



USO DE IMUNOINFORMÁTICA NA SELEÇÃO DE EPÍTOPOS PARA DESIGN DE VACINA CONTRA *Haemonchus contortus*

USE OF IMMUNOINFORMATICS IN THE SELECTION OF EPITOPES FOR VACCINE DESIGN AGAINST *Haemonchus contortus*

Ellen Aparecida Guimarães Bezerra¹
Dayse Marcielle de Souza Lopes²
Maximino Alencar Bezerra Júnior³
Alessandra Rejane Ericsson de Oliveira Xavier⁴
Ana Paula Venuto Moura⁵
Mauro Aparecido de Sousa Xavier⁶

RESUMO

Objetivo: Analisar, *in silico*, epítomos potenciais das proteínas H11 e Hc23 do *Haemonchus contortus* por meio de ferramentas de bioinformática, com maior imunogenicidade para design de vacina contra hemoncose. **Método:** As sequências das proteínas foram submetidas a servidores e softwares de predição de epítomos de células B e T. **Resultados:** Foram obtidos diversos epítomos, destes selecionadas 4 sequências de peptídeos para H11 (TYYFTRKAFDTSKPGKDDTGGKDKDNSPSAAELLPSNIKPLSY, TDVEGPDGKPMRTTEFASQWTTQMGPVISVAEFNSTTLKLTQSRYKANKDAVERE

¹ Biomédica. Mestranda em Biotecnologia. Universidade Estadual de Montes Claros (Unimontes). Minas Gerais. Brasil. E-mail: ellen.bezerra@yahoo.com.br . Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-4388-8850>.

² Bióloga. Mestranda em Biotecnologia. Universidade Estadual de Montes Claros (Unimontes). Minas Gerais. Brasil. E-mail: dayselopes.bio@gmail.com . Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-2156-2531>.

³ Doutor em Neurociências pela Universidade Federal Fluminense (UFF). Professor das Faculdades Integradas do Norte de Minas (FUNORTE). Minas Gerais. Brasil. E-mail: maximino.bezerra@funorte.edu.br. Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-4938-161X>.

⁴ Doutora em Biologia Molecular (UnB). Professora da Universidade Estadual de Montes Claros (Unimontes). Minas Gerais. Brasil. E-mail: ericsson_aerc@yahoo.com.br. Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-8558-4196>.

⁵ Doutora em Parasitologia (UFMG). Professora da Universidade Estadual de Montes Claros (Unimontes). Minas Gerais. Brasil. E-mail: apvenuto@yahoo.com.br. Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-3103-7063>.

⁶ Doutor em Biologia Molecular (UnB). Professor da Universidade Estadual de Montes Claros (Unimontes). Minas Gerais. Brasil. E-mail: mauro.xavier@unimontes.br. Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-0512-1616>.

Recebido em	Aceito em	Publicado em
18-06-2022	01-02-2023	03-02-2023

KYRHPK, LKPM
YEKSSIDFIANNYRNDKLFQINLQKDVIDMFCALGSQDCRKKYKCLFDDEVMNKCR
DGQAATECVRIA, TSGIRSQQQIDQLKNLQKNGMNARQFGAFDKAIERAQRNRVDWIK
KHFQKL) e 1 para Hc23 (LLPPPVRKAPEEVQEQRKIINDKTIPVEEKHKKMNELAQ
KVLTDGDNLKEYNEFTAHIEDRHKAVKAATLSPEAKAA) que continham maiores escores,
e que apresentaram localização acessível na estrutura tridimensional das proteínas com
potencial de induzir resposta imune. **Conclusão:** Neste estudo foi possível determinar as
sequências peptídicas mais imunogênicas das proteínas H11 e Hc23 do *Haemonchus contortus*
que as caracterizam como antígenos protetores. A comprovação dos epítomos obtidos deve ser
realizada em experimentos para avaliar a resposta imune in vivo, e assim verificar a
possibilidade do uso na produção de vacinas contra a hemonose, trazendo benefícios para a
cadeia produtiva bem como para o meio ambiente.

Palavras-chave: Hemonose; Vacinologia; Biologia computacional; Determinante antigênico.

ABSTRACT

Objective: To analyze, *in silico*, potential epitopes of the H11 and Hc23 proteins of *Haemonchus contortus* using bioinformatics tools, with greater immunogenicity for designing a vaccine against hemoncosis. **Method:** Protein sequences were submitted to B and T cell epitope prediction servers and software. **Results:** Several epitopes were obtained, of which 4 peptide sequences for H11 were selected (TYFTRKAFDTSKPKDDTGG KDKDNSPSAAELLPSNIKPLSY, TDVEGPDGKPMRTTEFASQWTTQMGFPVISVAEF NSTTLKLTQSRYKANKDAVEREKYRHPK, LKPMYEKSSIDFIANNYRNDKLFQINL QKDVIDMFCALGSQDCRKKYKCLFDDEVMNKCRDGDQAATECVRIA, TSGIRSQQQI DQLKNLQKNGMNARQFGAFDKAIERAQRNRVDWIKKHFQKL) and 1 for Hc23 (LLPPPVRKAPEEVQEQRKIINDKTIPVEEKHKKMNELAQKVLTDGDNLKEYNEFTAH IEDRHKAVKAATLSPEAKAA) which had higher scores, and which showed an accessible location in the three-dimensional structure of proteins with the potential to induce an immune response. **Conclusion:** In this study, it was possible to determine the most immunogenic peptide sequences of the *Haemonchus contortus* H11 and Hc23 proteins that characterize them as

