

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CAMPUS A. C. SIMÕES
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

GENILDA CASTRO DE OMENA NETA

**PREDIÇÃO *IN SILICO* DE CANDIDATO VACINAL MULTI-EPÍTOPO
ANTIGÊNICO TUMORAL PARA O ANTÍGENO TESTICULAR DE CâNCER -
TFDP3**

MACEIÓ – AL
2024

GENILDA CASTRO DE OMENA NETA

**PREDIÇÃO *IN SILICO* DE CANDIDATO VACINAL MULTI-EPÍTOPO
ANTIGÊNICO TUMORAL PARA O ANTÍGENO TESTICULAR DE CÂNCER -
TFDP3**

Defesa da Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Alagoas, como requisito final à obtenção do título de Doutora em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Carvalho Fraga.

Coorientador: Profa. Dra. Carolinne de Sales Marques

MACEIÓ – AL
2024

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

O55p Omena Neta, Genilda Castro de.
 Predição *in silico* de candidato vacinal multi-epítopo antigênico tumoral
 para o antígeno testicular de câncer-TFDP3 / Genilda Castro de Omena Neta. –
 2024.
 143 f. : il., grafs., tabs. color.

 Orientador: Carlos Alberto de Carvalho Fraga.
 Co-orientadora: Carolinne de Sales Marques.
 Tese (doutorado em ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto
 de Ciências Farmacêuticas. Programa Multicêntrico de Bioquímica e Biologia
 Molecular. Maceió, 2024.

 Bibliografia: f. 99-111.
 Apêndices: f. 112-143.

 1. Neoplasias. 2. Imunoinformática. 3. Predição de epítomos. 4. Vacinas de
 subunidades. I. Título.

CDU: 616.681-006.6:004

GENILDA CASTRO DE OMENA NETA

**PREDIÇÃO *IN SILICO* DE CANDIDATO VACINAL MULTI-EPÍTOPO
ANTIGÊNICO TUMORAL PARA O ANTÍGENO TESTICULAR DE CÂNCER –
TFDP3**

Tese submetido à banca examinadora do
Programa de Pós-graduação em Bioquímica e
Biologia Molecular da Universidade Federal de
Alagoas e aprovada em 19 de fevereiro de 2024.

Documento assinado digitalmente
 **CARLOS ALBERTO DE CARVALHO FRAGA**
Data: 23/02/2024 10:20:13-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

(Orientador – Prof. Dr. Carlos Alberto de Carvalho Fraga, UFAL)

(Coorientadora – Prof^ª. Dr^ª. Carolinne de Sales Marques, UFAL)

Banca examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **BRUNA DEL VECHIO KOIKE**
Data: 20/02/2024 16:59:17-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

(Examinadora Externa – Prof^ª. Dr^ª. Bruna Del Vechio Koike, UNIVASF)

Documento assinado digitalmente
 **JUSSARA ALMEIDA DE OLIVEIRA BAGGIO**
Data: 20/02/2024 09:29:24-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

(Examinadora Externa – Prof^ª. Dr^ª. Jussara Almeida de Oliveira Baggio, UFAL)

Documento assinado digitalmente
 **AMANDA KARINE BARROS FERREIRA RODRIGUE**
Data: 23/02/2024 09:52:58-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

(Examinadora Externa – Prof^ª. Dr^ª. Amanda Karine Barros Ferreira Rodrigues, UFAL)

Documento assinado digitalmente
 **FRANCIS SOARES GOMES**
Data: 21/02/2024 13:25:49-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

(Examinador Interno – Prof. Dr. Francis Soares Gomes, UFAL)

Aos meus pais Amaro José Castro de Omena e
Givônia Bazílio de Omena (*in memorian*),
meus irmãos, sobrinhos e o meu companheiro
Araken Cavalcante Neto pelo incentivo e
compreensão durante toda a jornada do
doutorado.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Amaro José Castro de Omena e Givônia Bazílio de Omena (*in memorian*), irmãos e sobrinhos pelo apoio e incentivo, em especial a minha mãe que deixou o legado da educação para que eu pudesse chegar até aqui;

Ao meu companheiro, Araken Cavalcante Neto, por compreender a minha ausência, torcer pelo meu sucesso e sempre está ao meu lado em todos os momentos ao longo dessa jornada;

Ao Instituto Federal de Alagoas – Campus Satuba por autorizar o meu afastamento para o doutorado que possibilitou a participação nas disciplinas, em eventos e no desenvolvimento do projeto da tese;

A Universidade Federal de Alagoas e ao Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular pela oportunidade do meu aperfeiçoamento e crescimento pessoal e profissional desde o mestrado até o doutorado;

Ao meu orientador, Prof^o. Dr. Carlos Alberto de Carvalho Fraga, pelo acolhimento, paciência, incentivo, dedicação e amizade construída desde o mestrado até o doutorado;

A minha coorientadora, Profa. Dra. Carolinne de Sales Marques, pelo acolhimento e suporte;

Aos membros da banca de qualificação e defesa, por aceitar o convite e pelas considerações e sugestões valiosas;

Aos colaboradores (docentes e discentes) do meu orientador por contribuíram direta e indiretamente com a minha tese;

Ao discente de iniciação científica, José Wilson Batista da Silva Júnior, pela ajuda durante toda a execução do projeto do doutorado;

A FAPEAL pelo suporte financeiro do meu projeto de doutorado e da bolsa de iniciação científica do discente José Wilson Batista da Silva Júnior que ajudou no desenvolvimento do projeto;

Ao Prof^o. Dr. Fernando Berton Zanchi, pesquisador da FIOCRUZ Rondônia, por executar as análises de Dinâmica Molecular no Laboratório de Bioinformática e Química Medicinal pelo Visual Dynamics, lotado no servidor da FIOCRUZ Rondônia.

Aos meus colegas de laboratório do grupo de pesquisa do Prof^o. Dr. Carlos Alberto de Carvalho Fraga, que tive o prazer de conhecer durante meu mestrado e doutorado.

Aos meus colegas do Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular por compartilhar experiências comigo;

Aos Professores do Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular por contribuírem para a minha formação profissional, apoio e incentivo;

Ao servidor público federal da secretária do programa Daniel de Brito Ricarte pelo suporte quanto às questões burocráticas da Pós-graduação do Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular – UFAL;

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente com a execução desse trabalho, o meu muito obrigada.

RESUMO

O aumento na incidência e mortalidade de câncer no mundo tem demonstrado a necessidade de investimentos em terapias antitumorais mais efetivas. Diante da complexidade dos mecanismos que levam a resistência aos tratamentos antitumorais, as terapias-alvo são abordagens promissoras. Os antígenos testiculares de câncer (CTAs) são alvos terapêuticos com potencial de serem explorados, pois não são expressos em células normais e expressos em células tumorais, como é o caso do TFDP3, expresso em câncer de mama subtipo triplo negativo, próstata, leucemia linfoblástica de célula T infantil e carcinoma hepatocelular. O objetivo proposto nesse trabalho é a predição *in silico* de um candidato vacinal multi-epítopo antigênico tumoral a partir do TFDP3. A triagem dos epítomos foi realizada com ferramentas de imunoinformática que identificaram os epítomos antigênicos que interagem com os linfócitos B, linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+. Em seguida, foi avaliado a cobertura populacional dos epítomos dos linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+. A partir dos epítomos dos linfócitos B, linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+ foram selecionados 3 epítomos de cada um deles para compor a vacina multi-epítopo determinados pela antigenicidade, alergenicidade, toxicidade, indução de IFN- γ e cobertura populacional. A vacina foi constituída além dos epítomos por um adjuvante e ligantes que garantiram algumas propriedades dos epítomos, o processamento deles na biosíntese do MHC de classe I e modificações pós-traducionais. A homologia da vacina em relação a outras proteínas foi avaliada pelo servidor NCBI BLASTp. A partir disso, foram avaliados os parâmetros físico-químicos, antigenicidade, alergenicidade e toxicidade. Através de servidores que utilizam redes neurais foi determinado a estrutura secundária e a estrutura terciária assim como os parâmetros de qualidade associados à estrutura. Na estrutura terciária foram determinados os epítomos lineares e descontínuos dos linfócitos B pelo servidor IEDB. A partir daí, foi avaliada a interação por ancoragem molecular com os receptores semelhantes a Toll e a dinâmica molecular para avaliar a estabilidade da vacina multi-epítopo num sistema biológico. Por fim, foi avaliado *in silico* a viabilidade de clonagem da vacina multi-epítopo e sua resposta imune mediante 1 e 3 administrações sucessivas. Foram identificados epítomos que interagem com os linfócitos B, linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+ antigênicos, não alergênicos e não tóxicos. Em relação aos linfócitos T CD4+, 4 epítomos além de serem antigênicos, não alergênicos e não tóxico, são possíveis indutores de IFN- γ . Já em relação a cobertura populacional os epítomos do MHC de classe I e MHC de classe II tiveram uma cobertura de 93,55% no mundo. A vacina multi-epítopo têm parâmetros físico-químicos favoráveis biologicamente, baixa homologia com proteínas humanas, conformação secundária e terciária compatível com estruturas de proteínas nativas. Também possui interações com os TLR-2 e TLR-3, sendo o TLR-3 a interação que num sistema biológico garante mais estabilidade da vacina multi-epítopo. Além disso, análises *in silico* demonstraram que a vacina multi-epítopo pode ser clonada e desenvolver reposta imune mais robusta e duradoura quando submetida a 3 administrações. Portanto, a vacina multi-epítopo desenhada a partir do antígeno testicular de câncer TFDP3 apresentou *in silico* diversas propriedades e respostas biológicas promissoras para que seja investido estudos *in vitro* e *in vivo* e a aplicação no futuro dessa vacina no tratamento de tipos de câncer que expressam esse CTA.

Palavras-chave: câncer, imunoinformática, predição de epítomos, vacina de peptídeos.

ABSTRACT

The increase in cancer incidence and mortality worldwide has demonstrated the need for investment in more effective anti-tumor therapies. Given the complexity of the mechanisms that lead to resistance to anti-tumor treatments, target therapies are promising approaches. Cancer testicular antigens (CTAs) are therapeutic targets with potential to be explored, as they are not expressed in normal cells and are expressed in tumor cells, as is the case with TFDP3, expressed in triple negative breast cancer, prostate cancer, childhood T-cell lymphoblastic leukemia and hepatocellular carcinoma. The objective proposed in this work is the *in silico* prediction of a multi-epitope tumor antigen vaccine candidate from TFDP3. The epitopes were screened using immunoinformatics tools that identified the antigenic epitopes that interacted with B lymphocytes, CD4⁺ T lymphocytes and CD8⁺ T lymphocytes. The population coverage of the epitopes on CD4⁺ T lymphocytes and CD8⁺ T lymphocytes was then assessed. From the epitopes of B lymphocytes, CD4⁺ T lymphocytes and CD8⁺ T lymphocytes, 3 epitopes from each were selected to make up the multi-epitope vaccine determined by antigenicity, allergenicity, toxicity, IFN- γ induction and population coverage. In addition to the epitopes, the vaccine was made up of an adjuvant and ligands that ensured certain properties of the epitopes, their processing in MHC class I biosynthesis and post-translational modifications. The vaccine's homology with other proteins was assessed using the NCBI BLASTp server. The physicochemical parameters, antigenicity, allergenicity and toxicity were then evaluated. The secondary structure and tertiary structure were determined using servers that use neural networks, as well as the quality parameters associated with the structure. In the tertiary structure, the linear and discontinuous epitopes of B lymphocytes were determined using the IEDB server. From there, the interaction by molecular docking with Toll-like receptors and molecular dynamics were evaluated to assess the stability of the multi-epitope vaccine in a biological system. Finally, the *in silico* assessment of the possibility of cloning the multi-epitope vaccine and its immune response after 1 and 3 successive administrations was also evaluated. Epitopes that interact with antigenic, non-allergenic and non-toxic B lymphocytes, CD4⁺ T lymphocytes and CD8⁺ T lymphocytes were identified. With regard to CD4⁺ T lymphocytes, 4 epitopes, as well as being antigenic, non-allergenic and non-toxic, are possible inducers of IFN- γ . In the population coverage, the MHC class I and MHC class II epitopes had 93.55% coverage worldwide. The multi-epitope vaccine has biologically favorable physicochemical parameters, low homology with human proteins, secondary and tertiary conformation compatible with native protein structures. It also has interactions with TLR-2 and TLR-3, with TLR-3 being the interaction that in a biological system guarantees the greatest stability of the multi-epitope vaccine. In addition, *in silico* analyses have shown that the multi-epitope vaccine can be cloned and develop a more robust and prolonged immune response when submitted to 3 administrations. Therefore, the multi-epitope vaccine designed from the testicular cancer antigen TFDP3 showed *in silico* several promising biological properties and responses so that *in vitro* and *in vivo* studies can be invested and the future application of this vaccine in the treatment of cancer types that express this CTA.

Keywords: cancer, immunoinformatics, epitope prediction, peptide vaccine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Mapa global do ranking da causa de morte precoce em relação as doenças cardiovasculares e câncer (idade entre 30 – 70 anos) em 183 países em 2019.....	19
Figura 02	Tendência epidemiológica estimada da causa de morte entre os anos de 2016 e 2060. Em (A) corresponde as doenças e (B) aos tipos de câncer mais frequentes.....	20
Figura 03	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma.....	21
Figura 04	Heterogeneidade genética e não genética determinam mecanismos de resistência aos antitumorais e a evolução do câncer.....	24
Figura 05	Processo de imunoeedição tumoral consiste de três fases: eliminação, equilíbrio e escape.....	25
Figura 06	Biossíntese do MHC de classe I.....	27
Figura 07	Biossíntese do MHC de classe II.....	28
Figura 08	Diagrama das abordagens terapêuticas da imunoterapia ativa e passiva no câncer.....	30
Figura 09	Relação dos CTAs com os hallmarks do câncer originais (em cinza), emergentes (em verde) e fatores facilitadores (em roxo).....	37
Figura 10	Repercussões da inibição do fator de transcrição E2F1 pelo TFDP3.....	38
Figura 11	Fluxograma dos métodos aplicados no estudo do desenvolvimento da vacina multi-epítopo.....	41
Figura 12	Frequência da cobertura populacional dos epítomos para MHC de classe I e classe II no mundo, na Europa, nos Estados Unidos, na China, no Japão e na América do Sul e no Brasil e suas etnias.....	53
Figura 13	Frequência da cobertura populacional dos epítomos para MHC de classe I e classe II no mundo (A) e no Brasil (B).....	54
Figura 14	Esquema representativo e sequência de aminoácidos da vacina (termos sublinhados correspondem aos linkers).....	56

Figura 15	Predição dos sítios de fosforilação da vacina multi-epítopo.....	58
Figura 16	Predição da estrutura secundária da vacina multi-epítopo.....	59
Figura 17	Representação gráfica do valor dos erros dos resíduos determinados pelo servidor ERRAT do modelo antes (A) e após (B) o refinamento pelo servidor GalaxyRefine.....	61
Figura 18	Gráfico de Ramachandran (A), avaliação da estabilidade estrutural da estrutura tridimensional com a sequência de aminoácidos pelo Verify 3D(B), Gráficos Z-score e de energia do modelo tridimensional pelo servidor ProSA-web (C-D) e estrutura terciária do modelo visualizada pelo PyMol.....	63
Figura 19	Posição dos epítomos lineares nº1 (A) e descontínuos nº 7 (B) dos linfócitos B na estrutura tridimensional da vacina multi-epítopo.....	68
Figura 20	Representação do docking molecular dos receptores semelhantes a Toll, TLR-2 (A), TLR-3 (B), TLR-4 (C), TLR-7 (D) e TLR-9 (E), com a vacina multi-epítopo.....	69
Figura 21	Representação das interações entre os receptores semelhantes a Toll, TLR-2 (A) e TLR-3 (B), com a vacina multi-epítopo.....	71
Figura 22	Representação das interações entre os receptores semelhantes a Toll, TLR-4 (A), TLR-7 (B) e TLR-9 (C), com a vacina multi-epítopo.....	73
Figura 23	Representação gráfica do RSMD da vacina multi-epítopo quando interagindo com TLR2 (A) e TLR3 (B).....	77
Figura 24	Representação gráfica do RSMF da vacina multi-epítopo quando interagindo com TLR2 (A) e TLR3 (B).....	78
Figura 25	Representação gráfica do raio de giro (Rg) da vacina multi-epítopo quando interagindo com TLR2 (A) e TLR3 (B).....	80
Figura 26	Representação gráfica do SASA da vacina multi-epítopo quando interagindo com TLR2 (A) e TLR3 (B).....	81
Figura 27	Clonagem in silico da vacina multi-epítopo no vetor linearizado TA (A) e gel de agarose 1% de simulação de eletroforese em solução de TBE (B) e	83

	solução de tampão SB (C).....	
Figura 28	Simulação imunológica em relação à imunidade inata e liberação de citocinas após uma administração da vacina multi-epítopo.....	85
Figura 29	Simulação imunológica em relação à imunidade inata e liberação de citocinas após três administrações da vacina multi-epítopo.....	86
Figura 30	Simulação imunológica em relação aos linfócitos T após uma administração da vacina multi-epítopo.....	88
Figura 31	Simulação imunológica em relação aos linfócitos T após três administrações da vacina multi-epítopo.....	89
Figura 32	Simulação imunológica em relação aos linfócitos B e a produção de imunoglobulinas após uma administração da vacina multi-epítopo.....	90
Figura 33	Simulação imunológica em relação aos linfócitos B e a produção de imunoglobulinas após três administrações da vacina multi-epítopo.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Epítomos preditos para os linfócitos B antigênicos de TFDP3 (Id. Uniprot: Q5H9I0) e suas características antigênicas.....	49
Tabela 02	Epítomos preditos dos linfócitos T CD8+ para o MHC de classe I antigênicos de TFDP3 (Id. Uniprot: Q5H9I0) e suas características antigênicas.....	50
Tabela 03	Epítomos preditos dos linfócitos T CD4+ para o MHC de classe II antigênicos de TFDP3 (Id. Uniprot: Q5H9I0) e suas características antigênicas.....	51
Tabela 04	Homologia da vacina em relação as proteínas humanas.....	57
Tabela 05	Epítomos lineares dos linfócitos B da estrutura tridimensional da vacina multi-epítopo.....	66
Tabela 06	Epítomos descontínuos dos linfócitos B da estrutura tridimensional da vacina multi-epítopo.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAI	Índice de Adaptação de Códon
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófago/granulócito
HLA	Antígenos Leucocitários Humanos
IEDB	Banco de dados de Epítopos Imunológicos
IFN- γ	Interferon Gama
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MEC	Matriz Extracelular
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
OMS	Organização Mundial da Saúde
PI	Ponto isoelétrico
RE	Retículo Endoplasmático
Rg	Raio de Giro
RMSF	Raiz Quadrada da Flutuação Quadrática
RSMD	Raiz Quadrada do Desvio Quadrático Médio
SASA	Área Superficial Acessível ao Solvente
TAP	Transportador Associado ao Antígeno
TFDP3	Fator de transcrição da família DP3
TLR	Receptor semelhante a Toll
TNBC	Câncer de Mama do subtipo Triplo Negativo
VR	Vacinologia Reversa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Epidemiologia do câncer.....	18
2.2 Câncer.....	21
2.3 Microambiente tumoral.....	22
2.4 Imunologia tumoral.....	24
2.5 Expressão dos complexos de histocompatibilidade humano no câncer.....	26
2.6 Imunoterapia.....	30
2.7 Vacinologia Reversa.....	31
2.8 Resposta imune a vacinas multi-epítipo.....	32
2.9 Vacinas de peptídeos no câncer.....	33
2.10 Imunoinformática.....	35
2.11 Antígeno testicular do câncer.....	36
2.12 Fator de transcrição da família DP3 (TFDP3).....	38
3. OBJETIVOS.....	40
3.1 Objetivo geral:.....	40
3.2 Objetivos específicos:.....	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1 Fluxograma dos métodos.....	41
4.2 Aquisição da sequência alvo.....	41
4.3 Predição de epítomos lineares dos linfócitos B.....	41
4.4 Predição dos epítomos dos linfócitos T.....	42
4.5 Predição da antigenicidade, alergenicidade, toxicidade dos epítomos dos linfócitos B e linfócitos T.....	42
4.6 Predição da indução de interferon gama (IFN- γ) nos epítomos dos linfócitos T do MHC de classe II.....	43
4.7 Análise da cobertura populacional do epítomos dos linfócitos T.....	43
4.8 Construção da vacina multi-epítipo.....	43
4.9 Análise de homologia da vacina multi-epítipo com o hospedeiro.....	44
4.10 Avaliação das propriedades físico-químicas da vacina.....	44
4.11 Predição de processamento via proteossoma, interação com os transportadores TAP (biosíntese de MHC de classe I) e modificações pós-traducionais da vacina multi-epítipo.....	44
4.12 Predição da estrutura secundária e terciária, refinamento e validação.....	45
4.13 Análise dos epítomos descontínuos dos linfócitos B na estrutura tridimensional da vacina multi-epítipo.....	46
4.14 Análise de Ancoragem molecular.....	46
4.15 Dinâmica molecular.....	46
4.16 Otimização de códons e clonagem <i>in silico</i>	47
4.17 Simulação da resposta imune.....	48
5. RESULTADOS.....	49
5.1 Predição e seleção dos epítomos.....	49

5.2 Análise da distribuição populacional dos epítomos preditos para o MHC de classe I e MHC de classe II.....	52
5.3 Construção da vacina multi-epítomo.....	55
5.4 Homologia e propriedades físico-químicas da vacina.....	57
5.5 Processamento via proteossoma, interação com os transportadores TAP (biosíntese de MHC de classe I) e modificações pós-traducionais da vacina.....	58
5.6 Estrutura secundária e terciária, refinamento e validação.....	59
5.7 Identificação dos epítomos descontínuos das células B na estrutura tridimensional da vacina multi-epítomo.....	66
5.8 Ancoragem molecular da vacina multi-epítomo com TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-7 e TLR-9.....	68
5.9 Avaliação da estabilidade da vacina multi-epítomo por dinâmica molecular.....	76
5.10 Adaptação do códon e clonagem <i>in silico</i> da vacina multi-epítomo.....	82
5.11 Simulação da resposta imune após administração da vacina multi-epítomo.....	85
6. DISCUSSÃO.....	92
7. CONCLUSÃO.....	98
REFERÊNCIAS.....	99
APÊNDICE A – PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS DOS LINFÓCITOS B.....	112
APÊNDICE B – PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS DOS LINFÓCITOS T.....	120
APÊNDICE C – COBERTURA POPULACIONAL DE MHC DE CLASSE I E CLASSE II.....	124
APÊNDICE D – PROCESSAMENTO DA VACINA PARA APRESENTAÇÃO NO MHC DE CLASSE I.....	129
APÊNDICE E – MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS DA VACINA MULTI-EPÍTOPO.....	134
APÊNDICE F – PREDIÇÃO DA ESTRUTURA TERCIÁRIA DA VACINA MULTI-EPÍTOPO.....	136

1. INTRODUÇÃO

Os dados epidemiológicos da Organização Mundial da Saúde (OMS) estimaram o aumento da incidência e mortalidade de câncer no mundo (WHO, 2024). Essa projeção está associada mais a fatores epigenômicos do que genômicos herdáveis. Diante desse cenário, vários estudos têm avançado no desenvolvimento de terapias antitumorais mais eficazes que incluem as terapias alvo, ou seja, aquelas direcionadas a uma determinada molécula que está envolvida em processos que estimulam a carcinogênese ou levam a resistência às terapias.

