos os componentes celulares como RNA, DNA, proteínas, aminoácidos, nucleotídeos, vitaminas, cofatores, lipídeos e íons. Esta equação funciona como o objetivo do modelo e é utilizada para simular o crescimento e fenótipos, assim como a produção de compostos de interesse (Feist and Palsson., 2010; Xavier et al., 2017). A composição química do meio extracelular, é um dos fatores determinantes na predição de fenótipos e simulação de processos dinâmicos. Os meios de cultivo podem ser reconstruídos *in silico* utilizando a composição química dos meios utilizados *in vitro*, configurando as reações de *exchanges* simulando o meio extracelular (Marinos et al., 2020). Após reconstruir um modelo metabólico, este é convertido em uma matriz (matemática) estequiométrica que descreve as relações estequiométricas entre os metabólitos e as reações metabólicas de um organismo (Feist et al., 2008). A matriz estequiométrica é a base para FBA em GEMs. Ela permite a aplicação de abordagens matemáticas, como a otimização linear, para calcular as taxas de fluxo metabólico através de reações, levando em consideração as restrições impostas pelos coeficientes estequiométricos e outras informações associadas às reações (Klamt and Kamp., 2022).

O FBA é uma técnica utilizada para resolver o problema de otimização linear em GEMs (Figura 7). O objetivo do FBA é encontrar as taxas de fluxo metabólico através das reações que maximizem ou minimizem uma função objetivo, sujeita a restrições estequiométricas (Orth et al., 2010). Matematicamente, o problema da otimização do FBA pode ser formulado da seguinte maneira:

$$\mathbf{Z} = \mathbf{c}^T \cdot \mathbf{v}$$

“**Z**”, é o valor da função objetivo que pode ser a equação de biomassa, ou alguma outra reação como a produção de um metabólito de interesse, por exemplo. “**c**” é um vetor de coeficientes que define a função objetivo, “**v**” é um vetor de taxas de fluxo metabólico através das reações. As restrições estequiométricas são definidas pela matriz estequiométrica **S** e pelos vetores de limites inferiores (**lb**) e limites superiores (**ub**). A matriz estequiométrica descreve as relações estequiométricas entre os metabólitos e as reações metabólicas, enquanto os vetores lb e ub definem os limites mínimos e máximos para as taxas de fluxo através das reações. As restrições estequiométricas são definidas como:

$$\mathbf{S} \cdot \mathbf{v} = \mathbf{0}$$

$$\mathbf{lb} \leq \mathbf{v} \leq \mathbf{ub}$$

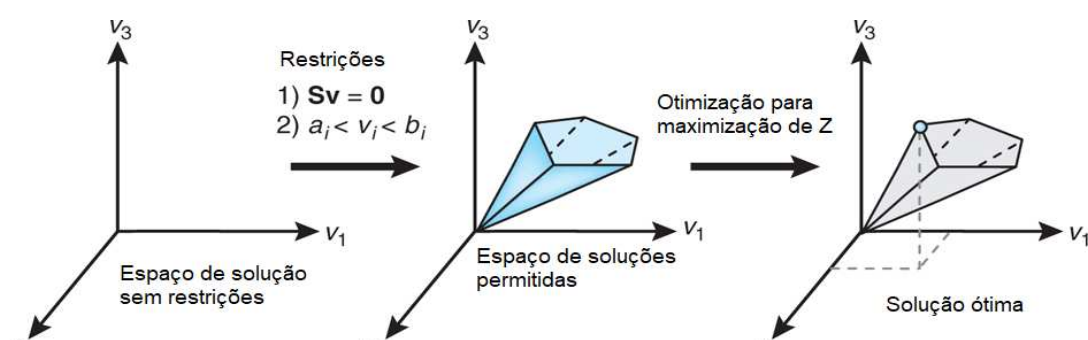


Figura 7 - Esquema solução FBA. (Orth et al., 2010).

No FBA, o modelo metabólico é baseado na premissa de que a rede metabólica está em um estado estacionário (steady-state), onde as taxas de produção e consumo de metabólitos estão equilibradas e as concentrações totais dos metabólitos não variam com tempo. O steady-state é uma suposição importante

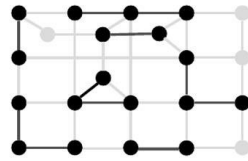
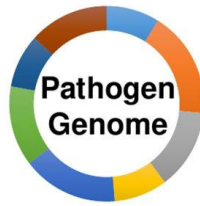
porque simplifica a modelagem matemática do metabolismo. Ao considerar um sistema em steady-state, podemos formular as equações de balanço de massa, expressas pela matriz estequiométrica, como um conjunto de equações lineares. Uma vez que o steady-state é alcançado, as taxas de fluxo metabólico não mudam ao longo do tempo. Isso permite que o FBA seja usado para prever o comportamento do sistema metabólico em diferentes condições e estudar como as alterações nas condições ambientais ou genéticas afetam o fluxo metabólico e as características do sistema (Ingalls., 2013; Varma and Palsson., 1994).

2.5.2 Modelagem Metabólica de Patógenos Bacterianos

Com o aumento cada vez maior da resistência a antibióticos, infecções causadas por patógenos bacterianos têm se tornado cada vez mais uma ameaça na saúde pública global (OMS., 2017). Estudar os mecanismos da resistência a antibióticos se tornou um ponto chave no combate a estes patógenos multirresistentes (Jurado-Martín., 2021). GEMs de patógenos nos permite estudar os mecanismos de resistência, como também o metabolismo do patógenos, interação patógeno-hospedeiro, fatores de virulência, pesquisar novos biomarcadores abrindo novos caminhos para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (Figura 8) (Sertbas and Ulgen., 2020). A utilização de GEMs para estudo de metabolismo de patógenos tem sido cada vez mais explorados para estudo da biologia desses organismos. Como a utilização de uma abordagem baseada no estudo de genes essenciais utilizando o modelo metabólico de *Klebsiella pneumoniae* iYL1228, nas condições intracelular e fluido de sangue humano, mostrou o potencial do gene *kdsA* como um potencial alvo farmacológico de amplo espectro (Cesur et al., 2020). A utilização do modelo iEK1011 de *Mycobacterium tuberculosis* no estudo de mecanismos de resistência a antibióticos, demonstrou que a eficiência dos antibióticos etambutol e d-cicloserina são diminuídas pela presença do aminoácido L-alanina *in vivo* (Kavvas et al., 2018).

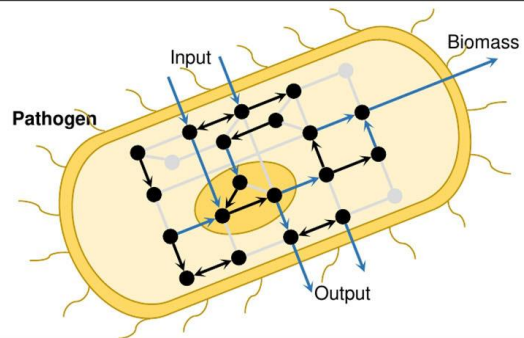
Draft Reconstruction

- Genome annotation
- Candidate metabolic function
- Draft reconstruction
- Experimental data



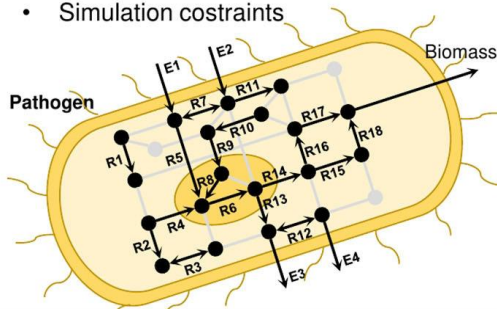
Manual Curation

- Reaction directionality
- Gene and reaction localization
- Subsystems information
- Exchange reactions
- Intracellular transport reactions
- Biomass reaction
- Demand and sink reactions



Conversion to Mathematical Model

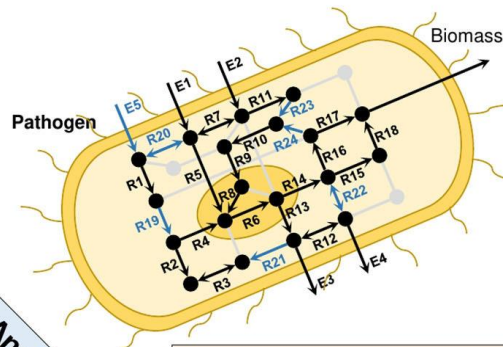
- Stoichiometric matrix
- Objective function
- Simulation constraints



$$\begin{matrix}
 & R1 & R2 & R3 & \dots & R16 & R17 & R18 & E1 & E2 & E3 & E4 & \text{Biomass} \\
 M1 & & & & & & & & & & & & & & V_{R1} \\
 M2 & & & & & & & & & & & & & & V_{R2} \\
 M3 & & & & & & & & & & & & & & V_{R3} \\
 & & & & & & & & & & & & & & \vdots \\
 & & & & & & & & & & & & & & V_{R16} \\
 & & & & & & & & & & & & & & V_{R17} \\
 & & & & & & & & & & & & & & V_{R18} \\
 & & & & & & & & & & & & & & V_{E1} \\
 & & & & & & & & & & & & & & V_{E2} \\
 & & & & & & & & & & & & & & V_{E3} \\
 & & & & & & & & & & & & & & V_{E4} \\
 Mm & & & & & & & & & & & & & & V_{\text{Biomass}}
 \end{matrix}
 \cdot \mathbf{S} = 0$$

Network Analysis

- Metabolic dead-ends
- Gap analysis
- Missing exchange reactions
- Single gene deletion phenotypes
- Growth testing



Analysis Approaches

FBA

FVA

Flux Sampling

Gene Essentiality

Drug Targeting

- Pathogen-specific GEMs applications**
- Pathogen metabolism
 - Pathogen-host interaction
 - Antibiotic resistance
 - Virulence factor
 - Biomarker research
 - New therapeutic strategies

Figura 8 - Processo de reconstrução de GEMs específicos de patógenos. (Sertbas and Ulgen., 2020)

JUSTIFICATIVA E MOTIVAÇÃO

Como mencionado, a brucelose é uma doença difundida mundialmente e que causa grande impacto econômico na pecuária e na saúde pública, em destaque a brucelose bovina. A brucelose bovina é uma doença ainda presente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento como o Brasil. Para o controle desta doença é necessário primeiramente, identificar com precisão os animais infectados e também é de extrema importância entender a biologia do patógeno, para auxiliar na busca de novas abordagens de controle eficientes e viáveis. A bactéria *B. abortus* causadora da brucelose bovina, nos seus hospedeiros possui um estilo de vida intracelular, no qual precisa se adaptar a condições de baixos nutrientes. E entender melhor o seu metabolismo, se torna um ponto chave para entender melhor as vias metabólicas utilizadas na sua adaptação, que possam ser utilizadas para explorar novos alvos antimicrobianos. O intuito deste trabalho é utilizar uma abordagem de imuno-informática para identificar epítomos com base nas proteínas anotadas no genoma de *B. abortus*, para o desenvolvimento de novos testes de diagnóstico específicos que possam auxiliar o controle da brucelose. Além disso, objetivou-se a construção de um modelo metabólico em escala-genômica de *B. abortus* que sirva como uma ferramenta para estudos *in silico* do metabolismo deste patógeno, assim como a exploração de novos alvos antimicrobianos.

OBJETIVO GERAL

Validar uma proteína quimérica desenvolvida por técnicas de imuno-informática para o diagnóstico de brucelose bovina e construir um modelo metabólico em escala-genômica de *B. abortus* para estudo *in silico* do metabolismo visando genes essenciais que possam ser explorados como possíveis novos alvos antimicrobianos para o tratamento de brucelose.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilizar uma abordagem de imuno-informática para identificar epítopos para construção de uma proteína quimérica para ser utilizada no diagnóstico de brucelose.
- Clonar, expressar, purificar e avaliar o potencial diagnóstico de uma proteína quimérica desenvolvida por meio de imuno-informática para a identificação de animais positivos para brucelose.
- Construção e curadoria de um modelo metabólico em escala-genômica de *B. abortus*.
- Modelagem das condições *in vitro* e *in vivo* para validação e validação do modelo.
- Utilização do modelo metabólico de *B. abortus* na análise *in silico* novos alvos terapêuticos (Drug Targets) visando genes essenciais.

CAPÍTULO 1 - AVALIAÇÃO DE UMA PROTEÍNA QUIMÉRICA PARA O DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE BOVINA

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Seleção de Epítomos

Primeiramente, foi utilizado as sequências de proteínas baseadas no genoma de *B. abortus* (Genbank assembly accession: GCA_000054005.1) como input no BepiPred 1.0 web server (Jens et al., 2006) para a identificação de epítomos lineares, que possuísem um escore maior que 1.3 e epítomos cuja sequência fosse de até sete aminoácidos sequenciais. Com o intuito de selecionar epítomos específicos para *B. abortus* que não possuísem reações cruzadas com outros patógenos bovinos, foi realizado o alinhamento das sequências das proteínas utilizando o BLASTp conta os organismos *Trypanosoma vivax*, *Cryptosporidium parvum*, *Mycobacterium bovis*, *Leptospira spp*, *Anaplasma marginale*, *Toxoplasma gondii*.

3.2 Desenho da Proteína Quimérica e Gene Sintético

A construção da proteína foi realizada a partir dos melhores epítomos selecionados. Foi adicionado à sequência proteica, metionina inicial, entre cada epítomo, um linker formado por glicina e serina GSGSGS (Chichili et al., 2013) e cauda de histidina na porção C terminal para purificação. A sequência proteica foi usada para a construção do gene sintético, utilizando a ferramenta Codon Optimization da Integrated DNA Technologies (IDT) (<https://www.idtdna.com/CodonOpt>) para expressão em *Escherichia coli* BL21 e a síntese do gene e ligação em plasmídeo pET28a foi realizada pela empresa FastBio.

3.3 Clonagem, Expressão e Purificação

O plasmídeo pET28a contendo o gene sintético foi introduzido na bactéria por meio de transformação via choque térmico em cepas competentes de *E. coli* BL21 e plaqueadas em meio LB-ágar, contendo canamicina 50 mg/mL para seleção dos transformantes via resistência a antibiótico. Posteriormente, foram selecionadas

colônias para confirmação dos transformantes via PCR utilizando primer T7, específico para pET28a. Os fragmentos foram avaliados via eletroforese de gel de agarose 1%. Os clones positivos isolados e confirmados via PCR, foram cultivados em 5mL de meio LB adicionado de canamicina 50 mg/mL a 37°C, 180 rpm por um período de dezesseis horas. Após este período foi acrescido de 150 mL de meio LB e a densidade ótica (D.O) acompanhada até o valor de 0.6. Neste momento, adicionou-se IPTG 0,5 mM para indução da expressão da proteína quimérica por um período de 24 horas a 37°C 180 rpm. Após o tempo de indução, o meio de cultivo foi processado via centrifugação de 10000 rpm por 15 minutos para a separação do *pellet* do sobrenadante. O *pellet* ressuspendido em tampão fosfato (PBS) seguido de lise de membrana por equipamento de ultrassom para separação de fase solúvel e insolúvel. A confirmação da expressão foi feita por meio da técnica eletroforese de gel de poliacrilamida com SDS seguido da técnica de *Western blotting*, utilizando anticorpo anti-his para identificação da cauda de histidina presente na proteína recombinante. A purificação da proteína foi realizada por meio de cromatografia de afinidade utilizando como fase estacionária a coluna níquel HisTrap Crude FF segundo protocolo já estabelecido pelo laboratório.

