

DESENVOLVIMENTO *IN SILICO* DE UM POLIANTÍGENO CONTRA *HAEMONCHUS CONTORTUS*

PEDRO MACHADO MEDEIROS DE ALBUQUERQUE¹; RODRIGO CASQUERO
CUNHA²; RENAN EUGÊNIO ARAUJO PIRAINÉ²; NEIDA LUCIA CONRAD²;
FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE³

¹Universidade Federal de Pelotas – albuquerque95pedro@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – rodrigocunha_vet@hotmail.com; renanbiotec@gmail.com;
conradneida@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – fleivasleite@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O *Haemonchus contortus* é o helminto hematófago causador da hemoncose em pequenos ruminantes, considerada a doença parasitária de maior importância econômica (WALLER;CHANDRAWATHANI, 2005). Embora a doença possa levar a morte do animal, perdas já são causadas ao produtor antes mesmo do estágio final da doença, uma vez que causa perda de peso do animal parasitado, que por consequência tem uma diminuição significativa na produção de leite e carne (CLIMENI ET AL., 2008). O parasito afeta centenas de milhões de animais em todo o planeta, causando anualmente cerca de 33 bilhões de reais de prejuízo nas indústrias de lã, carne e leite (ROEBER et al., 2013).

O *H. contortus* pertence ao filo Nematoda, não possui em seu ciclo hospedeiros intermediários e parasito em geral o abomaso de ovinos e caprinos. A infecção ocorre durante a alimentação na pastagem contendo larvas do parasito em sua forma infectante, que uma vez ingeridos, se fixam na mucosa do estômago começando a sua alimentação e desenvolvimento para a liberação de ovos pelas fezes dos hospedeiros, que posteriormente irão se desenvolver no ambiente como novas larvas infectantes (CLIMENI et al., 2008).

O parasito demonstrou ser capaz de desenvolver diferentes graus de resistência contra diferentes classes de drogas anti-helmínticas disponíveis no mercado (KOTZE;PRICHARD, 2016). As primeiras vacinas utilizadas contra hemoncose foram elaboradas a partir de larvas atenuadas por radiação as quais eram introduzidas pela via oral, no entanto, além da resposta imune não ser eficiente, o seu processo de obtenção e aplicação apresentava dificuldades para ser aplicado em larga escala (URQUHART et al., 1966). Com isso a abordagem foi alterada para o uso de vacinas de subunidade desenvolvidas a partir de proteínas nativas do intestino do parasito, o que acarretou no desenvolvimento da Barbervax®, a vacina comercial utilizada atualmente. O grande problema é que, apesar de induzir uma resposta imune adequada, o processo para seu desenvolvimento é oneroso, pois necessita da criação de ovinos para a obtenção das larvas que serão processadas para a prospecção do antígeno (MATOS, 2016).

A alternativa proposta para este sistema de produção foi o uso de sistemas heterólogos para a expressão em caráter recombinante destes antígenos nativos (SMITH;ZARLENGA, 2006). Isto fez com que a busca por antígenos se tornasse um alvo de estudos, uma vez que o avanço da bioinformática e das técnicas de vacinologia reversa possibilitou a análise *in silico* destes alvos vacinais, possibilitando a predição de epítomos antigênicos para a síntese de sequências para a expressão de proteínas recombinantes (RAPPOULI, 2003).

O presente trabalho teve como objetivo a análise e desenvolvimento *in silico* de um poliantígeno para ser utilizado no desenvolvimento de uma vacina contra *H. contortus*.

2. METODOLOGIA

A análise de vacinologia reversa do genoma de *H. contortus* foi realizada na ferramenta preditora de antígenos IMMUNORANK (LIGP – UFMG), na qual foram observadas as características referentes a: epítomos de linfócitos B; epítomos de linfócitos T CD8+; epítomos de linfócitos T CD4+; proteínas intrinsecamente desordenadas (PID); repetições; regiões de baixa complexidade; peptídeo sinal; hélice transmembrana; ancoragem por GPI; similaridade com proteínas do hospedeiro; similaridade com proteínas de outros patógenos; similaridade com proteínas sintéticas; N-Glicosilação e O-Glicosilação.