protective antigens. The confirmation of the epitopes obtained must be carried out in experiments to evaluate the immune response in vivo, and thus verify the possibility of using it in the production of vaccines against hemoncosis, bringing benefits to the production chain as well as to the environment.

Keywords: Haemonchiasis; Vaccinology; Computational biology; Antigenic determinant.

INTRODUÇÃO

O *Haemonchus contortus* é um nematóide gastrointestinal hematófago causador da Hemoncose, uma doença parasitária de ruminantes que acomete em grande parte ovinos e caprinos. Fica alojado no abomaso de ruminantes e sua infecção gera sintomas como edema submandibular ou papeira que é uma inflamação de aspecto mole sob a pele embaixo da mandíbula, anemia severa, perda de apetite e peso, gerando desidratação e o falecimento do ovino ou caprino 1-6.

Esta patologia gastrointestinal tem grande importância na produção de caprinos e ovinos em diversas regiões, pois é fator limitante a atividade pecuária, podendo chegar a inviabilizar as cadeias produtivas 2,7,8.

O *Haemonchus contortus* tem um ciclo evolutivo direto, com uma fase parasitária e uma fase no ambiente. A fase no ambiente, faz com que ocorra disseminação do parasito no rebanho devido à ingestão do pasto contaminado. O verme é um organismo difícil de ser eliminado totalmente tanto do ambiente quanto no animal 6, 9,10.

Entre as possíveis alternativas de controle do nematóide está o uso de vacinas. Estudos recentes se baseiam no desenvolvimento e validação de vacinas que podem trazer grandes benefícios para a cadeia produtiva e para o meio ambiente sendo uma medida eficaz contra esse parasito 11.

Proteínas integrais do trato digestivo deste nematóide vem sendo utilizadas na produção de imunizantes devido suas propriedades imunogênicas, como a proteína H11, um complexo com massa molecular de 110 kDa, expressado exclusivamente nas microvilosidades intestinais de *Haemonchus*. trata-se de um antígeno oculto e sendo o *H. contortus* um parasito hematófago, a H11 torna-se uma estrutura com potencial para receber anticorpos após alimentação de

sangue. Os anticorpos dirigidos contra a H11 podem ser capazes de causar danos e/ou neutralizar as enzimas que atuam no processo digestório dos helmintos adultos, conseqüentemente poderão causar alterações nas estruturas do parasito acarretando na morte por inanição 11-13.

Outra proteína Hc23 têm o efeito imunizante contra a hemoncose experimental, esta proteína é um componente abundante em uma fração de baixo peso molecular de 23 KDa, e faz parte das proteínas somáticas de *Haemonchus contortus* adulto. Sendo assim, podem ser utilizadas no design de imunizantes para ovinos e caprinos 14.

Para o desenvolvimento de uma vacina a identificação de determinantes antigênicos (epítomos) é uma etapa importante que pode ser realizada com estudos *in silico* das proteínas de interesse utilizando as ferramentas de bioinformática. O uso da bioinformática para identificação de epítomos permite auxiliar e orientar os métodos experimentais além de proporcionar informações bio/físico-químicas e evolutivas dos mesmos. Além disso, através da bioinformática é possível conhecer a estrutura tridimensional (3D) de proteínas e com isso buscar por sequências de aminoácidos da proteína que apresentem maior imunogenicidade 15-17.

O objetivo do estudo foi analisar as sequências das proteínas H11 e Hc23 do *H. contortus*, por meio de ferramentas de bioinformática em busca de potenciais epítomos *in silico*, com maior imunogenicidade para design de vacina contra *Haemonchus contortus*.

MÉTODOS

Obtenção das sequências proteicas

Para obtenção da sequência das proteínas foi utilizado o site do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e o site da Universal Protein Resource (UniProt) (<https://www.uniprot.org/>), que contém recursos abrangentes de sequências proteicas e informações funcionais.

Avaliação da topologia proteica

A partir das sequências proteicas foi feita a identificação da região correspondente ao peptídeo sinal e das regiões transmembranares das proteínas.