3.4 Teste de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)

O ensaio foi realizado em placas de 96 poços sensibilizados com 2 µg da proteína quimérica por poço, a 20°C *overnight*. Posteriormente os poços foram lavados por quatro vezes utilizando PBS-T e feito o bloqueio da placa utilizando PBS-BSA 3% por uma hora a 37°C. Em seguida foi realizada uma nova lavagem da placa e foi utilizado soro de bovinos positivos para Brucelose como anticorpo primário, por um período de 1 hora. Após a incubação com o anticorpo primário, foi feita a lavagem novamente e adição de um anticorpo Anti-Bovine IgG novamente por 1 hora. Finalizando a incubação com anticorpo secundário, a placa foi novamente lavada para posterior revelação utilizando 100 µL de OPD por 30 minutos a 25°C. A reação foi interrompida utilizando 50 µL de H₂SO₄ 0,5 M e a leitura realizada a 450 nm em espectrofotômetro

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

As análises de imuno-informática e seleção dos epítomos foram realizadas anteriormente por membros do nosso grupo de pesquisa, mostrados na Tabela 1, proveniente de proteínas potencialmente antigênicas, de *B. abortus* selecionadas por meio de imuno-informática.

Proteína	Epítopo	Sequência	Número de aa
WP_002963772.1 - AMP nucleosidase	1	MASQGGPARGEPPQ	14
WP_002966098. 1- DNA oxidative demethylase AlkB	2	YSPADPETGKPWPS	15
WP_002967038.1 - acetyl-CoA carboxylase carboxyltransferase	3	PANSDAPAPQKPDADSKAA	19
WP_002969270.1 - GumC family protein	4	VSDSKKSRSTEDQASPTPPWTPPASPREE	28
WP_002971921.1 - DNA translocase FtsK	5	TAPSPKPGPRAQRE	14
WP_002971921.1 - DNA translocase FtsK	6	EDEDDEGGSGPAGTGNLEDSDDPYD	27
WP_002963456.1 - multidrug efflux RND transporter permease	7	PKKHEDETADTPETPGGTGGGI	22
WP_002966843.1 - 3-deoxy-8-	8	QQPGGQGGSTGG	13

phosphooculonat e synthase			
WP_002966843.1 - 3-deoxy-8- phosphooculonat e synthase	9	EDPDNAPSDGPN	12
WP_002964226.1 - DNA gyrase subunit A	10	MNGGPNGGPSGI	12

Tabela 1 Epítomos selecionados via BepiPred 1.0

4.1 Expressão e Purificação da Proteína Quimérica

A purificação da proteína quimérica expressa em *E. coli* foi avaliada através de SDS-PAGE. Na Figura 9, é possível identificar a banda purificada referente a proteína heteróloga purificada, comparada ao extrato proteico bacteriano total. Posteriormente, para validar a expressão e purificação da proteína quimérica, foi utilizado a técnica western blot Figura 10. Na Figura 10 C e D respectivamente, é possível identificar a detecção da proteína quimérica por meio da marcação com o anticorpo anti-his tanto no extrato quanto na porção purificada, extrato da bactéria não transformada foi utilizado com controle negativo em B. Após confirmação da expressão e validação da purificação da proteína quimérica, foram realizados testes de ELISA para validar a funcionalidade da proteína.

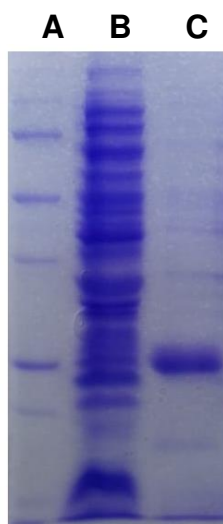


Figura 9 – Avaliação da purificação da proteína quimérica utilizando eletroforese de proteínas (SDS-PAGE) – A) Marcador de massa molecular, B) Extrato bruto da bactéria transformada com vetor contendo o gene codificador da proteína quimérica e C) Fração contendo a proteína quimérica purificada.

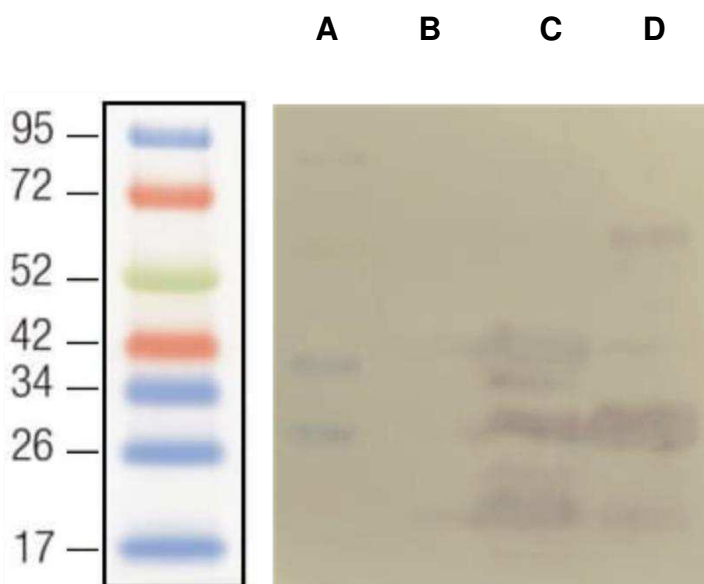


Figura 10 – Confirmação da expressão da proteína quimérica em *E. coli* utilizando Western Blot – A) Marcador de massa molecular, B) Extrato total da bactéria não transformada, C) Extrato total da Bactéria transformada com vetor de expressão contendo o gene codificador da proteína quimérica e D) Fração purificada contendo a proteína quimérica.

4.2 Análise de Sensibilidade e Especificidade da Proteína Quimérica no Diagnóstico de Animais Positivos para Brucelose Bovina.

Para avaliar o potencial diagnóstico da proteína quimérica em relação à brucelose bovina, conduziu-se um ensaio de ELISA utilizando soros provenientes de animais infectados (grupo positivo), não infectados (grupo controle negativo) e soros de animais contaminados com os patógenos *Leptospira spp*, *M. tuberculosis* e *T. vivax*, a fim de investigar possíveis reações cruzadas (conforme Figura 11). Conforme evidenciado nas Figuras 11 e 12, a proteína quimérica desenvolvida demonstrou uma acurácia de apenas 50%, com baixa tendência a reações cruzadas com outros patógenos. No entanto, os resultados obtidos devem ser considerados inconclusivos, devido a algumas limitações da abordagem adotada. Em primeiro lugar, o tamanho da amostra utilizado para as análises não foi suficientemente robusto para proporcionar resultados estatisticamente significativos. Além disso, não houve uma comparação com testes de referência estabelecidos para avaliar a sensibilidade e especificidade do ensaio de ELISA.

Os soros utilizados foram originários de um banco de soros de animais que estiveram tanto expostos à infecção quanto à vacinação com a vacina B19. Uma abordagem mais eficaz para avaliar o potencial diagnóstico da proteína quimérica neste estudo seria a utilização de soros mais cuidadosamente caracterizados, incluindo amostras verdadeiramente positivas e negativas, assim como amostras provenientes de animais de regiões endêmicas para a brucelose e áreas onde a doença é ausente. Isso permitiria uma quantidade adequada de amostras para garantir resultados estatisticamente significativos.

Além disso, seria de interesse comparar a antigenicidade dos epítomos utilizados na construção da proteína quimérica. Estudos anteriores demonstraram que a utilização de múltiplas proteínas de membrana externa (OMPs) com diferentes pesos moleculares pode ser uma abordagem mais eficiente para a detecção de anticorpos em animais. Além disso, a utilização de um fragmento recombinante de 10 kDa (r10-kDa-ELISA) da proteína B26 foi bem-sucedida em um teste de ELISA, demonstrando especificidade comparável aos testes AAT e SAL, sem reações cruzadas com a vacina B19.

Portanto, é fundamental considerar cuidadosamente os epítomos selecionados e as proteínas de origem na construção da proteína quimérica, dado que proteínas de superfície, como as OMPs, têm demonstrado eficácia no diagnóstico da brucelose. Consequentemente, é recomendável conduzir um novo

experimento de ELISA utilizando uma nova coleção de soros para uma caracterização mais precisa da especificidade e sensibilidade da proteína testada neste estudo. Além disso, uma possível reformulação da quimérica poderá aumentar seu potencial no diagnóstico da brucelose bovina.

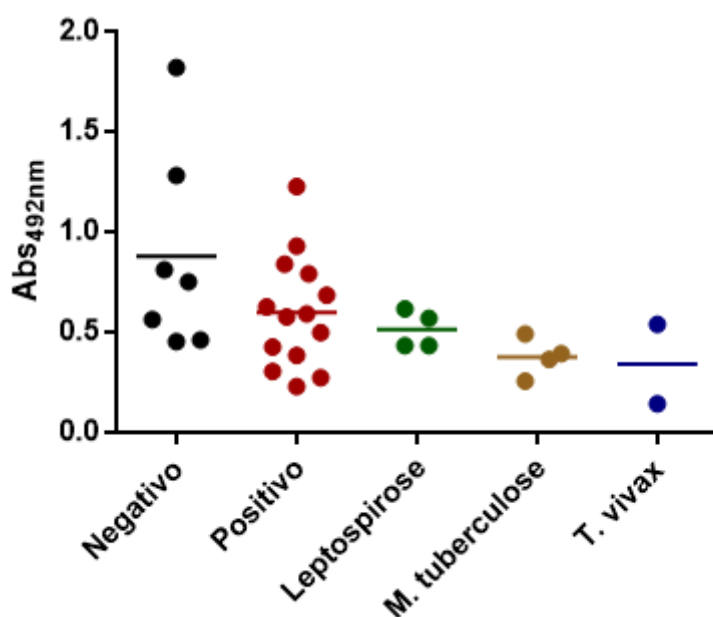


Figura 11 – Teste de ELISA

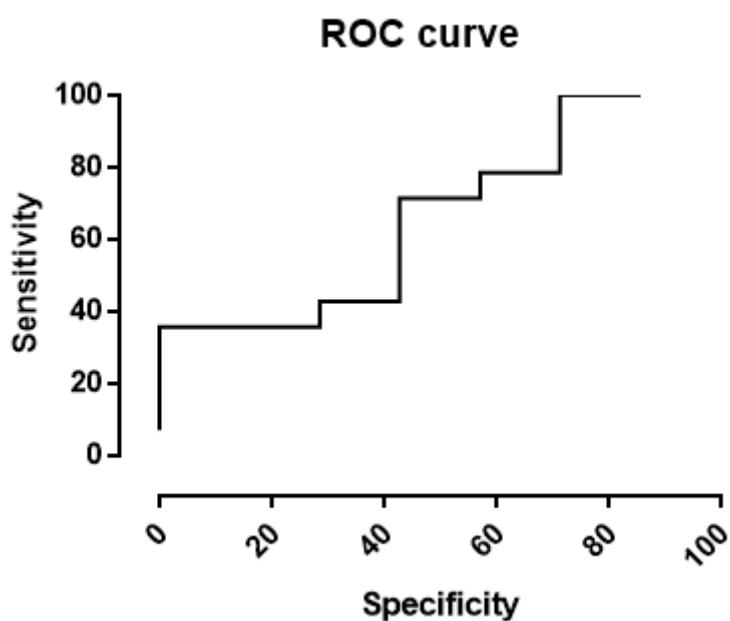


Figura 12 – Curva de Especificidade e Sensibilidade do Teste de ELISA

5. CONCLUSÕES

A proteína investigada neste estudo, embora tenha demonstrado capacidade para identificar de maneira positiva anticorpos contra *Brucella*, não permitiu a determinação estatisticamente robusta da sensibilidade e especificidade necessárias para sua aplicação como ferramenta de diagnóstico sorológico da brucelose. Consequentemente, há uma necessidade premente de realizar uma nova iteração do experimento, fazendo uso de um número substancialmente maior de amostras, as quais devem ser criteriosamente caracterizadas. Esse enfoque visa a obtenção de resultados estatisticamente significativos, que serão então comparados com testes já estabelecidos, tais como o teste de aglutinação rápida em tubo (AAT) e o ensaio de soroaglutinação lenta (SAL), a fim de proporcionar uma avaliação mais precisa da especificidade, sensibilidade e outros parâmetros, como a acurácia da proteína quimérica em questão.

REFERÊNCIAS

BATUT, J. ANDERSSON, S.G., O'CALLAGHAN, D. The evolution of chronic infection strategies in the alpha-proteobacteria. *Nature Reviews - Microbiology*, vol. 2, pag. 933-945, December, 2004. DOI:10.1038/nrmicro1044 .

CORBEL, M. J. Mc HENDRY, D. L. F. D. Urease activity of *Brucella* species. *Research in Veterinary Science*, Vol. 38, Issue 2, pag. 252-253, 1985. DOI: doi.org/10.1016/S0034-5288(18)31838-1.

Moreno E, Cloeckaert A, Moriyón I. *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet Microbiol*. 2002 Dec 20;90(1-4):209-27. doi: 10.1016/s0378-1135(02)00210-9. PMID: 12414145.

Araj, G. F. Update on laboratory diagnosis of human brucellosis. *International Journal of Antimicrobial Agents*. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2010.06.014

Głowacka, P., Żakowska, et. al. *Brucella – Virulence Factors, Pathogenesis and Treatment*. *Polish Journal of Microbiology*, vol.67, no.2, 2018, pp.151-161. <https://doi.org/10.21307/pjm-2018-029>

Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis*. 2006 Feb;6(2):91-9. doi: 10.1016/S1473-3099(06)70382-6. PMID: 16439329.

Zhang, Ning, et al. "Animal brucellosis control or eradication programs worldwide: a systematic review of experiences and lessons learned." *Preventive veterinary medicine* 160 (2018): 105-115.

Poester FP, Gonçalves VS, Lage AP. Brucellosis in Brazil. *Vet Microbiol*. 2002 Dec 20;90(1-4):55-62. doi: 10.1016/s0378-1135(02)00245-6. PMID: 12414134.

Abdisa T. 2018. Review on the reproductive health problem of dairy cattle. *Dairy and Vet Sci J*. 5(1):555655.

Lage, A. P.; Poester, F. P.; Paixão, T. A.; Silva, T. A.; Xavier, M. N.; Minharro, S.; Miranda, K. L.; Alves, C. M.; Mol, J. P. S.; Santos, R. L. Brucelose bovina: uma atualização. *Revista Brasileira de Reprodução animal*, Belo Horizonte, [online], v. 32, p. 202-212, 2008.

Acha N, Szyfers B. 2001. Zoonosis and communicable disease common to man and animals. Vol I. Bacteriosis and mycosis. 3rd ed. Washington (DC): Scientific and Technical Publication. No.580; p. 40–62.

Gwida M, Al Dahouk S, Melzer F, Rösler U, Neubauer H, Tomaso H. Brucellosis - regionally emerging zoonotic disease? *Croat Med J*. 2010 Aug;51(4):289-95. doi: 10.3325/cmj.2010.51.289. PMID: 20718081; PMCID: PMC2931433.

Gheibi A, Khanahmad H, Kashfi K, Sarmadi M, Khorramizadeh MR. Development of new generation of vaccines for *Brucella abortus*. *Heliyon*. 2018 Dec 26;4(12):e01079. doi: 10.1016/j.heliyon.2018.e01079. PMID: 30603712; PMCID: PMC6307385.

Khurana SK, Sehrawat A, Tiwari R, Prasad M, Gulati B, Shabbir MZ, Chhabra R, Karthik K, Patel SK, Pathak M, Iqbal Yatoo M, Gupta VK, Dhama K, Sah R, Chaicumpa W. Bovine brucellosis - a comprehensive review. *Vet Q*. 2021 Jan 1;41(1):61-88. doi: 10.1080/01652176.2020.1868616. PMID: 33353489; PMCID: PMC7833053.

Mukhtar F. Brucellosis in a high risk occupational group: seroprevalence and analysis of risk factors. *J Pak Med Assoc*. 2010 Dec;60(12):1031-4. PMID: 21381558.

Tuon FF, Gondolfo RB, Cerchiari N. Human-to-human transmission of *Brucella* - a systematic review. *Trop Med Int Health*. 2017 May;22(5):539-546. doi: 10.1111/tmi.12856. Epub 2017 Mar 9. PMID: 28196298.

Ulu-Kilic A, Metan G, Alp E. Clinical presentations and diagnosis of brucellosis. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*. 2013 Apr;8(1):34-41. PMID: 22873352.