Sob essa perspectiva, o fator epigenético tem mais repercussões no processo de alteração do fenótipo de uma célula normal para uma célula tumoral. A partir disso, acrescenta na definição de câncer o caráter de seleção natural que explica em parte a heterogeneidade clonal intratumoral do fenótipo das células tumorais (Nowell, 1976). No entanto, apenas com a inclusão da pressão seletiva do microambiente tumoral é possível explicar a existência de subclones simultaneamente (Salavaty et al., 2023). Essa concepção de câncer explica o papel do microambiente tumoral no desenvolvimento do câncer a partir de mecanismos de carcinogênese.

O microambiente tumoral é constituído por componentes celulares e acelulares que exercem papéis importantes no processo da carcinogênese, como estimulando a angiogênese, inibindo o reconhecimento das células imunes e promovendo condições favoráveis para o desenvolvimento das células tumorais em locais diferentes do foco primário (metástases) (Casey et al., 2015). Tanto a existência de subclones de células tumorais quanto as características do microambiente tumoral são fatores que contribuem para a resistência às terapias antitumorais seja por barreiras físicas (Vasan; Baselga; Hyman, et al., 2019) e/ou estimulando células pró-tumorais (Pitt et al., 2016).

Diante disso, as células imunes são elementos chaves que podem ter funções antitumorais ou pró-tumorais. A determinação de qual função das células imunes será predominante no microambiente tumoral está associada as fases do processo de imunoeedição. A imunoeedição é constituída por três fases: eliminação, equilíbrio e escape (Teng; Kershaw; Smyth, 2013; Desai; Coxon; Dunn, 2022). Na eliminação predomina a ação de células imunes antitumorais, no equilíbrio prevalece as células imunes da resposta imune adaptativa que promovem a dormência tumoral e no escape sobressai as células pró-tumorais (Lasek, 2022). Esse escape pode ser mediado por vários fatores, como o não reconhecimento das células

imunes antitumorais pelo complexo de histocompatibilidade humano (MHC) de classe I/II (Keshavarz-Fathi; Rezaei, 2018).

Tendo em vista isso, a imunoterapia vem com a proposta de fortalecer o sistema imune pela imunização ativa e imunização passiva (Abbott; Ustoyev, 2019). O tipo de imunização vai depender se o indivíduo possui uma resposta imune residual ou a resposta está deficiente ou pouco responsiva, sendo indicado o fortalecimento do sistema imune pela imunização ativa e pela imunização passiva, respectivamente (Escribese; Barber, 2017). Dentre os tipos de imunização ativa, a vacina de peptídeos sobressai devido ao custo-benefício, tolerância imune satisfatória, imunogenicidade desejada e monitoramento das respostas imunes mais fácil (Farran *et al.*, 2019; Parvizpour *et al.*, 2020).

As vacinas podem ser desenvolvidas utilizando a abordagem da vacinologia reversa que se baseia em informações genômicas para a determinação das proteínas antigênicas mais promissoras que farão parte da sua constituição (Goodswen; Kennedy; Ellis, 2023). Essa triagem é realizada por imunoinformática que é uma série de ferramentas que auxilia na seleção dos peptídeos com mais probabilidade de desencadear uma resposta imune com abrangência em populações que expressão uma variedade de alelos (Backert; Kohlbacher, 2015). No caso das vacinas desenvolvidas para o tratamento do câncer a presença de múltiplos epítomos aumenta a probabilidade de que a ação seja mais efetiva, pois epítomos distintos podem estimular células imunes distintas.

Outro ponto importante no desenvolvimento de uma vacina multi-epítopo antitumoral é identificar um alvo o mais específico possível a fim de mitigar os efeitos colaterais. A partir dessa concepção os Antígenos Testiculares do Câncer (CTAs) são alvos viáveis, pois são expressos apenas em células germinativas, trofoblastos e células tumorais (Nin; Deng, 2023). O silenciamento desses antígenos em células normais permite que a ação da vacina multi-epítopo seja direcionada para as células tumorais. Existem vários estudos que foram desenvolvidos utilizando essa abordagem com um antígeno, múltiplos antígenos ou em combinação com quimioterápicos (Meng *et al.*, 2021).

Além de ter a expressão em células tumorais, os CTAs estão envolvidos em diversas características que favorecem o processo de carcinogênese, como é o caso do TFDP3 que atua na ativação do ciclo e proliferação celular, na diferenciação e apoptose das células em que estão presentes (Huang *et al.*, 2021). A expressão do Fator de transcrição da família DP3 (TFDP3) já foi identificada no câncer de mama subtipo triplo negativo (Ding *et al.*, 2018),

câncer de próstata (Ma et al., 2014), leucemia linfoblástica de célula T infantil (Chun et al., 2017) e carcinoma hepatocelular (Wang et al., 2021). Por isso, o TFDP3 foi considerado nesse estudo para o desenvolvimento de uma vacina multi-epítopo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

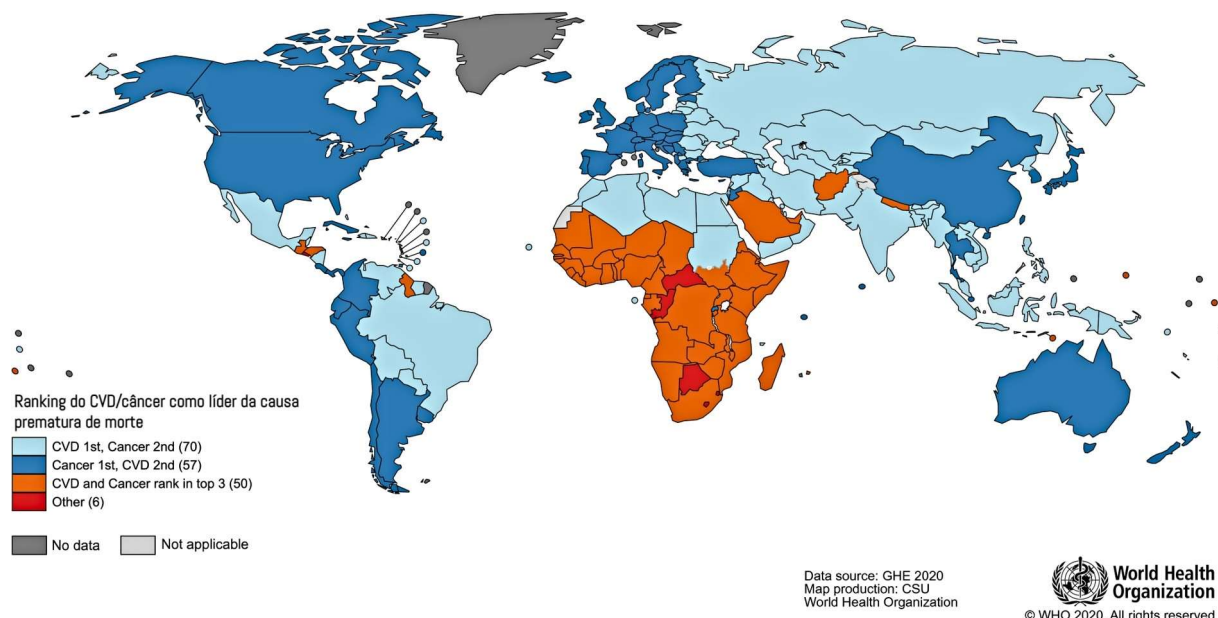
2.1 Epidemiologia do câncer

De acordo com os dados da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2024), foi diagnosticado um total de 18,7 milhões de novos casos de câncer em 2022, resultando em quase 9,6 milhões de óbitos relacionados à doença. As projeções indicam que o número de casos de câncer aumentará para 32,6 milhões em 2045. O câncer de mama feminino ultrapassou o câncer de pulmão como o mais comum globalmente, representando 47,0%, seguido por próstata (29,4%), traqueia, brônquios e pulmão (23,6,0%), colorretal (18,3%) e colo do útero (14,1%).

Já em relação à mortalidade, o câncer de pulmão lidera, causando 1,8 milhão de mortes (16,8%), seguido por câncer de mama (12,7%), colorretal (8,1%), fígado e ductos hepáticos (7,4%) e câncer de próstata (7,3%). Entre os homens, traqueia, brônquios e pulmão (32,1%), próstata (29,4%) e colorretal (21,9%) são os tipos de câncer predominantes, enquanto entre as mulheres, os principais são mama (46,8%), traqueia, brônquios e pulmão (16,2%) e colorretal (15,2%). Em geral, a prevalência do câncer no mundo nos últimos 5 anos foi de 8,23 milhões de casos de câncer de mama e 5,03 milhões de casos de câncer de próstata (WHO, 2024).

Tanto o câncer como as doenças cardiovasculares têm liderado a causa de morte prematura no mundo. Sendo o câncer a principal causa de morte em 57 países e a segunda causa em 70 países (Bray et al., 2021) (Figura 01). Cabe destacar que a Ásia constitui 60% da população mundial, e estima-se que é responsável por 50% de casos de câncer e 58% das mortes por câncer. Já na Europa e nas Américas a estimativa é de 22,8% e 20,9% dos casos de câncer e por 19,6% e 14,2% da mortalidade, respectivamente (Deo; Sharma; Kumar, 2022).

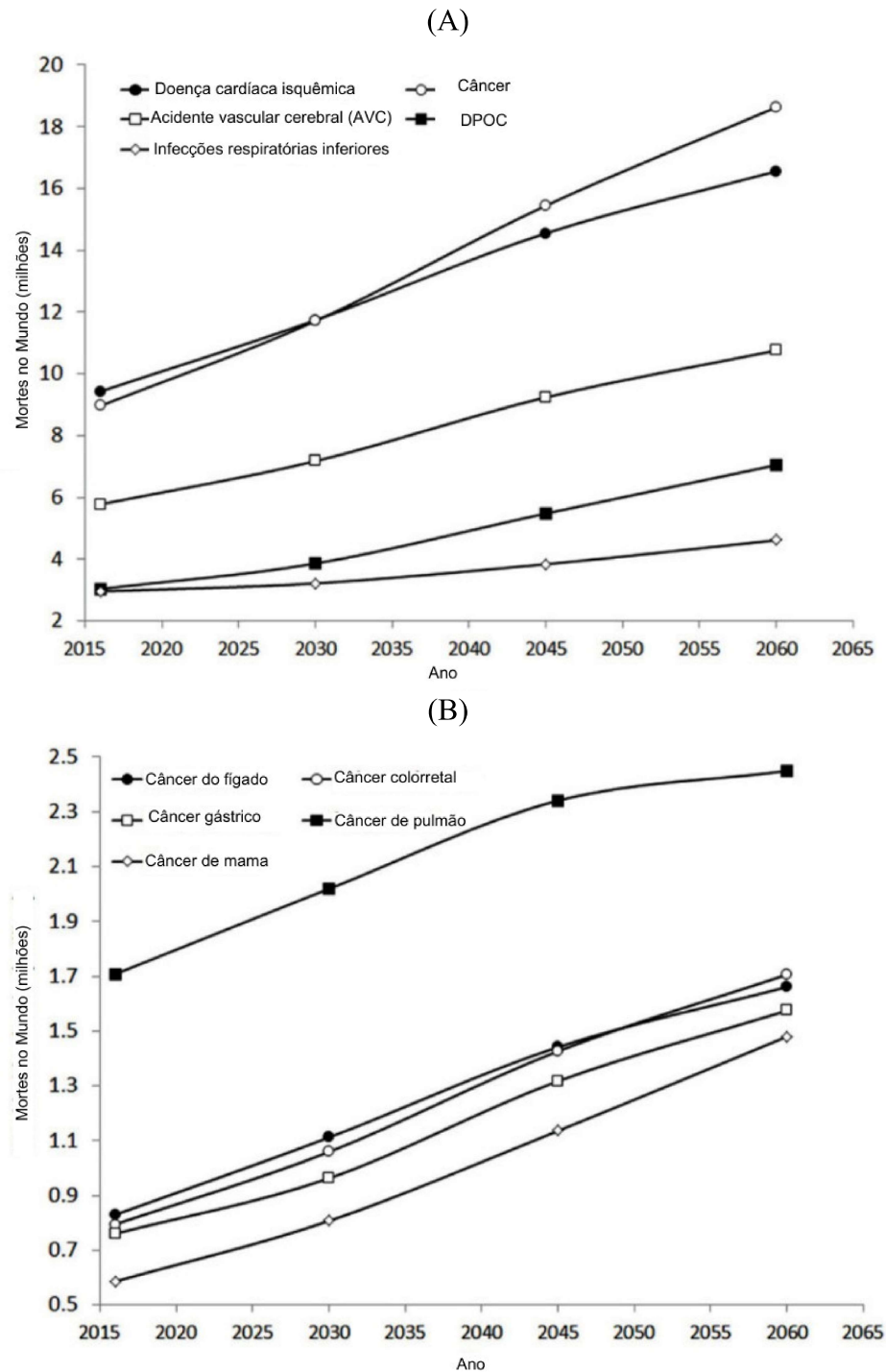
Figura 01— Mapa global do ranking da causa de morte precoce em relação as doenças cardiovasculares e câncer (idade entre 30 – 70 anos) em 183 países em 2019. Legenda: CVD indica doenças cardiovasculares.



Fonte: Adaptação de Bray et al. (2021).

Segundo a OMS, a tendência epidemiológica é que as mortes por câncer superem as causadas por doenças cardíacas isquêmicas, com aumento de 2,08 vezes (1,76 vezes para o aumento das doenças cardíacas isquêmicas) até o ano de 2060. Já quando é avaliada a tendência epidemiológica em relação as mortes causadas por câncer, o câncer colorretal tende a superar o câncer de fígado a partir de 2045 (Mattiuzzi; Lippi, 2019) (Figura02).

Figura 02 – Tendência epidemiológica estimada da causa de morte entre os anos de 2016 e 2060.
Em (A) corresponde as doenças e (B) aos tipos de câncer mais frequentes. (Legenda: DPOC, doença pulmonar obstrutiva crônica).



Fonte: Adaptação de Mattiuzzi e Lippi (2019).

No Brasil o cenário projetado em 2023 pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) (2022) demonstrou que a incidência dos tipos de câncer segue a tendência mundial em relação ao tipo de câncer previsto para homens e mulheres, respectivamente, câncer de mama e câncer de próstata. Em ambos os sexos, o câncer colorretal segue como o segundo tipo de câncer mais incidente correspondendo a 9,2% dos casos em homens e 9,7% dos casos em mulheres (INCA, 2022) (Figura 03).

Figura 03 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma*.

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	71.730	30,0%			Mama feminina	73.610	30,1%
Cólon e reto	21.970	9,2%			Cólon e reto	23.660	9,7%
Traqueia, brônquio e pulmão	18.020	7,5%			Colo do útero	17.010	7,0%
Estômago	13.340	5,6%			Traqueia, brônquio e pulmão	14.540	6,0%
Cavidade oral	10.900	4,6%			Glândula tireoide	14.160	5,8%
Esôfago	8.200	3,4%			Estômago	8.140	3,3%
Bexiga	7.870	3,3%			Corpo do útero	7.840	3,2%
Laringe	6.570	2,7%			Ovário	7.310	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.420	2,7%			Pâncreas	5.690	2,3%
Fígado	6.390	2,7%			Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA (2022).

Diante das projeções epidemiológicas para os próximos anos, o câncer será a doença que causará óbitos em todas as faixas etárias e ambos os sexos trazendo consigo os desafios de reverter essa tendência com o avanço de pesquisas no desenvolvimento de terapias mais eficazes e conscientização da população por estilo de vida mais saudável, já que a maioria dos tipos de câncer são de origem epigenética.

2.2 Câncer

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (2023), câncer é definido como várias doenças que possuem em comum o crescimento desordenado de células capazes de invadir e colonizar outros tecidos, denominado como metástase, processo que quando generalizado, é a principal causa de morte por câncer. Além dessa definição, existe a proposta por Brown et al. (2023): “Câncer é uma doença de proliferação descontrolada por células transformadas sujeitas à evolução por seleção natural”. Nessa definição a inclusão do termo seleção natural acrescenta as alterações genéticas e epigenéticas, que vão se acumulam numa população de células malignas, e tem como consequência um fenótipo letal.

Sob esse ponto de vista evolutivo, Peter Nowel (1976), postulou o modelo no qual uma única célula “normal” adquire uma mutação que favorece seu crescimento em relação as outras células dentro do microambiente, levando à expansão clonal. Além disso, apresentou a ideia de que as células tumorais podem apresentar instabilidade genética que as conduzem ao longo do tempo ao acúmulo de novas mutações. Consequentemente, resultando em populações subclonais que, por sua vez, devido à seleção natural a maioria delas são eliminadas e predomina o subclone mais apto (Nowell, 1976; Shlyakhtina, Moran, Portal, 2021). No entanto, esse modelo não explica a heterogeneidade intratumoral que corresponde a existente de mais de um clone como consequência da coexistência simultânea de múltiplas populações subclonais e a heterogeneidade não genética associada a variabilidade fenotípica.

A partir daí, surge a concepção de evolução paralela de múltiplos subclones após o início do câncer que, acrescenta além da mutabilidade intrínseca do DNA das células normais, a pressão seletiva dentro do microambiente tumoral como os principais estimuladores da evolução do câncer e da seleção clonal. Esses estimuladores estão associados ao crescimento do câncer, metástase, resistência aos medicamentos, recidiva e heterogeneidade clonal dentro de um tumor (Salavaty et al., 2023).

Portanto, a formação de neoplasias envolve um ecossistema dinâmico de clones celulares em constante evolução. Esses clones interagem através de competição e cooperação entre si e, com outras células presentes no microambiente tumoral (Merlo et al., 2006). A compreensão desse ecossistema e das interações celulares é fundamental para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficazes no contexto das neoplasias.

2.3 Microambiente tumoral

O microambiente tumoral corresponde a todas as células hospedeiras não neoplásicas presentes no tumor, tais como fibroblastos, células endoteliais, neurônios, adipócitos e células do sistema imunológico, tanto as inatas quanto as adaptativas. Além disso, abrange componentes não celulares, como a matriz extracelular (MEC) e produtos solúveis, a exemplo de quimiocinas, citocinas, fatores de crescimento e vesículas extracelulares (Xiao; Yu, 2021).

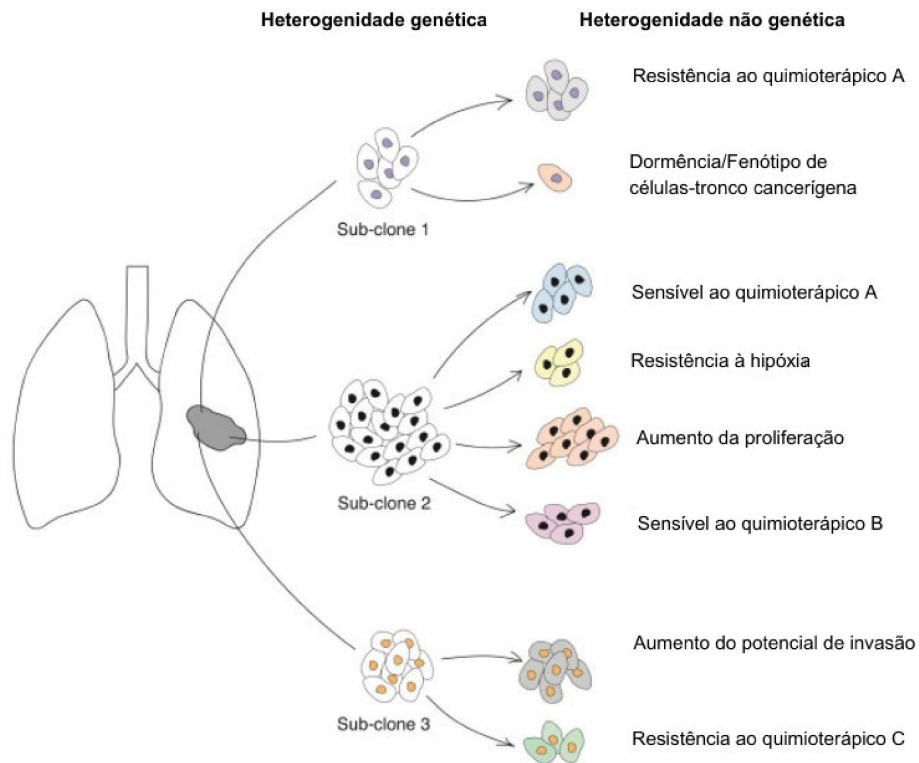
Tanto no processo de carcinogênese (processos de iniciação, progressão e metástase) quanto na resistência às terapias antitumorais o microambiente tumoral exerce funções importantes, devido a interação contínua entre as células tumorais e o estroma circundante

(Wu; Dai, 2017). No processo de carcinogênese, muitas alterações ocorrem no microambiente tumoral que incluem: a indução da proliferação e da angiogênese, a redução do reconhecimento do sistema imunológico devido à baixa imunogenicidade das células tumorais, a ativação das células imunológicas pró-tumorais que favorecem a invasão e metástase e, a ativação de vias de sinalização celular que regulam a progressão do câncer (Casey et al., 2015). Todos esses mecanismos distintos estimulam a transição de células normais para células neoplásicas malignas, a sobrevivência e a disseminação delas no organismo e são denominados *hallmarks* do câncer (as marcas registradas do câncer).

Já na resistência às terapias antitumorais diversos fatores podem ocorrer no microambiente tumoral, como é o caso barreiras físicas, sejam elas por características anatômicas (barreira hematocefálica, peritônio e testículos - “locais santuários”) ou pelo gradiente espacial dentro dos tumores que impede o suprimento sanguíneo adequado, criando um ambiente hipóxico pró-tumorigênico e diminuindo a exposição do tumor a ação dos antitumorais (Vasan; Baselga; Hyman, et al., 2019).

Outro fator importante de resistência aos antitumorais pode estar associado ao quimioterápico e as condições do microambiente tumoral, como a hipóxia, que seleciona dentro dos subclones aquelas células que são resistentes e elimina as células sensíveis a essas condições (Figura 04). Além disso, as células do sistema imunes associadas com o estroma e a vasculatura medeiam vários mecanismos de resistência, que vão evitar a eliminação das células tumorais mediada por células imunes pró-tumorais (Tregs, macrófagos M2) dificultando a ação de terapias antitumorais (Pitt et al., 2016).

Figura 04 – Heterogeneidade genética e não genética determinam mecanismos de resistência aos antitumorais e a evolução do câncer. Os sub- clones possuem perfis genéticos diferente que, consequentemente, expressam fenótipos diferentes.