As sequências foram submetidas aos servidores SignalP-5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0/>) que procura a presença de peptídeos de sinal e o seu local de clivagem nas proteínas e ao servidor TOPCONS (<http://topcons.cbr.su.se/>), para verificar a topologia das proteínas de membrana e predição de peptídeo sinal. Utilizou-se também o servidor TMHMM v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) para predição de hélices transmembranares nas proteínas.

Para verificar como a proteína é inserida na membrana empregou-se o site Protter (wlab.ethz.ch/protter/) e para visualizar se a proteínas tem regiões ordenadas ou desordenadas foi utilizado o servidor IUPred2A (<https://iupred2a.elte.hu/>), que possibilita a identificação de regiões estáveis ou não estáveis nas proteínas, dependendo do estado redox do seu ambiente.

Estrutura tridimensional

As estruturas 3D das proteínas foram obtidas pelo modo de modelagem intensivo do servidor Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0 (PHYRE2) (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>). O servidor gerou arquivos Protein Data Bank (PDB) que possibilitam análise em softwares como o UCSF CHIMERA.

Predição de epítomos de células B

Para o estudo de predição de epítomos para linfócitos B empregou-se o servidor Immune Epitope Database (IEDB) (<http://www.iedb.org/>), no tópico “Ferramentas de Previsão de Epítomo de Células B” (<http://tools.iedb.org/bcell/>). Neste foram utilizados três métodos para avaliar antigenicidade: Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0, Bepipred Linear Epitope Prediction, Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity. Também foram feitas as análises de volta beta (método: Chou & Fasman Beta-Turn Prediction), acessibilidade (método: Emini Surface Accessibility Prediction), flexibilidade (método: Karplus & Schulz Flexibility Prediction) e hidrofiliçidade (método: Parker Hydrophilicity Prediction).

As sequências de melhores escores encontradas foram conferidas no servidor VaxiJen: Prediction of Protective Antigens and Subunit Vaccines (VaxiJen v2.0) (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>) para verificar se as sequências encontradas poderiam induzir a produção de anticorpos protetores.

Predição de epítomos de células T (Complexo Principal de Histocompatibilidade I e II)

Para predição de bons epítomos para o Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) I foi feita utilizando o servidor IEDB (<http://tools.iedb.org/main/tcell/>). Foram utilizadas as análises do site: MHC-I Binding Predictions, Class I Immunogenicity e MHC-I Processing Predictions. Foram escolhidos alelos de Antígeno leucocitário humano (HLA) para estas análises. As sequências de melhores escores foram submetidas à análise do servidor VaxiJen v2.0.

Para predição de bons epítomos para MHC II foi feita a análise no servidor IEDB onde foi utilizada a análise: MHC-II Binding Predictions (<http://tools.iedb.org/mhcii/>) e estas sequências foram posteriormente analisadas pelo Proteochemometric tool for MHC class II binding prediction (EpiTOPV3) (<http://www.ddg-pharmfac.net/EpiTOP3/>).

Em uma segunda análise buscando mais sequências com forte ligação ao MHC classe II utilizou-se o Binding of peptides to MHC class II molecules (NETMHCII) (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetMHCII-2.3/>).

Predição de epítomos de células T citolíticas (CTL)

Foi utilizado para predição de sequências para Células T o servidor CTLPred (<http://crdd.osdd.net/raghava/ctlpred/>) que prevê epítomos de células T citolíticas (CTL) utilizando as abordagens Quantitative Matrix (QM), Support Vector Machine (SVM) e Artificial Neural Network (ANN), além de facilitar a previsão de restrição de MHC em epítomos de células T previstos. As análises foram feitas em 5 métodos: Quantitative matrices based, Only ANN Based, Only SVM Based, Consensus Approach e Combined Approach.

Para confirmar se as regiões encontradas era boas regiões para se ligar ao linfócito T ainda foi utilizado o servidor Prediction of CTL epitopes in protein sequences (NetCTL 1.2) (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetCTL-1.2/>).

Análise de peptídeos e antígenos na estrutura 3D das proteínas

Para analisar as estruturas tridimensionais e destacar as regiões consideradas imunogênicas em análises prévias, arquivo em extensão PDB foi submetido ao programa Extensible Molecular Modeling System - UCSF CHIMERA

(<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera>). O software visualiza e analisa, de forma interativa, as estruturas moleculares.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após estudo da morfologia e ciclo de vida do parasito *Haemonchus contortus* foram selecionadas as proteínas H11 e Hc23 como potenciais antígenos. Primariamente foi realizada a busca pela sequência de aminoácidos dessas proteínas e foi identificado que a proteína H11 possui 972 e a Hc23 tem 201 resíduos de aminoácidos.

Após obter as sequências das proteínas foi possível analisar a topologia das proteínas e se possuíam peptídeo sinal e região transmembrana. A topologia das proteínas verifica se as proteínas são exportadas para o ambiente extracelular ou se são proteínas ancoradas na membrana e parede celular. Aquelas que possuem exposição extracelular são acessíveis às células do sistema imune, constituindo potenciais alvos para uso como antígenos 10.