Quatro peptídeos foram selecionados e utilizados para compor o poliantígeno a ser utilizado. A sequência referente a essa molécula foi desenhada utilizando o programa Vector NTI Advance (Invitrogen), recebendo a nomenclatura de Hc1. A modelagem tridimensional da proteína foi predita pelo método de *threading* com o uso da plataforma I-Tasser (Zhang Lab).

Após a escolha das regiões imunodominantes e montagem do poliantígeno, a sequência foi otimizada para o *codon usage* e inserida entre as enzimas de restrição *BamHI* e *HindIII* no plasmídeo pAE de expressão em *Escherichia coli*, sendo enviada para síntese na empresa Genone (Rio de Janeiro – RJ).

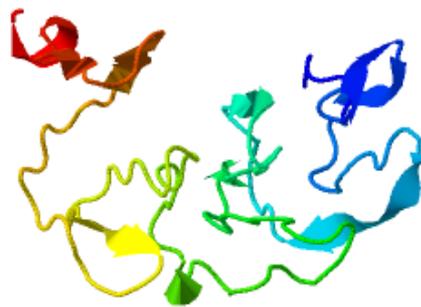
A construção sintética pAE/Hc1 foi utilizada na transformação da cepa TOP10F (One Shot®) de *Escherichia coli* seguindo a metodologia de SAMBROOK; RUSSEL (2001) através da técnica de transformação por choque térmico. Resumidamente, uma colônia isolada de *E. coli* TOP10F de uma placa do meio Luria Bertani (LB) Ágar foi adicionada em um microtubo contendo 100µl de cloreto de cálcio 100 mM juntamente com 2 µl do plasmídeo pAE/Hc1. A amostra foi submetida a um banho de gelo por 20 min, logo em seguida sendo incubada em um banho quente por 1 min e 30 seg a 42 °C e colocada novamente no banho de gelo por 2 min para que ocorra o choque térmico pela variação brusca de temperaturas. Foi adicionado 500µl de LB Low Salt líquido na amostra, seguido de uma incubação por 1 h sob agitação de 150 rpm a 37 °C para a propagação inicial das bactérias transformadas, após este tempo a transformação foi semeada em uma placa contendo o meio LB ágar com a adição do antibiótico ampicilina na concentração 100 ug/mL e cultivado por 14 h a 37 °C. A partir das colônias transformadas que cresceram na placa foi utilizado o kit comercial Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) para a extração dos plasmídeos de acordo com as especificações do protocolo disponibilizado pela empresa e armazenados sob aclimatação de -20 °C. Foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1%, por 2 h a 100 V para confirmar a inserção no plasmídeo da sequência que transcreverá para a proteína Hc1.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A proteína Hc1 modelada pelo I-TASSER apresentou uma estrutura linear compatível com a desejada. Dos cinco modelos preditos, o que demonstrou a maior semelhança com um possível modelo real apresentou um C-score de -3.74, TM-score de 0,31±0.10 e RMSD 13.2±4.1Å. Por ser uma construção feita a partir

de proteínas diferentes, era esperado que o meto de *threading* tivesse uma pontuação mais baixa.

Figura 1. Estrutura tridimensional da proteína Hc1 predita pela ferramenta I-TASSER.



A sequência do plasmídeo sintetizado por meio da análise *in silico* na ferramenta IMMUNORANK foi visualizada através do software SnapGene® demonstrando um plasmídeo contendo 3,189bp (Figura 2A). Ainda, a presença da sequência adicionada ao plasmídeo pAE foi confirmada por meio de eletroforese em gel de agarose, onde a amostra que continha o plasmídeo sintetizado (pAE/Hc1) possuía peso molecular maior que a amostra controle (pAE), como pode ser observado na Figura 2B. A análise da proteína pelo software apontou uma sequência de 133 aa e um peso molecular predito de 12,4 kDa.

Figura 2. Estrutura do plasmídeo pAE/Hc1 (A) e Análise por eletroforese do plasmídeo pAE/Hc1 (B).

