

Bioinformática como ferramenta na análise de epitopos antigênicos no design de vacinas contra *Anaplasma marginale*, *Leishmania spp.*, SARS-Cov-2 e toxina de *Clostridium septicum*

Bioinformatics as a tool in the analysis of antigenic epitopes in the design of vaccines against *Anaplasma marginale*, *Leishmania spp.*, SARS-Cov-2, and *Clostridium septicum* toxin

DOI:10.34117/bjdv7n4-566

Recebimento dos originais: 04/02/2021

Aceitação para publicação: 01/03/2021

Nayara Gonçalves Pereira

Graduada em Farmácia

Mestranda em Biotecnologia

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia / Universidade Estadual de Montes Claros

Endereço: Campus Universitário Darcy Ribeiro. Avenida Dr. Rui Braga, s/n, Vila Mauricéia, Prédio 7, sala 201. CEP: 39401-089. Montes Claros, Minas Gerais

E-mail: nayarafarm1989@gmail.com

Leonardo Ferreira Oliveira

Graduado em Biomedicina

Mestrando em Biotecnologia

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia / Universidade Estadual de Montes Claros

Endereço: Campus Universitário Darcy Ribeiro. Avenida Dr. Rui Braga, s/n, Vila Mauricéia, Prédio 7, sala 201. CEP: 39401-089. Montes Claros, Minas Gerais

E-mail: leolfo@gmail.com

Júlia Rodrigues Ortega

Graduada em Ciências Biológicas

Mestranda em Biotecnologia

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia / Universidade Estadual de Montes Claros

Endereço: Campus Universitário Darcy Ribeiro. Avenida Dr. Rui Braga, s/n, Vila Mauricéia, Prédio 7, sala 201. CEP: 39401-089. Montes Claros, Minas Gerais

E-mail: juliarortegar@gmail.com

Mariana Santana Versiani

Graduada em Ciências Biológicas

Mestranda em Biotecnologia

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia / Universidade Estadual de Montes Claros

Endereço: Campus Universitário Darcy Ribeiro. Avenida Dr. Rui Braga, s/n, Vila Mauricéia, Prédio 7, sala 201. CEP: 39401-089. Montes Claros, Minas Gerais

E-mail: marianaversiani97@gmail.com

Alexandre Moisés Ericsson de Oliveira

Doutor em Agronomia

Programa de Pós-graduação em Agronomia / Universidade Federal de Uberlândia
Endereço: Campus Umuarama. Rua Acre, s/n, Bloco 2E, sala 123. CEP: 38402-000.

Uberlândia, Minas Gerais

E-mail: moisesericsson@gmail.com

Alessandra Rejane Ericsson de Oliveira Xavier

Doutora em Biologia Molecular

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia / Universidade Estadual de Montes
Claros

Endereço: Campus Universitário Darcy Ribeiro. Avenida Dr. Rui Braga, s/n, Vila
Mauricéia, Prédio 7, sala 201. CEP: 39401-089. Montes Claros, Minas Gerais

E-mail: alessandra.ericsson@unimontes.br

Mauro Aparecido de Sousa Xavier

Doutor em Biologia Molecular

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia / Universidade Estadual de Montes
Claros

Endereço: Campus Universitário Darcy Ribeiro. Avenida Dr. Rui Braga, s/n, Vila
Mauricéia, Prédio 7, sala 201. CEP: 39401-089. Montes Claros, Minas Gerais

E-mail: mauro.xavier@unimontes.br

RESUMO

Introdução: A Bioinformática é o ramo que abrange todas as concepções de aquisição, como: processamento, armazenamento, distribuição, análise e interpretação de informação biológica, embasada na matemática, ciências da computação e na biologia molecular. O presente trabalho consistiu em uma análise teórico-prática baseada em princípios sobre vacinologia, utilizando programas de bioinformática disponíveis, para a construção de uma possível vacina contra *Anaplasma marginale*, *Leishmania spp.*, SARS-CoV-2 e *Clostridium septicum*. Metodologia: O desenvolvimento iniciou com a escolha das proteínas de trabalho durante o rastreamento de proteínas viáveis tais como MSP4, Rab, Spike e α -Toxina dos microrganismos supracitados, respectivamente. Utilizando-se de servidores e softwares disponíveis para mapeamento de epitopos de células B e T, estas proteínas foram analisadas para obtenção de epitopos com maior imunogenicidade capazes de estimularem a resposta imune. Resultados: Com as análises realizadas e concluídas, obteve-se várias sequências peptídicas, que foram, a priori, selecionadas as sequências de maiores escores no programa Vaxijen. Conclusões: As sequências escolhidas apresentaram localização acessível na estrutura tridimensional que as caracterizam como bons antígenos e, portanto, a comprovação dos epitopos obtidos deve ser realizada em experimentos *in vivo* na resposta imune e assim possibilitando o uso destes peptídeos na produção de potenciais vacinas.

Palavras-Chave: Bioinformática, Vacinologia Reversa, Epitopos Antigênicos, Design de Vacinas.