H11 não possui peptídeo sinal, mas possui uma região transmembrana de 35 resíduos de aminoácidos. A região transmembrana foi excluída da proteína, por não ser uma região alvo de anticorpos e a sequência final, com 937 aminoácidos seguiu para o estudo (figura 1).

Hc23 possui na sequência inicial uma região de peptídeo sinal e região transmembrana contendo 22 aminoácidos. Esta região foi excluída e a proteína que seguiu para análise correspondeu a 179 aminoácidos (figura 1). Peptídeo sinal é uma sequência que possui entre 15 e 30 aminoácidos, geralmente localizado na região N-terminal da proteína. Esta sequência tem a função de marcar proteínas que serão exportadas para determinados locais, como exemplo o meio extracelular 17.

Na análise das regiões de desordem das moléculas, ambas proteínas mostraram ser bem ordenadas.

Figura 1: Estrutura Tridimensional das proteínas H11 e Hc23



As imagens acima mostram a estrutura tridimensional (representação em fita) das duas proteínas de *H. contortus* após exclusão da região transmembrana e/ou peptídeo sinal. Estas estruturas foram alvo nos estudos de epítomos. Fonte: Elaborada pelos autores utilizando o Software UCSF Chimera.

Após a primeira análise da proteína, foi realizada a predição de epítomos para células B e T. As células B tem um importante papel na imunidade humoral e é um componente essencial do sistema imune adaptativo. A principal função das células B é a produção de anticorpos contra antígenos 19,20. A produção e consequente proteção conferida pelos anticorpos após exposição ao patógeno é extremamente importante. Anticorpos possuem diversas funções, a citar: opsonização de antígenos e, consequente estimulação da sua fagocitose, ativar o sistema complemento e/ou provocar citotoxicidade na célula alvo e a neutralização da entrada de patógenos nas células. Assim, antígenos capazes de induzir produção de anticorpos de forma satisfatória são alvos da vacinologia 21.

As células T são responsáveis pela defesa do organismo contra patógenos invasores, são capazes de induzir respostas efectoras e a autodestruição das células apresentadoras de antígenos 19. Além dos programas que identificam quais sequências podem induzir resposta positiva das células T, outros algoritmos produzem predições que podem apontar se tais conjuntos de aminoácidos são capazes de produzir resposta de anticorpos (pelas células B) 17.

Predição de células B

Com a consulta ao IEDB foi realizada a predição de células B através de três métodos (Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0, Bepipred Linear Epitope Prediction, Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity) que avaliam antigenicidade (tabela 1) e foi possível analisar as propriedades físico-químicas: volta beta, flexibilidade, acessibilidade e hidrofobicidade. Estas propriedades influenciam sobre os epítomos, mas individualmente não são suficientes para realizar uma predição totalmente precisa, por isso devem ser analisadas em conjunto.

Foi possível identificar 29 sequências antigênicas para H11 e 14 para Hc23. Na tabela 1 são exibidos os epítomos de Células B selecionados pelos melhores escores obtidos por estes métodos.

Para uma proteína ser considerada um candidato vacinal, ela precisa ter potencial imunogênico. Assim, para a predição das sequências que possam ser consideradas como antígenos, foi utilizado o software VaxiJen v2.0 que avalia a capacidade imunoestimulante de proteínas independente da realização de alinhamento da sequência com antígenos protetores. O preditor permite classificar o antígeno com base nas propriedades físico-químicas das proteínas sem recorrer ao alinhamento da sequência. O limiar determinado para identificar proteínas com potencial imunoestimulante foi de 0,5, este valor indica uma maior precisão, sensibilidade e especificidade, quanto as análises realizadas para validação 22. Portanto, as sequências que obtiveram um limiar $\geq 0,5$ foram selecionadas (tabela 1).