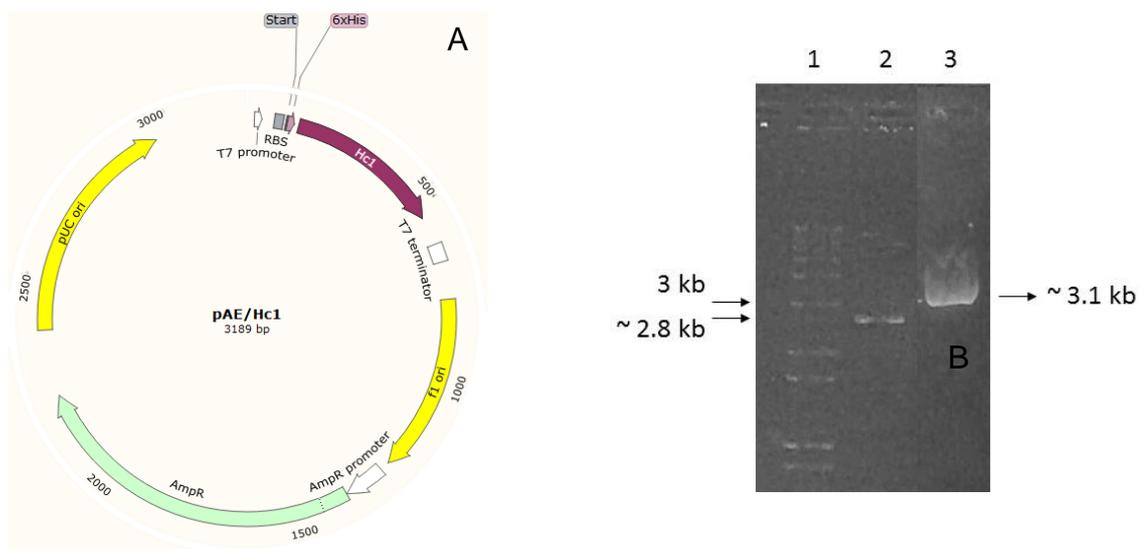


Figura 2 – A: Estrutura do plasmídeo pAE/Hc1. B: Gel de agarose 1%. 1) Marcador de peso molecular 1kb Plus DNA Ladder, 2) Plasmídeo pAE controle, 3) Plasmídeo pAE/Hc1.

4. CONCLUSÕES

No presente estudo foram analisadas as sequências de todo o genoma de *H. contortus*, construindo-se um vetor denominado pAE/Hc1. Este vetor foi sintetizado e corretamente identificado após a propagação inicial. Trabalhos subsequentes terão como objetivo a confirmação da antigenicidade e imunogenicidade desta molécula para o fim de desenvolver uma vacina.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CLIMENI, B. S. O. et al. Hemoncose ovina. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, v. 6, n. 11, 2008. Disponível em: <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/qhEoGFWTxMkIGSn_2013-6-13-16-15-28.pdf>.

KOTZE, A. C.; PRICHARD, R. K. Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*. History, Mechanisms and Diagnosis. **Advances in Parasitology**, v. 93, p. 397–428, 2016.

MATOS, A. F. I. M. DE. **EFICÁCIA DA VACINA BARBERVAX® NO CONTROLE DE *Haemonchus contortus* EM CAPRINOS**. 2016. 2016.

PETER, J. W.; CHANDRAWATHANI, P. *Haemonchus contortus*: parasite problem No. 1 from tropics - Polar Circle. Problems and prospects for control based on epidemiology. **Tropical biomedicine**, v. 22, n. 2, p. 131–137, dez. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16883278>>.

RAPPUOLI, R.; COVACCI, A. Reverse Vaccinology and Genomics. **Science**, v. 302, n. 5645, p. 602, 2003.

ROEBER, F.; JEX, A. R.; GASSER, R. B. Next-Generation Molecular-Diagnostic Tools for Gastrointestinal Nematodes of Livestock, with an Emphasis on Small Ruminants. A Turning Point? **Advances in Parasitology**, v. 83, p. 267–333, 2013.

SAMBROOK, J.; RUSSEL. Molecular cloning.
Methods in Enzymology, v. 529, p. 85–98, 2013.

SMITH, W. D.; ZARLENGA, D. S. Developments and hurdles in generating vaccines for controlling helminth parasites of grazing ruminants. **Veterinary Parasitology**, v. 139, n. 4, p. 347–359, 2006.

URQUHART, G. M. et al. Immunity to *Haemonchus contortus* infection. Failure of x-irradiated larvae to immunize young lambs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 27, n. 121, p. 1641–1643, 1966.