ABSTRACT

Introduction: Bioinformatics is the branch that covers all conceptions of acquisition, such as: processing, storage, distribution, analysis and interpretation of biological information, based on mathematics, computer science and molecular biology. This work consisted of an analyze based on vaccinology principles, using available bioinformatics' programs, for the construction of a possible vaccine against *Anaplasma marginale*, *Leishmania* spp., SARS-Cov-2, and *Clostridium septicum*. **Methodology:** The development started with chosen the working proteins and the results obtained during the screening of viable proteins MSP4, Rab, Spike and α -Toxin of the aforementioned microorganisms, respectively. Through servers and software available to mapping B and T cells putative epitopes, those proteins were analyzed to obtain putative epitopes with greater immunogenicity capable to stimulating the immune response. **Results:** With the analyses completed in the servers, several peptides sequences were obtained, that a priori, selected according to their Vaxijen scores. **Conclusions:** The selected sequences presented an accessible location in the three-dimensional structure that characterizes them as putative good antigens, and in vivo experiments should be carry-out to prove their immune response and then allowing their uses as potential vaccines peptides.

Keywords: Bioinformatics, Reverse Vaccination, Antigenic Epitopes, Vaccine Design.

1 INTRODUÇÃO

A Bioinformática compreende todas as concepções de aquisição, como: processamento, armazenamento, distribuição, análise e interpretação de informação biológica, embasada na matemática, ciências da computação e na biologia molecular. O desenvolvimento de algoritmos e softwares, assim como o surgimento da transcriptômica e proteômica, genômica funcional e biologia de sistemas possibilitaram integrar as informações do genoma aos conceitos de vacinas (DAMIÃO, 2019; ENAYATKHANI et al., 2020; NENKO, KYBALNA & SNISARENKO, 2020).

Através da bioinformática é possível desenvolver a estruturação de proteínas tridimensionais (3D), o que facilita a procura por sequências de aminoácidos da proteína de interesse que apresentem considerável imunogenicidade referente às suas regiões de estímulo a resposta imune (DAMIÃO, 2019; PETERSON et al, 2020).

A vaccinologia reversa fundamenta-se na utilização de sequências genômicas de um microrganismo predeterminado. Parte da busca de potenciais candidatos à vacina valendo-se de *screening* computadorizado de alto rendimento. Através dessa ferramenta, é possível investigar proteínas e avaliar sua capacidade de induzir uma resposta imune adaptativa ou de se ligar a medicamentos (NAZ et al, 2019; RODRIGUES et al, 2019).

A mudança drástica do comportamento da humanidade e de suas organizações, devido ao Sars-CoV-2, causador da pandemia de COVID-19, fez com que várias instituições escolares públicas e privadas brasileiras, substituíssem as aulas presenciais por aulas em meios digitais. Dessa forma, as instituições de ensino, aderiram em massa a Educação a Distância e o Ensino Remoto, modalidades que tornam facultativa a presença, física, do estudante no mesmo local em que o professor (CAMACHO et al., 2020; CASTAMAN & RODRIGUES, 2020; RODRIGUES et al, 2019).

A. marginale é uma rickettsia intra-eritrocitária obrigatória causadora da anaplasmose em ruminantes. A anaplasmose bovina é endêmica em partes tropicais e subtropicais, caracteriza-se pela febre, perda de peso, anemia hemolítica e até mesmo morte do animal (HOVE et al, 2020). A transmissão pela *A. marginale* ocorre por meio do repasto sanguíneo do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ou de mosquitos e moscas hematófagas. A infecção ocorre mediante a penetração da parede celular do eritrócito e desenvolve-se no vacúolo do citoplasma, onde sua forma vegetativa é modificada à infectante denominada densa, capaz de sobreviver fora da célula. Quando ingerida durante o repasto sanguíneo de outro animal, reinicia-se o ciclo (HOVE et al, 2020; WATTHANADIREK et al, 2019). A vacina de cultivados inativados ou mortos de *A. marginale* apresentam eficácia parcial, devido aos problemas relacionados à segurança e baixa reprodutibilidade em larga escala (HOVE et al, 2020).

A *Leishmania spp.*, são protozoários eucarióticos dimórficos da família Trypanosomatidae, transmitidos pela picada de flebotomíneos. A Leishmaniose causada por esse microrganismo atinge alguns dos animais de estimação, especialmente, o cão, considerado o principal reservatório da doença nas cidades, em que, maioria dos casos são assintomáticos e, possivelmente, transmite a doença para humanos (FRANSSEN et al, 2020; SOUZA & LIMA, 2018). Essa patologia se manifesta através de quatro formas clínicas: leishmaniose cutânea (LC), cutânea-difusa (LCD), muco-cutânea (LCM) e visceral (LV), esta última é a mais grave e pode levar à morte do hospedeiro quando não tratado. O tratamento é complicado o que ressalta a importância de métodos de tratamento preventivo como as vacinas (MELBY, TRAVI & YANETH-OSORIO, 2019).

O SARS-CoV-2 (Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Severa 2) é um β -Coronavírus descoberto em dezembro de 2019 em Wuhan (China), causador da COVID-19, possui genoma de RNA com cadeia positiva e contém 29.700 nucleotídeos, sua

compatibilidade com a sequência do SARS-CoV é de 79,5% (LANA et al, 2020; SHEREEN, 2020; ZHANG et al, 2020). Sua transmissão ocorre através de um ser humano para outro e seu quadro clínico varia de infecções assintomáticas a quadros respiratórios graves. Os sintomas mais comuns são febre, tosse, falta de ar e dificuldades respiratórias. Atualmente, não há agentes antivirais específicos disponíveis para seu tratamento (DUAN et al., 2020).