Reguera JM, Alarcón A, Miralles F, Pachón J, Juárez C, Colmenero JD. *Brucella* endocarditis: clinical, diagnostic, and therapeutic approach. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2003 Nov;22(11):647-50. doi: 10.1007/s10096-003-1026-z. Epub 2003 Oct 18. PMID: 14566576.

Bodur H, Erbay A, Akinci E, Colpan A, Cevik MA, Balaban N. Neurobrucellosis in an endemic area of brucellosis. *Scand J Infect Dis*. 2003;35(2):94-7. doi: 10.1080/0036554021000027000. PMID: 12693557.

Young EJ. *Brucella* species. In: Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th edition. Edited by Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2010: 2: 2921-25.

Villate SCA, Casallas JCG. 2020. Update of antibiotic therapy of brucellosis. In: Ranjbar M, Nojomi M and Mascellino MT. (Eds.), New insight into *Brucella* infection and foodborne diseases, p. 1-5. IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.86324. United Kingdom.

Doğanay M, Aygen B. Use of ciprofloxacin in the treatment of brucellosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1992 Jan;11(1):74-5. doi: 10.1007/BF01971279. PMID: 1563389.

Radostits OM, Gay CC, Blood CD, Hinchcliff K. 2000. *Veterinary medicine: a text book of the disease of cattle, sheep, pigs and horses*. 9th ed. New York (NY): W. B. Saunders Company Ltd. p. 867–882.

Yagupsky P. Detection of *Brucellae* in blood cultures. *J Clin Microbiol*. 1999 Nov;37(11):3437-42. doi: 10.1128/JCM.37.11.3437-3442.1999. PMID: 10523530; PMCID: PMC85661.

Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. 1988. *Techniques for the brucellosis laboratory*. Paris (France): Institute National de la Recherche Agronomique, INRA

Meirelles-Bartoli, R. B., and L. A. Mathias. "Estudo comparativo entre os testes adotados pelo PNCEBT para o diagnóstico sorológico da brucelose em bovinos." *Arquivos do Instituto Biológico* 77 (2020): 11-17.

Lucero NE, Escobar GI, Ayala SM, Paulo PS, Nielsen K. Fluorescence polarization assay for diagnosis of human brucellosis. *J Med Microbiol*. 2003 Oct;52(Pt 10):883-887. doi: 10.1099/jmm.0.05217-0. PMID: 12972582.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT) - Manual Técnico, 03 de março de 2006.

Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal - PNCEBT. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e>

[vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pncebt/controle-e-erradicacao-da-brucelose-e-tuberculose-pncebt>](#).

Al-Shamahy HA, Wright SG. Enzyme-linked immunosorbent assay for brucella antigen detection in human sera. *J Med Microbiol*. 1998 Feb;47(2):169-72. doi: 10.1099/00222615-47-2-169. PMID: 9879960.

Gurbilek SE, Tel OY, Oktay K. 2017. Comparative evaluation of three serological tests for the detection of *Brucella* antibodies from infected cattle herds. *J Appl Anim Res*. 45(1):557–559

Wang X, Wang Y, Ma L, Zhang R, De Y, Yang X, Wang C, Wu Q. Development of an improved competitive ELISA based on a monoclonal antibody against lipopolysaccharide for the detection of bovine brucellosis. *BMC Vet Res*. 2015 May 21;11:118. doi: 10.1186/s12917-015-0436-3. PMID: 25993986; PMCID: PMC4438517.

Sajid, Muhammad, Abdel-Nasser Kawde, and Muhammad Daud. "Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review." *Journal of Saudi Chemical Society* 19.6 (2015): 689-705.

Irmak, Hasan, et al. "Use of the *Brucella* IgM and IgG flow assays in the serodiagnosis of human brucellosis in an area endemic for brucellosis." *The American journal of tropical medicine and hygiene* 70.6 (2004): 688-694.

Manasa M, Revathi P, Chand MP, Maroudam V, Navaneetha P, Raj GD, Kishor PBK, De B, Rathnagiri P. Protein-G-based lateral flow assay for rapid serodiagnosis of brucellosis in domesticated animals. *J Immunoassay Immunochem*. 2019;40(2):149-158. doi: 10.1080/15321819.2018.1541803. Epub 2018 Nov 26. PMID: 30477402.

Palmer DA, Douglas JT. Analysis of *Brucella* lipopolysaccharide with specific and cross-reacting monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol*. 1989 Oct;27(10):2331-7. doi: 10.1128/jcm.27.10.2331-2337.1989. PMID: 2479655; PMCID: PMC267019.

Liao M, Zhang S, Xuan X, Zhang G, Huang X, Igarashi I, Fujisaki K. Development of rapid immunochromatographic test with recombinant NcSAG1 for detection of antibodies to *Neospora caninum* in cattle. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005 Jul;12(7):885-7. doi: 10.1128/CDLI.12.7.885-887.2005. PMID: 16002641; PMCID: PMC1182214.

Moraveji M, Hosseini A, Moghaddar N, Namavari MM, Eskandari MH. Development of latex agglutination test with recombinant NcSAG1 for the rapid detection of antibodies to *Neospora caninum* in cattle. *Vet Parasitol.* 2012 Oct 26;189(2-4):211-7. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.04.010. Epub 2012 Apr 19. PMID: 22571832.

De Groot AS, Sbai H, Aubin CS, McMurry J, Martin W. Immuno-informatics: Mining genomes for vaccine components. *Immunol Cell Biol.* 2002 Jun;80(3):255-69. doi: 10.1046/j.1440-1711.2002.01092.x. PMID: 12067413.

Valente AP, Manzano-Rendeiro M. Mapping conformational epitopes by NMR spectroscopy. *Curr Opin Virol.* 2021 Aug;49:1-6. doi: 10.1016/j.coviro.2021.04.001. Epub 2021 May 11. PMID: 33989923.

Kar PP, Srivastava A. Immuno-informatics Analysis to Identify Novel Vaccine Candidates and Design of a Multi-Epitope Based Vaccine Candidate Against *Theileria* parasites. *Front Immunol.* 2018 Oct 15;9:2213. doi: 10.3389/fimmu.2018.02213. PMID: 30374343; PMCID: PMC6197074.

Pereira HS, E Almeida LT, Fernandes V, Senra RL, Fontes PP, Bittar ER, Ribon AOB, Rotta PP, Menezes-Souza D, Bittar JFF, Mendes TAO. Chimeric Protein Designed by Genome-Scale Immunoinformatics Enhances Serodiagnosis of Bovine Neosporosis. *J Clin Microbiol.* 2020 Jun 24;58(7):e01343-19. doi: 10.1128/JCM.01343-19. PMID: 32404479; PMCID: PMC7315025.

Yaghoubi P, Bandehpour M, Mohebbali M, Akhouni B, Kazemi B. Designing and Evaluation of a Recombinant Multi-epitope Protein by Using ELISA for Diagnosis of *Leishmania infantum* Infected in Dogs. *Iran J Parasitol.* 2021 Jul-Sep;16(3):377-385. doi: 10.18502/ijpa.v16i3.7090. PMID: 34630582; PMCID: PMC8476736.

Yin D, Bai Q, Wu X, Li H, Shao J, Sun M, Jiang H, Zhang J. Paper-based ELISA diagnosis technology for human brucellosis based on a multi-epitope fusion protein. *PLoS Negl Trop Dis.* 2021 Aug 17;15(8):e0009695. doi: 10.1371/journal.pntd.0009695. Erratum in: *PLoS Negl Trop Dis.* 2023 Jan 24;17(1):e0011079. PMID: 34403421; PMCID: PMC8396774.

Celli J. The Intracellular Life Cycle of *Brucella* spp. *Microbiol Spectr*. 2019 Mar;7(2):10.1128/microbiolspec.BAI-0006-2019. doi: 10.1128/microbiolspec.BAI-0006-2019. PMID: 30848234; PMCID: PMC6448592.

Carvalho TP, Silva LAD, Castanheira TLL, Souza TD, Paixão TAD, Lazaro-Anton L, Tsohis RM, Santos RL. Cell and Tissue Tropism of *Brucella* spp. *Infect Immun*. 2023 May 16;91(5):e0006223. doi: 10.1128/iai.00062-23. Epub 2023 Apr 27. PMID: 37129522; PMCID: PMC10187126.

Martirosyan A, Gorvel JP. *Brucella* evasion of adaptive immunity. *Future Microbiol*. 2013 Feb;8(2):147-54. doi: 10.2217/fmb.12.140. PMID: 23374122.

Shakir R. Brucellosis. *J Neurol Sci*. 2021 Jan 15;420:117280. doi: 10.1016/j.jns.2020.117280. Epub 2020 Dec 21. PMID: 33358192.

Adams LG. The pathology of brucellosis reflects the outcome of the battle between the host genome and the *Brucella* genome. *Vet Microbiol*. 2002 Dec 20;90(1-4):553-61. doi: 10.1016/s0378-1135(02)00235-3. PMID: 12414171.

Rossetti CA, Drake KL, Siddavatam P, Lawhon SD, Nunes JE, Gull T, Khare S, Everts RE, Lewin HA, Adams LG. Systems biology analysis of *Brucella* infected Peyer's patch reveals rapid invasion with modest transient perturbations of the host transcriptome. *PLoS One*. 2013 Dec 9;8(12):e81719. doi: 10.1371/journal.pone.0081719. PMID: 24349118; PMCID: PMC3857238.

Castañeda-Roldán EI, Avelino-Flores F, Dall'Agnol M, Freer E, Cedillo L, Dornand J, Girón JA. Adherence of *Brucella* to human epithelial cells and macrophages is mediated by sialic acid residues. *Cell Microbiol*. 2004 May;6(5):435-45. doi: 10.1111/j.1462-5822.2004.00372.x. PMID: 15056214.

Rossetti CA, Drake KL, Adams LG. Transcriptome analysis of HeLa cells response to *Brucella melitensis* infection: a molecular approach to understand the role of the mucosal epithelium in the onset of the *Brucella* pathogenesis. *Microbes Infect*. 2012 Aug;14(9):756-67. doi: 10.1016/j.micinf.2012.03.003. Epub 2012 Mar 21. PMID: 22484383; PMCID: PMC3389182.

Barquero-Calvo E, Chaves-Olarte E, Weiss DS, Guzmán-Verri C, Chacón-Díaz C, Rucavado A, Moriyón I, Moreno E. *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. *PLoS One*. 2007 Jul 18;2(7):e631. doi: 10.1371/journal.pone.0000631. PMID: 17637846; PMCID: PMC1910614.

Kohler S, Foulongne V, Ouahrani-Bettache S, Bourg G, Teyssier J, Ramuz M, Liautard JP. The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Nov 26;99(24):15711-6. doi: 10.1073/pnas.232454299. Epub 2002 Nov 18. PMID: 12438693; PMCID: PMC137781.

Pizarro-Cerdá J, Méresse S, Parton RG, van der Goot G, Sola-Landa A, Lopez-Goñi I, Moreno E, Gorvel JP. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect Immun*. 1998 Dec;66(12):5711-24. doi: 10.1128/IAI.66.12.5711-5724.1998. PMID: 9826346; PMCID: PMC108722.

Starr T, Ng TW, Wehrly TD, Knodler LA, Celli J. *Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic*. 2008 May;9(5):678-94. doi: 10.1111/j.1600-0854.2008.00718.x. Epub 2008 Feb 4. PMID: 18266913.

Roop RM 2nd, Barton IS, Hoppersberger D, Martin DW. Uncovering the Hidden Credentials of *Brucella* Virulence. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2021 Feb 10;85(1):e00021-19. doi: 10.1128/MMBR.00021-19. PMID: 33568459; PMCID: PMC8549849.

O'Callaghan D, Cazevieille C, Allardet-Servent A, Boschioli ML, Bourg G, Foulongne V, Frutos P, Kulakov Y, Ramuz M. A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Mol Microbiol*. 1999 Sep;33(6):1210-20. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01569.x. PMID: 10510235.

Xiong X, Li B, Zhou Z, Gu G, Li M, Liu J, Jiao H. The VirB System Plays a Crucial Role in *Brucella* Intracellular Infection. *Int J Mol Sci*. 2021 Dec 20;22(24):13637. doi: 10.3390/ijms222413637. PMID: 34948430; PMCID: PMC8707931.

Ke Y, Wang Y, Li W, Chen Z. Type IV secretion system of *Brucella* spp. and its effectors. *Front Cell Infect Microbiol*. 2015 Oct 13;5:72. doi: 10.3389/fcimb.2015.00072. PMID: 26528442; PMCID: PMC4602199.

Foulongne V, Bourg G, Cazevieille C, Michaux-Charachon S, O'Callaghan D. Identification of *Brucella* suis genes affecting intracellular survival in an in vitro human macrophage infection model by signature-tagged transposon mutagenesis. *Infect Immun*. 2000 Mar;68(3):1297-303. doi: 10.1128/IAI.68.3.1297-1303.2000. PMID: 10678941; PMCID: PMC97282.

Hong PC, Tsolis RM, Ficht TA. Identification of genes required for chronic persistence of *Brucella abortus* in mice. *Infect Immun*. 2000 Jul;68(7):4102-7. doi: 10.1128/IAI.68.7.4102-4107.2000. PMID: 10858227; PMCID: PMC101704.

Delrue RM, Martinez-Lorenzo M, Lestrade P, Danese I, Bielarz V, Mertens P, De Bolle X, Tibor A, Gorvel JP, Letesson JJ. Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cell Microbiol*. 2001 Jul;3(7):487-97. doi: 10.1046/j.1462-5822.2001.00131.x. PMID: 11437834.

Comerci DJ, Martínez-Lorenzo MJ, Sieira R, Gorvel JP, Ugalde RA. Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. *Cell Microbiol*. 2001 Mar;3(3):159-68. doi: 10.1046/j.1462-5822.2001.00102.x. PMID: 11260139.

López-Goñi I, Guzmán-Verri C, Manterola L, Sola-Landa A, Moriyón I, Moreno E. Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system BvrR/BvrS. *Vet Microbiol*. 2002 Dec 20;90(1-4):329-39. doi: 10.1016/s0378-1135(02)00218-3. PMID: 12414153.

Sola-Landa A, Pizarro-Cerdá J, Grilló MJ, Moreno E, Moriyón I, Blasco JM, Gorvel JP, López-Goñi I. A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Mol Microbiol*. 1998 Jul;29(1):125-38. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00913.x. PMID: 9701808.

Guzman-Verri C, Manterola L, Sola-Landa A, Parra A, Cloeckert A, Garin J, Gorvel JP, Moriyon I, Moreno E, Lopez-Goni I. The two-component system BvrR/BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the Rhizobiaceae. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Sep

17;99(19):12375-80. doi: 10.1073/pnas.192439399. Epub 2002 Sep 6. PMID: 12218183; PMCID: PMC129452.

Li R, Liu W, Yin X, Zheng F, Wang Z, Wu X, Zhang X, Du Q, Huang Y, Tong D. *Brucella* spp. Omp25 Promotes Proteasome-Mediated cGAS Degradation to Attenuate IFN- β Production. *Front Microbiol.* 2021 Jul 29;12:702881. doi: 10.3389/fmicb.2021.702881. PMID: 34394047; PMCID: PMC8358459.

Manterola L, Guzmán-Verri C, Chaves-Olarte E, Barquero-Calvo E, de Miguel MJ, Moriyón I, Grilló MJ, López-Goñi I, Moreno E. BvrR/BvrS-controlled outer membrane proteins Omp3a and Omp3b are not essential for *Brucella abortus* virulence. *Infect Immun.* 2007 Oct;75(10):4867-74. doi: 10.1128/IAI.00439-07. Epub 2007 Jul 30. PMID: 17664262; PMCID: PMC2044513.

Moreno E, Berman DT, Boettcher LA. Biological activities of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Infect Immun.* 1981 Jan;31(1):362-70. doi: 10.1128/iai.31.1.362-370.1981. PMID: 6783538; PMCID: PMC351792.