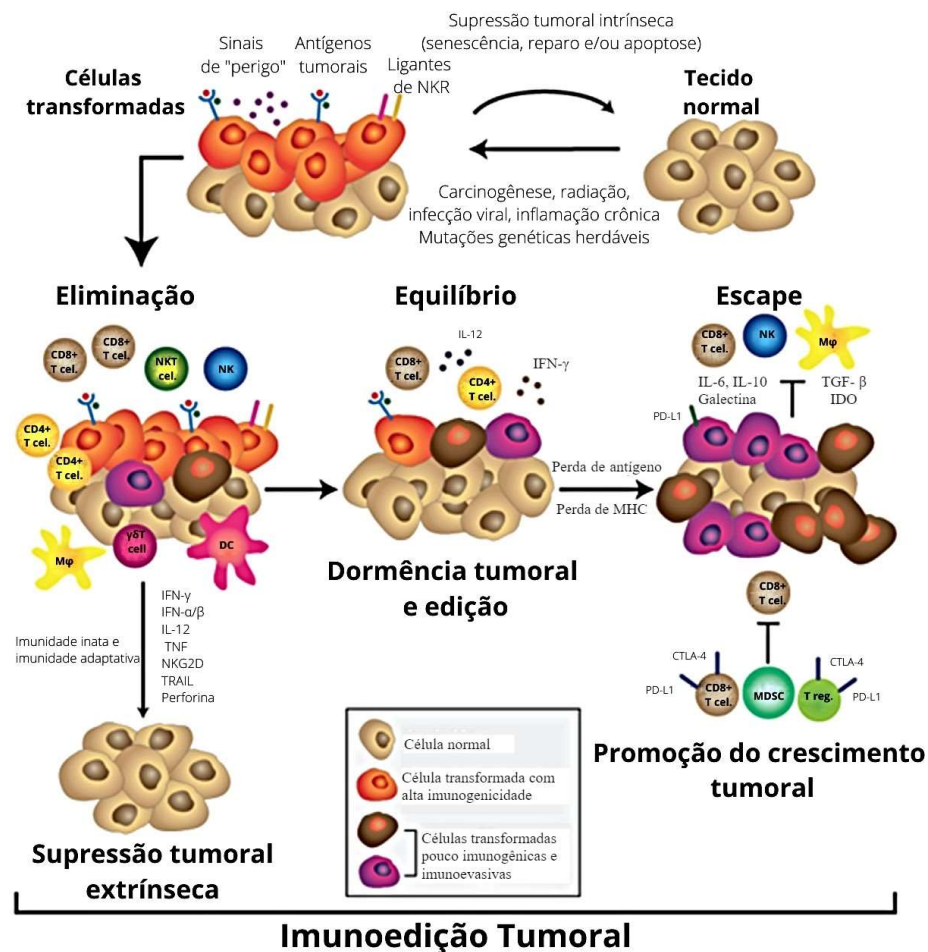
Fonte: Adaptação de Shlyakhtina; Moran; Portal (2021).

Logo, os componentes do microambiente tumoral são determinantes na evolução do processo de carcinogênese e no sucesso/fracasso das terapias antitumorais. Sendo importante no desenvolvimento de terapias anti-tumorais considerar as possíveis interações como os componentes do microambiente tumoral, principalmente, com as células imunes.

2.4 Imunologia tumoral

A interação entre o sistema imunológico e as células tumorais pode levar a erradicação ou estimular o desenvolvimento e progressão tumoral. Esse processo é denominado de imunoeedição tumoral e compreende três fases: eliminação, equilíbrio e escape (Figura 05). A imunidade inata e a imunidade adaptativa atuam na fase da eliminação, a imunidade adaptativa na fase de equilíbrio, e ocorre a supressão da imunidade inata e adaptativa na fase do escape (Teng; Kershaw; Smyth, 2013; Desai; Coxon; Dunn, 2022).

Figura 05 – Processo de imunoeedição tumoral consiste de três fases: eliminação, equilíbrio e escape. Durante essas fases as células imunes atuam mediante interação com receptores presentes nas células transformadas e sob liberação e estímulo de citocinas. O reconhecimento das células tumorais pelas células imunes é determinado pela imunogenicidade das células tumorais.



Fonte: Adaptação de Teng; Kershaw; Smyth (2013).

A eliminação é primeira fase, envolve a interação entre o tumor e sistema imunológico, e descreve a hipótese de imunovigilância. Essa hipótese sugere que os linfócitos sentinelas reconhecem e eliminam as células desreguladas através da interação das células imunes inatas e adaptativas que reconhecem as células tumorais em estágios iniciais (Tseng et al., 2019). Nesse processo de reconhecimento, as células apresentadoras de antígenos capturam antígenos tumorais e migram para os linfonodos de drenagem. A partir daí, apresentam os

antígenos aos linfócitos T virgens às moléculas de MHC-I (complexo principal de histocompatibilidade) e MHC-II, que ativam as células T imaturas em células T efetoras. Essas células seguem pela circulação sanguínea e infiltram-se no microambiente tumoral. Por sua vez, se as células T efetoras reconhecerem especificamente as células tumorais podem as eliminar através da liberação de granzimas e perforinas (Tang et al., 2020).

Já o equilíbrio corresponde a segunda fase, no qual as células tumorais que sobreviveram a fase de eliminação estão em equilíbrio dinâmico com o sistema imunológico, ou seja, em estado de dormência (Rao; Gharib; Han, 2019). Nesse estado, os linfócitos e o interferon gama (IFN- γ) exercem potente pressão seletiva capaz de conter variantes das células tumorais. Essa fase é provavelmente a mais longa das três fases e pode ocorrer por um período de muitos anos (Dunn et al., 2013). Conforme o tempo passa nessa fase, novas populações de células tumorais são produzidas com mais alterações genéticas e epigenéticas, que as permitem sobreviver e se proliferar no hospedeiro imunocompetente, fazendo a transição para a fase de escape.

Por fim, a fase de escape é caracterizada pelo crescimento das células tumorais sem as restrições da pressão imunológica exercida pelas defesas imunológicas inatas e adaptativas. Os mecanismos que interferem nas respostas imunes antitumorais são alterações no processamento, apresentação e reconhecimento de antígeno tumoral, perda da ativação de mecanismos, estado imunossupressor e inibição de mecanismos e, células tumorais resistentes (Keshavarz-Fathi; Rezaei, 2018). Nessa fase é possível identificar clinicamente a neoplasia maligna.

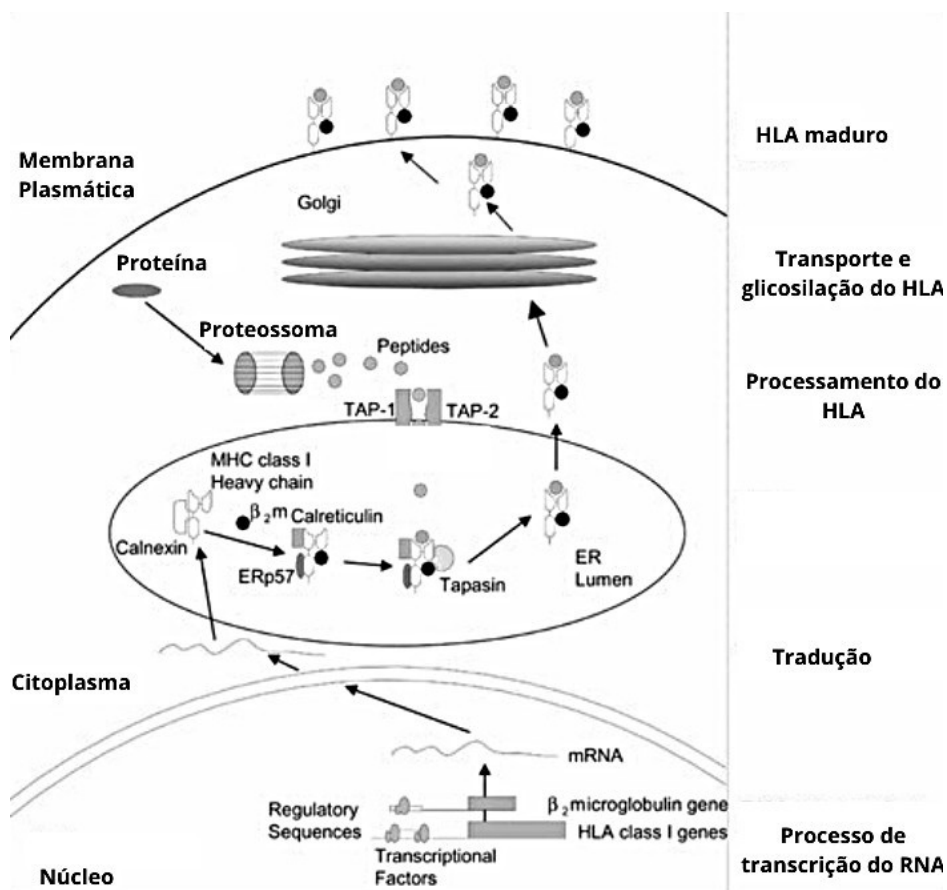
2.5 Expressão dos complexos de histocompatibilidade humano no câncer

Os complexos de histocompatibilidade de classe I (MHC de classe I) são receptores, que liga peptídeos de 8 a 10 aminoácidos, no qual interagem com os receptores de linfócitos T CD8⁺ e desencadeiam uma série de evento de sinalização (Wu et al., 2023). Essas sinalizações podem atuar na proliferação, produção de citocinas e lise da célula-alvo. A fim de que ocorra a interação do MHC classe I com os linfócitos T, é necessário que haja a biossíntese do MHC classe I.

Essa biossíntese corresponde ao processamento do antígeno por clivagem via proteossoma que em seguida será captado pelo transportador associado ao antígeno-1 e -2 (TAP) que estão presentes no lúmen do retículo endoplasmático (RE). Após essa etapa ocorre

a saída do complexo proveniente do RE pela via secretora de Golgi e sua apresentação na superfície da célula (Garcia-Lora; Algarra; Garrido, 2003; Rock; Reits; Neefjes, 2016) (Figura 06).

Figura 06 – Biossíntese do MHC de classe I. A síntese do MHC de classe I ocorre a partir da transcrição e tradução. Após essas etapas o MHC de classe I imaturo vai interagir com algumas proteínas no retículo endoplasmático que garantiram estabilidade e possibilitará a incorporação dos peptídeos obtidos via processamento de antígenos pelo proteossoma. Esses peptídeos serão captados pelo transportador associado ao processamento de antígeno (TAP) e internalizados no retículo endoplasmático. Por fim, esses peptídeos sofrerão modificações pós-traducionais no complexo de Golgi e serão apresentados na membrana plasmática como HLA maduro (MHC de classe I).

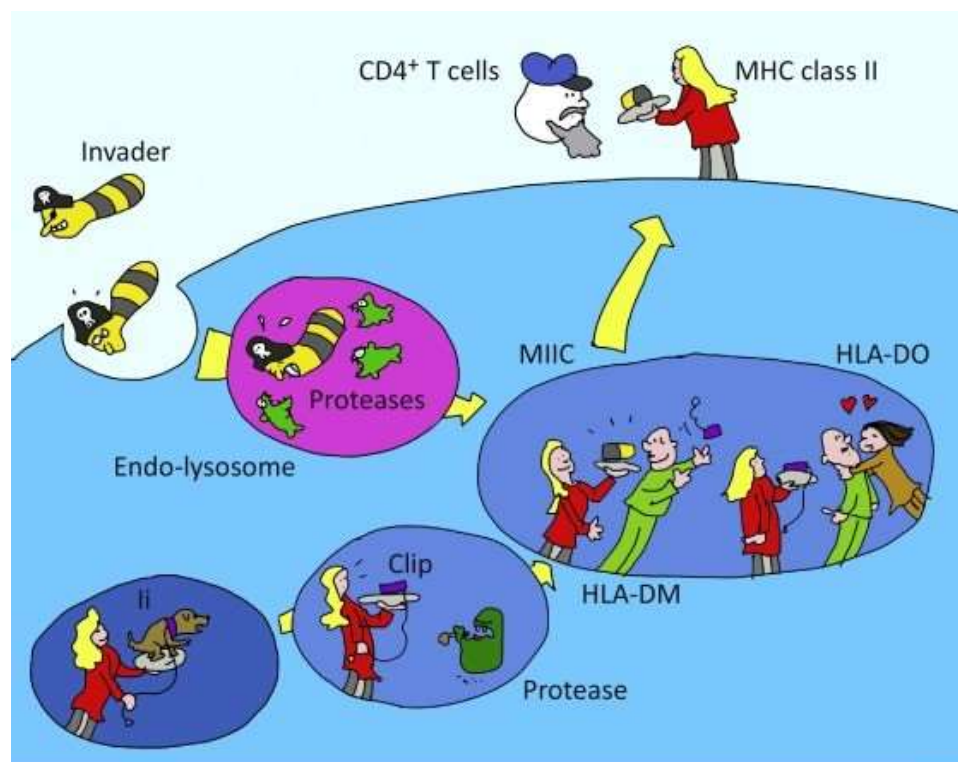


Fonte: adaptado de Garcia-Lora; Algarra; Garrido, 2003.

Outro complexo de histocompatibilidade humano importante é o MHC de classe II, liga peptídeos de mais de 13 aminoácidos, que reconhece linfócitos T CD4⁺ (Axelrod et al., 2019). A biossíntese desse complexo envolve endossomos+lisossomos (fagolisossomo) que

fazem o processamento da proteína, seguido pela dissociação de Ii por meio de enzimas proteolíticas deixando apenas a cadeia invariante associada à classe II (Clip) que se fundi ao endossomo tardio (MIIC) onde será trocado por um peptídeo antigênico no MHC de classe II chamado de DM (em humanos HLA-DM) que competirá com HLA-DO e em seguida será expresso na membrana plasmática (Figura 07).

Figura 07 – Biossíntese do MHC de classe II. Na síntese do MHC de classe II ocorre a formação de um fagossomo (endossomo+lisossomo) que atuará no processamento do antígeno. Paralelamente, a síntese do MHC de classe II imaturo ocorre mediante a interação com a cadeia invariante Ii seguido pela dissociação para cadeia invariante Clip. No momento seguinte ocorrerá a competição do antígeno e do HLA-DO para sítio ocupado por Clip. Após a incorporação do antígeno, o MHC de classe II será expresso na membrana plasmática e será apresentado aos receptores das células CD4⁺. Legenda: Invader – invasor ou antígeno; endo-lysosome – endolisossomo; MIIC – endossomo tardio.



Fonte: Rock; Reits; Neefjes (2016).

Em comparação ao processamento do MHC de classe I, o MHC de classe II o processamento do antígeno é via endossomo/lisossomo, a captação do peptídeo não envolve a tapasina como ocorre nos processos do MHC de classe I. Além disso, o MHC de classe II está

presente em células apresentadoras de antígeno, endoteliais e linfócitos B, enquanto o MHC de classe I está presente em todas as células nucleadas (Axelrod et al., 2019; Reits; Neefjes, 2016).

A expressão dos componentes da via do MHC de classe I e os níveis de expressão na superfície das células aumentam mediante o estímulo de interferons do tipo 2 (IFN- γ) (Zhou, 2009). Dentre as alterações que afetam a expressão do MHC de classe I, podem ocorrer alterações nas vias de resposta aos interferons e, conseqüentemente, a diminuição e perda da expressão de MHC de classe I em neoplasias malignas (Dhatchinamoorthy; Colbert; Rock, 2021). Esse mecanismo imunossupressor prejudica o reconhecimento das células tumorais pelas células T CD8⁺ (Dhatchinamoorthy; Colbert; Rock, 2021).

Nesse contexto, as células tumorais podem induzem mutações que interferem na síntese dos alelos do MHC de classe I e desencadear o escape das células tumorais (Garcia-Lora; Algarra; Garrido, 2003). A partir disso, a expressão positiva e elevada de MHC de classe I está associada ao prognóstico favorável de pacientes com câncer, enquanto que a baixa expressão, a um mau prognóstico (Wu et al., 2023). No entanto, na baixa expressão do MHC classe I pode favorecer uma segunda linha de defesa mediada pelas células Natural Killer (NK), mas não conseguem impedir a progressão tumoral quando os tumores estão clinicamente evidentes (Dhatchinamoorthy; Colbert; Rock, 2021).

Assim como ocorre no MHC de classe I, a expressão do MHC de classe II está associada a um bom prognóstico e desempenhar um importante no sucesso da imunoterapia (Axelrod et al., 2019). Nesse caso, o reconhecimento das células que expressão o MHC de classe é realizado por receptores das células T CD4⁺ (Axelrod et al., 2019). A expressão do MHC de classe II em células cancerígenas já foi observado em melanoma, câncer de mama, câncer colorretal, câncer de ovário, câncer de próstata, linfoma de Hodgkin clássico, glioma e câncer de pulmão de células não pequenas (Axelrod et al., 2019).

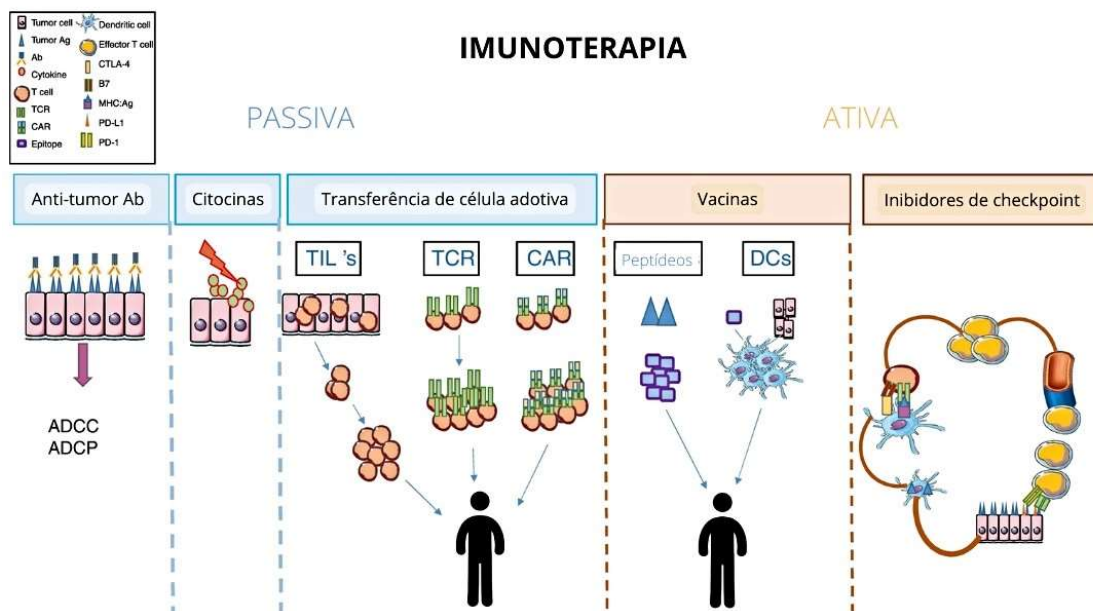
Por isso, no desenvolvimento de uma vacina é crucial verificar se a vacina predita consegue ser processada pela via de biossíntese de MHC de classe I e de classe II. Portanto, a biossíntese desses complexos é essencial para que seja desenvolvida reposta imune antitumoral. Dessa forma, é imprescindível a avaliação do processamento desses complexos e a da interação deles com os linfócitos.

2.6 Imunoterapia

A imunoterapia é a utilização de substâncias que ampliam e/ou restauram a capacidade do sistema imunológico para prevenir e combater doenças. Um dos objetivos da imunoterapia é ajustar o sistema imunológico para eliminar as células cancerígenas, evitando, ao mesmo tempo, respostas inflamatórias autoimunes descontroladas que podem resultar em limitações terapêuticas das imunoterapias (Abbott; Ustoyev, 2019).

Essa abordagem terapêutica é dividida em dois grupos dependendo do agente terapêutico e da condição do sistema imune do paciente em imunoterapia ativa e imunoterapia passiva. A imunoterapia passiva é usada quando a resposta do paciente é fraca ou pouco responsiva e envolve o uso de moléculas ou células para compensar a deficiência imunológica do paciente. Já a proposta da imunização ativa é estimular a função efetora do sistema imune residual (Escribese; Barber, 2017) (Figura 08).

Figura 08 – Diagrama das abordagens terapêuticas da imunoterapia ativa e passiva no câncer.



Fonte: Adaptação de Escribese; Barber (2017).

A imunoterapia passiva inclui a administração de anticorpos monoclonais, citocinas e transferência de células adotivas. Os anticorpos monoclonais são amplamente utilizados na clínica e tem o objetivo de especificamente alterar as vias ativadas/inativadas pelos receptores

das células tumorais que impedem a eliminação delas (Escribese; Barber, 2017). Outra terapia envolve a administração de citocinas imunomoduladoras como monoterapias ou combinada com outros regimes terapêuticos para tratar malignidades, que é pouco tolerada devido aos seus efeitos colaterais e necessita de modificações para diminuir a toxicidade (Farran *et al.*, 2019). Já a estratégia da transferência das células adotivas envolve a infusão de linfócitos T específicos do tumor, modificados ou amplificados, no sistema circulatório do paciente com câncer (Bujak *et al.*, 2018).

A imunoterapia ativa compreende as vacinas e inibidores de *checkpoint*. No desenvolvimento das vacinas é utilizada a estratégia denominada vacinologia reversa, no qual são utilizadas informações genômicas e ferramentas de bioinformática para identificar agentes imunogênicos com a habilidade de induzir a resposta imune (Parvizpour *et al.*, 2020). As vacinas podem ser baseadas em peptídeos (epítomos), células dendríticas (DC), RNA/DNA, entre outras modalidades (Barzaman *et al.*, 2021). Já os inibidores de *checkpoint* têm a finalidade de regular a indução de tolerância que permite que as células tumorais sejam capazes de evadir da resposta imune, como o CTLA-4 e PD-1 (Escribese; Barber, 2017).

Todavia, tanto a imunoterapia passiva quanto a imunoterapia ativa, são abordagens terapêuticas que possuem vantagens e desvantagens. Dentre as terapias mais recentes, a vacina baseada em peptídeos destaca-se como a mais promissora quando se considera o custo-benefício, tolerância imune satisfatória, imunogenicidade desejada e monitoramento das respostas imunes mais fácil (Farran *et al.*, 2019; Parvizpour *et al.*, 2020).

2.7 Vacinologia Reversa

A partir da identificação de antígenos específicos contra determinadas doenças, pode-se desenvolver uma nova abordagem na produção de vacinas. A chamada vacinologia reversa (VR) utiliza informações genômicas dos patógenos, ou parte deles, para que a vacina seja imunogênica e o indivíduo possa estabelecer resposta contra eventuais infecções específicas. Tal método destoa dos convencionais, na medida em que não necessita de crescimento de patógenos para que seja desenvolvida, podendo, também, ser utilizadas em doenças não infecciosas como o câncer, além de serem confeccionadas de maneira mais rápida (Monterrubio-López; Delgadillo-Gutiérrez, 2021).

Com base no exposto, o método convencional possui passos limitantes com relação ao tempo de produção da vacina, tendo inicialmente o cultivo do patógeno sob condições

laboratoriais como etapa para que, a partir disso, partes do organismo seja dissecada em componentes individuais que serão testadas por métodos genéticos, bioquímicos ou sorológicos, quanto a sua capacidade de gerar resposta imune. Finalmente, são determinadas as proteínas antigênicas. No método da VR, parte-se inicialmente da predição de proteínas antigênicas a partir de análise bioinformática, poupando o tempo necessário para se fazer todos os passos descritos acima (Goodswen; Kennedy; Ellis, 2023).

Diante do supracitado, a identificação de proteínas é parte determinante do método VR, de modo que o microrganismo, ou outro agente causador da doença, não seja introduzido inteiramente na formulação da vacina, fato que diminui a possibilidade de efeitos adversos ou reações imunológicas. Ademais, a capacidade de correspondência morfológica advinda da abordagem imunoinformática traz uma maior assertividade nos alvos terapêuticos, com anticorpos se ligando aos epítomos conformacionais gerando respostas neutralizadoras maiores do que os epítomos lineares (Heinson; Woelk; Newell, 2015).