O *Clostridium septicum* pertence ao gênero *Clostridium* da família Clostridiaceae, é uma bactéria Gram-positiva e tem como fator virulento a toxina alfa, uma toxina necrosante formadora de poros, causa gangrena gasosa traumática ou não traumática e enterocolite necrosante em animais. A principal fração de *C. septicum* responsável por elicitar anticorpos protetores é a toxina alfa. Vacinas e tratamento ainda não estão prontamente disponíveis para algumas doenças clostridiais e o diagnóstico de várias dessas doenças permanece desafiador (CHURRIA et al., 2018; GAZIOGLU et al. 2018; UZAL, NAVARRO & HOSTETTER, 2020).

Os microrganismos supracitados são agentes patógenos que ainda apresentam algum problema de saúde e/ou segurança. Diante disso, elaborou-se uma pesquisa sobre esses patógenos em busca de uma proteína viável, como, também, epitopos com maior antigenicidade. A vacina é uma alternativa importante para imunização e prevenção, principalmente, quando possuem em sua estrutura polipeptídeos que, ao serem bem selecionados, são considerados uma alternativa mais segura, com maior eficácia e apresentam grande reprodutibilidade industrial (DUAN et al., 2020; HOVE et al, 2020).

O objetivo deste trabalho consistiu no rastreamento de proteínas viáveis de *A. marginale*, *Leishmania spp.*, SARS-CoV-2 e *Clostridium septicum*, por meio de servidores e softwares disponíveis, para obtenção de potenciais epitopos, *in silico*, com maior imunogenicidade capazes de estimularem uma resposta imune.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

SELEÇÃO DAS SEQUÊNCIAS PROTEICAS

Após definidos os patógenos alvo do trabalho: *Clostridium septicum*, SARS-Cov-2 (Novo Coronavírus), *Leishmania donovani* e *Anaplasma marginale*, foram feitas buscas na literatura para aprofundar o conhecimento sobre cada patógeno e possíveis proteínas envolvidas nos mecanismos de disseminação da doença no hospedeiro.

Fez-se a busca das sequências proteicas no *Universal Protein Resource* (UniProt) (<https://www.uniprot.org/>), um recurso abrangente de sequências de proteínas e informações funcionais. Foi realizada a escolha de uma única sequência proteica com base em dois critérios básicos: 1 - a proteína deveria estar relacionada (mesmo que de forma hipotética) com o estabelecimento da doença causada pelo patógeno e estar vinculada a resposta imune do hospedeiro; e, 2 - quando submetida nos servidores que identificam regiões na membrana, a proteína deveria apresentar uma porção significativa extracelular. Foram escolhidas as proteínas com número de identificação: α -Toxina (Q53482), Spike (P0DTC2), Rab (E9ACA1) e MSP4 (Q07408).

PREDIÇÃO E ELIMINAÇÃO DO PEPTÍDEO SINAL E DA REGIÃO TRANSMEMBRANA

A partir das sequências obtidas fez-se a identificação da sequência correspondente ao peptídeo sinal e regiões transmembranares das proteínas. As sequências foram submetidas aos servidores SignalP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), que prevê a presença de peptídeos de sinal e a localização de seus locais de clivagem nas proteínas. O servidor TOPCONS (<http://topcons.cbr.su.se/>), para topologia combinada de proteínas de membrana e previsão de peptídeos de sinal. Além dos servidores supracitados, utilizou-se também o TMHMM v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) para previsão de hélices transmembranares em proteínas.

Com a intenção de conhecer melhor a proteína de trabalho, utilizou-se a ferramenta ProtParam (ExPASy) (<https://web.expasy.org/protparam/>) que mostra os principais parâmetros da sequência proteica. As sequências também foram submetidas ao servidor IUPred2A (<https://iupred2a.elte.hu/>), uma interface que possibilita a identificação de regiões proteicas que assumam ou não uma estrutura estável, dependendo do estado redox de seu ambiente.

ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL

Para a construção da estrutura tridimensional, utilizou-se o servidor *Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0* (PHYRE²) (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>), selecionou-se o Modo de

Modelagem Intensivo. O servidor também produziu arquivos de extensão *Protein Data Bank* (PDB) que possibilitam análise em softwares como Pymol, Visual Molecular Dynamics (VMD) e Chimera.

PREDIÇÃO DE EPITOPO DE CÉLULAS B

Fez-se análise de previsão de epítopos de Células B, na guia “Ferramentas de Previsão de Epítopo de Células B” (<http://tools.iedb.org/bcell/>), do servidor *Immune Epitope Database* (IEDB) (<http://www.iedb.org/>). Para esse trabalho utilizou-se os métodos “Emini surface accessibility scale”, “Kolaskar and Tongaonkar antigenicity scale”, “BepPred” e “Chou and Fasman beta turn prediction”, para prever acessibilidade da superfície, determinantes antigênicos e regiões de *beta-turn* das proteínas selecionadas, respectivamente. As sequências de melhores *scores* obtidas foram submetidas à análise de predição de antígenos protetores no servidor VaxiJen v.20 (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>). O VaxiJen é capaz de realizar uma predição se estas sequências configuram um possível antígeno, conforme um modelo previamente especificado para parasita, bactéria, tumor, vírus ou fungo.