Tabela 1 - Epítomos de Células B selecionados

PROTEÍNA	EPÍTOPOS SELECIONADOS	
	Método: Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0	Vaxijen v2.0
H11	TRKAFDTSEKPGKDDTGGKDKDNSPSAAEL	0.3983
	KKLFDDEV MNKCRDGOAATECVRIA	0.9902
	KADSVASSHPLSFRIDKAAEVEEA	0.6703
	RSQQQIDQLKNLQKNGMNARQFGA	0.6281
	YKANKDAVEREKYRHPKYGFKWD	0.4552
	ELVSGDKKLEIESVKEHPRL	0.4934
	GGDYAFDKVMELYTAETLAL	0.4726
	KSSIDFIANNYRNDKLF	0.7165
	QEGDKKEIKRTWLRRD	0.5629
	ERAQNRVDWIKKHFQK	0.6696
	YGFYRQNHASGWKK	0.3702
	LPGYVDFPPEKNL	0.6838
	TDVEGPDGKPMRT	1.0377
Hc23	HPPPECGLPPFVNDLPADDQAK	-1,1692
	NWKEGDKCY	-1,1692
	LLPPPVRKAPEEVQE	0,1459
	TIPVEEKHK	1,0475
	TLSPEAKAAY	0,5896
	Método: Bepipred Linear Epitope Prediction	Vaxijen v2.0
H11	FDTSEKPGKDDTGGKDKDNSPSA	0.5620
	QTTYTPDGTPKIAAVSQNEPMD	0.0734
	TDVEGPDGKPMRTTEFASQ	1,1470
	RYKANKDAVEREKYRHPK	0.9667
	GIEVNGDGEISGD	3,3430
	PSAFNDVAANPI	-0.0345
Hc23	GLPPFVNDLPADDQAK	0,6451
	KDIWKNWKEGDKCYHEQGL	0,1550
	TEIRRKISKDALLPPPVRKAPEE	0,2593
	RKIINDKTIPVEEKHKMNELAQVLTGDNLKEYNEFTAHIEDRHKAVKAAT	0,7899
	QVFKLRHSKS	0,2075
	Método: Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity	Vaxijen v2.0
H11	AAELLPSNIKPLSYDLTIKTYLPGYVDFP	1.0402
	LRLALGCHKDVTALKGLLRAL	0.5940
	ATECVRIAAPLRSSVYCYGV	1,1120
	KISVIPQECLELVSGD	0.5939
	QILLKVGYIGLISN	1,0110
	HTYVERVIPACTSG	0.4133
	QYALQSGIKCIEF	0.5240
	ADSVASSHPLSFR	0.5241
	SSYLLAVMVSEF	1,1470
	LWAVFDEVVTDV	-0,2501
Hc23	PECGLPPFVNDL	0,5553
	KDALLPPPVRK	0,1407
	KAVKAATLS	0,9879
	EELFQVFKLRHS	-0,2091

A tabela acima mostra os epítomos de Células B selecionados pelos melhores escores obtidos por diferentes métodos e analisados pelo VaxiJen v2.0 em maio de 2021. Fonte: Elaborada pelos autores

Predição de células T

Os epítomos de células T são apresentados pelas células apresentadoras de antígenos, assim estes fragmentos de antígenos ou epítomos estão ligados a moléculas MHC 19,20.

Todas as células somáticas nucleadas apresentam moléculas MHC classe I, ligadas a epítomos. Estas são apresentadas para as células T citotóxicas as quais induzem apoptose nas células infectadas ou doentes. O número de aminoácidos nos epítomos apresentados pelas moléculas MHC classe I se encontra entre 8 e 11, principalmente apresentados a células T CD8+ ou citotóxicas. As moléculas MHC classe II apresentam epítomos com tamanhos entre 13 a 17 aminoácidos para células T CD4+ ou Helper que participam ativando células B que se transformam em plasmócitos 23.

Dessa forma, é importante ter epítomos que sejam bons na predição de linfócitos B e T, sendo que no linfócito T estes devem ser bons para MHC I e MHC II já que uma vacina ideal deve ser capaz de estimular as respostas imunes celulares e humorais 24.

Para o MHC, existem duas opções de escolha de sequências baseadas no score. A primeira é optar pelas sequências com maiores escores e a segunda é escolher sequências identificadas nas análises anteriores e verificar seus scores.

Para predição de bons epítomos para MHC I e MHC II as sequências iniciais com 937 aminoácidos para H11 e 179 para Hc23 foram utilizadas.

Para análise de ligação ao MHC Classe I, foi utilizada a ferramenta MHC-I Binding Predictions do IEDB para diferentes alelos. Foram encontradas diversas sequências, dentre estas 6 sequências que se ligam ao MHC classe I foram escolhidas por apresentar melhores scores para H11 e 12 sequências para Hc23 (tabela 2). Em seguida essas regiões foram testadas para verificar se possuíam imunogenicidade. Todas demonstraram ser bons imunógenos. Posteriormente, foi verificado o processamento das regiões pela célula para serem apresentados observando se o este era igual ou em uma região diferente para ajustar o tamanho do peptídeo. As sequências de maiores escores foram analisadas pelo VaxiJen v.2.0. Das 6 sequências, 4 delas apresentaram score acima de 0,5 o que indica que conferem anticorpo protetor, já para a Hc23, das 12 sequências, apenas 2 conferem anticorpo protetor.

Para análise de ligação ao MHC Classe II, foi utilizada inicialmente a ferramenta MHC-II Binding Predictions do IEDB para diferentes alelos, seguida da análise pelo EpiToPv3. Em seguida, para buscar mais sequências com forte ligação ao MHC classe II utilizou-se o site

NETMHCII. Diversas sequências foram encontradas, no entanto foram escolhidas aquelas que apresentavam melhores scores, sendo 13 para H11 e 7 para Hc23.