Com a abordagem de VR, Herrera (2021) desenvolveu uma vacina multiepítomo contra o câncer de pulmão, tomando como alvo Antígenos Testicular Câncer (CTA), uma vez que estes se encontram apenas em células germinativas, em indivíduos saudáveis, ou em diversos tipos de tumores. A vacina, denominada Mvax, contém 22 epítomos de vários CTAs, como MAGE3, MAGE4, NY-ESO-1, sendo não tóxica, não alergênica e antigênica, além de estável do ponto de vista físico-químico. Isso demonstra o potencial que tais vacinas multi-epítomo possuem no enfrentamento de doenças como o câncer, uma vez que estimulam a produção específica de antígenos relacionados aos tumores (Herrera, 2021).

2.8 Resposta imune a vacinas multi-epítomo

Ao ter o conteúdo da vacina injetado, o corpo passará por diversos processos até que haja o desenvolvimento de uma memória ativa contra o patógeno que se quer combater. Inicialmente, deverá ocorrer o processo de reconhecimento de epítomos presentes no antígeno componente da vacina, por células denominadas como células apresentadoras de antígenos (APC – sigla em inglês), como são as células dendríticas, que a partir disso passarão a fagocitar e processar as partículas vacinais internamente. Geralmente, antígenos proteicos são geralmente reconhecidos por células T dependentes de antígenos, enquanto polissacarídeos são reconhecidas por células T independentes de antígenos (Prawiningrum; Paramita; Panigoro, 2022).

A partir dessa digestão, pedaços desse antígeno serão transportados para a membrana celular e farão parte do complexo principal de histocompatibilidade tipo II (MHC II). Diante disso, estas células passarão, então, a circular no corpo até que cheguem aos linfonodos e desenvolvam uma resposta imune duradoura e efetiva ao antígeno vacinal, além de participar da maturação de células B. Durante as etapas iniciais do processamento, receptores presentes nas células auxiliaadoras T CD4⁺ interagem com o receptor MHC II das células APC e o antígeno vacinal expressado em sua superfície. Essa interação causa ativação das células T CD4⁺ e as fazem estimular a produção de células B, além de sua ativação (Hill; Beitelshes; Pfeifer, 2021).

Quando a célula T interage com a célula B, há a produção de citocinas promotoras da proliferação da população de células B e sua maturação em células secretoras de anticorpos. Ao serem geradas, tais células efetoras podem se disseminar ou permanecerem como células de memória nos linfonodos, para que haja resposta rápida às infecções por mesmo antígeno, respondendo intrinsecamente melhor ao estímulo após serem treinadas (Palgen et al., 2021).

Por fim, em contraste com o preconizado pelo padrão tradicional, há uma expansão do conceito de vacinação para além da prevenção de doenças, ao passo que é possível atualmente atingir, também, doenças em andamento, fazendo parte do seu tratamento. No caso do câncer, a identificação de neoantígenos, produzidos em processos de mutação e apenas expressos em tumores, permite que haja a produção de vacinas específicas contra variados tipos de neoplasias (Cao et al., 2021).

2.9 Vacinas de peptídeos no câncer

Vacinas baseadas em peptídeos representam uma abordagem de vacinação com baixo índice de efeitos colaterais nas quais utilizam-se peptídeos sintéticos ou específicos, ou uma combinação deles, associados ao tumor, para induzir e ativar células T reativas contra o câncer. Tais peptídeos estão presentes na superfície de células dos antígenos leucocitários humanos (HLA – sigla em inglês) e podem ser reconhecidas por receptores de células CD4⁺ e CD8⁺ (Nelde; Rammensee; Walz, 2021).

Com base nessas informações, novas pesquisas foram conduzidas no sentido de identificar uma gama de antígenos associados ao tumor, que podem ser utilizados para a vacinação contra o câncer, desde que sejam identificados pelo HLA I e reconhecidos pelo

linfócito T citotóxico. Estes peptídeos utilizados na vacinação são usualmente pequenos (7 – 14 aminoácidos) e imunogênicos, capazes de se ligar a antígenos específicos do HLA I e, ao serem processados pelas APCs viajam aos linfonodos e sensibilizam os linfócitos T circulantes (Izumoto, 2012).

Exemplificando a aplicabilidade da vacina de epítopo na prática clínica foi desenvolvida em 2014 a IMA901, utilizada no tratamento do câncer de células renais. O tratamento demonstrou potencial de resposta das células T contra o IMA901 e benefícios clínicos associados a isso, como a indução de respostas duradouras nos pacientes, o que pode prolongar a sobrevida e beneficiar doentes acometidos por esse tipo de câncer (Kirner; Mayer-mokler; Reinhardt, 2014).

Com relação ao câncer de mama, a vacina denominada NeuVax TM, é uma vacina baseada em um peptídeo imunogênico conhecido como E75 derivado do receptor do fator de crescimento 2 (HER2) associado ao imunoadjuvante fator estimulador de colônia de macrófago / granulócito (GM-CSF) e apresenta uma redução no risco relativo de recorrência em 5 anos de 48% (Clifton et al., 2016).

Além da aplicação no câncer de subtipo HER2, demonstrou-se que há também a possibilidade de se utilizar a vacina de peptídeo para o subtipo de câncer de mama triplo negativo. A vacina PVX-140, baseada em um tetrapeptídeo que inclui dois *splices* variantes do fator de transcrição XBP1 associado a CD138 e CS-1, foi combinada com prembolizumab, e aplicada em pacientes com câncer de mama triplo negativo em fase metastática, de modo que houve resposta citotóxica por células T específicas, com um incremento na capacidade de memória específica na maioria dos pacientes (Isakoff et al., 2022).

Ainda com base em mecanismos sinérgicos entre vacinas e tratamentos com anticorpos monoclonais, novos estudos trazem mais força para essa abordagem para o aumento do tempo livre da doença (DFS) no câncer de mama TNBC. Foi-se identificado que a capacidade de resposta do anticorpo monoclonal transtuzumabe, devido a sua característica de depender de uma resposta imune adaptativa competente, é beneficiada pela introdução de uma vacina de peptídeo derivada de HER-2, além de haver efeitos ampliados na administração de ambos os componentes. Esse é o caso da vacina nelipepimut-S (NPS) que aumentou o DFS quando comparado com o placebo (O'shea; Clifton; Peoples, 2021).

Em 2020, estudou-se uma monoterapia para pacientes com câncer de mama TNBC refratários à quimioterapia sistemática, utilizando-se uma vacina de mix de 19 peptídeos (UMINI000014616) e não foram observados efeitos adversos graves após a aplicação, no período de tempo em que o ensaio estava sendo realizado, além de se correlacionar positivamente com um aumento da sobrevida. Ademais, avaliou-se quais candidatos se beneficiariam mais com o tratamento proposto e chegaram à conclusão de que pacientes com baixos níveis de proteína c reativa ou 3 ou mais ciclos de terapia química seriam os melhores candidatos (Toh et al., 2020).

2.10 Imunoinformática

A necessidade da identificação de antígenos, devido às diversas terapias imunológicas e vacinas desenvolvidas, tornou possível a elaboração de mecanismos cada vez mais arrojados para essa finalidade. A imunoinformática surge em um contexto no quais técnicas computacionais passaram a fazer parte do arsenal utilizado para analisar a maneira como o corpo funciona, incluindo nisso a resposta imune. Dessa maneira, a imunoinformática envolve a aplicação de métodos computacionais para resolução de problemas imunológicos a partir da acumulação de diversos dados relevantes advindos do sequenciamento genético tanto de organismos humanos quanto outros (Tomar; Rajat, 2010).

Uma das maiores aplicações da imunoinformática é a previsão de epítomos específicos que podem ser detectados por células B e T, devido aos sistemas de reconhecimento MHC classe I e II. Diante disso, a principal utilização dessa tecnologia consiste no desenvolvimento de vacinas baseadas em peptídeos, através da detecção dos epítomos relevantes para cada produto. Além disso, a modelagem de estruturas proteicas permite o entendimento sobre como estas moléculas interagem com outras moléculas e com o sistema imune. Baseando-se nisso, é possível caracterizar com grande acurácia o alelo do antígeno leucocitário humano (HLA) de um indivíduo (Backert; Kohlbacher, 2015).

Com base no exposto, as aplicações da imunoinformática são múltiplas e a predição de epítomos lineares de células B e T de vírus, bactérias e tumores podem diminuir os custos relacionados com operações laboratoriais. Também há a redução dos riscos relacionados à produção da vacina por métodos convencionais, como a exposição a agentes infecciosos durante o cultivo e manipulação, fazendo com que este seja um bom método alternativo (Raoufi et al., 2020).

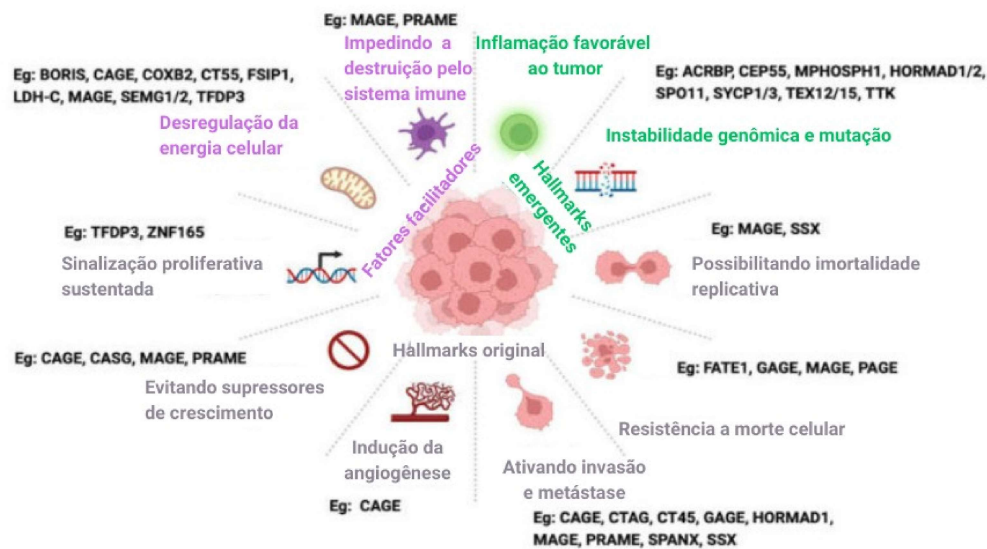
Com os antígenos tumorais como alvo, as vacinas podem ser desenhadas para que treinem o sistema imune para reconhecer as células tumorais. A imunoinformática pode auxiliar no processo, incrementando a segurança em termos de antigenicidade. Isso pode ser feito com base na identificação do antígeno, análise estrutural da proteína, predição do epítipo da célula T, caracterização do epítipo e avaliação da interação entre epítipo e proteína. A análise estrutural da proteína relaciona-se com as características físico-químicas, hidroquímicas, e antigênicidade da proteína. Além disso, a caracterização da alergenicidade e toxicidade podem ser feitas *in silico* utilizando-se preditores (Prawiningrum; Paramita; Panigoro, 2022).

2.11 Antígeno testicular do câncer

Os Antígenos Cancerígenos Associados/testicular (CTAs) estão expressos em células germinativas e trofoblastos, sendo silenciados à medida que essas células se diferenciam para formar células somáticas. O fenômeno de silenciamento ou expressão coordenada desses CTAs ao longo do desenvolvimento indica a existência de um mecanismo regulador comum para controlar a expressão genética (Nin; Deng, 2023). Segundo Salmaninejad e colaboradores (2016), a regulação da expressão dos CTAs pode estar associada a agentes epigenéticos (metilação do DNA e modificação de histonas) e agentes não-epigenéticos (citocinas, tirosina quinases, fatores de transcrição precisos e vias de sinalização de controle de CTAs).

CTAs podem ser ligados ou não ao cromossomo X, sendo os ligados ao X relatados como os que apresentam mais associação com os tumores devido a expressão maior em tecidos tumorais e pela forte antigenicidade (Meng et al., 2021). Além disso, diversas pesquisas indicaram que os CTAs atuam em uma variedade de vias celulares que levam ao fenótipo cancerígeno em células humanas. Essa evidência sugere uma diversidade nas funções dos CTAs em cânceres humanos e destaca o envolvimento deles em características fundamentais do câncer (*hallmarks* do câncer) (Figura 09) (Nin; Deng, 2023).

Figura 09 – Relação dos CTAs com os *hallmarks* do câncer originais (em cinza), emergentes (em verde) e fatores facilitadores (em roxo).



Fonte: Adaptação de Nin e Deng (2023).

Por conta dos padrões específicos de expressão e a imunogenicidade, os CTAs são considerados alvos ideais para a imunoterapia no combate ao câncer. Quando apresentados em conjunto com HLA Classes I ou II, esses CTAs têm a capacidade de desencadear tanto respostas imunes humorais quanto de células T (Gordeeva, 2018). Contudo, é importante considerar que a imunogenicidade varia entre diferentes CTAs e em sua distribuição em células tumorais heterogêneas que pode estar relacionada ao status de metilação do promotor global ou específico (Scanlan et al., 2002).

Portanto, para uma abordagem eficaz de imunoterapia baseada em CTAs, é crucial seguir as seguintes etapas (Gordeeva, 2018): (i) identificar o conjunto ideal de CTAs altamente imunogênicos expressos em Células-Tronco Cancerígenas (CSCs) e suas descendentes com proliferação indefinida, mas não nas células-tronco normais; (ii) selecionar o regime terapêutico mais apropriado para estimular a resposta imune a antígenos específicos, considerando opções como vacinas peptídicas ou proteicas completas, com ou sem adjuvante, tratamentos combinados, entre outras; e (iii) escolher o regime terapêutico que oferece máxima segurança e tolerabilidade.

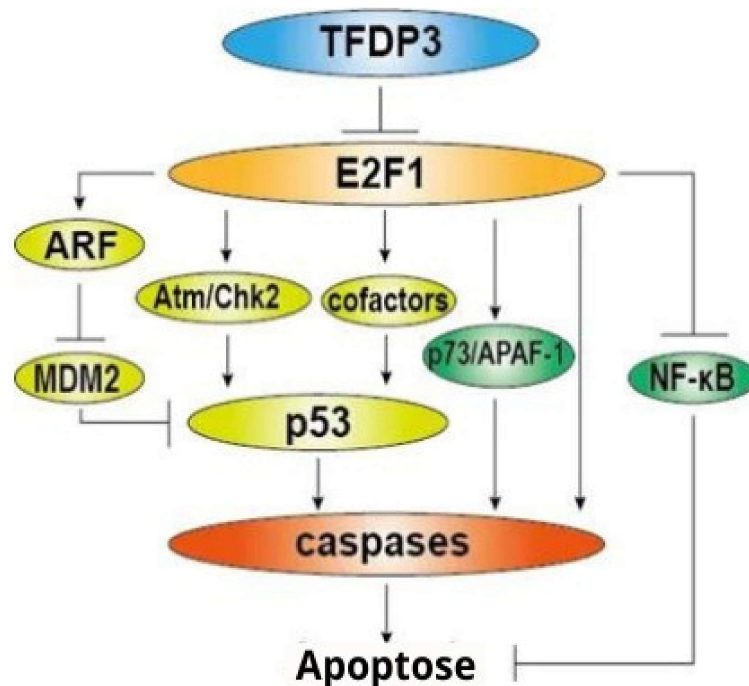
Diversos estudos têm demonstrado o uso de CTAs como alvo para o desenvolvimento de vacinas antitumorais com um antígeno, múltiplos antígenos ou combinadas com

quimioterapia (Meng et al., 2021). Logo, os CTAs são alvos promissores para o desenvolvimento de terapias visto que desempenham papéis importantes em vias e mecanismos da carcinogênese.

2.12 Fator de transcrição da família DP3 (TFDP3)

TFDP3 é um gene (ID: 51270) localizado no cromossomo X chamado de *Transcription factor DP family member*, e por ser expresso principalmente em testículo ou células cancerosas, raramente em células normais, é chamado de antígeno testicular do câncer. A proteína transcrita a partir deste gene age na ativação do ciclo e proliferação celular, na diferenciação e apoptose das células em que estão presentes. Isso é possível graças à capacidade de fazer uma desregulação da ativação transcricional mediada por proteínas da família E2F (Huang et al., 2021) (Figura 10).

Figura 10 – Repercussões da inibição do fator de transcrição E2F1 pelo TFDP3. O diagrama esquematiza as vias gerais de ativação da apoptose causada por E2F1 e a função repressora do TFDP3. A porção verde clara representa os mecanismos dependentes de p53, enquanto a parte verde representa os mecanismos independentes de p53.



Fonte: Adaptação de Huang et al. (2021).

Inicialmente, a característica de desregulação da apoptose trouxe a perspectiva de que esta proteína poderia atuar inibindo a degradação do tumor, o que contribuiria com a capacidade aumentada de crescimento das células cancerosas, determinando o processo de proliferação tumoral. Isso se tornou mais evidente em células de câncer de mama do tipo triplo negativo (TNBC), nas quais Ding e colaboradores (2018) encontraram relação entre a superexpressão do TFDP3 e células da linhagem MDA-MB-231, determinando maior resistência à quimioterapia e à apoptose, através da autofagia induzida por essa proteína que estaria ligada a regulação positiva da proteína autofágica chave LC3(MAP1LC3) aumentando o número de autofagossomos durante a quimioterapia, reparando os danos causados. Além disso, foi detectado que a inibição do TFDP3 aumenta a sensibilidade a drogas quimioterápicas.

Ma e colaboradores (2014) demonstraram a relação do aumento da expressão do TFDP3 com a supressão da apoptose induzida por E2F1 em câncer de próstata que corrobora com os achados das células de linhagem MDA-MB-231 de câncer de mama triplo negativo. Por sua vez, a resistência à quimioterapia também foi descrita em leucemia linfoblástica das células T infantil por Chun e colaboradores (2017), mas associada à desmetilação parcial do promotor de TFDP3.

Outro mecanismo relacionado com o TFDP3 e o câncer de mama é o seu papel na regulação da transição epitélio-mesenquimal. Yin e colaboradores (2017) detectaram que a inibição do TFDP3 interfere nessa transição, mas não atua na proliferação celular durante o processo, o que indica que a proteína TFDP3 age como fator de transcrição na transição epitélio-mesenquimal do câncer de mama. Essa relação do TFDP3 com a transição epitélio-mesenquimal também foi identificada no carcinoma hepatocelular e também o revelou como um potencial marcador prognóstico (Wang et al., 2021).

Diante disso, o gene TFDP3 tem emergido como um importante regulador da proliferação celular e invasão em TNBC. A expressão aumentada do gene TFDP3 está associada a uma pior sobrevida, uma menor resposta à quimioterapia e a uma maior taxa de recorrência em pacientes com TNBC. Logo, o TFDP3 pode ser considerado um alvo promissor para desenvolvimento de terapias anti-tumorais para o câncer de mama subtipo triplo negativo, próstata, leucemia linfoblástica de célula T infantil e carcinoma hepatocelular.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Prospectar *in silico* epítomos candidatos para a construção de uma vacina multi-epítomo para os tipos de câncer que expressam o TFDP3.

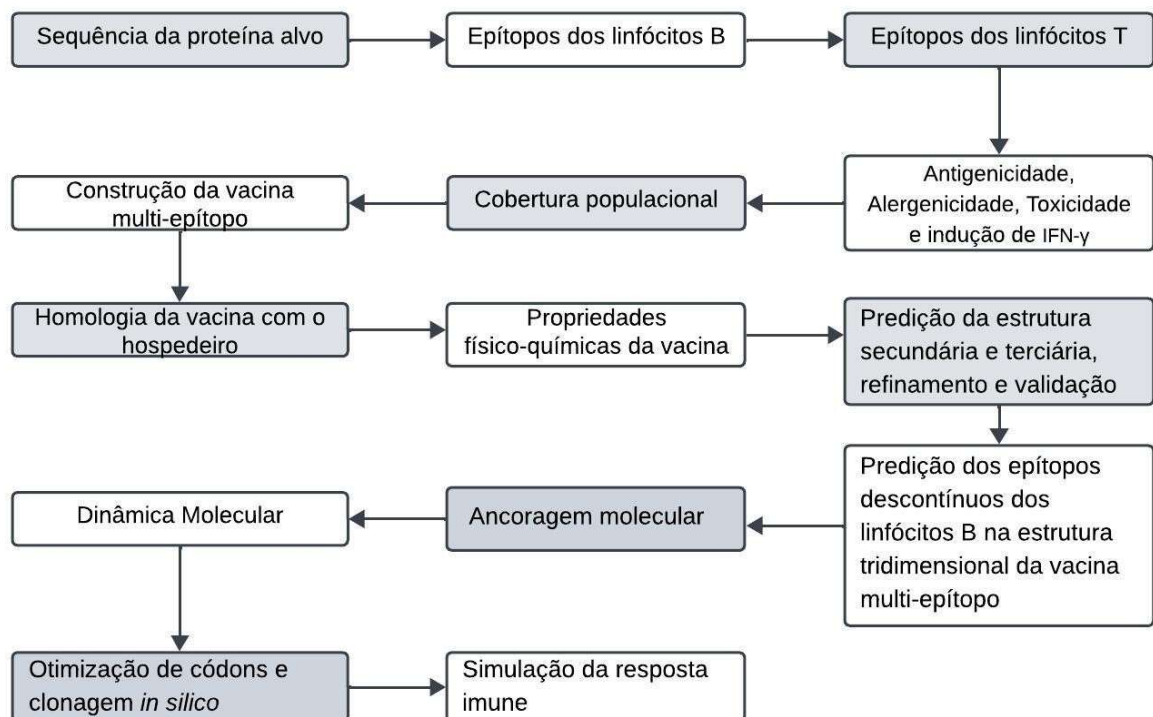
3.2 Objetivos específicos:

- Identificar candidatos a epítomos lineares dos linfócitos B e dos linfócitos T CD8+ e linfócitos T CD4+;
- Avaliar a antigenicidade, alergenicidade e toxicidade dos epítomos;
- Identificar epítomos do linfócito T CD4+ que induzem a produção de interferon-gama (IFN- γ);
- Estimar a cobertura populacional dos epítomos dos linfócitos T CD8+ e linfócitos T CD4+;
- Delinear a vacina multi-epítomo;
- Avaliar a homologia da vacina multi-epítomo com outras proteínas humanas;
- Estimar as propriedades físico-químicas da vacina multi-epítomo;
- Avaliar o processamento da vacina multi-epítomo na biossíntese do complexo de histocompatibilidade (MHC) de classe I e modificações pós-traducionais;
- Predizer a estrutura secundária e terciária, refinar e validar a vacina multi-epítomo;
- Avaliar os epítomos descontínuos dos linfócitos B na estrutura tridimensional da vacina multi-epítomo;
- Avaliar a afinidade de ligação da vacina multi-epítomo *in silico* com os receptores semelhantes a Toll (TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-7 e TLR-9);
- Identificar as adaptações estruturais da vacina multi-epítomo por meio da simulação de sistemas biológicos;
- Otimizar de códons para clonagem *in silico* da vacina multi-epítomo;
- Avaliar a resposta imune por simulação da vacina multi-epítomo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Fluxograma dos métodos

Figura 11 – Fluxograma dos métodos aplicados no estudo do desenvolvimento da vacina multi-epítopo.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

4.2 Aquisição da sequência alvo

A sequência de aminoácidos do TFDP3 (código de acesso: Q5H9I0) foi obtida no formato FASTA canônica no UniProt (<https://www.uniprot.org/>) (Acesso no banco de dados em: 23 de junho de 2023).