PREDIÇÃO DE EPITOPOS LINEARES E DESCONTÍNUOS

Submeteu-se o arquivo PDB (gerado no PHYRE²) ao servidor ElliPro (<http://tools.iedb.org/ellipro/>) para previsão de epítopos lineares e descontínuos com base na estrutura tridimensional. O servidor gera tabelas com *score* de epítopos, além de possibilitar a visualização dos mesmos em estrutura tridimensional.

PREDIÇÃO DE LIGAÇÃO DO MHC-I E MHC-II

Fez-se a predição de ligação em moléculas de MHC-I e II, submetendo as sequências proteicas aos servidores *MHC-I Binding Predictions* (<http://tools.iedb.org/mhci/>) e *MHC-II Binding Predictions* (<http://tools.iedb.org/mhcii/>). Para realização dessa análise foram escolhidos alelos de Antígeno leucocitário humano (HLA), podendo-se gerar uma grande variedade de análises. As sequências de melhores *scores* obtidas foram submetidas à análise do servidor VaxiJen v.20.

PREDIÇÃO DE EPITOPOS DE CTL

Utilizou-se o servidor CTLPred (<http://crdd.osdd.net/raghava/ctlpred/>) para predição de sequências para Células T, o qual possibilita predizer epítopos de células T citolíticas (CTL) por meio de abordagens *Quantitative Matrix* (QM), *Support Vector Machine* (SVM), *Artificial Neural Network* (ANN), além de facilitar a previsão de restrição de MHC em epítopos de células T previstos. As sequências de melhores *scores* obtidas foram submetidas à análise do servidor VaxiJen v.20.

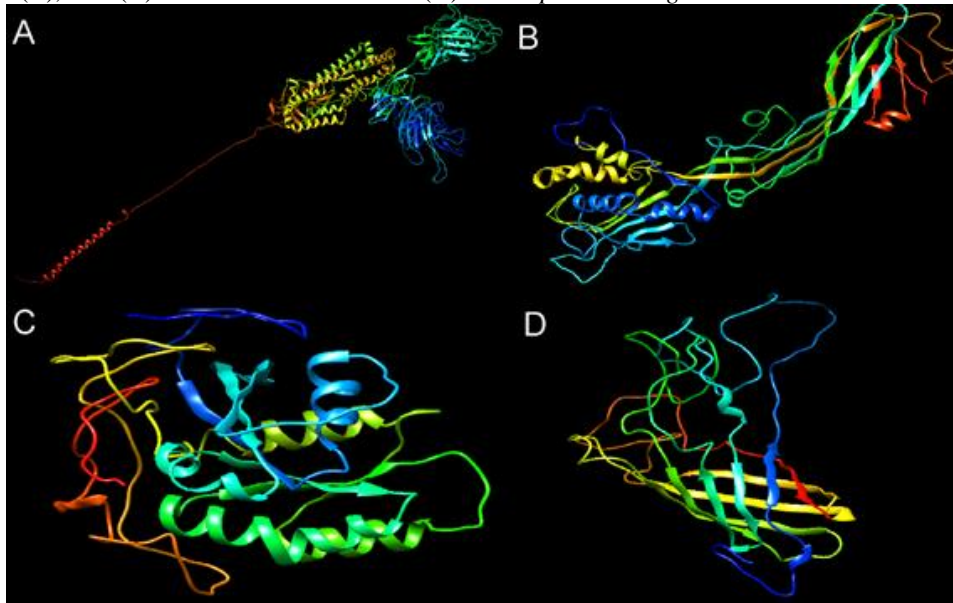
ANÁLISE DE PEPTÍDEOS E ANTÍGENOS NA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA PROTEÍNA

Para análise da estrutura tridimensional e verificação das sequências e epítopos gerados nas análises anteriores, submeteu-se arquivo PDB ao software UCSF Chimera. O software é um programa para visualizar e analisar, de forma interativa, estruturas moleculares e dados relacionados, como: mapas de densidade, trajetórias e alinhamentos de sequências. Imagens e animações de alta qualidade, também, podem ser geradas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta a estrutura tridimensional das quatro proteínas selecionadas para execução do trabalho com potencial uso na produção de vacinas. Após conclusão das análises nos servidores, as várias sequências peptídicas, que foram, a priori, selecionadas as sequências de maiores escores. A opção de trabalhar com vários segmentos da proteína ou somente uma sequência peptídica foi considerada pelo racional específico, visto que estivesse em acordo com os princípios e fundamentos apresentados pela imunologia.

Figura 1: Estrutura Tridimensional das Proteínas: Spike (A) do vírus SARS-CoV-2, α Toxina de *C. septicum* (B), Rab (C) de *Leishmania* e MSP4 (D) de *Anaplasma marginale*.



Fonte: Elaborada pelos autores utilizando o *Software* UCSF Chimera.

Os anticorpos são proteínas do sistema imune que apresentam alta especificidade antigênica. São capazes de existir durante muito tempo no organismo e podem ser reativados caso entrem em contato com o antígeno novamente. As Células B, ou linfócitos B, são as células responsáveis pela produção dos anticorpos (JAHNMATZ et al, 2020; SETLIFF et al., 2019). Com base nisso a identificação de antígenos de Células B é extremamente importante no âmbito vacinal (Tabela 1).