Caroff M, Bundle DR, Perry MB, Cherwonogrodzky JW, Duncan JR. Antigenic S-type lipopolysaccharide of *Brucella abortus* 1119-3. *Infect Immun.* 1984 Nov;46(2):384-8. doi: 10.1128/iai.46.2.384-388.1984. PMID: 6437981; PMCID: PMC261543.

Cardoso PG, Macedo GC, Azevedo V, Oliveira SC. *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microb Cell Fact.* 2006 Mar 23;5:13. doi: 10.1186/1475-2859-5-13. PMID: 16556309; PMCID: PMC1435926.

Ferguson GP, Datta A, Baumgartner J, Roop RM 2nd, Carlson RW, Walker GC. Similarity to peroxisomal-membrane protein family reveals that *Sinorhizobium* and *Brucella* BacA affect lipid-A fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Apr 6;101(14):5012-7. doi: 10.1073/pnas.0307137101. Epub 2004 Mar 24. PMID: 15044696; PMCID: PMC387365.

Lapaque N, Takeuchi O, Corrales F, Akira S, Moriyon I, Howard JC, Gorvel JP. Differential inductions of TNF- α and IGTP, IIGP by structurally diverse classic and non-classic lipopolysaccharides. *Cell Microbiol.* 2006 Mar;8(3):401-13. doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00629.x. PMID: 16469053

Conde-Álvarez R, Arce-Gorvel V, Iriarte M, Manček-Keber M, Barquero-Calvo E, Palacios-Chaves L, Chacón-Díaz C, Chaves-Olarte E, Martirosyan A, von Bargen K, Grilló MJ, Jerala R, Brandenburg K, Llobet E, Bengoechea JA, Moreno E, Moriyón I, Gorvel JP. The lipopolysaccharide core of *Brucella abortus* acts as a shield against innate immunity recognition. *PLoS Pathog.* 2012;8(5):e1002675. doi: 10.1371/journal.ppat.1002675. Epub 2012 May 10. PMID: 22589715; PMCID: PMC3349745.

Lapaque N, Moriyon I, Moreno E, Gorvel JP. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr Opin Microbiol.* 2005 Feb;8(1):60-6. doi: 10.1016/j.mib.2004.12.003. PMID: 15694858.

Porte F, Naroeni A, Ouahrani-Bettache S, Liautard JP. Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. *Infect Immun.* 2003 Mar;71(3):1481-90. doi: 10.1128/IAI.71.3.1481-1490.2003. PMID: 12595466; PMCID: PMC148865.

Tumurkhuu G, Koide N, Takahashi K, Hassan F, Islam S, Ito H, Mori I, Yoshida T, Yokochi T. Characterization of biological activities of *Brucella melitensis* lipopolysaccharide. *Microbiol Immunol.* 2006;50(6):421-7. doi: 10.1111/j.1348-0421.2006.tb03810.x. PMID: 16785713.

de Iannino NI, Briones G, Iannino F, Ugalde RA. Osmotic regulation of cyclic 1,2-beta-glucan synthesis. *Microbiology (Reading).* 2000 Jul;146 (Pt 7):1735-1742. doi: 10.1099/00221287-146-7-1735. PMID: 10878137.

Iñón de Iannino N, Briones G, Tolmasky M, Ugalde RA. Molecular cloning and characterization of *cgs*, the *Brucella abortus* cyclic beta(1-2) glucan synthetase gene: genetic complementation of *Rhizobium meliloti* *ndvB* and *Agrobacterium tumefaciens* *chvB* mutants. *J Bacteriol.* 1998 Sep;180(17):4392-400. doi: 10.1128/JB.180.17.4392-4400.1998. PMID: 9721274; PMCID: PMC107446.

Arellano-Reynoso B, Lapaque N, Salcedo S, Briones G, Ciocchini AE, Ugalde R, Moreno E, Moriyón I, Gorvel JP. Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nat Immunol.* 2005 Jun;6(6):618-25. doi: 10.1038/ni1202. Epub 2005 May 8. PMID: 15880113.

Degos C, Gagnaire A, Banchereau R, Moriyón I, Gorvel JP. Brucella C β G induces a dual pro- and anti-inflammatory response leading to a transient neutrophil recruitment. *Virulence*. 2015;6(1):19-28. doi: 10.4161/21505594.2014.979692. PMID: 25654761; PMCID: PMC4603436.

Guidolin LS, Morrone Seijo SM, Guaimas FF, Comerci DJ, Ciocchini AE. Interaction network and localization of Brucella abortus membrane proteins involved in the synthesis, transport, and succinylation of cyclic β -1,2-glucans. *J Bacteriol*. 2015 May;197(9):1640-8. doi: 10.1128/JB.00068-15. Epub 2015 Mar 2. PMID: 25733613; PMCID: PMC4403662.

Jiménez de Bagüés MP, Loisel-Meyer S, Liautard JP, Jubier-Maurin V. Different roles of the two high-oxygen-affinity terminal oxidases of Brucella suis: Cytochrome c oxidase, but not ubiquinol oxidase, is required for persistence in mice. *Infect Immun*. 2007 Jan;75(1):531-5. doi: 10.1128/IAI.01185-06. Epub 2006 Nov 13. PMID: 17101669; PMCID: PMC1828397.

Haine V, Dozot M, Dornand J, Letesson JJ, De Bolle X. NnrA is required for full virulence and regulates several Brucella melitensis denitrification genes. *J Bacteriol*. 2006 Feb;188(4):1615-9. doi: 10.1128/JB.188.4.1615-1619.2006. PMID: 16452445; PMCID: PMC1367225.

Kim DH, Lim JJ, Lee JJ, Kim DG, Lee HJ, Min W, Kim KD, Chang HH, Rhee MH, Watarai M, Kim S. Identification of genes contributing to the intracellular replication of Brucella abortus within HeLa and RAW 264.7 cells. *Vet Microbiol*. 2012 Aug 17;158(3-4):322-8. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.02.019. Epub 2012 Feb 20. PMID: 22397928.

MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:323-50. doi: 10.1146/annurev.immunol.15.1.323. PMID: 9143691.

Wang M, Qureshi N, Soeurt N, Splitter G. High levels of nitric oxide production decrease early but increase late survival of Brucella abortus in macrophages. *Microb Pathog*. 2001 Nov;31(5):221-30. doi: 10.1006/mpat.2001.0463. PMID: 11710842.

Zúñiga-Ripa A, Barbier T, Conde-Álvarez R, Martínez-Gómez E, Palacios-Chaves L, Gil-Ramírez Y, Grilló MJ, Letesson JJ, Iriarte M, Moriyón I. Brucella abortus depends on pyruvate phosphate dikinase and malic enzyme but not on Fbp and GlpX fructose-1,6-bisphosphatases for full virulence in laboratory models. *J Bacteriol*. 2014 Aug

15;196(16):3045-57. doi: 10.1128/JB.01663-14. Epub 2014 Jun 16. PMID: 24936050; PMCID: PMC4135635.

Czyż DM, Willett JW, Crosson S. *Brucella abortus* Induces a Warburg Shift in Host Metabolism That Is Linked to Enhanced Intracellular Survival of the Pathogen. *J Bacteriol.* 2017 Jul 11;199(15):e00227-17. doi: 10.1128/JB.00227-17. PMID: 28559292; PMCID: PMC5512224.

Eisenreich W, Rudel T, Heesemann J, Goebel W. To Eat and to Be Eaten: Mutual Metabolic Adaptations of Immune Cells and Intracellular Bacterial Pathogens upon Infection. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017 Jul 13;7:316. doi: 10.3389/fcimb.2017.00316. PMID: 28752080; PMCID: PMC5508010.

Eisenreich W, Dandekar T, Heesemann J, Goebel W. Carbon metabolism of intracellular bacterial pathogens and possible links to virulence. *Nat Rev Microbiol.* 2010 Jun;8(6):401-12. doi: 10.1038/nrmicro2351. Epub 2010 May 10. PMID: 20453875.

Vizcaíno N, Pérez-Etayo L, Conde-Álvarez R, Iriarte M, Moriyón I, Zúñiga-Ripa A. Disruption of pyruvate phosphate dikinase in *Brucella ovis* PA CO₂-dependent and independent strains generates attenuation in the mouse model. *Vet Res.* 2020 Aug 14;51(1):101. doi: 10.1186/s13567-020-00824-7. PMID: 32795361; PMCID: PMC7427901.

Machelart A, Willemart K, Zúñiga-Ripa A, Godard T, Plovier H, Wittmann C, Moriyón I, De Bolle X, Van Schaftingen E, Letesson JJ, Barbier T. Convergent evolution of zoonotic *Brucella* species toward the selective use of the pentose phosphate pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020 Oct 20;117(42):26374-26381. doi: 10.1073/pnas.2008939117. Epub 2020 Oct 5. PMID: 33020286; PMCID: PMC7584911.

Pitzer JE, Zeczycki TN, Baumgartner JE, Martin DW, Roop RM 2nd. The Manganese-Dependent Pyruvate Kinase PykM Is Required for Wild-Type Glucose Utilization by *Brucella abortus* 2308 and Its Virulence in C57BL/6 Mice. *J Bacteriol.* 2018 Nov 26;200(24):e00471-18. doi: 10.1128/JB.00471-18. PMID: 30275278; PMCID: PMC6256021.

Sperry JF, Robertson DC. Erythritol catabolism by *Brucella abortus*. *J Bacteriol.* 1975 Feb;121(2):619-30. doi: 10.1128/jb.121.2.619-630.1975. PMID: 163226; PMCID: PMC245974.

Keppie, J., et al. "The role of erythritol in the tissue localization of the brucellae." *British journal of experimental pathology* 46.1 (1965): 104.

ANDERSON JD, SMITH H. THE METABOLISM OF ERYTHRITOL BY BRUCELLA ABORTUS. *J Gen Microbiol.* 1965 Jan;38:109-24. doi: 10.1099/00221287-38-1-109. PMID: 14283026.

Meador VP, Deyoe BL. Intracellular localization of *Brucella abortus* in bovine placenta. *Vet Pathol.* 1989 Nov;26(6):513-5. doi: 10.1177/030098588902600609. PMID: 2513676.

Sperry, J. F., and D. C. Robertson. "Inhibition of growth by erythritol catabolism in *Brucella abortus*." *Journal of bacteriology* 124.1 (1975): 391-397.

Sperry JF, Robertson DC. Erythritol catabolism by *Brucella abortus*. *J Bacteriol.* 1975 Feb;121(2):619-30. doi: 10.1128/jb.121.2.619-630.1975. PMID: 163226; PMCID: PMC245974.

Sangari FJ, Agüero J, Garcı A-Lobo JM. The genes for erythritol catabolism are organized as an inducible operon in *Brucella abortus*. *Microbiology (Reading).* 2000 Feb;146 (Pt 2):487-495. doi: 10.1099/00221287-146-2-487. PMID: 10708387.

Barbier T, Collard F, Zúñiga-Ripa A, Moriyón I, Godard T, Becker J, Wittmann C, Van Schaftingen E, Letesson JJ. Erythritol feeds the pentose phosphate pathway via three new isomerases leading to D-erythrose-4-phosphate in *Brucella*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Dec 16;111(50):17815-20. doi: 10.1073/pnas.1414622111. Epub 2014 Dec 1. PMID: 25453104; PMCID: PMC4273404.

Wu Q, Pei J, Turse C, Ficht TA. Mariner mutagenesis of *Brucella melitensis* reveals genes with previously uncharacterized roles in virulence and survival. *BMC Microbiol.* 2006 Dec 18;6:102. doi: 10.1186/1471-2180-6-102. PMID: 17176467; PMCID: PMC1766931.

Ronneau S, Moussa S, Barbier T, Conde-Álvarez R, Zuniga-Ripa A, Moriyon I, Letesson JJ. *Brucella*, nitrogen and virulence. *Crit Rev Microbiol.* 2016 Aug;42(4):507-25. doi: 10.3109/1040841X.2014.962480. Epub 2014 Dec 4. PMID: 25471320.

Kerrinnes T, Winter MG, Young BM, Diaz-Ochoa VE, Winter SE, Tsolis RM. Utilization of Host Polyamines in Alternatively Activated Macrophages Promotes Chronic Infection by *Brucella abortus*. *Infect Immun*. 2018 Feb 20;86(3):e00458-17. doi: 10.1128/IAI.00458-17. PMID: 29203548; PMCID: PMC5820950.

Orth JD, Thiele I, Palsson BØ. What is flux balance analysis? *Nat Biotechnol*. 2010 Mar;28(3):245-8. doi: 10.1038/nbt.1614. PMID: 20212490; PMCID: PMC3108565.

Nielsen J. Systems Biology of Metabolism. *Annu Rev Biochem*. 2017 Jun 20;86:245-275. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-044757. Epub 2017 Mar 8. PMID: 28301739.

Likić VA, McConville MJ, Lithgow T, Bacic A. Systems biology: the next frontier for bioinformatics. *Adv Bioinformatics*. 2010;2010:268925. doi: 10.1155/2010/268925. Epub 2011 Feb 9. PMID: 21331364; PMCID: PMC3038413.

Kitano H. Systems biology: a brief overview. *Science*. 2002 Mar 1;295(5560):1662-4. doi: 10.1126/science.1069492. PMID: 11872829.

Sertbas M, Ulgen KO. Genome-Scale Metabolic Modeling for Unraveling Molecular Mechanisms of High Threat Pathogens. *Front Cell Dev Biol*. 2020 Nov 3;8:566702. doi: 10.3389/fcell.2020.566702. PMID: 33251208; PMCID: PMC7673413.

Machado D, Herrgård MJ, Rocha I. Stoichiometric Representation of Gene-Protein-Reaction Associations Leverages Constraint-Based Analysis from Reaction to Gene-Level Phenotype Prediction. *PLoS Comput Biol*. 2016 Oct 6;12(10):e1005140. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005140. PMID: 27711110; PMCID: PMC5053500.

Seaver SMD, Liu F, Zhang Q, Jeffryes J, Faria JP, Edirisinghe JN, Mundy M, Chia N, Noor E, Beber ME, Best AA, DeJongh M, Kimbrel JA, D'haeseleer P, McCorkle SR, Bolton JR, Pearson E, Canon S, Wood-Charlson EM, Cottingham RW, Arkin AP, Henry CS. The ModelSEED Biochemistry Database for the integration of metabolic annotations and the reconstruction, comparison and analysis of metabolic models for plants, fungi and microbes. *Nucleic Acids Res*. 2021 Jan 8;49(D1):D1555. doi: 10.1093/nar/gkaa1143. Erratum for: *Nucleic Acids Res*. 2021 Jan 8;49(D1):D575-D588. PMID: 33179751; PMCID: PMC7778962.

Fondi M, Liò P. Genome-scale metabolic network reconstruction. *Methods Mol Biol.* 2015;1231:233-56. doi: 10.1007/978-1-4939-1720-4_15. PMID: 25343869.

Bernstein DB, Sulheim S, Almaas E, Segrè D. Addressing uncertainty in genome-scale metabolic model reconstruction and analysis. *Genome Biol.* 2021 Feb 18;22(1):64. doi: 10.1186/s13059-021-02289-z. PMID: 33602294; PMCID: PMC7890832.

Thiele I, Palsson BØ. A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. *Nat Protoc.* 2010 Jan;5(1):93-121. doi: 10.1038/nprot.2009.203. Epub 2010 Jan 7. PMID: 20057383; PMCID: PMC3125167.

Mendoza SN, Olivier BG, Molenaar D, Teusink B. A systematic assessment of current genome-scale metabolic reconstruction tools. *Genome Biol.* 2019 Aug 7;20(1):158. doi: 10.1186/s13059-019-1769-1. PMID: 31391098; PMCID: PMC6685185.