4.3 Predição de epítomos lineares dos linfócitos B

O reconhecimento dos epítomos dos linfócitos B é uma etapa crucial no desenvolvimento de vacinas multi-epítopo, já que os anticorpos liberados por essas células estimulam a imunidade humoral. Os epítomos lineares dos linfócitos B foram preditos pelo servidor ABCpred (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/abcpred/index.html>) (Saha; Raghava,

2006), o qual utiliza a abordagem de redes neurais recorrentes e apresenta 65,93% de acurácia. Este método foi desenvolvido utilizando um conjunto de 700 epítomos da base de dados Bcired (Saha.; Bhasin; Raghava, 2005) juntamente com 700 peptídeos derivados aleatoriamente da base de dados do Swiss-Prot, garantindo que o conjunto de dados fosse diversificado e não redundante (Saha; Raghava, 2006). Na avaliação da sequência pelo servidor ABCpred foi adotado o ponto de corte igual a 0,51 e comprimento do aminoácido igual a 16.

4.4 Predição dos epítomos dos linfócitos T

Os epítomos dos linfócitos T devem interagir com as moléculas de MHC de classe I e MHC de classe II para melhor reatividade imunogênica celular. Os epítomos que se ligam as moléculas de MHC de classe I e MHC de classe II foram preditos pelos servidores baseados em rede neural artificial, NetMHCpan-4.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetMHCpan-4.1>) (acessado em 19 de julho de 2023) e NetMHCIIpan-4.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetMHCIIpan-4.0>) (acessado em 19 de julho de 2023) foram usados com os parâmetros padrão (Reynisson *et al.*, 2020). Sendo para o servidor NetMHCpan-4.1 considerado peptídeos constituídos por 9 aminoácidos, os limites de % rank estabelecidos para ligação forte < 0.50% e para ligação fraca < 2.00%. Já no servidor NetMHCIIpan-4.0 considerado peptídeos constituídos por 15 aminoácidos, os limites de % rank estabelecidos para ligação forte < 2% e para ligação fraca < 10%.

4.5 Predição da antigenicidade, alergenicidade, toxicidade dos epítomos dos linfócitos B e linfócitos T

Os epítomos identificados dos linfócitos B e linfócitos T foram avaliados quanto à antigenicidade pelo servidor VaxiJen v 2.0 (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>) (Doytchinova; Flower, 2007), cujo ponto de corte foi 0,5 e o alvo “tumour”. Já alergenicidade foi avaliada pelo servidor AllerTop v2.0 (<https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/index.html>) (Dimitrov *et al.*, 2014), e a toxicidade pelo ToxinPred (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred/index.html>) (Gupta *et al.*, 2013), cujo método utilizado foi o “SVM (Swiss-Prot)” e ponto de corte 0.0 . Apenas os epítomos lineares do linfócito B e dos epítomos dos linfócitos T identificados como antigênicos, não alergênicos e não tóxicos foram considerados para compor a vacina multi-epítomo.

4.6 Predição da indução de interferon gama (IFN- γ) nos epítomos dos linfócitos T do MHC de classe II

A identificação dos epítomos que possuem afinidade pelo MHC de classe II e ativam os linfócitos T CD4 através do estímulo do IFN- γ tem papel importante no reconhecimento imunológico e desenvolvimento da resposta imune tumoral (Haabeth, 2014). O servidor IFNepitope (<https://webs.iiitd.edu.in/raghava/ifnepitope/predict.php>) (acessado em 24 de julho de 2023) foi utilizado para identificar os epítomos com potencial de indução de IFN- γ usando o algoritmo de máquina de vetores de suporte (SVM) (Dhanda; Vir; Raghava, 2013).

4.7 Análise da cobertura populacional do epítomos dos linfócitos T

O uso de multi-epítomos na composição de vacinas pode ampliar a cobertura populacional devido à variedade de alelos nas populações do mundo. Por isso, os alelos de MHC de classe I e classe II dos epítomos foram avaliados em relação a cobertura populacional pela ferramenta do IEDB (<http://tools.iedb.org/population/>) (acesso em 20 de julho de 2023) (Bui et al., 2006). As regiões consideradas para serem avaliadas foram Europa, Estados Unidos, China, Japão e América do Sul. No caso do Brasil também foi avaliada a cobertura populacional em relação as etnias ameríndias (indígenas do continente americano), caucasoide, miscigenado e mulato.

4.8 Construção da vacina multi-epítomo

A vacina foi elaborada com epítomos de linfócitos B, MHC de classe I e classe II. Na seleção dos epítomos foram considerados aqueles que atendiam aos parâmetros de imunogenicidade, não alergenicidade, não toxicidade e indutor de IFN- γ (MHC de classe II). No caso dos epítomos de MHC de classe I e classe II também foram considerados aqueles com maior quantidade de alelos de HLA para cada epítomo e a ampla cobertura populacional. Além disso, foi realizada a triagem dos epítomos que não se sobrepunha em relação a posição dos aminoácidos a fim de explorar a maior diversidade de epítomos da sequência do TFD3. Na junção dos epítomos foram utilizados os linkers EAAAK, KK, GPGPG, AAY e uma cauda de Histidina (6xHist) amplamente utilizados nas vacinas de peptídeos (Nezafat et al., 2014). A fim de aumentar a imunogenicidade foi utilizado como adjuvante a proteína 50S ribossomal L7/L12 da *Mycobacterium tuberculosis* Rv0652 (Lee et al., 2014; Mahdevar et al., 2021).

4.9 Análise de homologia da vacina multi-epítopo com o hospedeiro

A homologia com proteínas expressas no tecido normal além do tumoral pode provocar autoimunidade. O servidor online NCBI BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Johnson et al., 2008) foi utilizado para verificar a homologia da vacina multi-epítopo com outras proteínas humanas. A sequência de aminoácidos da vacina foi adicionada no formato FASTA, o organismo alvo selecionado foi o *Homo sapiens* (taxid:9606) e o BLAST foi executado e os outros parâmetros permaneceram inalterados.

4.10 Avaliação das propriedades físico-químicas da vacina

Após a junção dos epítopos para a composição de uma vacina é importante a avaliar suas características, como antigenicidade, alergenicidade e toxicidade. Esses fatores contribuem para o desenvolvimento de uma resposta imune segura. Os servidores utilizados para avaliar esses parâmetros foram os mesmos utilizados na predição dos epítopos dos linfócitos B e linfócitos T no item 4.4 (acesso em 20 de julho de 2023).

Além disso, as propriedades físicas e químicas foram avaliadas pelo servidor ExPASy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) (acesso em 20 de outubro de 2023) que incluíram índice alifático (indica termoestabilidade da proteína), índice de hidropaticidade (GRAVY), peso molecular, ponto isoelétrico (PI) e composição de aminoácidos na vacina (Gasteiger et al., 2005). A solubilidade da vacina foi avaliada pelo SOLPro (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>) que apresenta 74,15% de acurácia na predição por máquina de vetores de suporte (SVM) (ponto de corte $\geq 0,5$) (Magnan; Randall; Baldi, 2009).

4.11 Predição de processamento via proteossoma, interação com os transportadores TAP (biosíntese de MHC de classe I) e modificações pós-traducionais da vacina multi-epítopo

A identificação de pontos de clivagem via proteossoma da vacina foi previsto pelo NetChop-3.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetChop-3.1/>) (Kesmir et al., 2002), método de predição (“C term 3.0”) e ponto de corte 0,5. Também foi avaliada a afinidade da ligação entre a vacina e os transportadores TAP pelo TAPPred (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/tappred/>) (Bhasin; Raghava, 2004). Além disso,

modificações pós-traducionais por glicosilação e fosforilação foram previstos pelo NetOGlyc v.4.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetOGlyc-4.0/>) (Steentoft et al., 2013) e NetPhos v. 3.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>) (Blom; Gammeltoft; Brunak, 1999), respectivamente.

4.12 Predição da estrutura secundária e terciária, refinamento e validação

A estrutura secundária tem influência na conformação e estrutura tridimensional da vacina multi-epítipo. Assim, a determinação das estruturas secundárias, como a folha beta e alfa-hélice, da sequência de aminoácidos da vacina foram previstas pelo PSI-blast (PSIPRED 4.0) (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) que utiliza duas camadas ocultas de redes neurais com 84.2% de precisão nas predições (Jones, 1999; McGuffin; Bryson; Jones, 2019).

Já a estrutura terciária da vacina multi-epítipo foi modelada usando o servidor ROBETTA (método RoseTTAFold) (<https://robetta.bakerlab.org/>) (acesso em 14 de setembro de 2023) (Baek et al., 2021). A qualidade dos modelos foi avaliada pelo ERRAT (<https://saves.mbi.ucla.edu/>) que analisa a interação entre os átomos da estrutura comparando com as estruturas cristalográficas de raio-x (Colovos, C.; Yeates, T. O., 1993). O modelo com maior fator de qualidade foi refinado pelo servidor GalaxyRefine (<https://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=REFINE>) que emprega modelagem de loop e relaxamento por dinâmica molecular (Lee; Heo; Seok, 2015).

A validação do modelo foi avaliada pelo gráfico de Ramachandran obtido pelo PROCHECK (<https://saves.mbi.ucla.edu/>) que indica resíduos em regiões favoráveis e desfavoráveis (Laskowski; MacArthur; Thornton, 2012). Nesse caso, o modelo apresenta boa qualidade se pelo menos 90% dos resíduos estejam em regiões favoráveis. A compatibilidade do modelo tridimensional com a própria sequência de aminoácidos foi avaliada pelo VERIFY 3D (<https://saves.mbi.ucla.edu/>) no qual pelo menos 80% dos aminoácidos devem ter score ≥ 0.1 no perfil 3D/1D para ser considerado um modelo compatível (Eisenberg; Lüthy, Bowie, 1997). Já o ProSA-web (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) foi utilizado para calcular o potencial energético do modelo que indica o quanto mais próximo está de uma proteína nativa (Wiederstein; Sippl, 2007). A melhor estrutura terciária do modelo foi visualizada usando o PyMol (Schrödinger; DeLano, 2020).

4.13 Análise dos epítomos descontínuos dos linfócitos B na estrutura tridimensional da vacina multi-epítopo

Na estrutura tridimensional de uma proteína podem ser identificados epítomos descontínuos dos linfócitos B. A predição desses epítomos foi obtida pelo servidor Ellipro (<http://tools.iedb.org/ellipro/>) utilizando os parâmetros padrão (score mínimo: 0,5 e distância máxima de 6 Ångströms (Ponomarenko et al., 2008). Esse servidor atribui um índice de protrusão (PI) baseado nas propriedades geométricas da estrutura tridimensional da proteína. O escore de PI determina a acessibilidade ao solvente dos resíduos no qual quanto maior o score de PI, maior a acessibilidade ao solvente dos resíduos.

4.14 Análise de Ancoragem molecular

A ancoragem molecular (*docking*) entre a vacina multi-epítopo e o receptor do sistema imune tem um papel importante na previsão das interações entre eles (Patra et al., 2020). Com base nesse princípio, a vacina multi-epítopo (ligante) foi submetida ao processo de *docking* com os receptores semelhante a Toll (TLR), TLR2 (ID. PDB: 2z7x), TLR3 (ID. PDB: 2a0z), TLR4 (ID. PDB: 3fxi), TLR7 (ID. PDB: 7cyn) e TLR9 (ID. PDB: 8ar3) pelo ClusPro 2.0 (<https://cluspro.bu.edu/>) (Acessado em: 11 de novembro de 2023), algoritmo automatizado que realiza docking rígido entre proteínas. O método apresenta as poses ancoradas com forte complementariedade e classifica-as de acordo com a qualidade de agrupamento (Comeau et al., 2004). Posteriormente, a pose que apresentaram o menor valor de RMSD de cada receptor foram visualizadas pelo PyMol e analisadas pelo servidor PDBSum Generation (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/Generate.html>) (Laskowski, 2008) para caracterizar as interações moleculares entre a vacina multi-epítopo e os TLRs.

4.15 Dinâmica molecular

Com a simulação de dinâmica molecular é possível prever baseado em física newtoniana como a vacina multi-epítopo interage com os sistemas biológicos em meio aquoso e indicar possíveis adaptações estruturais sob condições fisiológicas (Aghajani, 2022). Para o estudo de dinâmica molecular da vacina multi-epítopo interagindo com os receptores semelhantes a Toll (TLR2 e TLR3) foi utilizado o pacote de simulações do GROMACS (Berendsen; Spoel; Drunen, 1995) disponível no servidor Visual Dynamics (<https://visualdynamics.fiocruz.br/en-US>) (Vieira et al., 2023) com o campo de força Amber99 (Pearlman et al., 1995). O sistema foi solvatado a partir do modelo de água TIP3P

(Jorgensen et al., 1983) em caixa cúbica com limites de 3 Ångströms da borda da proteína. O sistema foi neutralizado com uma solução de concentração de 0,15 M de NaCl com o objetivo de neutralizar as cargas negativas dos aminoácidos. A minimização de energia foi conduzida no algoritmo Steepest Descent (até atingir uma força de $1000 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{nm}^{-1}$) e Conjugate Gradient. O comprimento das interações de van der Waals e das ligações de hidrogênio foram fixados pelo algoritmo de LINCS (Hess et al., 1997), permitindo o emprego de um tempo de integração de 2fs. A simulação foi equilibrada usando NVT por 20ps e NPT mais 20ps com temperatura e pressão constante de 310K (temperatura fisiológica ótima que corresponde a $36,85^\circ\text{C}$) e 1 bar, respectivamente, usando o algoritmo de Parrinello-Rahman (Parrinello; Rahman, 1981). O tempo de simulação foi de 100ns com passos de simulação de 2fs. A partir da dinâmica molecular foram obtidos dados da raiz quadrada do desvio quadrático médio (RMSD), raiz quadrada da flutuação quadrática (RMSF), raio de giro (Rg) e área superficial acessível ao solvente (SASA) da vacina multi-epítipo interagindo com os TLRs ao longo da simulação. Com esses dados foram plotados gráficos usando os pacotes numpy, seaborn e matplotlib.pyplot do Python que permitem avaliar a estabilidade da vacina multi-epítipo ao longo da simulação.

4.16 Otimização de códons e clonagem *in silico*

A otimização de códons foi realizada pela conversão da sequência de aminoácidos para a sequência de nucleotídeos utilizando o servidor JAVA Codon Adaptation (<https://www.jcat.de/>) (Grote et al., 2005) com o sítio de expressão de *Escherichia coli* para a vacina multi-epítipo. Nesse servidor também foram obtidas as métricas que mensuram o grau de tradução de uma proteína, o índice de adaptação de códons (CAI) e o componente CG. Os valores ideais para a obtenção de uma expressão proteica eficiente são os valores de 1,0 e 30-70%, respectivamente para CAI e CG. Utilizando o software SnapGene (<https://www.snapgene.com/>) (Acesso em 27 de novembro de 2023), a sequência obtida foi inserida no vetor Allele TA linearizado de 2707bp (Allele Biotechnology). Esse tipo de vetor é utilizado quando não se localizam locais convenientes para a ação das enzimas de restrição (Clark; Pazdernik; McGehee, 2019). Além disso, no software SnapGene foi possível obter géis de agarose a 1% em solução tampão de TBE (Tris/Borato/EDTA) e em solução tampão de SB (ácido bórico de sódio) por simulação de eletroforese utilizado para distinguir o inserto, o vetor e o vetor clonado.

4.17 Simulação da resposta imune

A fim de se prever a resposta do sistema imunológico após a administração da vacina multi-epítopo foi utilizado o servidor de simulação imunológica C-ImmSim (<https://kraken.iac.rm.cnr.it/C-IMMSIM/>) (Acesso em 27 de outubro de 2023) (Rapin et al., 2010) que utiliza uma matriz de pontuação específica de posição e técnicas de aprendizagem de máquina para prever as repostas imunes. Este modelo simula os três principais componentes funcionais do sistema imune humano (médula óssea, timo e linfonodo). Nesse estudo foram considerados uma administração e outra com três administrações da vacina multi-epítopo contendo 1000 antígenos cada no intervalo de 4 semanas (intervalo recomendado de vacinação). No caso do “Time steps” foram adotados os valores de 1, 84 e 168 (cada “time step” corresponde a 8 h e o “time step” igual a 1 é igual ao tempo de injeção zero. Os alelos escolhidos correspondem àqueles relacionados aos epítomos da vacina multi-epítopo: MHC de classe I (A0301, A1101, B1501 e B3501) e MHC de classe II (DRB1_0401 e DRB1_0402). No parâmetro “Simulation Steps” foi adotado o valor de 1050 e os outros seguiram os padrões já estabelecidos.

5. RESULTADOS

5.1 Predição e seleção dos epítomos

A partir da sequência de 405 aminoácidos do TFDP3 (Id. Uniprot: Q5H9I0) foi realizada a predição dos epítomos para as células B, linfócito T CD8+ e linfócito TCD4+. A identificação dos epítomos dos linfócitos B vai induzir que haja liberação de anticorpos estimulando a imunidade humoral. Já os epítomos dos linfócitos T CD8+ e linfócitos T CD4+ interagem com moléculas de MHC de classe I e MHC de classe II, respectivamente, podendo desencadear a ativação de células dendríticas, a produção de IFN- γ e a indução do processo de apoptose em células neoplásicas malignas (Jahangirian et al., 2022). Além disso, os epítomos desses tipos celulares devem apresentar antigenicidade, não alergenicidade, não toxicidade e capacidade de induzir a produção de interferon-gama, especificamente este último no caso dos linfócitos T CD4+.

Nesse estudo foram identificados 40 epítomos lineares (comprimento de 16 aminoácidos cada) dos linfócitos B antigênicos dos quais metade apresentaram provável antigenicidade (Apêndice A). Desses epítomos, 14 deles foram classificados como provável não alergênicos e provável não tóxicos para células eucarióticas humanas (Apêndice A; Tabela 01).

Tabela 01 – Epítomos preditos para os linfócitos B antigênicos de TFDP3 (Id. Uniprot: Q5H9I0) e suas características antigênicas.

Id.	Sequência	Posição	Vaxijen score	Alergenicidade	Toxicidade
01B	TSSGGSQYSGSRVETP	368-383	1.0805	Não alergênico	Não tóxico
02B	RVERQKRLERIKQKQS	201-216	1.6392	Não alergênico	Não tóxico
03B	CSISDDKSEYLFKFNS	269-284	0.7976	Não alergênico	Não tóxico
04B	SSPPWAGQHNRKGEKN	92-107	0.7683	Não alergênico	Não tóxico
05B	DVKNIKRRTYDALNVL	156-171	1.0012	Não alergênico	Não tóxico
06B	SGSCSAEDLKMARNLV	306-321	0.7467	Não alergênico	Não tóxico
07B	PKALEPYVTEMAQGTF	322-337	0.5497	Não alergênico	Não tóxico
08B	LMDENQTSRPVAVHTS	17-32	0.5233	Não alergênico	Não tóxico
09B	LSMKVWETVQRKGTTT	114-129	0.7633	Não alergênico	Não tóxico
10B	EDLKMARNLVPKALEP	312-327	0.5484	Não alergênico	Não tóxico
11B	PQRPAASNIPVVGSPN	62-77	0.8037	Não alergênico	Não tóxico
12B	TNSAQNCQNLRLVERQK	191-206	0.9420	Não alergênico	Não tóxico
13B	PNESAYDVKNIKRRTY	150-165	0.6101	Não alergênico	Não tóxico
14B	FRAASNHASPNESAYD	141-156	0.5059	Não alergênico	Não tóxico

Fonte: elaborado pela autora (2023).

Já em relação aos epítomos dos linfócitos T CD8+ para o MHC de classe I foram identificados 17 epítomos lineares (comprimento de 9 aminoácidos cada) que apresentaram provável antigenicidade relação aos alelos HLA-A e HLA-B representativos (Antígenos Leucocitários Humanos) (Apêndice B – Tabela 01). Desses epítomos, 8 foram classificados como provável não alergênicos e provável não tóxico (Apêndice B – Tabela 01; Tabela 02).

Tabela 02 – Epítomos preditos dos linfócitos T CD8+ para o MHC de classe I antigênicos de TFDP3 (Id. Uniprot: Q5H9I0) e suas características antigênicas.

Id.	Sequência	Posição	Alelos	Vaxijen Score	Alergenicidade	Toxicidade
01T8	KVWETVQRK	117-125	HLA-A*03:01 HLA-A*11:01 HLA-A*30:01 HLA-A*31:01	0.7471	não alergênico	não tóxico
02T8	DALNVLMAM	166-174	HLA-A*26:01 HLA-B*35:01	0.8599	não alergênico	não tóxico
03T8	KRLERIKQK	206-214	HLA-B*27:05	1.5955	não alergênico	não tóxico
04T8	RIKQKQSEL	210-218	HLA-B*07:02 HLA-B*08:01 HLA-A*30:01	1.5326	não alergênico	não tóxico
05T8	SISDDKSEY	270-278	HLA-A*01:01 HLA-A*26:01 HLA-B*15:01 HLA-B*35:01	0.6114	não alergênico	não tóxico
06T8	ISDDKSEYL	271-279	HLA-A*01:01	0.9410	não alergênico	não tóxico
07T8	AGSRNNGTW	344-352	HLA-B*58:01	0.5672	não alergênico	não tóxico
08T8	ATSSGGSQY	367-375	HLA-A*01:01 HLA-A*11:01 HLA-A*26:01 HLA-B*15:01	1.3318	não alergênico	não tóxico

Fonte: elaborado pela autora (2023).

Quando avaliado os epítomos dos linfócitos T CD4+ para o MHC de classe II foram identificados 6 epítomos lineares (comprimento de 15 aminoácidos) que apresentaram provável antigenicidade em relação aos alelos HLA-DR representativos (Apêndice B – Tabela 02). Desses epítomos, quatro foram classificados como provável não alergênicos, provável não tóxico e indutor de INF- γ (Tabela 03).

Tabela 03 – Epítomos preditos dos linfócitos T CD4+ para o MHC de classe II antigênicos de TFDP3 (Id. Uniprot: Q5H9I0) e suas características antigênicas.

Id.	Sequência	Posição	Alelos (HLA)	Vaxijen Score	Alergenicidade	Toxicidade	INF- γ
01T4	ELKVLMDENQTSRPV	91-105	DRB1*03:01 DRB1*03:05 DRB1*04:01 DRB1*04:02 DRB1*14:02 DRB3*01:01	0.6150	não alergênico	não tóxico	Indutor
02T4	SPPWAGQHNRKGEKN	171-185	DRB1*01:03 DRB1*04:01 DRB1*04:02 DRB1*04:08	0.8473	não alergênico	não tóxico	Indutor
03T4	VGELVAKFRAASNHA	212-226	DRB1*11:01 DRB1*11:04 DRB1*13:01	0.6633	não alergênico	não tóxico	Indutor
04T4	VAKFRAASNHASPNE	216-230	DRB1*01:01 DRB1*01:02 DRB1*01:03 DRB1*04:01 DRB1*04:02 DRB1*04:03 DRB1*04:04 DRB1*04:05 DRB1*04:08 DRB1*07:01 DRB1*08:01 DRB1*08:03 DRB1*09:01 DRB1*10:01 DRB1*11:01 DRB1*13:02 DRB1*13:03 DRB1*14:02 DRB3*16:01 DRB3*02:02 DRB5*01:01	0.6149	não alergênico	não tóxico	Indutor

Fonte: elaborado pela autora (2023).