Tabela 1 - Epitopos de Células B selecionados pelos melhores escores obtidos por diferentes métodos e analisados pelo Vaxijen 20.

Proteína	Epitopos Selecionados	
Método: Chou & Fasman Beta-Turn Prediction		
Spike	TPGDSSSGW	PDPSKPSKR
	PGDSSSGWT	DSKVGGNYN
	LTPGDSSSG	DPSKPSKRS
MSP4	SEGGVMGGS	GGVMGGSFY
	PANFSKSGY	DGAVGYSLG
	SYVRGYDKS	ADGQYAKSG
	GAVGYSLGG	DGQYAKSGA
α -Toxina	FNAEQGWSN	GWSNTNSTT
	NAEQGWSNT	TKQUESTTYT
Rab	SNGTGGAG	STGGGAG
Método: Emini Surface Accessibility Prediction		
Spike	PDPSKPSKR	YQTQNSPR
	QTQNSPRR	QTNSPRRAR
	DPSKPSKRS	
MSP4	TSFDMRESSKETSIVRGYD	ELEASYRRF
	LFDESYKDIPA	KQVTTKLAY
α -Toxina	IPLPDKKRRGK	RYNPNDPYASGYRAKD
	TGNAREDHTEDRPT	QGWSNTNSTTETKQEST
	NESKTESKLSKTFNY	
Rab	DGANPNAQ	
Método: Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity		
Spike	YQPYRVVLSFELLHAPATVCGP	GFNCYFPLQSY
	SNLLQYGSFCTQL	SVASQSIAYTNVVIKVFCEQ
	QSLQTYVTQLLIRA	QTLALHRSY
	PHGVVFLHVTYVPA	TFKCYGVSPT
	SNCVADYSVLYNSCTEVPVAIHADQ	SGNCDVVIGI
	CNDPFLGVYYH	QVAVLYQDV
MSP4	FYVGAAYSPAFPSVT	CYDVLHTDLPVSPYVCAGI
	TIDVSVPAN	ASFVDISKQ
α -Toxina	NVAHSLGFG	GVKTSFKVGLAIAIDSK
	EHLKDLYSH	KLGTKVKKLAPLNSASFD
	GAGGKVSYLLSA	TYTATVSPQTKKRLFDVLGSQIDIP
	MKISNVRFVIDN	YE
Rab	GGIVRSPFLITP	HKLVLGDQ

Fonte: Elaborada pelos autores.

A proteção fornecida pelos anticorpos após a exposição a um patógeno é algo demasiadamente importante. Os anticorpos exibem várias funções, tais como; neutralizar a entrada de patógenos na célula hospedeira, opsonização de antígenos e, conseqüentemente, estimulam a fagocitose, ativação do sistema complemento e/ou

provocar citotoxicidade na célula alvo. Antígenos capazes de induzir resposta humoral protetora satisfatória são alvos tanto na vacinologia convencional quanto na reversa (SORGI et al, 2020). As sequências proteicas com maiores escores para prováveis antígenos protetores obtidos estão listados na Tabela 2).

Tabela 2 - Previsão de antígenos protetores pelo programa Vaxijen20

Proteína	Peptídeo	Bactéria	Vírus	Parasita
Spike	VRQIAPGQTGKIAD	0,5254	1,2606	0,7282
	NNLDSKVGG	2,2301	0,8904	1,1414
	PCNGVEGFNCYFPLVEFNCYFPL	1,2978	0,7167	0,5398
	LQIPFAMQMLQIPFAMQM	1,3218	1,0531	0,5426
	RQIAPGQTGKIADYRQIAPGQTY	0,4409	1,0688	0,4845
	SYLTPGDSS	0,7499	0,7324	1,2407
MSP4	DGQYAKSGAE	1.5416	0.7229	1.3998
	SVKFSGEAKAS	1.0089	0.7442	1.7458
	GVMGGSFYV	0.8410	0.1673	1.7556
α -Toxina	AEQGWSNTNSTTETKQESTTYTATV	1,1649	0,6130	0,7638
Rab	NGTGGAG	4,2851	0,7214	2,9734
	STGGGAG	4,0229	1,0660	2,3665
	SNGTGA	3,5824	0,7541	2,2440
	ATSSSAGGVGAAGA	2,0439	0,7686	1,8002
	AQGGRGACC	2,2049	1,3092	2,0148
	SPFLITPSAM	0,8920	0,6173	0,5955

Fonte: Elaborada pelos autores.

Uma das funções das moléculas de MHC é ligação a fragmentos peptídicos derivados de patógenos e seus produtos, sendo que eles desempenham desempenha papéis importantes no processamento e apresentação de antígenos (SHARMA, KUMAR & SHARMA, 2017). Quando um antígeno é degradado por proteassoma no citoplasma, ele é reconhecido e apresentado pelo MHC Classe I na superfície celular, ativando linfócitos T citotóxicos. Quando a captação de antígenos ocorre via endossomos, ele é reconhecido e apresentado pelas moléculas do MHC de Classe II, resultando na produção de anticorpos. Uma vacina bem elaborada deve ser capaz de melhorar as respostas imunes celulares e humorais (YANG et al, 2019). A Tabela 3 apresenta a predição de ligação a moléculas de MHC-I e MHC-II oriundas de alelos de HLA de alta frequência. A escolha das sequências pode ser feita com base no escore, ou seja, as sequências com maiores

escores, como também, pode-se selecionar sequências que haviam sido identificadas nas análises anteriores e/ou verificando seus *scores*.