Xavier JC, Patil KR, Rocha I. Integration of Biomass Formulations of Genome-Scale Metabolic Models with Experimental Data Reveals Universally Essential Cofactors in Prokaryotes. *Metab Eng.* 2017 Jan;39:200-208. doi: 10.1016/j.ymben.2016.12.002. Epub 2016 Dec 8. PMID: 27939572; PMCID: PMC5249239

Feist AM, Palsson BO. The biomass objective function. *Curr Opin Microbiol.* 2010 Jun;13(3):344-9. doi: 10.1016/j.mib.2010.03.003. Epub 2010 Apr 27. PMID: 20430689; PMCID: PMC2912156.

Marinos G, Kaleta C, Waschina S. Defining the nutritional input for genome-scale metabolic models: A roadmap. *PLoS One.* 2020 Aug 14;15(8):e0236890. doi: 10.1371/journal.pone.0236890. PMID: 32797084; PMCID: PMC7428157.

Klamt S, von Kamp A. Analyzing and Resolving Infeasibility in Flux Balance Analysis of Metabolic Networks. *Metabolites.* 2022 Jun 23;12(7):585. doi: 10.3390/metabo12070585. PMID: 35888712; PMCID: PMC9317134.

Feist AM, Herrgård MJ, Thiele I, Reed JL, Palsson BØ. Reconstruction of biochemical networks in microorganisms. *Nat Rev Microbiol.* 2009 Feb;7(2):129-43. doi: 10.1038/nrmicro1949. Epub 2008 Dec 31. PMID: 19116616; PMCID: PMC3119670.

VARMA, Amit; PALSSON, Bernhard O. Metabolic flux balancing: basic concepts, scientific and practical use. *Bio/technology*, v. 12, n. 10, p. 994-998, 1994.

INGALLS, Brian P. *Mathematical modeling in systems biology: an introduction*. MIT press, 2013.

World Health Organization (2017). *Prioritization of Pathogens to Guide Discovery, Research and Development of New Antibiotics for Drug Resistant Bacterial Infections, Including Tuberculosis*. Geneva.

Kavvas ES, Seif Y, Yurkovich JT, Norsigian C, Poudel S, Greenwald WW, Ghatak S, Pals-son BO, Monk JM. Updated and standardized genome-scale reconstruction of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, iEK1011, simulates flux states indicative of physiological conditions. *BMC Syst Biol*. 2018 Mar 2;12(1):25. doi: 10.1186/s12918-018-0557-y. PMID: 29499714; PMCID: PMC5834885.

Cesur MF, Siraj B, Uddin R, Durmuş S, Çakır T. Network-Based Metabolism-Centered Screening of Potential Drug Targets in *Klebsiella pneumoniae* at Genome Scale. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Jan 14;9:447. doi: 10.3389/fcimb.2019.00447. PMID: 31993376; PMCID: PMC6970976.

Jurado-Martín I, Sainz-Mejías M, McClean S. *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 18;22(6):3128. doi: 10.3390/ijms22063128. PMID: 33803907; PMCID: PMC8003266.

CAPÍTULO 2 – CONSTRUÇÃO E VALIDAÇÃO DO MODELO METABÓLICO EM ESCALA-GENÔMICA DE *Brucella abortus* E ANÁLISE *in silico* DE POTENCIAIS ALVOS TERAPÊUTICOS

Molecular Omics



Molecular
Omics

Brucella abortus Genome-Scale Metabolic Model as a Platform for Prospecting Putative Drug Targets

Journal:	Molecular Omics
Manuscript ID	MO-RES-10-2023-000218
Article Type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	22-Oct-2023
Complete List of Authors:	Pinto, Bruno; Universidade Federal de Viçosa, Bioquímica e Biologia Molecular de Oliveira, Vilaça; Universidade Federal de Viçosa, Bioquímica e Biologia Molecular Fernandes, Miqueias; Universidade Federal de Minas Gerais, Bioinformática Lima, Alex Jerônimo; Instituto Butantan Mendes, Tiago ; Federal University of Vicosa Centre of Biological and Health Sciences Department of Biochemistry and Molecular Biology
Note: The following files were submitted by the author for peer review, but cannot be converted to PDF. You must view these files (e.g. movies) online.	
iBP932.xml	

SCHOLARONE™
Manuscripts

ARTICLE

Received 00th January 20xx,
Accepted 00th January 20xx

DOI: 10.1039/x0xx00000x

Brucella abortus Genome-Scale Metabolic Model as a Platform for Prospecting Putative Drug Targets

Bruno Ribeiro Pinto, Filipe Vilaça Guimarães de Oliveira, Miquéias Fernandes, Alex Jerônimo Ranieri Lima, Tiago Antônio de Oliveira Mendes

The worldwide spread disease bovine brucellosis causes great economical losses in livestock production. The pathogen *Brucella abortus* infects preferentially bovines and it may affect humans, being a potential public health issue in countries where the disease had not been eradicated. The treatment of infected animals with antibiotics is hampered, due to the pathogen intracellular survival within macrophages. To comprehend the biology of the pathogen and its interactions with the host, Pathogen-specific Genome-Scale Metabolic Models offer valuable insights, facilitating the identification of new drug targets and biomarkers. These findings can be employed to devise novel strategies for controlling brucellosis. In this study, we constructed and validated the first Genome-Scale Metabolic Model of *B. abortus* 2308, termed iBP932, which consists of 932 genes, 1,140 reactions, and 999 metabolites. When simulated in a macrophage environment and in vitro 2YT rich media conditions, the iBP932 model exhibited accuracy rates of 76% and 79%, respectively. iBP932 was also capable of predicting new and known potential drug targets, including the products of genes *AdsA*, *FabZ*, *lpxA*, and *LpxC* as potential broad-spectrum drug targets, devoid of homology to human proteins.

Introduction

Brucella, a genus of Gram-negative bacteria, is classified within the α -proteobacterial class (Batut et al, 2004). It is characterized as an aerobic coccobacillus, non-encapsulated, non-motile, facultatively intracellular, and urease-positive (Corbel and Hendry, 1985). The *Brucella* genus shelters around nine species, each pathogenic to distinct hosts (Moreno and Moriyón, 2002). Certain species within the genus exhibit positive oxidase, catalase, and superoxide dismutase activity (Araj, 2010). The presence of virulence factors like an unusual lipopolysaccharide, a type IV secretion system, cyclic β -1-2-glucans (CBG), *Brucella* virulence factor A (BvfA), and the BvrR/BvrS system are characteristics of the *Brucella* genus (Glowacka et al, 2018).

Among the members of the *Brucella* spp., *Brucella abortus* stands out as the etiological agent of bovine brucellosis. This is a worldwide spread disease with a high economic impact on livestock production, causing abortion, infertility, and weight loss in cattle (Gul and Khan, 2007). *Brucella* spp. possess the

* Address here.

* Address here.

* Address here.

† Footnotes relating to the title and/or authors should appear here.

Electronic Supplementary Information (ESI) available: [details of any supplementary information available should be included here]. See DOI: 10.1039/x0xx00000x

ability to adapt to novel hosts and can readily transmit to humans through direct contact with infected animals, as well as through the consumption of contaminated milk and its byproducts, thereby warranting attention in terms of public health concerns. Effective management of this disease entails animal vaccination, accurate diagnosis of infected animals, and culling of confirmed positive cases (Khurana et al., 2018).

The metabolic activities of intracellular pathogens such as *B. abortus* play a pivotal role in their virulence and ability to survive within the challenging intracellular environment. Gaining insights into these metabolic processes occurring within the host can facilitate the exploration of pathogen biology and identification of potential drug targets for effective control of the infection (Best and Kwaik, 2019). In this context, Genome-Scale Metabolic Models (GSMM) serve as a valuable knowledge base for understanding the intricate metabolic pathways of the pathogen. These models can be analyzed *in silico* using diverse Systems Biology approaches, enabling comprehensive investigations of the pathogen's metabolism. One such approach is Flux Balance Analysis (FBA), which leverages the pathogen's GSMM to make predictions about phenotypes, gene essentiality, and growth under various conditions (Teusink et al., 2010).

Pathogen-specific GSMMs can be used to study the pathogen metabolism, pathogen-host interactions, antibiotic resistance, virulence factors metabolism, biomarker research, and analysis of putative essential genes, which can be explored as new drug targets to design new therapeutic strategies. Furthermore, these data can be integrated with omics data to produce context-specific models (Sertbas, and Ulgen, 2020). While the central carbon metabolism of *B. abortus* has been extensively investigated (Barbier et al., 2017), the molecular mechanisms underlying infection remain poorly understood, and currently, there is a lack of a GSMM for *B. abortus*. In this study, we constructed the first GSMM of *B. abortus* by utilizing the existing genomic information, as well as metabolic data sourced from public databases and literature. Experimental data on gene essentiality, as well as information regarding carbon and nitrogen sources, were employed for model validation. Furthermore, the model was utilized to identify potential drug targets that exhibit broad-spectrum efficacy and do not share homology with human proteins.

Results and discussion

Model Reconstruction

The resulting model reconstruction of the *B. abortus* 2308 was named iBP932, which consists of 1,140 reactions, 999 metabolites, 932 genes, and three cellular compartments: cytoplasm, extracellular, and the periplasm. The total of 932 genes included in the iBP932 represents 26.7 % of the genes present in the bacterial genome, which codes for enzymes and transporters of a total of 3,034 genes distributed in a genome size of 3.2 Mb. Among the reactions included in this model, 36 are non-gene associated. These reactions either occur

spontaneously or have been incorporated into the model to fulfill the requirement for the production of biomass components. A comprehensive overview of the model is displayed in Table 1.

The establishment of a precise biomass equation is a pivotal requirement in the process of reconstructing metabolic models. This equation bears a direct correlation with the accuracy of predicting gene essentiality, which holds great significance in the context of pathogen GSMMs. In this study, we opted for the adaptation of the biomass equation from the GSMM of *S. meliloti*, primarily due to the close phylogenetic relationship between this organism with *B. abortus*. Furthermore, in order to generate a biomass equation that is more specific to *Brucella*, adjustments were made to account for the lipid composition and other virulence factors such as LPS. This refined biomass equation, tailored to *Brucella*, holds the potential to serve as a template for the development of GSMMs for other *Brucella* species. Moreover, it also lays the foundation for further refinement and enhancement of the equation itself. The iBP932 *in silico* growth rate in the *Brucella* synthetic media was 0.058 h⁻¹ predicted using FBA and the biomass equation as objective function. Compared with experimental data, 0.052 h⁻¹, the model shows a very close value in the growth rate. These results validate the iBP932 *in silico* growth prediction. The construction of a functional GSMM for *B. abortus* was made possible through the integration of information derived from genomic annotation, scientific literature, and biological databases. Further investigations into the biochemistry and physiology of *B. abortus* have the potential to provide valuable insights that can be utilized to enhance and refine the model, advancing our understanding of this pathogen's metabolic capabilities.

Gene Essentiality Analysis

In the context of GSMMs for pathogens, the analysis of gene essentiality plays a critical role in model validation, as the predictions inferred from the model can contribute to the identification of feasible antimicrobial drug targets. In the dataset obtained from BioCyc (BioCyc ID: MIX2B4Q-7), based on a comprehensive Tn-seq study (Sternon et al., 2018) revealed that 476 single gene knockouts of *B. abortus* resulted in no growth in 2YT culture media. Among these studied genes, a total of 275 are present in the iBP932 model. To assess the accuracy of iBP932 in predicting gene essentiality, single *in silico* gene knockout simulations were performed in 2YT complex media, and the results are presented in Figure 1. A comparison between the gene essentiality predictions of iBP932 and experimental data showed a remarkable accuracy of 79%. This value falls within an acceptable range and surpasses the accuracy of other published pathogen GSMMs, such as *Acinetobacter baumannii* with 72% accuracy (Kim et al., 2009), *Streptococcus aralis* with 71-76% accuracy (Jensen et al., 2020), and *Mycobacterium tuberculosis* with 71% accuracy (Kavvas et al., 2018).

Among the instances of false positive results in gene essentiality analysis (genes that are experimentally essential and computationally not essential), a notable observation pertains to genes associated with the Tricarboxylic Acid (TCA)

cycle. When these genes are computationally deleted *in silico*, the TCA intermediates can still be produced through alternative reactions present in the model, particularly catabolic reactions involved in the degradation of amino acids. It is important to note that the computational model predicts a steady-state condition, wherein the majority of reactions governing growth prediction are biosynthesis reactions. In contrast, catabolic reactions primarily occur when the cell requires a breakdown of molecules for energy generation or nutrient utilization.

In the steady-state condition of a GSMM, the deactivation of any reaction triggers the network to reconfigure itself by adopting alternative pathways to achieve the optimal solution for the given objective function. This observation highlights the potential benefit of integrating transcriptomic data into context-specific modeling approaches, as it can provide valuable constraints to better align the model with experimental conditions. In the study conducted by Sternon et al. (2018), the gene essentiality of *B. abortus* was assessed specifically in macrophages. In order to evaluate the accuracy of gene essentiality predictions of the iBP932 model, we incorporated the MFG growth conditions into the model. The comparison between the model predictions and the experimental data yielded a commendable accuracy of 76%. This demonstrates the reliability and utility of the iBP932 model in predicting gene essentiality under the specific growth conditions encountered in macrophages.

The study by Sternon et al. underscores the requirement for the presence of complete biosynthetic pathways for histidine and pyrimidine in order to support growth. To examine the essentiality of these pathways under macrophage condition, we conducted simulations within the iBP932 model by systematically applying gene knockouts and deactivating individual reactions within the biosynthetic pathways for histidine and pyrimidines. The results revealed that the iBP932 model also relies on the presence of these intact pathways to sustain *in silico* growth (Figure 2). This finding further supports the critical role of these biosynthetic pathways in supporting the metabolic requirements of *B. abortus*.

Utilization of Carbon and Nitrogen Sources by iBP932: *in silico* and *in vitro* conditions

To assess the model's validity in simulating growth across diverse carbon and nitrogen sources, we employed the metabolic test devised by Al Dahouk et al. in 2010. This test leverages enzyme activities and the ability to metabolize various substrates as carbon and nitrogen sources to phenotypically differentiate *Brucella* spp. In our study, we evaluated a total of 27 metabolites that were experimentally confirmed to be utilized by *B. abortus*. Among these metabolites, 19 (of a total of 27) exhibited positive outcomes for biomass production when simulated using the iBP932 model, while 8 showed negative results. The metabolites yielding negative outcomes were D-glucose-L-cysteine, D-Talose, D-threitol, Gallic acid, L-cystine, L-carnosin, D-arabinose, and Guanidininosuccinic acid.

The identification of metabolites yielding negative results served as a starting point for refining the model. For instance,

the metabolite D-threitol, which demonstrated unfavorable outcomes, was investigated based on the research conducted by Huang et al. in 2015. Huang et al. elucidated the catabolic pathway of this polyol in *Mycobacterium smegmatis*, involving four enzymes: D-threitol dehydrogenase (DthD), D-erythrulose kinase (Derk), and D-erythrulose-4-phosphate isomerase (Delr1 or Der2) (Huang et al., 2015). To address this gap in the iBP932 model, a homology search was performed using BLASTp and InterproScan (Blum et al., 2020) to identify homologous enzymes within the *B. abortus* genome. The search focused on examining protein domains. Consequently, a gene encoding D-threitol dehydrogenase (BAB_RS23775) was identified in the *B. abortus* genome. For the D-erythrulose kinase, the transporter (BAB_RS23780) and two copies of genes encoding subunits of this enzyme (BAB_RS23755, BAB_RS23750, BAB_RS23770, and BAB_RS23765) were found. As for the D-erythrulose-4-phosphate isomerase, a single gene (BAB_RS28110) encoding this enzyme was identified in the *B. abortus* genome.