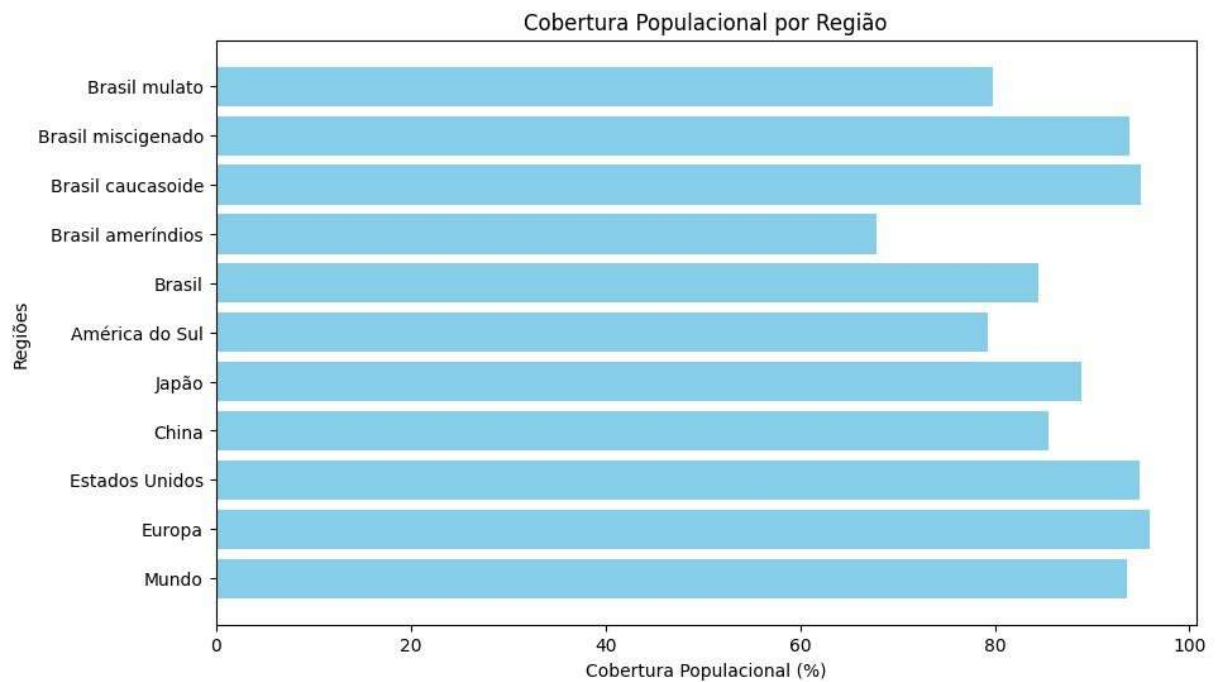
5.2 Análise da distribuição populacional dos epítomos preditos para o MHC de classe I e MHC de classe II

O alto polimorfismo das proteínas do MHC de classe I e classe II tem um papel fundamental na imunidade adaptativa (Wieczorek et al., 2017). Os alelos de HLA apresentam uma distribuição diferente em diferentes países e regiões geográficas do mundo. Por conta desses fatores, a análise da cobertura populacional dos epítomos é uma etapa importante para a validação deles como elegíveis para a composição da vacina multi-epítomo.

Os epítomos avaliados foram aqueles que não apresentaram sobreposição em relação a posição dos aminoácidos a fim de explorar mais regiões distintas da sequência de aminoácidos de TFDP3. Em relação ao MHC de classe I foram avaliados o epítomos: 01T8 – KVVETVQRK (117-125), 08T8 – ATSSGGSQY (367-375) e 05T8 – SISDDKSEY (270-278). Já no MHC de classe II foram os epítomos: 01T4 – ELKVLMDENQTSRPV (91-105), 02T4 – SPPWAGQHNRKGEKN (171-185) e 04T4 – VAKFRAASNHASPNE (216-230).

A combinação dos epítomos na ferramenta do IEDB apresentou uma cobertura populacional de 93,55% no mundo, 95,88% na Europa, 94,93% nos Estados Unidos, 85,48% na China, 88,94% no Japão e 79,29% na América do Sul (Apêndice C – Figura 01; Figura 12 e Figura 13A). Em relação ao Brasil, a cobertura populacional é de 84,45% (Figura 13 B). Considerando a cobertura populacional em relação a etnia no Brasil foi de 67,87% para ameríndios (indígenas do continente americano), 95,06% caucasóide, 93,85% miscigenado e 79,84% mulato (Apêndice C – Figura 02).

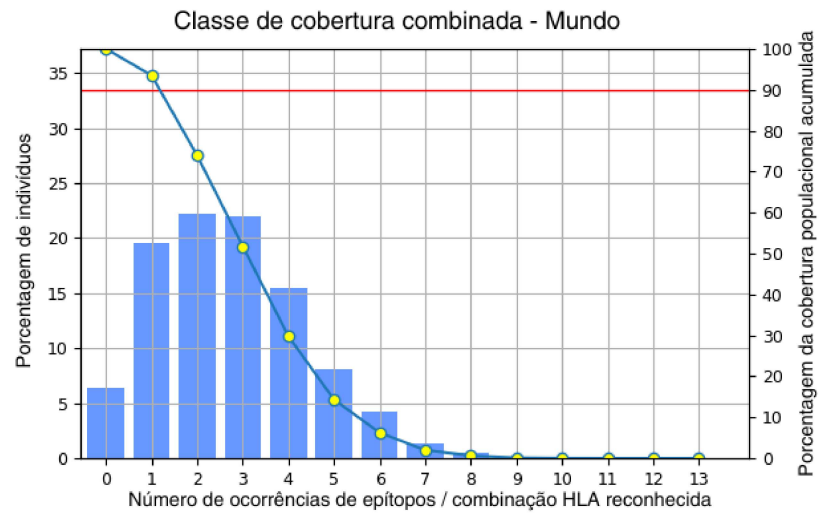
Figura 12 – Frequência da cobertura populacional dos epítomos para MHC de classe I e classe II no mundo, na Europa, nos Estados Unidos, na China, no Japão e na América do Sul e no Brasil e suas etnias.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Figura 13 – Frequência da cobertura populacional dos epítomos para MHC de classe I e classe II no mundo (A) e no Brasil (B). No gráfico, a linha (-o-) representa a percentagem acumulada da população cobertura de informação dos epítomos; as barras representam a cobertura populacional para cada epítopo.

(A)

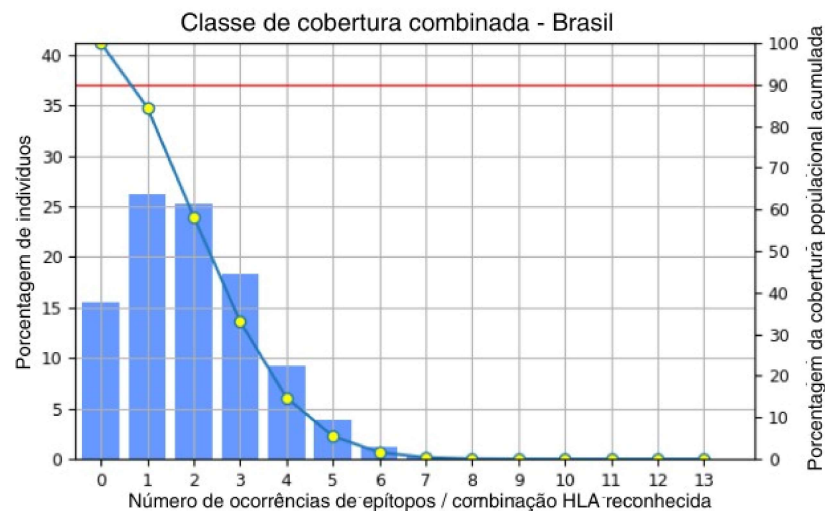


MHC classe	Cobertura ^a	Média hit ^b	PC90 ^c
Combinado	93.55%	2.72	1.18

Fonte: elaborado pela autora (2023).

Figura 13 (cont.) – Frequência da cobertura populacional dos epítomos para MHC de classe I e classe II no mundo (A) e no Brasil (B). No gráfico, a linha (-o-) representa a percentagem acumulada da população cobertura de informação dos epítomos; as barras representam a cobertura populacional para cada epítomo.

(B)



MHC classe	Cobertura ^a	Média hit ^b	PC90 ^c
Combinado	84.45%	1.98	0.64

Legenda: a – cobertura populacional projetada; b – número médio de ocorrências de epítomos/combinações HLA reconhecidas pela população; c – número mínimo de ocorrências de epítomos/combinações HLA reconhecidas por 90% da população.

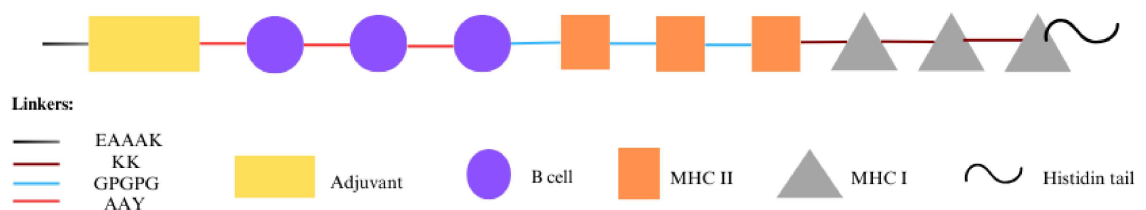
Fonte: elaborado pela autora (2023).

5.3 Construção da vacina multi-epítopo

A vacina multi-epítopo foi projetada usando os epítomos que não se sobrepuseram, apresentaram ampla cobertura populacional e características imunogênicas. O epítomos selecionados dos linfócitos B foram: 02B – RVERQKRLERIKQKQS (201–216), 12B – TNSAQNCQNLRVERQK (191–206), 06B – SGSCSAEDLKMARNLV (306–321). Já os epítomos do MHC de classe I e classe II foram os avaliados na cobertura populacional: MHC de classe I: 01T8 – K VWETVQRK (117–125), 08T8 – ATSSGGSQY (367–375) e 05T8 –

SISDDKSEY (270-278); MHC de classe II: 01T4 – ELKVLMDENQTSRPV (91-105), 02T4 – SPPWAGQHNRKGEKN (171-185) e 04T4 – VAKFRAASNHASPNE (216-230). Esses epítomos foram unidos por ligantes amplamente utilizados na construção de vacinas de peptídeos que podem tornar a proteína estável (Nezafat et al., 2014), aumentar a imunogenicidade (Avvagari et al., 2020) e auxiliar na purificação da vacina (Herrera, 2020). Os ligantes utilizados foram o EAAAK na porção N-terminal ligando-se ao adjuvante, KK entre os epítomos dos linfócitos B, GP GPG entre os epítomos do MHC de classe II (linfócito T CD4+), AAY entre os epítomos de MHC de classe I (linfócito T CD8+) e uma cauda de Histidina (6xHist) na porção C terminal. Já o adjuvante utilizado foi a proteína 50S ribossomal L7/L12 da *Mycobacterium tuberculosis* Rv0652(MAKLSTDELLDAFKEMTLLELSDFVKKFEETFEVTAAAPVAVAAAGAAPAGAAVEAAEEQSEFDVILEAAGDKKIGVIKVVREIVSGLGLKEAKDLVDGAPKPLLEKVAKEAADEAKAKLEAAGATVTVK) com o objetivo de aumentar a imunogenicidade (Lee et al., 2014; Mahdevar et al., 2021) (Figura 14). Após a junção dos epítomos foi obtido uma vacina com uma sequência de 291 aminoácidos.

Figura 14 – Esquema representativo e sequência de aminoácidos da vacina (termos sublinhados correspondem aos linkers).



EAAA

KMAKLSTDELLDAFKEMTLLELSDFVKKFEETFEVTAAAPVAVAAAGAAPAGAAVEAAEEQSEFDVILEAAGDKKIGVIKVVREIVSGLGLKEAKDLVDGAPKPLLEKVAKEAADEAKAKLEAAGATVTVKKKRV ERQKRLERIKQKQSKKTNSAQNCQNL RVERQKKSGSCSAEDLKMARNLVGPGPGGELKVLMDENQTSRPVGPGPGSPPWAGQHNRKGEKNGPGPGVAKFRAASNHASPNEAAYKVWETVQRKAAAYSISDDKSEY AAYATSSGGSQYHHHHHH

Legenda: Adjuvant: adjuvante; Histidin tail: cauda de histidina.

Fonte: elaborado pela autora (2023).

5.4 Homologia e propriedades físico-químicas da vacina

A homologia da vacina multi-epítipo em relação as proteínas humanas apresentaram identidade de 35,86% com TFPD3, 49,32% com a proteína E2F e 40.62% com o fator de transcrição Dp-1 e suas isoformas (Tabela 04). O alinhamento das proteínas que apresentaram identidade com a vacina multi-epítipo apresentam um percentual que varia de 26% a 13% de cobertura. Sendo 26% correspondente ao alvo do estudo, ou seja, apresenta baixo risco de desenvolver autoimunidade e afetar tecidos normais.

Tabela 04 – Homologia da vacina em relação as proteínas humanas.

Descrição	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. ident	Acc. Len
Fator de transcrição da família Dp membro 3 (NP_057605.3)	67.8	107	26%	2E-11	35.86%	405
Proteína E2F-like (AAF37562.2)	65.5	104	22%	8E-11	49.32%	345
Fator de transcrição Dp-1 isoforma X6 (XP_016876208.1)	40.0	40.0	13%	0.019	40.62%	337
Fator de transcrição Dp-1, isoforma CRA_b (KAI2569993.1)	39.7	39.7	13%	0.016	40.62%	236
Fator de transcrição Dp-1 (EAX09217.1)	39.7	39.7	13%	0.022	40.62%	312
Fator de transcrição Dp-1 (NP_009042.1)	39.7	39.7	13%	0.024	40.62%	410
Fator de transcrição Dp-1 isoforma X4 (XP_005268385.1)	39.7	39.7	13%	0.024	40.62%	406
Fator de transcrição Dp-1 (AAN46090.1)	39.7	39.7	13%	0.026	40.62%	406
Fator de transcrição Dp-1 isoforma X2 (XP_047286517.1)	39.3	39.3	13%	0.035	40.62%	472
Fator de transcrição Dp-1 isoforma X1 (XP_016876206.1)	39.3	39.3	13%	0.035	40.62%	476

Legenda: Query Cover: extensão da sequência que foi alinhada.

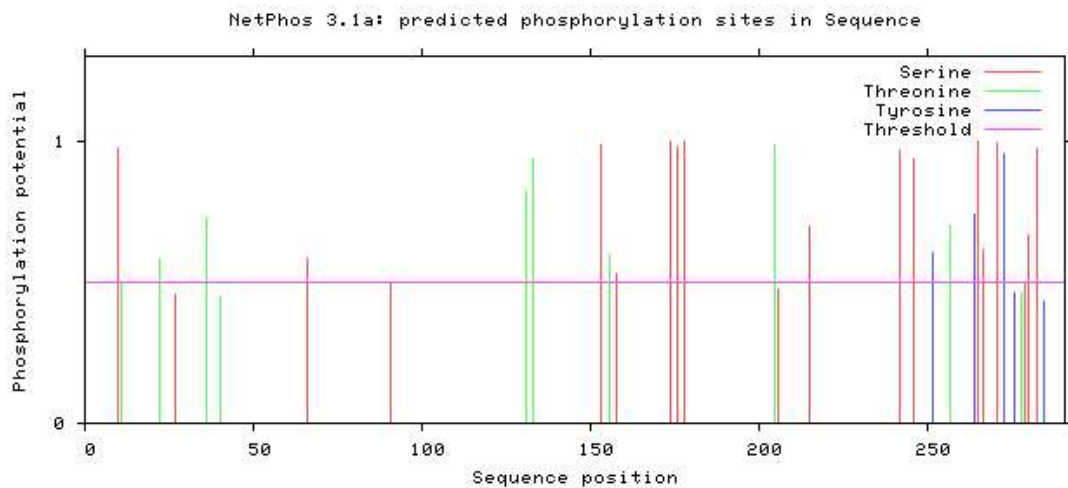
Fonte: elaborado pela autora (2023).

A vacina multi-epítipo é antigênica (Vaxijen v.2 = 0,7018), não alergênica e com baixo risco de toxicidade (apenas a sequência do peptídeo KKTNSAQNCQ (posição: 154) (SVM score = 0,04) apresentou toxicidade baixa). Com relação as propriedades físico-químicas, a vacina multi-epítipo apresenta peso molecular de 31.142,24 Da, ponto isoelétrico de 9,05 que pode ser utilizado na purificação através da precipitação isoelétrica. A solubilidade da vacina após superexpressão em *Escherichia. coli* foi cerca de 0.9609 (96,1%). Além disso, possui um índice de instabilidade de 31,94 que classifica a vacina como estável, índice alifático de 71,24 indicando estabilidade térmica e índice de hidropaticidade (GRAVY) igual a -0,619 que a classifica como hidrofílica. A estimativa de meia-vida predita foi de 1h em reticulócitos de mamíferos (*in vivo*), 30 minutos em leveduras (*in vivo*) e maior que 10 horas em *E. coli* (*in vivo*).

5.5 Processamento via proteossoma, interação com os transportadores TAP (biosíntese de MHC de classe I) e modificações pós-traducionais da vacina

Na sequência da vacina multi-epítipo foram preditos 85 sítios de clivagem no sítio de ligação de regiões C-terminais pelo proteossoma (Apêndice D, Tabela 01). Já na interação com os transportadores TAP foram preditos 96 peptídeos com alta afinidade de ligação quando considerado a sequência e propriedades dos aminoácidos da vacina multi-epítipo (Apêndice D, Tabela 2). Quando foi avaliado as modificações pós-traducionais da vacina multi-epítipo foram preditos 7 sítios de O-glicosilação ((posição 153 (score: 0.67), posição 156 (score: 0.5), posição 205 (score: 0.62), posição 206 (score: 0.64), posição 215 (score: 0.90), posição 242 (score: 0.51) e posição 279 (score: 0.61)) e 26 sítios de fosforilação no qual 15 deles podem ser alvo de mais de uma quinase (Apêndice E – Tabela 02; Figura 15).

Figura 15 – Predição dos sítios de fosforilação da vacina multi-epítipo.

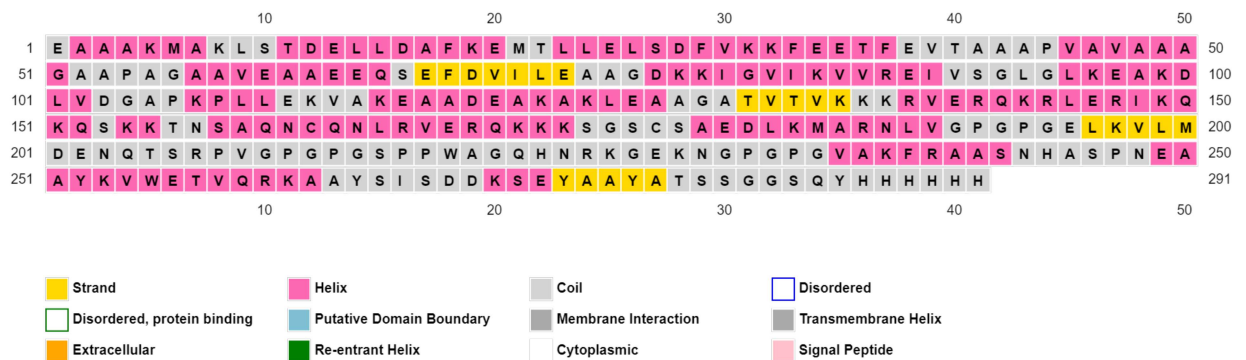


Fonte: elaborado pela autora (2023).

5.6 Estrutura secundária e terciária, refinamento e validação

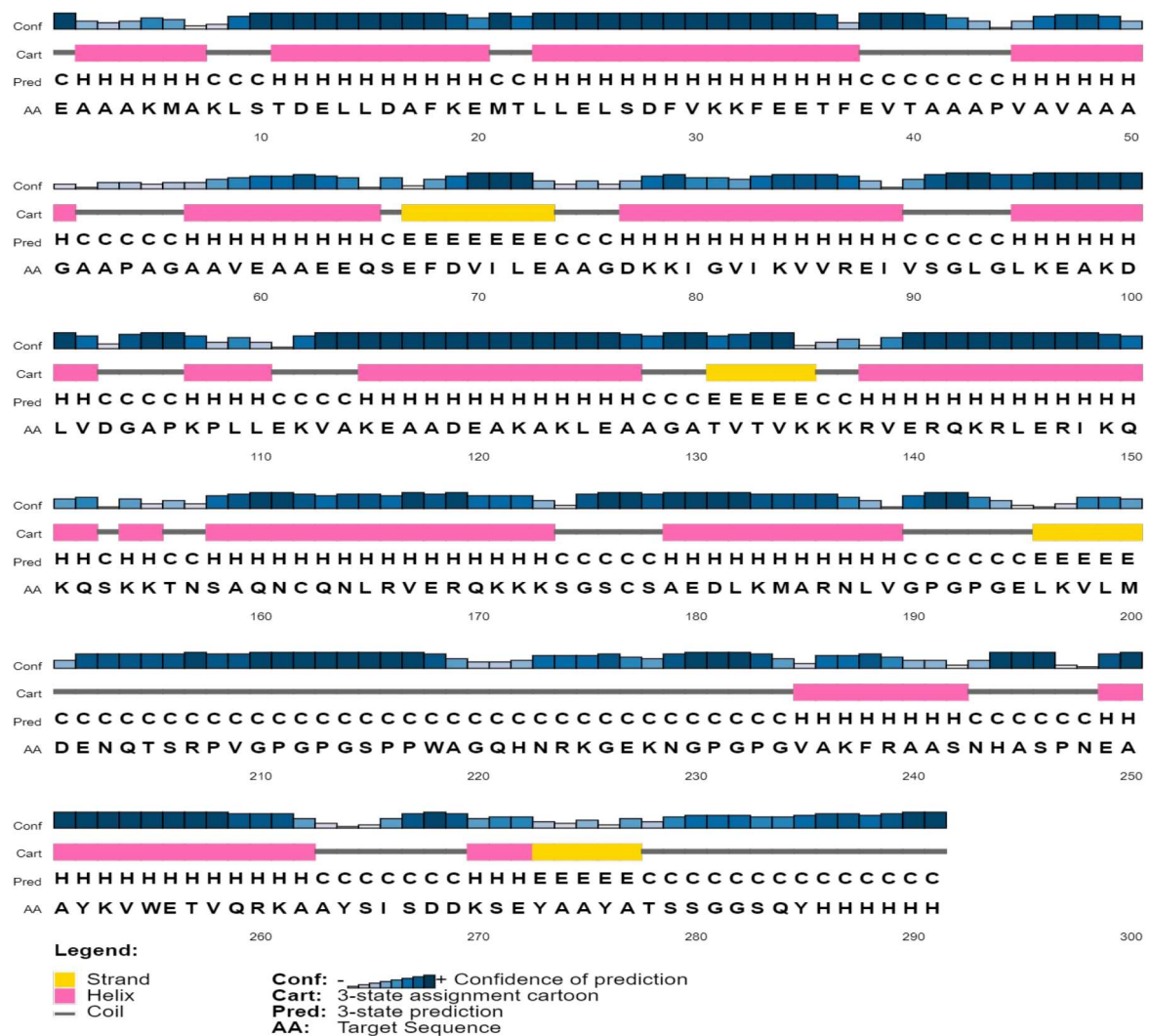
A predição da estrutura secundária da sequência de aminoácidos da vacina multi-epítopo pelo servidor PSIPRED indicou a presença de 7,56% de folha-beta, 39,52% de regiões sem estruturas secundárias definidas e 52,92% de alfa-hélice (Figura 16). Esses resultados indicam um predomínio de estrutura secundária alfa-hélice.