Tabela 3 – Epitopos selecionados pela predição de ligação do MHC-I e MHC-II.

	MHC-I	MHC-II
Spike	PCNGVEGFNCYFPLVEFNCYFPL	VNLTTRTQLPPAYTN
	LQIPFAMQMLQIPFAMQM	LTTRTQLPPAYTNSF
	RQIAPGQTGKIADYRQIAPGQTY	TTRTQLPPAYTNSFT
MSP4	GVMGGSFYV	SGYTFAFSKNLITSF
	NFSKSGYTF	GYTFAFSKNLITSFD
	AYSPAFPSV	KSGYTFAFSKNLITS
α-Toxina	KTFNYTTSK	EQGWSNTNSTTETKQE
	IPYEGKIYM	QGWSNTNSTTETKQES
	NSYDALTSR	SNTNSTTETKQESTTYTA
	RLSMKISNV	ETKQESTTY
Rab	SPFLITPSAM	NGTGGAGEADGANPN
	QAASNGTGGAGEADG	

Fonte: Elaborada pelos autores.

Embora as Células B consigam identificar antígenos através de seus receptores (RCB), a maior parte dos antígenos, ao se ligarem a esses receptores, não estimulam a diferenciação das Células B. Há a necessidade do auxílio dos linfócitos T auxiliares (Th) e, por esse motivo, esses antígenos são denominados como “antígenos T-dependentes”. Assim sendo, é importante que vacinas contenham “antígenos T-dependentes”, visando a estimulação que culmina em células de memória e na proteção ao indivíduo vacinado (CHAGAS et al., 2019).

A interação entre as células TCD4 e o MHC-II permite a ativação das células TCD4 possibilitando a diferenciação destas tanto fenotípica quanto funcional. Os antígenos reconhecidos por essas células são específicos e auxiliam no monitoramento da imunidade adquirida através da vacinação e compreensão de muitas doenças (ELIAS, OGUNJIMI & TENDELOO, 2020).

A Tabela 4 demonstra as sequências que preditas pelo servidor como “bons” epitopos de CTL. Assim como na predição de MHC as sequências selecionadas poderiam ser as de maiores escores, ou aquelas de identificação em análises anteriores com confirmação de escore significativo para epitopos de CTL.

Tabela 4 - Predição de epitopos de CTL

Proteína	Epitopo CTL
Spike	SYLTPGDSS
	CTLKSFTVE
	QPTESIVRF
MSP4	SVKFSGEAK
	AYSPAFPSV
	ASYRRFATL
α -Toxina	KQUESTTYTA
	RAKDRLSMK
	SYDALTSRK
Rab	SPFLITPSAM

Fonte: Elaborada pelos autores.

Após análise dos resultados obtidos nos servidores, foram selecionadas as sequências que melhor atendesse aos pré-requisitos para um antígeno ou antígenos vacinais. Além dos *scores*, a localização na estrutura tridimensional também foi um critério para a escolha final das sequências. Dois resultados puderam ser observados. O primeiro foi identificação de sequências que apresentavam proximidade e/ou que se apresentava sobreposição de resíduos de aminoácidos, possibilitando trabalhar com somente uma sequência peptídica. O segundo foi à identificação de sequências em locais distantes entre si, sendo necessário trabalhar com mais de uma sequência peptídica.

Tabela 5 - Sequências peptídicas obtidas ao final das análises.

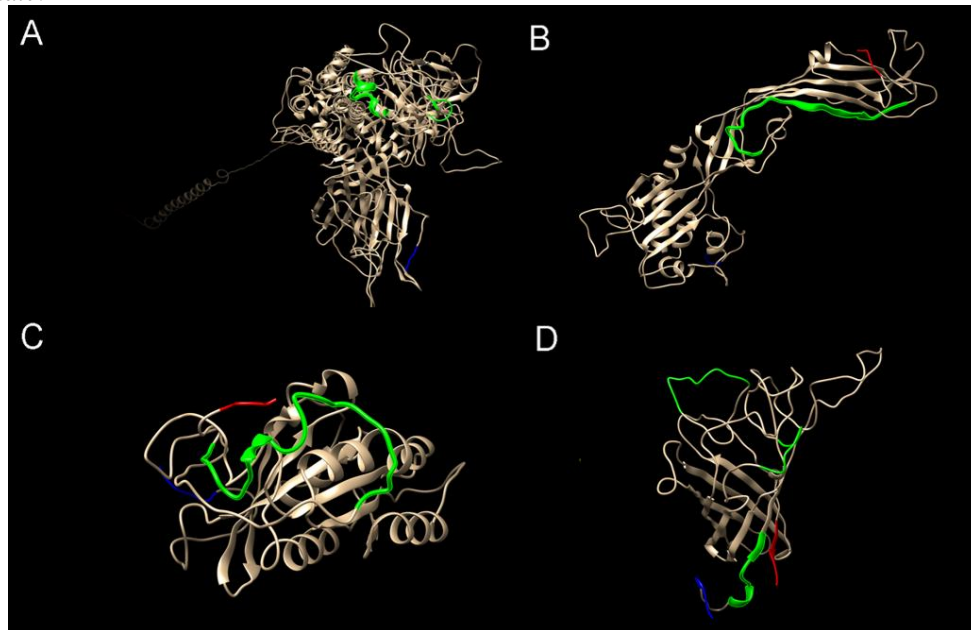
Spike	NNLDSKVGG
	VRQIAPGQTGKIAD
MSP4	SVKFSGEAKAS
	DGQYAKSGAE
	GVMGGSFYV
α -Toxina	AEQGWSNTNSTTETKQUESTTYTATV
Rab	SPFLITPSAMQAASNGTGGAGEADGANPN

Fonte: Elaborada pelos autores.