The metabolism of gallic acid has been extensively characterized in *Pseudomonas putida*, where enzymes encoded by the gal cluster play a pivotal role (Nogales et al., 2011). However, the metabolic pathway for gallic acid in *B. abortus* remains poorly understood. In the experiments conducted by Al Dahouk et al., all *Brucella* species exhibited significant metabolic activity towards gallic acid. To elucidate the metabolic pathway in *B. abortus*, a homology-based gene search was performed within the *B. abortus* genome targeting the gal cluster. As a result, two genes encoding the enzyme protocatechuate 3,4 dioxygenase were identified, which have been described in MetaCyc as part of the gallic acid biodegradation pathway II (BioCyc ID: GALLATE-DEGRADATION-I-PWY). These enzymes catalyze the initial step of gallic acid metabolism, as previously described by Sparnis and Dagley (Sparnis and Dagley, 1975). Additionally, two putative genes were found: one for galT, encoding a transporter for gallic acid, and another for galB, encoding the enzyme 4-oxalomesaconate hydratase. These findings enabled the careful incorporation of the transport and metabolic reactions of gallic acid into the model.

In the case of L-carnosine, a potential beta-ala his peptidase (BAB_RS16495) responsible for the conversion of L-carnosine into β -alanine and L-histidine was identified in the *B. abortus* genome. This enzyme was successfully included in the model to account for L-carnosine metabolism. Regarding the other metabolites that exhibited negative results for *in silico* growth, no information regarding their metabolism was discovered within the *B. abortus* genome. Despite extensive searches, no relevant genes or pathways associated with these metabolites were found.

After this meticulous curation process, it was observed that 22 out of the 27 (81%) simulated metabolites (Figure 3) allowed for the prediction of biomass production. The utilization of various carbon and nitrogen sources appears to be vital for the survival of microorganisms during the infection process, thereby contributing to a better understanding of the pathological mechanisms involved. The iBP932 model exhibits the ability to predict growth under different conditions, considering diverse

sources of carbon and nitrogen utilization. The identification of negative results serves as a crucial reference point for further refinement of the model.

Essential gene analysis and drug targets selections of human blood fluid and macrophage conditions

The investigation of potential drug targets for two distinct conditions, human blood fluid (HBF) and MFG, resulted in the identification of 183 and 245 non-human homologous essential genes, respectively, within the iBP932 model (Supplementary material file 2). Notably, two distinct metabolic profiles emerged from this analysis. The MFG condition displayed a greater reliance on biosynthetic pathways involved in arginine, cysteine, histidine, aromatic, and branched amino acids, compared to the HBF condition. In particular, the HBF condition exhibited four essential genes associated with reactions in the biosynthetic pathway of aromatic amino acids, which are also vital in the MFG condition. These genes play a pivotal role in chorismate synthesis, highlighting the significance of chorismate within the iBP932 network. Chorismate is a critical metabolite required for the biosynthesis of aromatic amino acids, siderophores, and ubiquinone, underscoring its indispensability in various cellular processes.

Several crucial metabolic pathways were found to be common to both HBF and MFG conditions (Figure 4). Notably, one such shared pathway is the biosynthesis of lipopolysaccharides (LPS), which holds significance in *Brucella* infection. LPS plays a pivotal role in the interaction between *Brucella* and the host, enabling the evasion of immune defense mechanisms and facilitating intracellular internalization (Cardoso et al., 2006). Given the criticality of LPS in *Brucella* infection, enzymes involved in LPS biosynthesis represent promising candidates for drug target exploration. Targeting these enzymes could impede *Brucella*'s ability to evade host defenses, thereby thwarting the establishment of infection.

Vitamins play a critical role in maintaining metabolic processes, and adenosylcobalamin (B12) is particularly noteworthy. This vitamin binds to a diverse range of ligands, including proteins and nucleic acids, and is crucial for catalytic activities in B12-dependent enzymes (Gruber et al., 2011). The simulation involving the deletion of both *RibH1* and *RibH2* genes in the iBP932 model identified them as essential components. A previous investigation demonstrated that the double knockout of *RibH1* and *RibH2* genes, which encode two isoenzymes of lumazine synthase involved in riboflavin biosynthesis, resulted in *B. abortus* mutants incapable of surviving within cells and mice. These findings unveil the potential of targeting *RibH1* and *RibH2* genes for the treatment of brucellosis (Bonomi et al., 2010; Serer et al., 2014). Moreover, the enzyme riboflavin synthase, which catalyzes the final step of riboflavin biosynthesis, emerges as an additional promising drug target candidate. These studies underscore the vital role of vitamins, such as riboflavin, in the survival of *Brucella* and highlight their potential significance as targets for therapeutic interventions.

Potential Drug Targets Identification

The non-homologous essential proteins were subjected to further analysis based on druggability, virulence factors, and broad-spectrum characteristics. Initially, druggability was assessed to identify proteins with similarities to known drug targets. For the two analyzed conditions, a total of 69 potential drug targets were identified for MFG and 47 for HBF (Table 2), with MFG encompassing all the targets identified in HBF. These targets shared common metabolic pathways involved in amino acid and vitamin metabolism, as well as peptidoglycan biosynthesis. Notably, 17 targets exhibited affinity with at least five drug-like molecules. Among the identified targets, four significant matches were found to interact with approved antimicrobials. Dihydropteroate synthase demonstrated an affinity for ten approved sulfonamides, while cycloserine, tigecycline, and clindamycin interacted with three respective putative drug targets: D-alanine-D-alanine ligase, 30S ribosomal protein S13, and 50S ribosomal protein L1 (Supplementary Material File S3). Subsequently, the selection of druggable targets was followed by the prediction of virulence targets using the complete dataset from VFDB. Only six targets met the criteria, including the genes *dhdB* (isochorismatase), *lpxA* (UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase), *lpxC* (UDP-3-O-acyl-N-acetylglucosamine deacetylase), *kdsB* (3-deoxy-manno-octulosonate cytidyltransferase), *kdsA* (2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase), and *FabZ* (3-hydroxyacyl-ACP dehydratase). These identified factors participate in various pathways, such as aromatic amino acid biosynthesis, LPS and core glucan biosynthesis, nucleotide-sugar biosynthesis, and saturated fatty acid biosynthesis. Of particular interest, the *dhdB* gene codes for the enzyme isochorismatase in the iBP932 model, which catalyzes the conversion of isochorismate to 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate and pyruvate. Proteome analysis has indicated isochorismatase as a putative drug target candidate for *Brucella melitensis* (Rahman et al., 2021).

The virulence of *Brucella* relies on its ability to proliferate within phagocytic host cells while evading the host's killing mechanisms. In *B. suis*, the LPS-O chain has been implicated in inhibiting early fusion between lysosomes and *B. suis* phagosomes within macrophages, thereby facilitating its intracellular survival (Cerdá et al., 1998; Porte et al., 2003). Through drug target prediction analysis, the virulence factors identified, namely *lpxA*, *lpxC*, *kdsB*, and *kdsA*, are involved in different stages of lipid A biosynthesis, a crucial component of the LPS structure. The *kdsA* gene has previously been recognized as a potential drug target in studies focused on *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Serratia marcescens*, all of which are opportunistic pathogens (Perumal et al., 2010; Gupta et al., 2016; Cesur et al., 2020). The *lpxC* gene has also been explored as a drug target for *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* (Mdluli et al., 2006; Ahmad et al., 2016), while inhibition of the *lpxA* gene product has been investigated through the development of inhibitor peptides (Jenkins and Dotson, 2012; Dangkulwanich et al., 2019). The enzyme 3-hydroxyacyl-ACP dehydratase *FabZ* was also identified as a virulence factor. Its structure, inhibitors, and inhibition mechanism have been characterized to validate its potential as a target for antimicrobial development against pathogenic

Journal Name

ARTICLE

bacteria (Liu et al., 2005; Zhang et al., 2008; Kumar et al., 2018). In the reconstruction of the iBP932 model, the biosynthesis pathways of lipid A and saturated fatty acids were identified as potential virulence-associated pathways, suggesting the genes *lpxA*, *lpxC*, *kdsB*, *kdsA*, and *FabZ* as potential drug targets. Currently, there is limited data exploring these targets specifically for *B. abortus*. However, a Tn-seq experiment demonstrated that five of these genes were experimentally validated as essential genes (Steron et al., 2020).

The prediction of essential genes and analysis of non-human homologs for both HBF and MFG conditions have revealed important genes involved in vitamin biosynthesis. These genes present potential as drug targets and warrant further investigation into their impact on *B. abortus* metabolism and virulence. The final step in prioritizing drug targets involved a broad-spectrum analysis using the PIBT web browser for the identified 69 druggable proteins. Among them, a total of 59 proteins were identified as having broad-spectrum potential, with 35 of them being associated with 100 or more pathogenic bacteria. Notably, the targets *lpxC*, *kdsB*, *kdsA*, and *FabZ* met all the criteria tested and are considered the most promising broad-spectrum drug target candidates.

Experimental

Reconstruction of the metabolic network

To initiate the draft reconstruction of the GSMM of *B. abortus*, a homology reconstruction process was carried out employing the RAVEN Toolbox version 2.0 (Wang et al., 2018), as illustrated in Figure 5. Initially, protein sequences extracted from the genomes of *B. abortus* 2308 (GenBank assembly accession: GCA_000054005.1) and the related organism *Sinorhizobium meliloti* 2011 (GenBank assembly accession: GCF_000346065.1) were utilized as input for the homology reconstruction process. For the draft homology reconstruction, the GSMM of *S. meliloti* was employed as a reference (diCenzo et al., 2020). The biomass equation of *S. meliloti* was modified to suit the *B. abortus* GSMM, considering their close phylogenetic relationship regarding differences in lipids and lipopolysaccharide (LPS) composition (Cardoso et al., 2006). Inclusion of cofactors and vitamins in the model was based on the comprehensive study by Xavier et al. (2017), which identifies essential cofactors and vitamins universal to prokaryotes. As the LPS of *B. abortus* differs from that of *S. meliloti*, it was incorporated into the biomass equation along with its corresponding biosynthetic pathway, as described by Cardoso et al. (2006). The Monomethyl phosphatidylethanolamine (MMPE) and sulfolipid sulfonoquinovosyl diacylglycerol (SL) were excluded from the biomass equation of *B. abortus*, as these lipids are not present in this organism (Sohlenkamp and Geiger, 2016). The proportions of amino acids and nucleotides were determined by extrapolating from the nucleotide and amino acid compositions of the predicted proteins encoded by the *B. abortus* genome (Zorrilla and Kerkhoven, 2021). The final biomass equation of *B. abortus* model is composed of amino acids, nucleotides present in DNA and RNA, LPS, peptidoglycan,

phospholipids, fatty acids, inorganic ions, cofactors and vitamins (Supplementary File S2).

Following the GSMM draft generation, an extensive manual curation process was undertaken to incorporate additional reactions, metabolites, and establish accurate Gene-Protein-Reactions (GPR) associations. This curation process involved leveraging the genomic annotation of *B. abortus* as well as utilizing several databases, including KEGG (Kanehisa et al., 2006), Metacyc (Caspi et al., 2020), BiGG (King et al., 2016), and PATRIC (Davis et al., 2020). To access the model functionality, the growth rate was predicted *in silico* and compared with experimental data. The growth rate from experimental data, was accessed based on the growth of *B. abortus* in a *Brucella* synthetic media. And the growth rate was calculated based on the growing curve. (Viadas et al., 2010). The *Brucella* synthetic media was reconstructed *in silico* and the uptake rate of each component was set to 1 mmol gDW⁻¹ h⁻¹. The description of the growth rate calculations and detailed media composition are described in Supplementary Material File S1 and S2. All constraint-based flux analyses and tests conducted during the draft generation phase were implemented using Constraint-Based Metabolic Modeling in Python (COBRApy) version 0.25.0 (Orth et al., 2010; Mahadevan and Schilling, 2003). The finalized and curated model was designated as iBP932.

Model validation

Gene Essentiality

To validate the reconstruction of iBP932, an *in silico* analysis of gene essentiality was conducted. The predictions obtained were compared to previous *in vitro* investigations that identified genes crucial for survival within macrophage cells (Bonomi et al., 2010; Gao et al., 2013; Steron et al., 2018; Tian et al., 2019; Révora et al., 2020). Additionally, the gene essentiality dataset available in the BioCyc database for *B. abortus* 2308 (BioCyc ID: MIX2B4Q-7) was utilized. This dataset is based on the research published by Steron et al. (2018) and encompasses growth conditions using the 2YT complex medium as well as macrophage infection experiments.

To achieve accurate gene essentiality results, the 2YT complex medium growth was modeled *in silico* following the methodology described by Marinos et al., 2020. This approach considers the comprehensive composition of amino acids, nucleotides, vitamins, and ions present in the complex medium components such as yeast extract and tryptone. The model incorporates exchange reactions to account for the metabolites derived from the medium, and rather than employing uptake rates, the concentration of individual components is utilized (see Supplementary Material File S2).

Under *in vivo* conditions, during the initial stages of infection, *Brucella* spp. establishes residence within the phagosomal compartment of host macrophages and endures hostile environmental factors such as reactive oxygen intermediates, acidic pH, and nutrient scarcity. In response to nutrient deprivation, bacteria enter a physiological state known as the stationary phase, which allows for the maintenance of metabolism and cell viability (Roope II et al., 2003). During macrophage infection, *B. abortus* induces a metabolic shift

known as the Warburg effect in the host cell, leading to increased glycolysis and the production of lactate, which is used as a carbon and energy source (Czyz et al., 2017). Thus, in the simulation of macrophage conditions (MFG), lactate was employed as the carbon source.

A study investigating the nitrogen sources available to *Mycobacterium tuberculosis* within human macrophages revealed the presence of amino acids, including glutamine, alanine, aspartate, glutamate, valine, leucine, and glycine. Among these, glutamine was identified as the primary nitrogen donor (Borah et al., 2019). Considering this study, glutamine and the other six amino acids, alanine, aspartate, glutamate, valine, leucine, and glycine, were constrained as nitrogen sources for the MFG modeling. To assess the impact of gene deletions, simulations were performed utilizing the COBRAPy single gene knockout function. This enabled the investigation of the consequences resulting from the removal of specific genes within the metabolic network.

Nitrogen and Carbon Sources Utilization

Prior investigations have demonstrated the ability of certain strains of *B. abortus* to utilize diverse carbon sources via the Biotype 100 carbon assimilation system (López-Merino et al., 2000). Additionally, biotyping systems have been employed to assess metabolic activity to differentiate various members of the *Brucella* species (Wong et al., 1992; Al Dahouk et al., 2010). To validate the reconstructed iBP932 model, an analysis was conducted to examine the utilization of metabolites as carbon and nitrogen sources. This analysis was based on the methodology developed by Al Dahouk et al. (2010). Metabolites associated with high and moderate metabolic activity in *B. abortus* were selected for validation purposes. A chemically-defined minimal medium was utilized, with the exchange of lactate and glycerol for D-glucose as the carbon source and ammonia as the nitrogen source (Gerhardt and Wilson, 1948). In this analysis, D-glucose was substituted with other carbon sources to be tested, while ammonia was replaced with alternative nitrogen sources. FBA was subsequently employed to evaluate the *in silico* growth under these conditions.

Gene-Centric Identification of Drug Targets for iBP932

The identification of potential drug targets was based on the methodology established by Cesur et al. (2020). This approach involved a two-step process. Initially, the essentiality of each gene in the metabolic network was determined by constraining the model to specific growth conditions. In the second step, genes exhibiting no homology to humans were selected and tested for the following criteria, druggability, potential virulence factors and broad-spectrum (Cesur et al., 2020). Gene essentiality was assessed using the single-gene deletion function from COBRAPy under two distinct conditions: simulating Human Blood Fluids (HBF) (Hadi and Marashi, 2014) and the macrophage intracellular environment using the same gene essentiality constraints applied in model validation. The HBF condition was defined by 77 metabolites, which were used as constraints corresponding to the uptake reactions present in the iBP932 model. During HBF simulations, the uptake rate of

all media components was set to 10 mmol gDW⁻¹ h⁻¹ with the biomass equation serving as the objective function in order to predict the growth rate during FBA.