A Tabela 2 mostra a predição de ligação ao MHC-I e MHC-II provenientes de alelos de HLA. A escolha das sequências foi baseada nos maiores escores.

Ainda na predição de boas sequências para células T, foi realizada a busca de bons epítomos para CTL (células T citolíticas) utilizando os servidores CTLPred e NetCTL. Foram localizados 3 bons peptídeos para H11 e 2 para Hc23.

A Tabela 2 exibe as sequências de aminoácidos que foram preditas pelos servidores como “bons” epítomos de CTL. Da mesma forma como na predição do MHC, as sequências escolhidas são as que possuem melhores escores ou aquelas identificadas em análises prévias com confirmação do escore para epítomos de CTL.

Tabela 2 – Epítomos selecionados pela predição de ligação de células T

EPÍTOMOS SELECIONADOS	PROTEÍNAS	
	H11	Hc23
MHC I	RSQQQIDQLKNL RVDWIKKHFQKL YVDFPPEKNLTF KPMRTTEFASQW LLPSNIKPLSY QQILLKVGYIGL	EQGLTRDLVETL LEKEKHDIIASL EQFRKIINDKTI LPPVVRKAPEEV HPPPECGLPPFV KHKKMNELAQKV TEIRRKISKDAL KTIPVEEKHKKM EAKAAYDKIAKL ELAQKVLTDGDL EQGLTRDLVETL EQFRKIINDKTI
MHC II	TYFTRKAFDTSEK RVEISMVIEPTKS LLKVGYIGLISNLGGIYQT DEPKYKANWTVTVIH SSHPLSFRIDKAAEVEEAFDDITYAKGASVLTMLRA ASQWTTQMGGFPVISV KRTWLRREPLYLHV ETEYLPLEIAMSGISS LKPMYEKSSIDFIA FFQJNLQKDVIDMFCAL EGGDYAFDKVMELY RISSFVRMQDIPSAFNDVAANPI TSGIRSQQQIDQLKNL	PPPECGLPPFVNDLPADDQAK YHEQGLTRDLVETLPTIERR EEVQEQRKIINDKTIPEVEEKHKKMNE FTAHIEDRHKAVKAATLSPEA KEKHDIASLNEQAQEELFQVFKLRHSKSA QEQRKIINDKTIPV ELFQVFKLRHSKSAK
CTL	FASQWTTQM FELLKYAEK IEYETVFEL	GLPPFVNDL ETLPTIERR

A tabela acima mostra os epítomos selecionados na predição de células T (MHC-I, MHC-II e CTL) em maio de 2021. Fonte: Elaborada pelos autores.

Sequências escolhidas

Todos os epítomos selecionados em diferentes ferramentas e softwares considerados como regiões imunogênicas foram analisados no programa UCSF CHIMERA para visualizar se as sequências demonstravam estar na superfície externa da proteína. No software foi possível analisar as estruturas tridimensionais com distinção dos segmentos, também pode-se observar a localização dos antígenos na molécula, conhecer as estruturas secundárias, bem como visualizar o estado rotacional das proteínas.

Após estudo das sequências obtidas nos servidores, foram escolhidas aquelas que tiveram os melhores escores, que possuíam localização externa na estrutura 3D e que atendessem aos requisitos para um bom antígeno vacinal. As sequências selecionadas estão apresentadas na tabela 3.

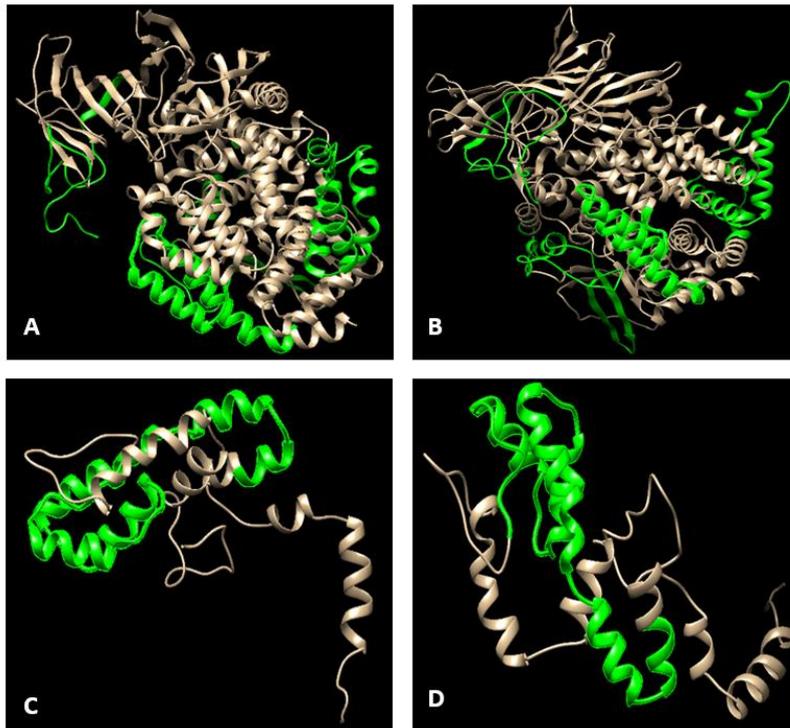
Tabela 3 - Sequências peptídicas obtidas ao final das análises.