Figura 16 – Predição da estrutura secundária da vacina multi-epítopo. Legenda: Helix: α -hélice; Strand: folha- β ; coil: alça ou cauda.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Figura 16 (cont.) - Predição da estrutura secundária da vacina multi-epítopo. Legenda: Helix: α -hélice; Strand: folha- β ; coil: alça ou cauda.



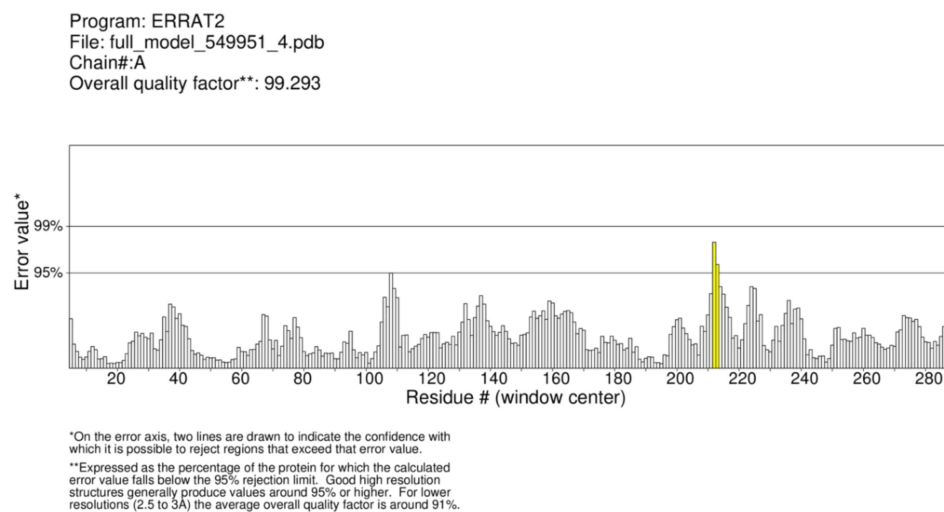
Fonte: elaborado pela autora (2023).

Já a estrutura terciária foi determinada usando o servidor Robetta com o método RoseTTAFOLD cujos cinco modelos obtidos apresentaram confiança de 0,55 (Anexo VI – Figura 01). A partir daí, esses modelos foram avaliados quanto à qualidade estereoquímica pelas ferramentas ERRAT, PROCHECK e ProSA-Web. De acordo com a validação pela ERRAT, o modelo 4 apresentou o maior fator de qualidade correspondente a 99,293%, indicando que o modelo apresenta uma alta resolução (Anexo VI – Figura 02; Figura 17 A). A fim de melhorar a qualidade do modelo 4 foi utilizado o GalaxyRefine que apresentou cinco modelos (Apêndice F – Tabela 01) no qual o modelo 3 quando avaliado pelo ERRAT

apresentou um fator de qualidade de 99,647. Esse valor corresponde a um aumento percentual na qualidade do modelo de 0,354 em relação ao modelo 4 predito pelo servidor Robetta (Figura 17 B). Quando comparado o modelo 3 em relação modelo 4 antes do refinamento houve um aumento do Clash score de 1,7 para 13,8, um aumento do valor de Rama favorável de 95,2 para 96,5, um aumento do MolProbity de 1,259 para 1,873, o RMSD foi de 0 para 0,24, o GDT-HA foi de 1 para 0,9923, e continuou sem nenhum rotâmero ruim (Apêndice F – Tabela 01).

Figura 17 – Representação gráfica do valor dos erros dos resíduos determinados pelo servidor ERRAT do modelo antes (A) e após (B) o refinamento pelo servidor GalaxyRefine.

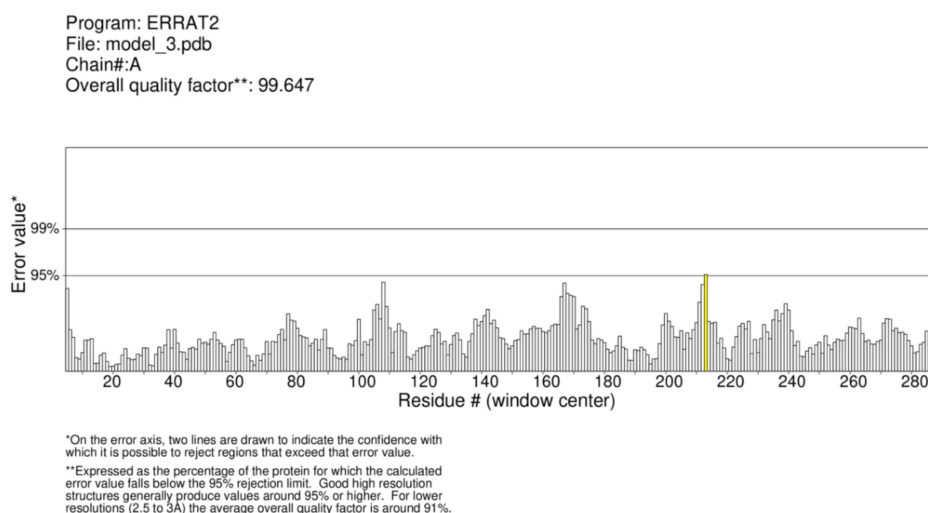
(A)



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Figura 17 – Representação gráfica do valor dos erros dos resíduos determinados pelo servidor ERRAT do modelo antes (A) e após (B) o refinamento pelo servidor GalaxyRefine.

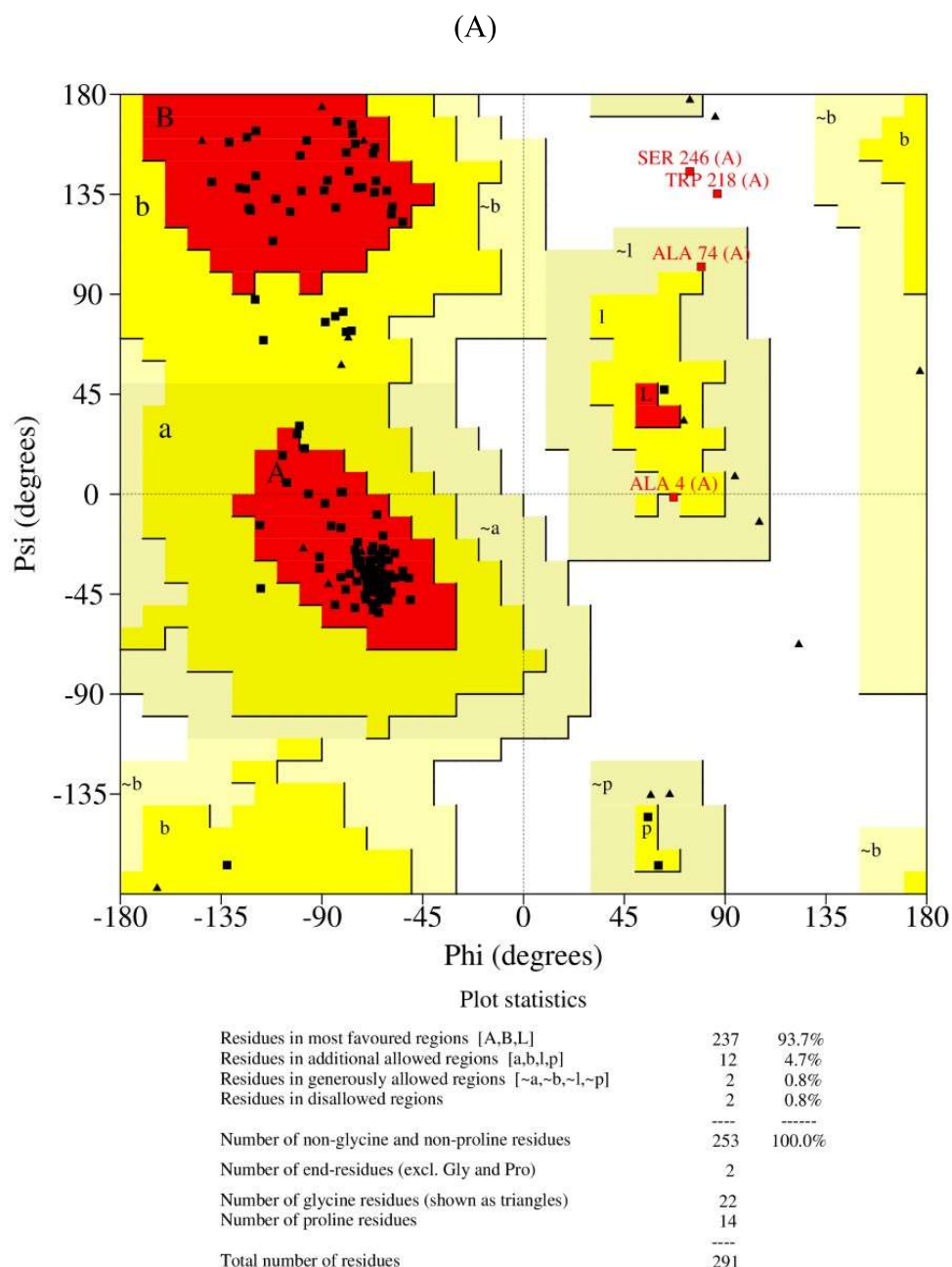
(B)



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Em seguida, o modelo 3 obtido pelo refinamento foi avaliado pelo PROCHECK, VERIFY-3D e ProSA-web. Através do PROCHECK foi obtido o gráfico de Ramachandran no qual apresentou 93,7% dos resíduos em regiões favoráveis, 4,7% dos resíduos em regiões permitidas adicionais e 0,8% dos resíduos em regiões não permitidas (Figura 18 A). A estrutura tridimensional apresentou compatibilidade com a sequência de aminoácidos uma vez que 80,76% dos resíduos tiveram pontuação média 3D-1D $\geq 0,1$ pelo servidor Verify 3D (Figura 18 B). No gráfico obtido pelo ProSA o z-score obtido da estrutura foi de -6.98 que indica que a estrutura está mais próxima da estrutura nativa da proteína (Figura 18 C-D). Na figura 18 E é apresentado a estrutura terciária do modelo 3 obtido pelo refinamento.

Figura 18 – Gráfico de Ramachandran (A), avaliação da estabilidade estrutural da estrutura tridimensional com a sequência de aminoácidos pelo Verify 3D(B), Gráficos Z-score e de energia do modelo tridimensional pelo servidor ProSA-web (C-D) e estrutura terciária do modelo visualizada pelo PyMol.

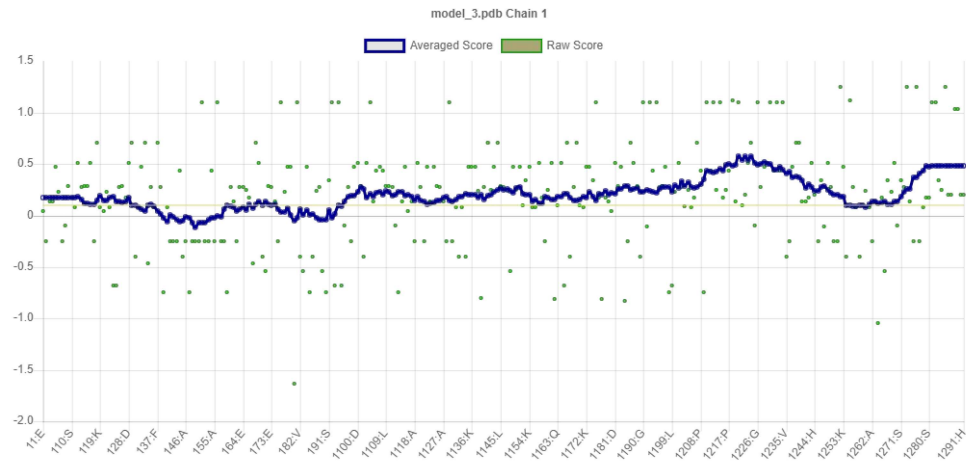


Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.

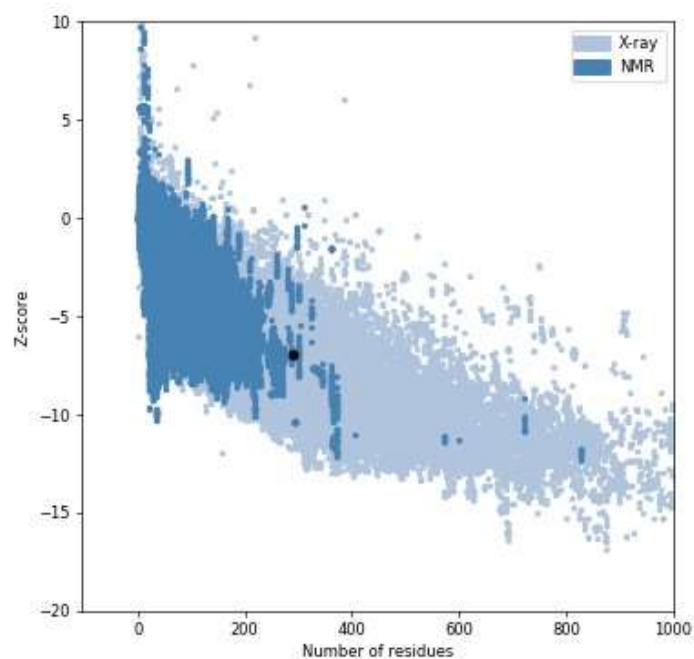
Fonte: elaborado pela autora (2023).

Figura 18 (Cont.) - Gráfico de Ramachandran (A), avaliação da estabilidade estrutural da estrutura tridimensional com a sequência de aminoácidos pelo Verify 3D (B), Gráficos Z-score e de energia do modelo tridimensional pelo servidor ProSA-web (C-D) e estrutura terciária do modelo visualizada pelo PyMol (E).

(B)



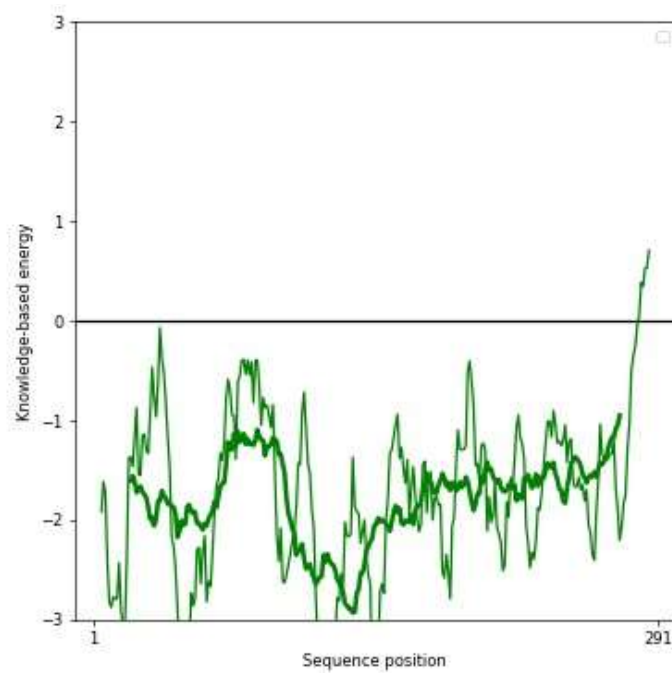
(C)



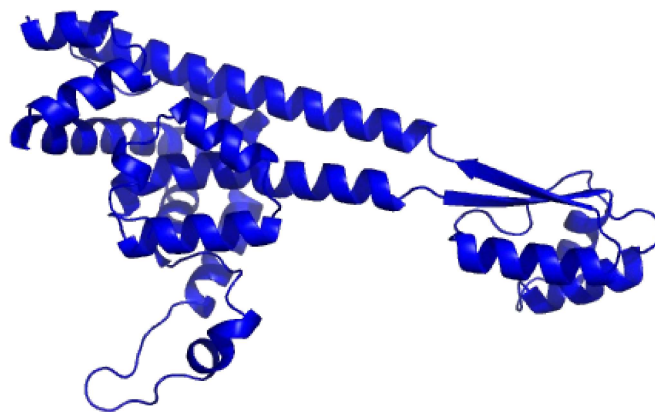
Fonte: elaborado pela autora (2023).

Figura 18 (Cont.) - Gráfico de Ramachandran (A), avaliação da estabilidade estrutural da estrutura tridimensional com a sequência de aminoácidos pelo Verify 3D (B), Gráficos Z-score e de energia do modelo tridimensional pelo servidor ProSA-web (C-D) e estrutura terciária do modelo visualizada pelo PyMol (E).

(D)



(E)



Fonte: elaborado pela autora (2023).

5.7 Identificação dos epítomos descontínuos das células B na estrutura tridimensional da vacina multi-epítopo

A identificação das regiões de interação entre os epítomos dos linfócitos B e os anticorpos desempenham um papel importante no desenvolvimento da resposta imunológica (Kringelum et al., 2012). Na estrutura tridimensional da vacina multi-epítopo foram preditos 6 epítomos lineares com tamanho variando de 41 a 4 resíduos e score (PI) de 0,819 a 0,542 (Tabela 05). Já em relação aos epítomos descontínuos também foram preditos 6 epítomos com o tamanho variando de 62 a 6 resíduos e score (PI) de 0.822 a 0.513 (Tabela 06). Houve sobreposição de parte dos resíduos dos epítomos lineares com os resíduos dos epítomos descontínuos, como no epítopo 1 (204-209) e epítopo 7 (207-233) (Figura 19), com altos valores de score (PI), que indica a presença de epítomos que tornam a vacina multi-epítopo mais imunogênica.

Tabela 05 – Epítomos lineares dos linfócitos B da estrutura tridimensional da vacina multi-epítopo.

Epítomos	Posição	Peptídeos	Número de resíduos	Score (PI)
1	204-249	QTSRPVGP GPGSPWAGQHNRKGEKN	26	0.819
2	70-110	VILEAAGDKKIGVIKVVREIVSGLGLKEAKDLV DGAPKPLL	41	0.802
3	116-135	EAADEAKAKLEAAGATVTVK	20	0.708
4	266-291	ISDDKSEYAAAYATSSGGSQYHHHHHH	26	0.688
5	164-183	NLRVERQKKKSGSCSAEDLK	20	0.63
6	1-4	EAAA	4	0.542

Legenda: PI – índice de protusão.

Fonte: elaborado pela autora (2023).

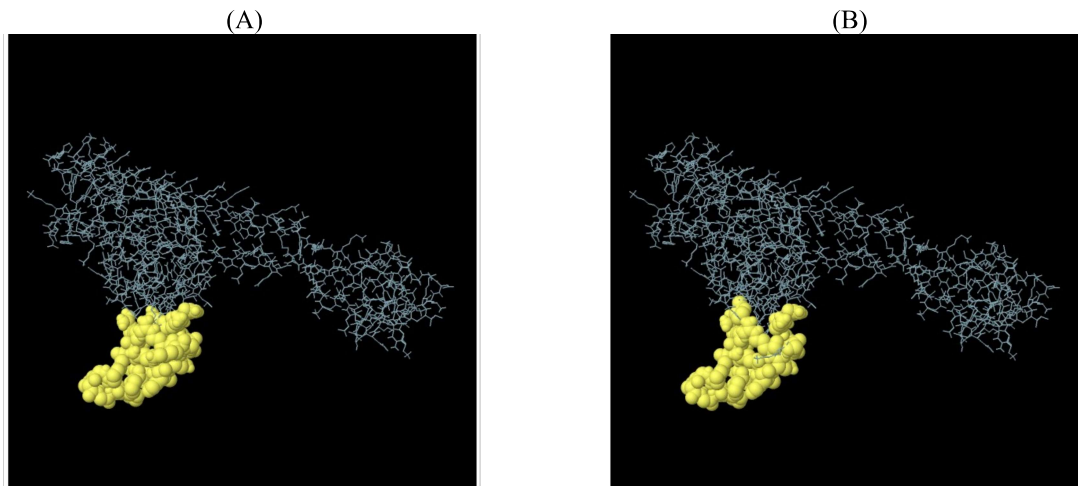
Tabela 06 – Epítomos descontínuos dos linfócitos B da estrutura tridimensional da vacina multi-epítopo.

Epítomos	Resíduos	Número de resíduos	Score (PI)
7	A:R207, A:P208, A:V209, A:G210, A:P211, A:G212, A:P213, A:G214, A:S215, A:P216, A:P217, A:W218, A:A219, A:G220, A:Q221, A:H222, A:N223, A:R224, A:G226, A:E227, A:K228, A:N229, A:P233	23	0.822
8	A:V70, A:I71, A:L72, A:E73, A:A74, A:A75, A:G76, A:D77, A:K78, A:K79, A:I80, A:G81, A:V82, A:I83, A:K84, A:V85, A:V86, A:R87, A:E88, A:I89, A:V90, A:S91, A:G92, A:L93, A:G94, A:L95, A:K96, A:E97, A:A98, A:K99, A:D100, A:L101, A:V102, A:D103, A:G104, A:A105, A:P106, A:K107, A:P108, A:L109, A:L110, A:E111, A:A114, A:E116, A:A118, A:D119, A:E120, A:A121, A:K122, A:A123, A:K124, A:L125, A:E126, A:A127, A:A128, A:G129, A:A130, A:T131, A:V132, A:T133, A:V134, A:K135	62	0.762
9	A:N161, A:N164, A:L165, A:V167, A:E168, A:R169, A:Q170, A:K171, A:K172, A:K173, A:S174, A:G175, A:S176, A:I266, A:S267, A:D268, A:D269, A:K270, A:S271, A:E272, A:Y273, A:A274, A:A275, A:A277, A:T278, A:S280, A:G281, A:G282, A:S283, A:Q284, A:Y285, A:H286, A:H287, A:H288, A:H289, A:H291	36	0.688
10	A:C177, A:S178, A:A179, A:E180, A:D181, A:K183, A:A245, A:S246, A:N248, A:E249	10	0.618
11	A:K197, A:M200, A:D201, A:Q204, A:T205, A:S206, A:A240, A:N243, A:H244	9	0.613
12	A:E1, A:A2, A:A3, A:A4, A:K8, A:L9	6	0.513

Legenda: PI – índice de protusão.

Fonte: elaborado pela autora (2023).

Figura 19 - Posição dos epítopos lineares nº1 (A) e descontínuos nº 7 (B) dos linfócitos B na estrutura tridimensional da vacina multi-epítipo.