Druggable Targets Analysis

In order to mitigate the selection of drug targets that could pose harm to the human host, we employed the following strategy. Initially, protein sequences corresponding to essential genes predicted by iBP932 were subjected to BLASTp analysis against human protein sequences (GenBank assembly accession: GCA_000001405.29) using an expected value (E-value) cut-off of 1x 10⁻⁴. Proteins encoded by genes with E-values exceeding the cut-off and present in the essential gene list were considered devoid of homology to humans and selected for further analysis. Next, we assessed the druggability of the identified targets that were non-homologous to humans but predicted as essential to *B. abortus*. Druggability refers to the capacity of a target to bind tightly to drug-like compounds. To evaluate druggability, we utilized the Drugbank database (Wishart et al., 2008). The non-homologous proteins were subjected to a BLASTp search against the known targets in the Drugbank database, adopting an E-value cut-off of 1x10⁻²⁵.

Potential Virulence Factor Analysis

Virulence factors encompass a diverse array of molecules such as toxins, enzymes, lipopolysaccharides, as well as cell surface structures like capsules, LPS, glycoproteins, and lipoproteins. These molecules are produced by microbial pathogens to subvert the host's defense mechanisms and establish an infection (Leitão, 2020). To identify drug targets that may also serve as anti-virulence agents for more effective drug therapy, we investigated whether any of the druggable proteins identified could be potential virulence factors. For this purpose, we employed the virulence-factor database VDFB (Chen et al., 2016) and conducted a BLASTp analysis against the database, considering as valid hits which presented an E-value cut-off of 1x10⁻⁴, a bit score of 100, and an identity threshold of 65% (Cesur et al., 2020).

Broad-Spectrum Analysis

To assess the potential for broad-spectrum activity in drug target candidates, which can be employed for the treatment of co-infections or diverse infections, we performed a broad-spectrum analysis. This analysis involved a homology search against various infectious bacteria utilizing the comprehensive dataset of PBIT (Pipeline Builder for Identification of Drug Targets) web browser (Shende et al., 2017). Specifically, we executed a BLASTp search against protein sequences of pathogenic organisms, applying an E-value cut-off of 1x10⁻⁵, a bit score of 100, and a sequence identity threshold of 35%. A protein was considered a broad-spectrum target if it was identified in at least 40 diverse pathogenic strains (Cesur et al., 2020) Figure 6.

Conclusions

This study developed the first *B. abortus* GEM based on genomic data and information from databases and literature. The model enabled prediction of essential genes and the simulation under different carbon and nitrogen sources. Through the application of this model, a series of analyses was performed, leading to the identification of four essential genes that could be explored as potential targets for the treatment of brucellosis and other infectious diseases, given their identification as broad-spectrum targets. This model can serve as a tool for construction of other *Brucella* species GEMs, as well as integrated metabolic models that can simulate the systemic pathogen-host interaction metabolism. The integration of other omics data, such as transcriptomics and proteomics, can contribute to the construction of context-specific models in order to simulate biological conditions more accurately. Additionally, the development of models with enzymatic constraints based on iBP932 can be utilized to conduct more precise analyses, helping to elucidate the processes of *B. abortus* intracellular pathogenesis.

Conflicts of interest

"There are no conflicts to declare".

Acknowledgements

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). The authors thank the Diretoria de Tecnologia de Informação (DTI) at Universidade Federal de Viçosa for availability of the computational cluster and software used in this work.

Notes and references

- 1- BATUT, J. ANDERSSON, S.G., O'CALLAGHAN, D. The evolution of chronic infection strategies in the alpha-proteobacteria. *Nature Reviews - Microbiology*, vol. 2, pag. 933-945, December, 2004. DOI:10.1038/nrmicro1044.
- 2- CORBEL, M. J. Mc HENDRY, D. L. F. D. Urease activity of *Brucella* species. *Research in Veterinary Science*, Vol. 38, Issue 2, pag. 252-253, 1985. DOI: doi.org/10.1016/S0034-5288(18)31838-1.
- 3- Moreno E, Cloeckert A, Moriyón I. *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet Microbiol*. 2002 Dec 20;90(1-4):209-27. doi: 10.1016/S0378-1135(02)00210-9. PMID: 12414145.
- 4- ARAJ, G. F. Update on laboratory diagnosis of human brucellosis. *International Journal of Antimicrobial Agents*. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2010.06.014
- 5- GŁOWACKA, P., ŻAKOWSKA, et al. *Brucella* – Virulence Factors, Pathogenesis and Treatment. *Polish Journal of Microbiology*, vol.67, no.2, 2018, pp.151-161. <https://doi.org/10.21307/pjm-2018-029>
- 6- GUL, S. T. et al. Epidemiology and epizootology of brucellosis: A review. *Pakistan veterinary journal*, v. 27, n. 3, p. 145, 2007.
- 7- Khurana SK, Sehrawat A, Tiwari R, Prasad M, Gulati B, Shabbir MZ, Chhabra R, Karthik K, Patel SK, Pathak M, Iqbal Yatoo M, Gupta VK, Dhama K, Sah R, Chaicumpa W. Bovine brucellosis - a comprehensive review. *Vet Q*. 2021 Jan 1;41(1):61-88. doi: 10.1080/01652176.2020.1868616. PMID: 33353489; PMCID: PMC7833053.
- 8- Best A, Abu Kwaik Y. Nutrition and Bipartite Metabolism of Intracellular Pathogens. *Trends Microbiol*. 2019 Jun;27(6):550-561. doi: 10.1016/j.tim.2018.12.012. Epub 2019 Jan 14. PMID: 30655036; PMCID: PMC6527459.
- 9- Teusink B, Westerhoff HV, Bruggeman FJ. Comparative systems biology: from bacteria to man. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2010 Sep-Oct;2(5):518-532. doi: 10.1002/wsbm.74. PMID: 20836045.
- 10- Sertbas M, Ulgen KO. Genome-Scale Metabolic Modeling for Unraveling Molecular Mechanisms of High Threat Pathogens. *Front Cell Dev Biol*. 2020 Nov 3;8:566702. doi: 10.3389/fcell.2020.566702. PMID: 33251208; PMCID: PMC7673413.
- 11- Barbier T, Zúñiga-Ripa A, Moussa S, Plovier H, Sternon JF, Lázaro-Antón L, Conde-Álvarez R, De Bolle X, Iriarte M, Moriyón I, Letesson JJ. *Brucella* central carbon metabolism: an update. *Crit Rev Microbiol*. 2018 Mar;44(2):182-211. doi: 10.1080/1040841X.2017.1332002. Epub 2017 Jun 12. PMID: 28604247.
- 12- Wang H, Marcišauskas S, Sánchez BJ, Domenzain I, Hermansson D, Agren R, Nielsen J, Kerkhoven EJ. (2018) RAVEN 2.0: A versatile toolbox for metabolic network reconstruction and a case study on *Streptomyces coelicolor*. *PLoS Comput Biol* 14(10): e1006541. doi:10.1371/journal.pcbi.1006541.
- 13- diCenzo, G.C., Tesi, M., Pfau, T. et al. Genome-scale metabolic reconstruction of the symbiosis between a leguminous plant and a nitrogen-fixing bacterium. *Nat Commun* 11, 2574 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16484-2>
- 14- Cardoso, P. G., Macedo, G. C., Azevedo, V., & Oliveira, S. C. (2006). *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microbial cell factories*, 5, 13. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-13>
- 15- Xavier, J. C., Patil, K. R., & Rocha, I. (2017). Integration of Biomass Formulations of Genome-Scale Metabolic Models with Experimental Data Reveals Universally Essential Cofactors in Prokaryotes. *Metabolic engineering*, 39, 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.12.002>
- 16- Christian Sohlenkamp, Otto Geiger, Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways, *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 40, Issue 1, January 2016, Pages 133–159. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv008>
- 17- Zorrilla F, Kerkhoven EJ. Reconstruction of Genome-Scale Metabolic Model for *Hansenula polymorpha* Using RAVEN. *Methods Mol Biol*. 2022;2513:271-290. doi: 10.1007/978-1-0716-2399-2_16. PMID: 35781211.

- 18 Kanehisa, M., Goto, S., Hattori, M., Aoki-Kinoshita, K. F., Itoh, M., Kawashima, S., Katayama, T., Araki, M., & Hirakawa, M. (2006). From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *Nucleic acids research*, 34(Database issue), D354–D357. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl102>
- 19- [MetaCyc20] R.Caspi, R.Billington, I.M. Keseler, A.Kothari, M.Krummenacker, P.E.Midford, W.K. Ong, S.Paley, P.Subhraveti, P.D. Karp The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes - a 2019 update *Nucleic Acids Res*48(D1):D445–D453.doi: 10.1093/nar/gkz862.(2020)
- 20- King ZA, Lu JS, Dräger A, Miller PC, Federowicz S, Lerman JA, Ebrahim A, Palsson BO, and Lewis NE. BiGG Models: A platform for integrating, standardizing, and sharing genome-scale models (2016) *Nucleic Acids Research* 44(D1):D515–D522. doi:10.1093/nar/gkv1049
- 21- Davis JJ, Wattam AR, Aziz RK, Brettin T, Butler R, Butler RM, Chlenski P, Conrad N, Dickerman A, Dietrich EM, Gabbard JL, Gerdes S, Guard A, Kenyon RW, Machi D, Mao C, Murphy-Olson D, Nguyen M, Nordberg EK, Olsen GJ, Olson RD, Overbeek JC, Overbeek R, Parrello B, Pusch GD, Shukla M, Thomas C, VanOeffelen M, Vonstein V, Warren AS, Xia F, Xie D, Yoo H, Stevens R. The PATRIC Bioinformatics Resource Center: expanding data and analysis capabilities. *Nucleic Acids Res.* 2020 Jan 8;48(D1):D606–D612. doi: 10.1093/nar/gkz943. PMID: 31667520. PMCID: PMC7145515.
- 22- Viadas C, Rodriguez MC, Sangari FJ, Gorvel JP, Garcia-Lobo JM, López-Goñi I. Transcriptome analysis of the *Brucella abortus* BvrR/BvrS two-component regulatory system. *PLoS One.* 2010 Apr 21;5(4):e10216. doi: 10.1371/journal.pone.0010216. PMID: 20422049; PMCID: PMC2858072.
- 23- Orth, J., Thiele, I. & Palsson, B. What is flux balance analysis? *Nat Biotechnol* 28, 245–248 (2010). <https://doi.org/10.1038/nbt.1614>
- 24- Mahadevan, R., and Schilling, C. H. (2003). The effects of alternate optimal solutions in constraint-based genome-scale metabolic models. *Metab. Eng.* 5, 264–276. doi: 10.1016/j.ymben.2003.09.002
- 25- Bonomi HR, Marchesini MI, Klinke S, Ugalde JE, Zylberman V, Ugalde RA, Comerci DJ, Goldbaum FA. An atypical riboflavin pathway is essential for *Brucella abortus* virulence. *PLoS One.* 2010 Feb 25;5(2):e9435. doi: 10.1371/journal.pone.0009435. PMID: 20195542; PMCID: PMC2828483.
- 26- Gao G, Wang Y, Chen Z, Xu X, Xu J. *Brucella* virulence mechanisms and implications in novel vaccines and drugs. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2013;23(1):49–64. doi: 10.1615/critrevukaryogeneexpr.2013006666. PMID: 23557337.
- 27- Sternon JF, Godessart P, Gonçalves de Freitas R, Van der Henst M, Poncin K, Francis N, Willemart K, Christen M, Christen B, Letesson JJ, De Bolle X. Transposon Sequencing of *Brucella abortus* Uncovers Essential Genes for Growth *In Vitro* and Inside Macrophages. *Infect Immun.* 2018 Jul 23;86(8):e00312–18. doi: 10.1128/IAI.00312-18. PMID: 29844240; PMCID: PMC6056880.
- 28- Tian M, Qu J, Li P, Bao Y, Liu J, Ding C, Wang S, Li T, Qi J, Yu S. Identification of novel genes essential for *Brucella abortus* to establish infection by signature-tagged mutagenesis. *Vet Microbiol.* 2019 Mar;230:130–137. doi: 10.1016/j.vetmic.2019.02.005. Epub 2019 Feb 5. PMID: 30827378.
- 29- Révora V, Marchesini MI, Comerci DJ. *Brucella abortus* Depends on l-Serine Biosynthesis for Intracellular Proliferation. *Infect Immun.* 2020 Jan 22;88(2):e00840–19. doi: 10.1128/IAI.00840-19. PMID: 31740531; PMCID: PMC6977118.
- 30- Marinos G, Kaleta C, Waschina S. Defining the nutritional input for genome-scale metabolic models: A roadmap. *PLoS One.* 2020 Aug 14;15(8):e0236890. doi: 10.1371/journal.pone.0236890. PMID: 32797084; PMCID: PMC7428157.
- 31- Roop RM 2nd, Gee JM, Robertson GT, Richardson JM, Ng WL, Winkler ME. *Brucella* stationary-phase gene expression and virulence. *Annu Rev Microbiol.* 2003;57:57–76. doi: 10.1146/annurev.micro.57.030502.090803. Epub 2003 May 1. PMID: 12730323.
- 32- Czyż DM, Willett JW, Crosson S. *Brucella abortus* Induces a Warburg Shift in Host Metabolism That Is Linked to Enhanced Intracellular Survival of the Pathogen. *J Bacteriol.* 2017 Jul 11;199(15):e00227–17. doi: 10.1128/JB.00227-17. PMID: 28559292; PMCID: PMC5512224.
- 33- Borah K, BeyB M, Theorell A, Wu H, Basu P, Mendum TA, Nöh K, Beste DJV, McFadden J. Intracellular Mycobacterium tuberculosis Exploits Multiple Host Nitrogen Sources during Growth in Human Macrophages. *Cell Rep.* 2019 Dec 10;29(11):3580–3591.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2019.11.037. PMID: 31825837; PMCID: PMC6915324.
- 34- López-Merino A, Monnet DL, Hernández I, Sánchez NL, Boeufgras JM, Sandoval H, Freney J. Identification of *Brucella abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, and *B. suis* by carbon substrate assimilation tests. *Vet Microbiol.* 2001 Jun 22;80(4):359–63. doi: 10.1016/s0378-1135(01)00312-1. PMID: 11348772.
- 35- Wong JD, Janda JM, Duffey PS. Preliminary studies on the use of carbon substrate utilization patterns for identification of *Brucella* species. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1992 Feb;15(2):109–13. doi: 10.1016/0732-8893(92)90032-o. PMID: 1572134.
- 36- Al Dahouk S, Scholz HC, Tomaso H, Bahn P, Göllner C, Karges W, Appel B, Hensel A, Neubauer H, Nöckler K. Differential phenotyping of *Brucella* species using a newly developed semi-automated metabolic system. *BMC Microbiol.* 2010 Oct 23;10:269. doi: 10.1186/1471-2180-10-269. PMID: 20969797; PMCID: PMC2984481.
- 37- Gerhardt P, Wilson JB. The Nutrition of *Brucellae*: Growth in Simple Chemically Defined Media. *J Bacteriol.* 1948 Jul;56(1):17–24. doi: 10.1128/jb.56.1.17-24.1948. PMID: 16561542; PMCID: PMC518538.
- 38- Cesur MF, Siraj B, Uddin R, Durmuş S, Çakır T. Network-Based Metabolism-Centered Screening of Potential Drug Targets in *Klebsiella pneumoniae* at Genome Scale. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020 Jan 14;9:447. doi: 10.3389/fcimb.2019.00447. PMID: 31993376; PMCID: PMC6970976.
- 39- Hadi M, Marashi SA. Reconstruction of a generic metabolic network model of cancer cells. *Mol Biosyst.* 2014 Nov;10(11):3014–21. doi: 10.1039/c4mb00300d. PMID: 25196995.
- 40- Wishart DS, Knox C, Guo AC, Cheng D, Shrivastava S, Tzur D, Gautam B, Hassanali M. DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. *Nucleic Acids Res.* 2008 Jan;36(Database issue):D901–6. doi: 10.1093/nar/gkm958. Epub 2007 Nov 29. PMID: 18048412; PMCID: PMC238889.
- 41- Leitão JH. Microbial Virulence Factors. *Int J Mol Sci.* 2020 Jul 27;21(15):5320. doi: 10.3390/ijms21155320. PMID: 32727013; PMCID: PMC7432612.
- 42- Chen L, Zheng D, Liu B, Yang J, Jin Q. VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis—10 years on. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jan 4;44(D1):D694–7. doi: 10.1093/nar/gkv1239. Epub 2015 Nov 17. PMID: 26578559; PMCID: PMC4702877.
- 43- Shende G, Haldankar H, Barai RS, Bharmal MH, Shetty V, Idicula-Thomas S. PBIT: Pipeline Builder for Identification of drug Targets for infectious diseases. *Bioinformatics.* 2017 Mar 15;33(6):929–931. doi: 10.1093/bioinformatics/btw760. PMID: 28039165.