PROTEÍNA	NÚMERO DE AMINOÁCIDOS	SEQUÊNCIA
H11	45	TYFFTRKAFDTSEKPGKDDTGGKDKDNPSAAELLPSNIKPLSY
	62	TDVEGPDGKPMRTTEFASQWTTQMGPVISVAEFNSTTLKLTQSRKANKDAVEREKYRHPK
	73	LKPMYEKSSIDFIANNYRNDKLEFFQINLQKDVIDMFCALGSQDCRKKYKLLFDDEVMMNKRCDGQAA TECVRIA
	50	TSGIRSQQQIDQLKNLQKNGMNARQFGAFDKAIERAQRVDWIKKHFQKL
Hc23	77	LLPPPVRKAPEEVQEQRKIINDKTIPVEEKHKKMNELAQKVLTDGNLKEYNEFTAHIEDRHKAVKA ATLSPEAKAA

A tabela acima apresenta as sequências mais imunogênicas do *Haemoncus contortus* para design da vacina. Fonte: Elaborada pelos autores.

As sequências escolhidas (tabela 3) estão destacadas na estrutura 3D das proteínas na figura 2.

Figura 2: Antígenos potenciais das proteínas H11 e Hc23



As imagens acima apresentam as proteínas H11 e Hc23 com os potenciais antígenos (em verde) em diferentes ângulos. (A e B) - Proteína H11, (C e D) - Proteína Hc23. Fonte: Elaborada pelos autores com o uso do Software UCSF Chimera.

Este estudo apresenta limitações a serem destacadas. Muitos antígenos que demonstram ser imunogênicos *in vitro* podem não apresentar o mesmo resultado *in vivo*, sendo necessário testá-los posteriormente em estudos experimentais. Além disso, apenas os programas gratuitos foram utilizados para análise dos epítomos o que pode ser um fator limitante para uma análise mais completa e aprofundada. E por último, faz-se necessário a realização de mais estudos com o parasito devido à mutações que podem vir a ocorrer, polimorfismos e demais características da variabilidade genética.

Os resultados deste estudo demonstram que a combinação de análises de bioinformática são ferramentas úteis e importantes para a identificação de epítomos *in silico* potencialmente capazes de disparar resposta imunogênica. As análises fornecem informações teóricas fundamentais para testar a hipótese em laboratório o que diminui o número de elementos candidatos aos testes *in vivo* que demandam maior tempo e recursos financeiros. Sendo assim,

a bioinformática é uma metodologia útil no desenvolvimento de vacinas por meio dos métodos de vacinologia reversa e vacinas gênicas 18,25,26.

CONCLUSÃO

Através da bioinformática com o uso de algoritmos e softwares valendo-se de screening computadorizado de alto rendimento pode-se unir informações do genoma aos conceitos de vacina. Essa seria a primeira etapa de predição *in silico* para design de vacinas por tecnologias baseada em genômica e também em proteômica utilizadas globalmente por pesquisadores e empresas desse ramo.

Neste estudo foi possível determinar as sequências peptídicas que continham maiores escores para induzir a produção de anticorpos protetores e que apresentavam localização acessível na estrutura tridimensional das proteínas com potencial de induzir resposta imune. As sequências das proteínas H11 e Hc23 do *Haemonchus contortus* que continham esses requisitos foram qualificadas como “bons” antígenos. No entanto, é necessário realizar a comprovação dos epítomos obtidos através de experimentos para avaliar a resposta imune *in vivo* e dessa forma utilizá-los na produção de vacinas contra a hemoncose trazendo benefícios para a cadeia produtiva bem como para o meio ambiente.

REFERÊNCIAS

1. CLIMENI, Bruno Santi Orsi et al. Hemoncose ovina. Revta Cient. Eletr. Med. Vet., São Paulo, v. 6, n. 11, p. 1-7, 2008.
2. DA SILVA ROBERTO, Francisca Fernanda et al. Nematoides gastrintestinais na ovinocultura de corte sob regime de pastejo. PUBVET, v. 12, p. 147, 2018.
3. VILLAR, David et al. Haemonchosis en una ternera raza Brahman en el trópico alto del Nordeste Antioqueño. CES Medicina Veterinaria y Zootecnia, v. 13, n. 2, p. 173-183, 2018.
4. BERTAGNON, Heloisa Godoi et al. Efeito do parasitismo por *Haemonchus contortus* sobre o metabolismo oxidativo de leucócitos de ovinos. Ciência Animal Brasileira, v. 20, 2019.
5. DA SILVA, Helenara Machado. Nematodioses gastrointestinais de caprinos: uma revisão. Revista de Ciências Agroveterinárias, v. 13, n. 2, p. 199-208, 2014.