A análise das proteínas Rab e α -Toxina foi possível obter uma sequência, de cada proteína, com 29 e 25, resíduos de aminoácidos, respectivamente. Para a proteína Spike obteve-se duas sequências (9 e 14 resíduos de aminoácidos). Já a proteína MSP4 apresentou três peptídeos, sendo 11, 10 e 9 o número de resíduos de aminoácidos apresentados por cada um (Tabela 5). As sequências de potencial antigênico dos peptídeos (epitopos) selecionados (Tabela 5) estão apresentados nas estruturas tridimensionais das

respectivas proteínas (Figura 2). Portanto, foi possível a análise da estrutura tridimensional da proteína alvo podendo distinguir segmentos, localizar antígenos na molécula, reconhecer estruturas secundárias, bem como rotacional destas proteínas.

Figura 2: Estrutura Tridimensional das Proteínas apresentando os potenciais antígenos (em verde). Spike (A) do vírus SARS-CoV-2, α Toxina de *C. septicum* (B), Rab (C) de *Leishmania* e MSP4 (D) de *Anaplasma marginale*.



Fonte: Elaborada pelos autores com o uso do *Software* UCSF Chimera.

4 CONCLUSÃO

As sequências preditas para Células B, CTL, MHC-I e MHC-II apresentaram localização acessível na estrutura tridimensional que as caracterizam como “bons” antígenos. Portanto, a comprovação dos epitopos obtidos deve ser realizada em experimentos *in vivo* na resposta imune e assim verificar a possibilidade do uso destes peptídeos na produção de potenciais vacinas.

Além disso, o uso de programas de bioinformática disponíveis pode ser utilizado pelos estudantes nas áreas vinculadas a biologia molecular, bioquímica e imunologia, pois possibilita a incorporação de conhecimentos prévios destas disciplinas na análise e seleção de sequências peptídicas com potencial imunogênico.

REFERÊNCIAS

- CAMACHO, A.C.L.F., JOAQUIM, F.L., MENEZES, H.F., SANT'ANNA, R.M. A tutoria na educação à distância em tempos de COVID-19: orientações relevantes. *Research, Society and Development*. V. 9, n. 5, p. e30953151, 2020. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i5.3151>
- CASTAMAN, A.S., RODRIGUES R.A. Educação a Distância na crise COVID - 19: um relato de experiência. *Research, Society and Development*. V. 9, n. 6, p. e180963699, 2020. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i6.3699>
- CHAGAS S.R., DALL'AGNOL M., PESSOA A.V.C.; NACENTE E.P., RAMIS-VIDAL M.G., PASCOAL L.M. Vaccines and its adverse reactions: a review. *PUBVET*. V. 13, n. 8, p. 1-14, 2019. DOI: <https://doi.org/10.31533/pubvet.v13n8a398.1-14>
- DAMIÃO H.S.B. Identificação e caracterização de genes codificantes de quitinase no genoma de *Handroanthus impetiginosus*. (TCC) Universidade Federal de Uberlândia - Instituto de Biotecnologia Curso de Graduação Em Biotecnologia. Patos De Minas – MG, 2019.
[http://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/27623/1/Identifica% c3% a7% c3% a3oCaracteriza% c3% a7% c3% a3oGenes.pdf](http://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/27623/1/Identifica%c3%a7%c3%a3oCaracteriza%c3%a7%c3%a3oGenes.pdf)
- CHURRIA, C.D.G., CRISPO, M., SHIVAPRASAD, H.L., UZAL, F.A. Gangrenous Dermatitis in Chickens and Turkeys. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. V. 30, n. 2, p. 188-196, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1177/1040638717742435>
- DUAN, K., LIU, B., LI, C., ZHANG, H., YU, T., QU, J., et al. Effectiveness of convalescent plasma therapy in severe COVID-19 patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. V. 117, n. 17, p. 9490-9496, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.2004168117>
- ELIAS, G., OGUNJIMI, B., TENDELOO, V.V. Activation-induced surface proteins in the identification of antigen-responsive CD4 T cells. *Immunology Letters*. V. 219, p. 1-7, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2019.12.006>
- ENAYATKHANI, M., HASANIAZAD, M., FAEZI, S., GOUKLANI, H., DAVOODIAN, P., AHMADI, N., et al. Reverse vaccinology approach to design a novel multi-epitope vaccine candidate against COVID-19: an *in silico* study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1756411>
- FRANSSEN, S.U., DURRANT, C., STARK, O., MOSER, B., DOWNING, T., IMAMURA, H., et al. Global genome diversity of the *Leishmania donovani* complex. *eLife*. V. 9, p. e51243, 2020. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.51243>
- GAZIOGLU, A., KARAGÜLLE, B., YÜKSEL, H., AÇIK M.N., KEÇECİ, H., DÖRTBUDAK, M.B., et al. Sudden death due to gas gangrene caused by *Clostridium septicum* in goats. *BMC Veterinary Research*. V. 14, n. 406, p. 1-6, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1747-y>