- 44 Kim HU, Kim TY, Lee SY. Genome-scale metabolic network analysis and drug targeting of multi-drug resistant pathogen *Acinetobacter baumannii* AYE. *Mol Biosyst.* 2010 Feb;6(2):339-48. doi: 10.1039/b916446d. Epub 2009 Dec 8. PMID: 20094653.
- 45 Jensen CS, Norsigian CJ, Fang X, Nielsen XC, Christensen JJ, Pálsson BO, Monk JM. Reconstruction and Validation of a Genome-Scale Metabolic Model of *Streptococcus oralis* (IC1415), a Human Commensal and Opportunistic Pathogen. *Front Genet.* 2020 Mar 3;11:116. doi: 10.3389/fgene.2020.00116. PMID: 32194617; PMCID: PMC7063969.
- 46 Kavvas ES, Seif Y, Yurkovich JT, Norsigian C, Poudel S, Greenwald WW, Ghatak S, Pálsson BO, Monk JM. Updated and standardized genome-scale reconstruction of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, iEK1011, simulates flux states indicative of physiological conditions. *BMC Syst Biol.* 2018 Mar 2;12(1):25. doi: 10.1186/s12918-018-0557-y. PMID: 29499714; PMCID: PMC5834885.
- 47 Hua Huang, Michael S. Carter, Matthew W. Vetting, Nawar Al-Obaidi, Yury Patskovsky, Steven C. Almo, and John A. Gerlt. A General Strategy for the Discovery of Metabolic Pathways: d-Threitol, l-Threitol, and Erythritol Utilization in *Mycobacterium smegmatis* *Journal of the American Chemical Society* 2015 137 (46), 14570-14573 DOI: 10.1021/jacs.5b08968
- 48 Blum M, Chang H, Chuguransky S, Grego T, Kandasamy S, Mitchell A, Nuka G, Paysan-Lafosse T, Qureshi M, Raj S, Richardson L, Salazar GA, Williams L, Bork P, Bridge A, Gough J, Haft DH, Letunic I, Marchler-Bauer A, Mi H, Natale DA, Necci M, Orengo CA, Pandurangan AP, Rivoire C, Sigrist CJA, Sillitoe I, Thanki N, Thomas PD, Tosatto SCE, Wu CH, Bateman A and Finn RD The InterPro protein families and domains database: 20 years on. *Nucleic Acids Research*, Nov 2020, (doi: 10.1093/nar/gkaa977)
- 49 Nogales J, Canales A, Jiménez-Barbero J, Serra B, Pingarrón JM, García JL, Díaz E. Unravelling the gallic acid degradation pathway in bacteria: the gal cluster from *Pseudomonas putida*. *Mol Microbiol.* 2011 Jan;79(2):359-74. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07448.x. Epub 2010 Nov 16. PMID: 21219457
- 50 Sparrins VL, Dagle S. Alternative routes of aromatic catabolism in *Pseudomonas acidovorans* and *Pseudomonas putida*: gallic acid as a substrate and inhibitor of dioxygenases. *J Bacteriol.* 1975 Dec;124(3):1374-81. doi: 10.1128/jb.124.3.1374-1381.1975. PMID: 1194238; PMCID: PMC236050.
- 51 Gruber K, Puffer B, Kräutler B. Vitamin B12-derivatives-enzyme cofactors and ligands of proteins and nucleic acids. *Chem Soc Rev.* 2011 Aug;40(8):4346-63. doi: 10.1039/c1cs15118e. Epub 2011 Jun 20. PMID: 21687905.
- 52 Serer MI, Bonomi HR, Guimarães BG, Rossi RC, Goldbaum FA, Klinké S. Crystallographic and kinetic study of riboflavin synthase from *Brucella abortus*, a chemotherapeutic target with an enhanced intrinsic flexibility. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2014 May;70(Pt 5):1419-34. doi: 10.1107/S1399004714005161. Epub 2014 Apr 30. PMID: 24816110; PMCID: PMC4014124.
- 53 Rahman N, Shah M, Muhammad I, Khan H, Imran M. Genome-wide Core Proteome Analysis of *Brucella melitensis* Strains for Potential Drug Target Prediction. *Mini Rev Med Chem.* 2021;21(18):2778-2787. doi: 10.2174/1389557520666200707133347. PMID: 32634082.
- 54 Pizarro-Cerdá J, Méresse S, Parton RG, van der Goot G, Sola-Landa A, Lopez-Gofí I, Moreno E, Gorvel JP. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect Immun.* 1998 Dec;66(12):5711-24. doi: 10.1128/IAI.66.12.5711-5724.1998. PMID: 9826346; PMCID: PMC1087722.
- 55 Porte F, Naroeni A, Ouahrani-Bettache S, Liautard JP. Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. *Infect Immun.* 2003 Mar;71(3):1481-90. doi: 10.1128/IAI.71.3.1481-1490.2003. PMID: 12595466; PMCID: PMC148865.
- 56 Perumal D, Sakharkar KR, Tang TH, Chow VT, Lim CS, Samal A, Sugiura N, Sakharkar MK. Cloning and targeted disruption of two lipopolysaccharide biosynthesis genes, *kdsA* and *waag*, of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by site-directed mutagenesis. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2010;19(4):169-79. doi: 10.1159/000322157. Epub 2010 Oct 29. PMID: 21042030.
- 57 Gupta SK, Gross R, Dandekar T. An antibiotic target ranking and prioritization pipeline combining sequence, structure and network-based approaches exemplified for *Serratia marcescens*. *Gene.* 2016 Oct 10;591(1):268-278. doi: 10.1016/j.gene.2016.07.030. Epub 2016 Jul 16. PMID: 27425866.
- 58 Liu W, Luo C, Han C, Peng S, Yang Y, Yue J, Shen X, Jiang H. A new beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratase (FabZ) from *Helicobacter pylori*: Molecular cloning, enzymatic characterization, and structural modeling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Aug 12;333(4):1078-86. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.05.197. PMID: 15967411.
- 59 Zhang L, Liu W, Hu T, Du L, Luo C, Chen K, Shen X, Jiang H. Structural basis for catalytic and inhibitory mechanisms of beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratase (FabZ). *J Biol Chem.* 2008 Feb 29;283(9):5370-9. doi: 10.1074/jbc.M705566200. Epub 2007 Dec 19. PMID: 18093984.
- 60 Kumar V, Sharma A, Pratap S, Kumar P. Characterization of isoflavonoids as inhibitors of β -hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratase (FabZ) from *Moraxella catarrhalis*: Kinetics, spectroscopic, thermodynamics and in silico studies. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2018 Mar;1862(3):726-744. doi: 10.1016/j.bbagen.2017.10.017. Epub 2017 Oct 29. PMID: 29092780.

ARTICLE

Journal Name

Figures

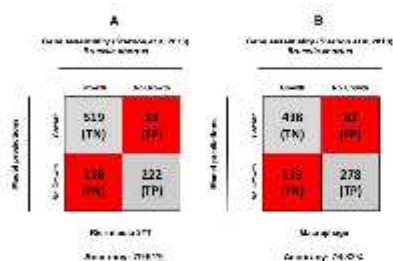


Figure 1 Gene essentiality comparison between IBP932 and experimental data. (A) When IBP932 is compared with the experimental data of Sternon et al 2018, 2YT rich media condition there is a 79% accuracy with gene essentiality. (B) When comparing with macrophage in vivo condition the gene essentiality accuracy of IBP932 is 76% also based on the Sternon et al 2018 experimental data.



Figure 3 Carbon and nitrogen sources utilization validation. The results presents de 22 of 27 positive results of nitrogen and carbon utilization based on the Al Dahouk et al 2010 metabolic test, the 'X' in the boxes represent negative results, indicating that IBP932 cannot use that source to predict in silico growth and the '✓' indicate the positive results comparing the in silico utilization of IBP932 of these substrates to predict growth a total of 81% accuracy.

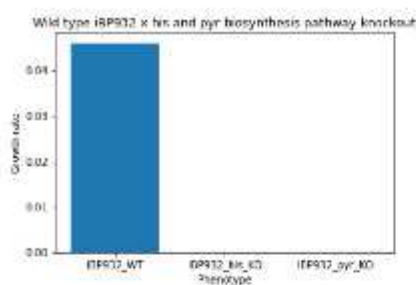


Figure 2 The histidine biosynthesis pathway in IBP932 comprises ten reactions: ATPPPRT (hisZ and hisG), PRATPP (hisE), PRAMPIC (hisI), PRMIC (hisA), IG3PS (hisH and hisF), IGPDH (hisB), HSTPT (hisC), HISTP (hisN), HISTD, and HISND (hisD). The pyrimidine biosynthesis pathway, comprising the reactions ASPCT (pyrB), DHORTS (pyrC), DHORDI (pyrD), ORPT (pyrE), and OMPDC (pyrF). Detailed information regarding these reactions can be accessed in the IBP932 Excel format provided in the supplementary material. Following the in silico knockout of all histidine of pyrimidine biosynthesis genes, it is predicted that no growth would occur under MFG conditions, consistent with the findings of Sternon et al. in their 2018 in vitro study. This observation underscores the indispensable requirement for a fully functional histidine and pyrimidines biosynthesis pathway to ensure survival within macrophages.

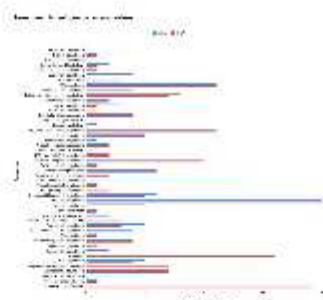


Figure 4 Comparison of the non-human homologue essential gene subsystem distribution between conditions HBF and MFG.

Journal Name

ARTICLE



Figure 5 iBP932 reconstruction summary. In the initial phase, the *S. meliloti* model, iGD1348, and protein sequences, along with *B. abortus* proteins, were employed to draft a reconstruction through the utilization of the RAVEN Toolbox 2.0. Subsequently, following the draft generation, the formulation of a biomass equation and a manual curation process ensued, drawing upon information available in databases and the existing literature. Upon completion of the curation process, the final model, denoted as iBP932, was established.



Figure 6 Drug Targets selection pipeline.

ARTICLE

Journal Name

Tables

Features of iBP932	Numbers
Total genome size (bp)	3,278,307
Open Reading Frames (ORFs)	3,034
Gene Included in the model (GPR)	932
Model Reactions	1140
Model Reactions Without GPR	36
Purely Metabolic Reactions	862
Transport Reactions	139
Metabolites	999

Table 1. Features of *B. abortus* genome-scale metabolic model iBP932.

Journal Name

ARTICLE

Putative drug target list		Prioritization of putative drug targets		
Genes	Protein	Virulence Analysis	Druggability analysis	Broad spectrum analysis
BAB_RS21460	2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase	+	10	107
BAB_RS16105	3-deoxy-manno-octulosonate cytidyltransferase	+	5	100
BAB_RS21545	3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase FabZ	+	11	152
BAB_RS21540	acyl-ACP-UDP-N-acetylglucosamine O-acyltransferase	+	2	77
BAB_RS26430	isochorismatase	+	2	34
BAB_RS22805	UDP-3-O-acyl-N-acetylglucosamine deacetylase	+	6	104
BAB_RS31000	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-succinyltransferase	-	5	67
BAB_RS20960	2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyldihydropteridine diphosphokinase	-	7	53
BAB_RS21810	30S ribosomal protein S13	-	2	179
BAB_RS21990	30S ribosomal protein S2	-	1	180
BAB_RS21890	30S ribosomal protein S3	-	4	180
BAB_RS19990	30S ribosomal protein S4	-	6	189
BAB_RS20360	3-dehydroquinate dehydratase	-	7	127
BAB_RS25585	3-dehydroquinatase synthase	-	1	126
BAB_RS16045	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	-	4	70
BAB_RS18305	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	-	2	126
BAB_RS31105	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase	-	2	84
BAB_RS19125	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase	-	1	151
BAB_RS19290	4-hydroxythreonine-4-phosphate dehydrogenase PdxA	-	1	75
BAB_RS21975	50S ribosomal protein L1	-	1	180
BAB_RS30985	acetylglutamate kinase	-	1	74
BAB_RS20070	adenylosuccinate lyase	-	2	65
BAB_RS26740	aminodeoxychorismate synthase component I	-	1	151
BAB_RS21490	anthranilate phosphoribosyltransferase	-	1	121

ARTICLE

Journal Name

Putative drug target list		Prioritization of putative drug targets		
Genes	Protein	Virulence Analysis	Druggability analysis	Broad spectrum analysis
BAB_RS22283	bifunctional adenosylcobinamide kinase/adenosylcobinamide-phosphate guanylyltransferase	-	2	54
BAB_RS27283	bifunctional riboflavin kinase/FAD synthetase	-	3	110
BAB_RS29460	bifunctional UDP-N-acetylglucosamine diphosphorylase/glucosamine-1-phosphate N-acetyltransferase GlmU	-	4	151
BAB_RS18083	chorismate synthase	-	1	129
BAB_RS20483	cysteine desulfurase	-	8	168
BAB_RS16030	Cytidylate kinase	-	4	137
BAB_RS22823	D-alanine--D-alanine ligase	-	2	102
BAB_RS20930	Dihydropteroate synthase	-	22	138
BAB_RS23800	DNA polymerase III subunit epsilon	-	1	81
BAB_RS16083	DNA polymerase III subunit gamma/tau	-	1	97
BAB_RS10423	DNA-polimetase III	-	1	66
BAB_RS28103	fructose-bisphosphate aldolase class II	-	1	67
BAB_RS17283	Histidinol dehydrogenase	-	3	123
BAB_RS19730	ketoacyl-ACP synthase III	-	15	171
BAB_RS21493	ndole-3-glycerol phosphate synthase TrpC	-	1	130
BAB_RS20873	NH(3)-dependent NAD(+) synthetase	-	1	49
BAB_RS26080	orotidine-5'-phosphate decarboxylase	-	2	65
BAB_RS21283	pantetheine-phosphate adenyltransferase	-	3	141
BAB_RS26033	Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit	-	1	69
BAB_RS22243	precorrin-4 C(11)-methyltransferase	-	1	54
BAB_RS22170	precorrin-8X methylmutase	-	1	47
BAB_RS27963	Putative FMN Reductase	-	8	127
BAB_RS22050	serine O-acetyltransferase	-	2	157
BAB_RS23150	Thioredoxin reductase	-	2	186
BAB_RS20773	Thymidylate kinase	-	1	124
BAB_RS23970	tryptophan synthase subunit alpha	-	12	101
BAB_RS23980	tryptophan synthase subunit beta	-	12	145
BAB_RS23880	type I pantothenate kinase	-	3	59

Journal Name

ARTICLE

Putative drug target list		Prioritization of putative drug targets		
Genes	Protein	Virulence Analysis	Druggability analysis	Broad spectrum analysis
BAB_RS22840	UDP-diphospho-muramoylpentapeptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase	-	1	42
BAB_RS17295	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	-	6	197
BAB_RS22835	UDP-N-acetylmuramate-L-alanine ligase	-	3	117
BAB_RS22865	UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate-2,6-diaminopimelate ligase	-	3	90

Table 2. Targets predicted in at least two of three criteria tested. Only five genes passed all criteria. All essential genes and proteins along with the number of interacting drugs are listed in the table.