6. SILVA, Gabriella Meneses Freitas et al. *Haemonchus contortus* em ovinos e caprinos. PUBVET, v. 13, p. 130, 2019.
7. SCZESNY-MORAES, Eurico A. et al. Anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes in sheep, Mato Grosso do Sul, Brazil. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 30, n. 3, p. 229-236, 2010.
8. TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. Parasitologia Veterinária. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.
9. ENDO, Vanessa Tiemi et al. Prevalência dos helmintos *Haemonchus contortus* e *Oesophagostomum columbianum* em pequenos ruminantes atendidos no setor de anatomia patológica–UEM. Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública, v. 1, n. 2, p. 112-118, 2014.
10. MENDES, Janaína Palermo et al. *Haemonchus contortus* e medidas estratégicas de controle para ovinos. Ensaios e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde, v. 24, n. 2, p. 105-110, 2020.
11. KNOX, David P. et al. The nature and prospects for gut membrane proteins as vaccine candidates for *Haemonchus contortus* and other ruminant *Trichostrongyloids*. International Journal for Parasitology, v. 33, n. 11, p. 1129-1137, 2003.
12. MUNN, Edward A. et al. The potential value of integral membrane proteins in the vaccination of lambs against *Haemonchus contortus*. International Journal for Parasitology, v. 23, n. 2, p. 261-269, 1993.
13. GEORGI, J. R.; BOWMAN, Dwight D. Georgis Parasitologia Veterinária. 9. ed. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier, p.432, 2010.
14. FAWZI, Elshaima M. et al. Vaccination of lambs against *Haemonchus contortus* infection with a somatic protein (Hc23) from adult helminths. International Journal for Parasitology, v. 44, n. 7, p. 429-436, 2014.
15. DE MACEDO JUNIOR, Lafayete Modesto; MELO, Tuane Ferreira; PECONICK, Ana Paula. Predição *in silico* de epítomos antigênicos para produção de uma vacina humana contra leishmaniose visceral. Scire Salutis, v. 9, n. 1, p. 62-71, 2019.
16. PETERSON, Celeste N. et al. An idea to explore: Use of augmented reality for teaching three-dimensional biomolecular structures. Biochemistry and Molecular Biology Education, v. 48, n. 3, p. 276-282, 2020.
17. PEREIRA, Nayara Gonçalves et al. Bioinformática como ferramenta na análise de epítomos antigênicos no design de vacinas contra *Anaplasma marginale*, *Leishmania* spp., SARS-Cov-2 e toxina de *Clostridium septicum*. Brazilian Journal of Development, v. 7, n. 4, p. 41634-41650, 2021.
18. MARQUES, Andressa Souza et al. Identificação *in silico* de potenciais alvos antigênicos de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. PUBVET, v. 13, p. 153, 2019.
19. MESQUITA JÚNIOR, Danilo et al. Sistema Imunitário-parte II: Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. Revista Brasileira de Reumatologia, v. 50, n. 5, p. 552-580, 2010.
20. ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. Imunologia Básica - funções e distúrbios do sistema imunológico. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2021.

21. SORGI, Sara et al. São Paulo School of Advanced Sciences on Vaccines: an overview. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 26, p. e20190061, 2020.
22. DOYTCHINOVA, Irini A.; FLOWER, Darren R. Bioinformatic approach for identifying parasite and fungal candidate subunit vaccines. *The Open Vaccine Journal*. v. 1, n.1, p. 22–26,2008.
23. MOTA JÚNIOR, André Oliveira.; RAMOS, Maria Tereza Bento Pimentel; MOTA, Letícia de Melo. *Imunologia Essencial*. 1.ed. Rio de Janeiro: Gramma, 2018.
24. YANG, Jieru et al. Cell-penetrating peptides: efficient vectors for vaccine delivery. *Current Drug Delivery*, v. 16, n. 5, p. 430-443, 2019.
25. PINTO, Eduardo Fonseca; MATTA, Nubia Estela; DA-CRUZ, Alda Maria. Vacinas: progressos e novos desafios para o controle de doenças imunopreveníveis. *Acta Biológica Colombiana*, v. 16, n. 3, p. 197-212, 2011.
26. DE MACEDO JUNIOR, Lafayette Modesto; MELO, Tuane Ferreira; PECONICK, Ana Paula. Predição *in silico* de epítomos antigênicos para produção de uma vacina humana contra leishmaniose visceral. *Scire Salutis*, v. 9, n. 1, p. 62-71, 2019.