HOVE, P., BRAYTON, K.A., LIEBENBERG, J., PRETORIUS, A., OOSTHUIZEN, M.C., NOH, S.M., et al. *Anaplasma marginale* outer membrane protein vaccine candidates are conserved in North American and South African strains. *Ticks and Tick-borne Diseases*. V. 11, n. 4, e101444, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101444>

JAHNMATZ, P., SUNDLING, C., MAKOWER, B., SONDÉN, K., FÄRNERT, A., AHLBORG, N. Multiplex analysis of antigen-specific memory B cells in humans using reversed B-cell FluoroSpot. *Journal of Immunological Methods*. V. 478, e112715, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.112715>

LANA, R.M., COELHO, F.C., GOMES, M.F.C., CRUZ, O.G., BASTOS, L.S., VILELA, D.A.M., et al. The novel coronavirus (SARS-CoV-2) emergency and the role of timely and effective national health surveillance. *Caderno de Saúde Pública*. V. 36, n.3, p. e19620, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/0102-311X00019620>

MELBY, P.C.; TRAVI, B.L.; YANETH-OSORIO, E. *Leishmania*. Reference Module in Biomedical Sciences - Encyclopedia of Microbiology (Fourth Edition). P. 769-779, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.02473-9>

NAZ, K., NAZ, A., ASHRAF, S.T., RIZWAN, M., AHMAD, J., BAUMBACH, J., et al. PanRV: Pangenome-reverse vaccinology approach for identifications of potential vaccine candidates in microbial pangenome. *BMC Bioinformatics*. V. 20, n. 123, p. 1-10, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12859-019-2713-9>

NENKO, Y., KYBALNA, N., SNISARENKO, Y. The COVID-19 Distance Learning: Insight from Ukrainian students. *Revista Brasileira de Educação do Campo*. V. 5, p. e8925, 2020. DOI: <https://doi.org/10.20873/uft.rbec.e8925>

PETERSON, C.N., TAVANA, S.Z., AKINLEYE, O.P., JOHNSON, W.H., BERKMEN, M.B. An idea to explore: Use of augmented reality for teaching three-dimensional biomolecular structures. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. V. 48, n. 3, p. 1-7, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/bmb.21341>

RODRIGUES, T.C.V., JAISWAL, A.K., SAROM, A., OLIVEIRA, L.C., OLIVEIRA, C.J.F., GHOSH, P., et al. Reverse vaccinology and subtractive genomics reveal new therapeutic targets against *Mycoplasma pneumoniae*: a causative agent of pneumonia. *Royal Society Open Science*. V. 6, p. e190907, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1098/rsos.190907>

SETLIFF, I., SHIAKOLAS, A.R., PILEWSKI, K.A., MURJI, A.A., MAPENGO, R.E., JANOWSKA, K., et al. High-throughput mapping of B cell receptor sequences to antigen specificity. *Cell*. V. 179, n. 7, p. 1636-1646, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.11.003>

SHARMA P., KUMAR P., SHARMA R. The Major Histocompatibility Complex: A Review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. V. 10, n. 2, p. 33-36, 2017. DOI: <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10i2.15555>

SORGI S., BONEZI V., DOMINGUEZ M.R., GIMENEZ, A.M., DOBRESU, I., BOSCARDIN, S. 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. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-9199-jvatitd-2019-0061>

SHEREEN, M. A.; KHAN, S.; KAZMI, A.; BASHIR, N.; SIDDIQUE, R. COVID-19 infection: Emergence, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *Journal of Advanced Research*. V. 24, p. 91-98, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.03.005>

SOUZA, G., LIMA, G.H.M.A. Eutanásia canina como medida profilática para o controle da leishmaniose humana: uma abordagem bioética. *Evidência-Ciência e Biotecnologia*. V. 18, n. 1, p. 21–40, 2018. DOI: <https://doi.org/10.18593/eba.v18i1.16977>

UZAL, F.A., NAVARRO, M.A., HOSTETTER, J.M. Focus issue on clostridial disease. *Journal of Veterinary and Diagnostic Investigation*. V. 32, n. 2, p. 173-174, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1177/1040638720908420>

WATTHANADIREK, A., CHAWENGKIRTTIKUL, R., POOLSAWAT, N., JUNSIRI, W., BOONMEKAM, D., REAMTONG, O., et al. Recombinant expression and characterization of major surface protein 4 from *Anaplasma marginale*. *Acta Tropica*. V. 197, p. e105047, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105047>

YANG, J., LUO, Y., SHIBU, M.A., TOTH, I., SKWARCZYNSKIA, M. Cell-Penetrating Peptides: Efficient Vectors for Vaccine Delivery. *Current Drug Delivery*. V. 16, n. 5, p. 430–443, 2019. DOI: <https://doi.org/10.2174/1567201816666190123120915>

ZHANG, J., ZENG, H., GU, J., LI, H., ZHENG, L., ZOU, Q. Progress and Prospects on Vaccine Development against SARS-CoV-2. *Vaccines*. V. 8, n. 2, p. 153, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines8020153>