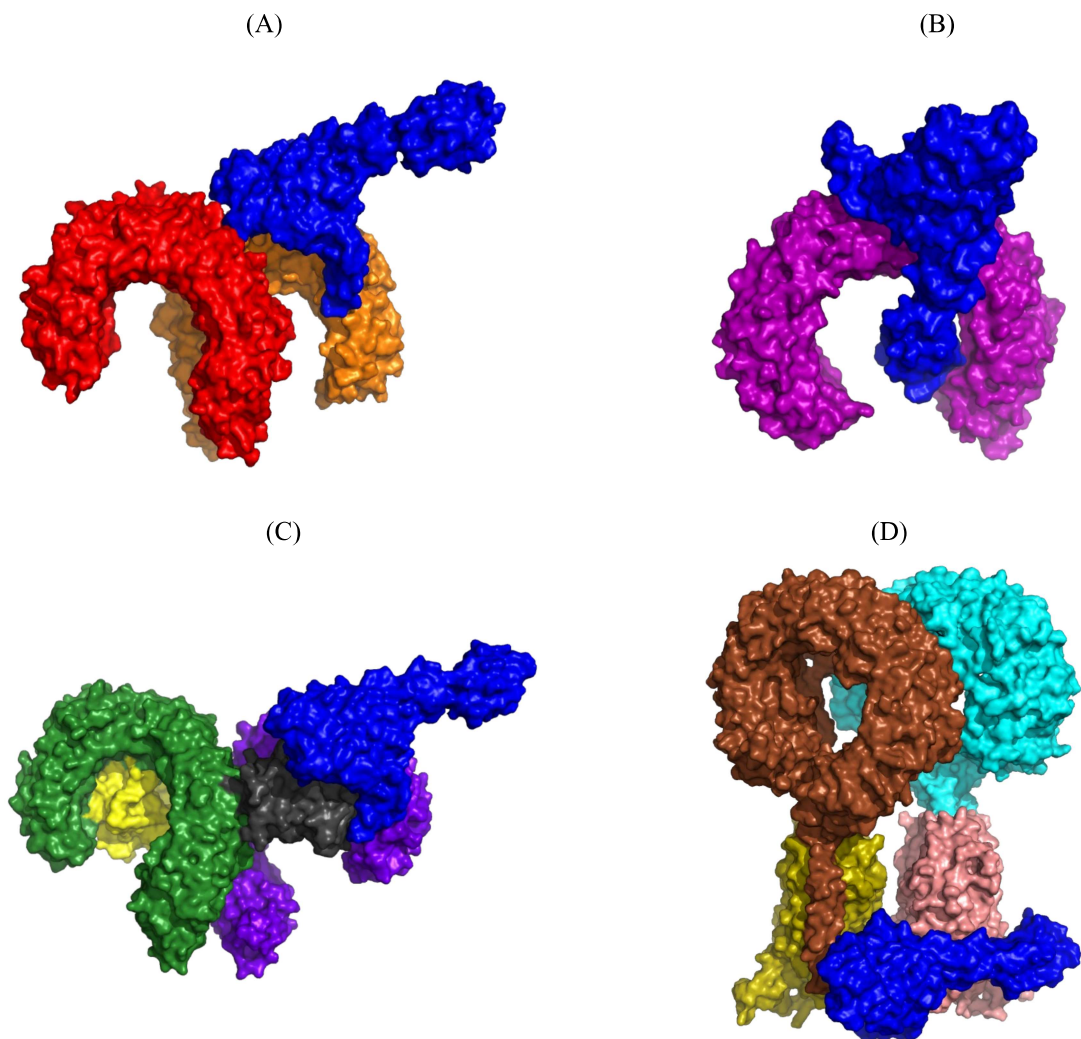


Fonte: elaborado pela autora (2023).

5.8 Ancoragem molecular da vacina multi-epítipo com TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-7 e TLR-9

Os receptores semelhantes a Toll (TLRs) são moléculas que medeiam a resposta na imunidade inata em diversas condições de doença. Há evidências que essas moléculas são expressas em células neoplásicas malignas com papel importante na progressão tumoral (Kumar et al., 2022). A interação da vacina multi-epítipo com os TLRs pode aumentar a resposta imune. Por isso, foi avaliado a interação por docking molecular da vacina multi-epítipo com as moléculas TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-7 e TLR-9 usando o servidor ClusPro. A energia da afinidade de ligação da melhor pose dos TLRs: TLR-2 (–691,4 Kcal/mol), TLR-3 (–806,9 Kcal/mol), TLR-4 (–705,6 Kcal/mol), TLR-7 (–1485,4 Kcal/mol) e TLR-9 (–1002,0 Kcal/mol). O software PyMol foi utilizado para visualizar o complexo gerado pelo docking (Figura 20).

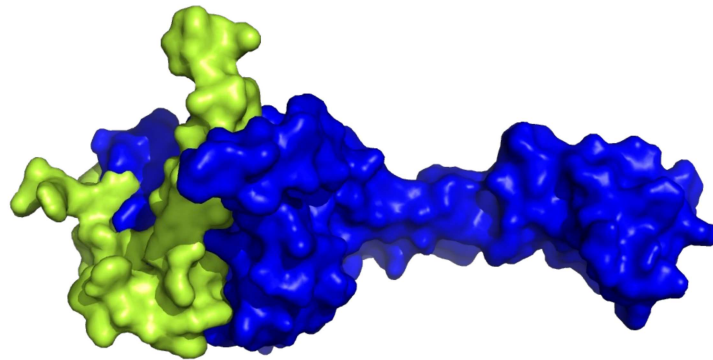
Figura 20 - Representação do docking molecular dos receptores semelhantes a Toll, TLR-2 (A), TLR-3 (B), TLR-4 (C), TLR-7 (D) e TLR-9 (E), com a vacina multi-epítopo. A vacina multi-epítopo é indicada em azul e os receptores de TLR-2 (cadeia C em laranja e cadeia D em vermelho), TLR-3 (cadeia B em rosa), TLR-4 (cadeia E em verde, cadeia F em roxo, cadeia G em amarelo e cadeia H em cinza), TLR-7 (cadeia I em marrom, cadeia J em ciano, cadeia L em oliva e cadeia M em salmão) e TLR-9 (cadeia N em verde limão).



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Figura 20 (cont.) - Representação do docking molecular dos receptores semelhantes a Toll, TLR-2 (A), TLR-3 (B), TLR-4 (C), TLR-7 (D) e TLR-9 (E), com a vacina multi-epítipo. A vacina multi-epítipo é indicada em azul e os receptores de TLR-2 (cadeia C em laranja e cadeia D em vermelho), TLR-3 (cadeia B em rosa), TLR-4 (cadeia E em verde, cadeia F em roxo, cadeia G em amarelo e cadeia H em cinza), TLR-7 (cadeia I em marrom, cadeia J em ciano, cadeia L em oliva e cadeia M em salmão) e TLR-9 (cadeia N em verde limão).

(E)

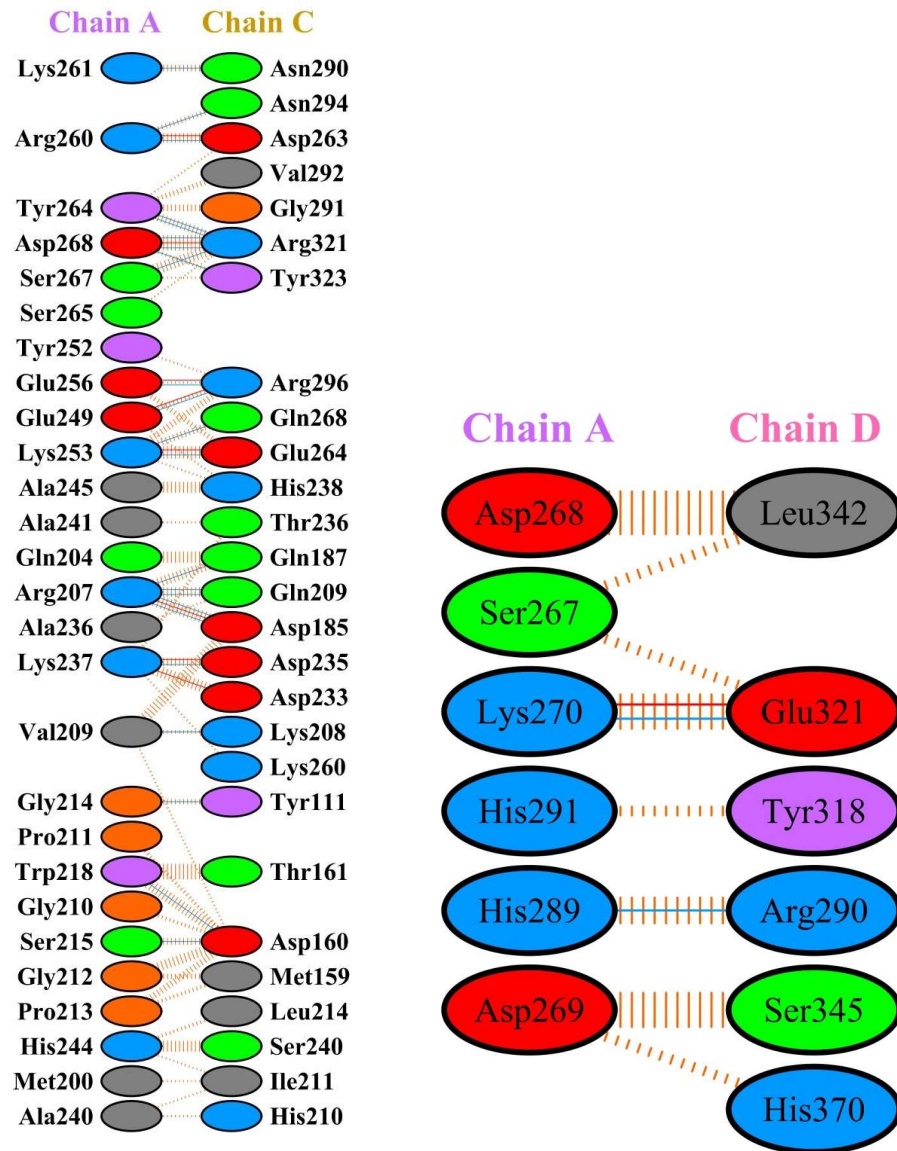


Fonte: elaborado pela autora (2023).

A identificação das interações moleculares entre a vacina e o TLRs foi obtida pelo servidor PDBSum Generate que identificou um total de 23 pontes de hidrogênio, 8 pontes salinas e 190 interações sem contato para o TLR-2 na cadeia C, e 2 pontes de hidrogênio, 1 ponte salina e 20 interações sem contato para a cadeia D do TLR-2 (Figura 21 A). Já para o TLR-3 na cadeia B a existência de 13 pontes de hidrogênio, 12 pontes salinas e 217 interações sem contato (Figura 21 B). A presença de pontes salinas e interações sem contato na interação da vacina com os TLRs são essenciais para a manutenção da estrutura e estabilidade da proteína.

Figura 21 – Representação das interações entre os receptores semelhantes a Toll, TLR-2 (A) e TLR-3 (B), com a vacina multi-epítopo. A vacina multi-epítopo corresponde a cadeia A, os receptores de TLR-2 (cadeia C e cadeia D) e TLR-3 (cadeia B).

(A)

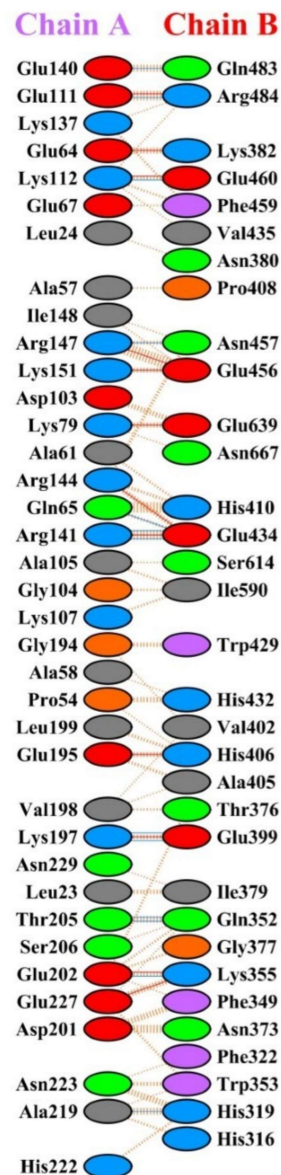


Legenda: Linha azul – ponte de hidrogênio, linha vermelha – ponte salina e linha tracejada laranja – interações sem contato. As cores correspondem as propriedades dos aminoácidos: positivo – azul, negativo – vermelho, neutro – verde, alifático – cinza, aromático – rosa, prolina e glicina – laranja.

Fonte: elaborado pela autora (2023).

Figura 21 (cont.) - Representação das interações entre os receptores semelhantes a Toll, TLR-2 (A) e TLR-3 (B), com a vacina multi-epítopo. A vacina multi-epítopo corresponde a cadeia A, os receptores de TLR-2 (cadeia C e cadeia D) e TLR-3 (cadeia B).

(B)



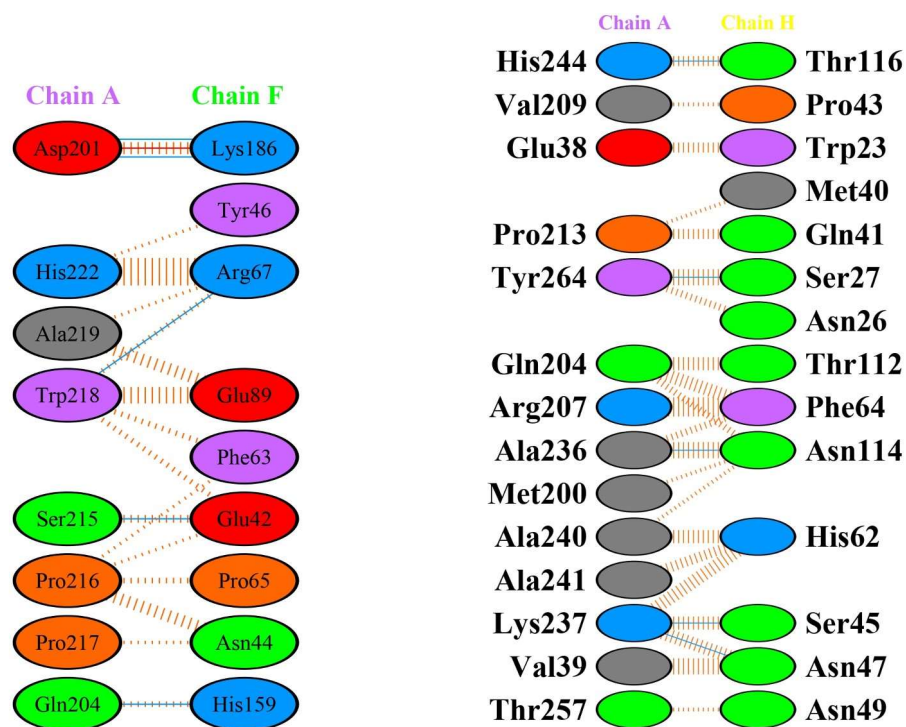
Legenda: Linha azul – ponte de hidrogênio, linha vermelha – ponte salina e linha tracejada laranja – interações sem contato. As cores correspondem as propriedades dos aminoácidos: positivo – azul, negativo – vermelho, neutro – verde, alifático – cinza, aromático – rosa, prolina e glicina – laranja.

Fonte: elaborado pela autora (2023).

Além disso, foram identificadas as interações moleculares entre a vacina e o TLR-4, TLR-7 e TLR-9. No TLR-4 foram identificadas 5 pontes de hidrogênio, 1 ponte salina e 52 interações sem contato na cadeia F, e a presença de 5 pontes de hidrogênio e 68 interações sem contato na cadeia H (Figura 22 A). Em TLR-7 foram identificadas 2 pontes de hidrogênio e 7 interações sem contato na cadeia I, 1 ponte de hidrogênio e 32 interações sem contato na cadeia L, e 5 pontes de hidrogênio, 6 pontes salinas e 177 interações sem contato na cadeia M (Figura 22 B). Já em TLR-9 foram identificadas 10 pontes de hidrogênio, 1 ponte salina e 129 interações sem contato na cadeia N (Figura 22 C).

Figura 22 - Representação das interações entre os receptores semelhantes a Toll, TLR-4 (A), TLR-7 (B) e TLR-9 (C), com a vacina multi-epítipo. A vacina multi-epítipo corresponde a cadeia A, os receptores de TLR-4 (cadeia F e cadeia H), TLR-7 (cadeia I, cadeia L e cadeia M) e TLR-9 (cadeia N).

(A)

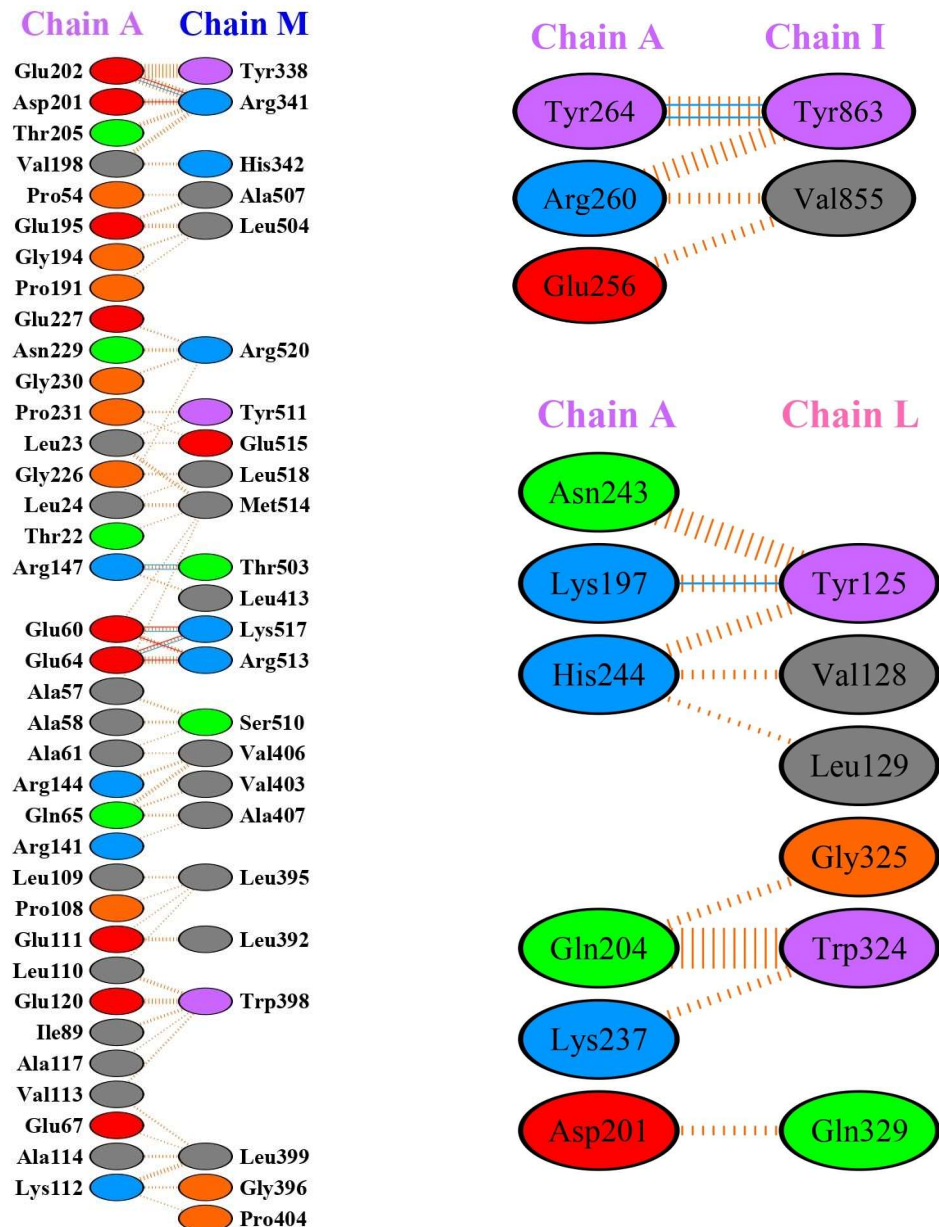


Legenda: Linha azul – ponte de hidrogênio, linha vermelha – ponte salina e linha tracejada laranja – interações sem contato. As cores correspondem as propriedades dos aminoácidos: positivo – azul, negativo – vermelho, neutro – verde, alifático – cinza, aromático – rosa, prolina e glicina – laranja.

Fonte: elaborado pela autora (2023).

Figura 22 (cont.) - Representação das interações entre os receptores semelhantes a Toll, TLR-4 (A), TLR-7 (B) e TLR-9 (C), com a vacina multi-epítopo. A vacina multi-epítopo corresponde a cadeia A, os receptores de TLR-4 (cadeia F e cadeia H), TLR-7 (cadeia I, cadeia L e cadeia M) e TLR-9 (cadeia N).

(B)

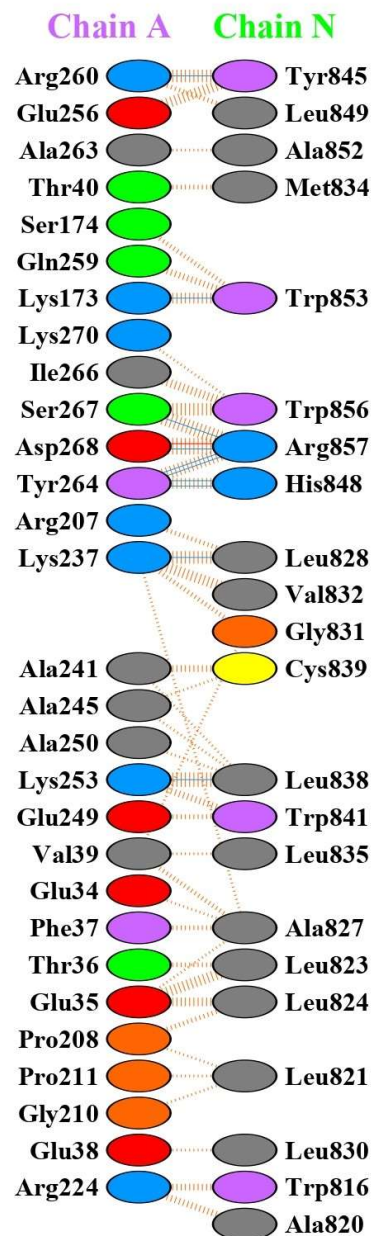


Legenda: Linha azul – ponte de hidrogênio, linha vermelha – ponte salina e linha tracejada laranja – interações sem contato. As cores correspondem as propriedades dos aminoácidos: positivo – azul, negativo – vermelho, neutro – verde, alifático – cinza, aromático – rosa, prolina e glicina – laranja.

Fonte: elaborado pela autora (2023).

Figura 22 (cont.) - Representação das interações entre os receptores semelhantes a Toll, TLR-4 (A), TLR-7 (B) e TLR-9 (C), com a vacina multi-epítopo. A vacina multi-epítopo corresponde a cadeia A, os receptores de TLR-4 (cadeia F e cadeia H), TLR-7 (cadeia I, cadeia L e cadeia M) e TLR-9 (cadeia N).

(C)



Legenda: Linha azul – ponte de hidrogênio, linha vermelha – ponte salina e linha tracejada laranja – interações sem contato. As cores correspondem as propriedades dos aminoácidos: positivo – azul, negativo – vermelho, neutro – verde, alifático – cinza, aromático – rosa, prolina e glicina – laranja.

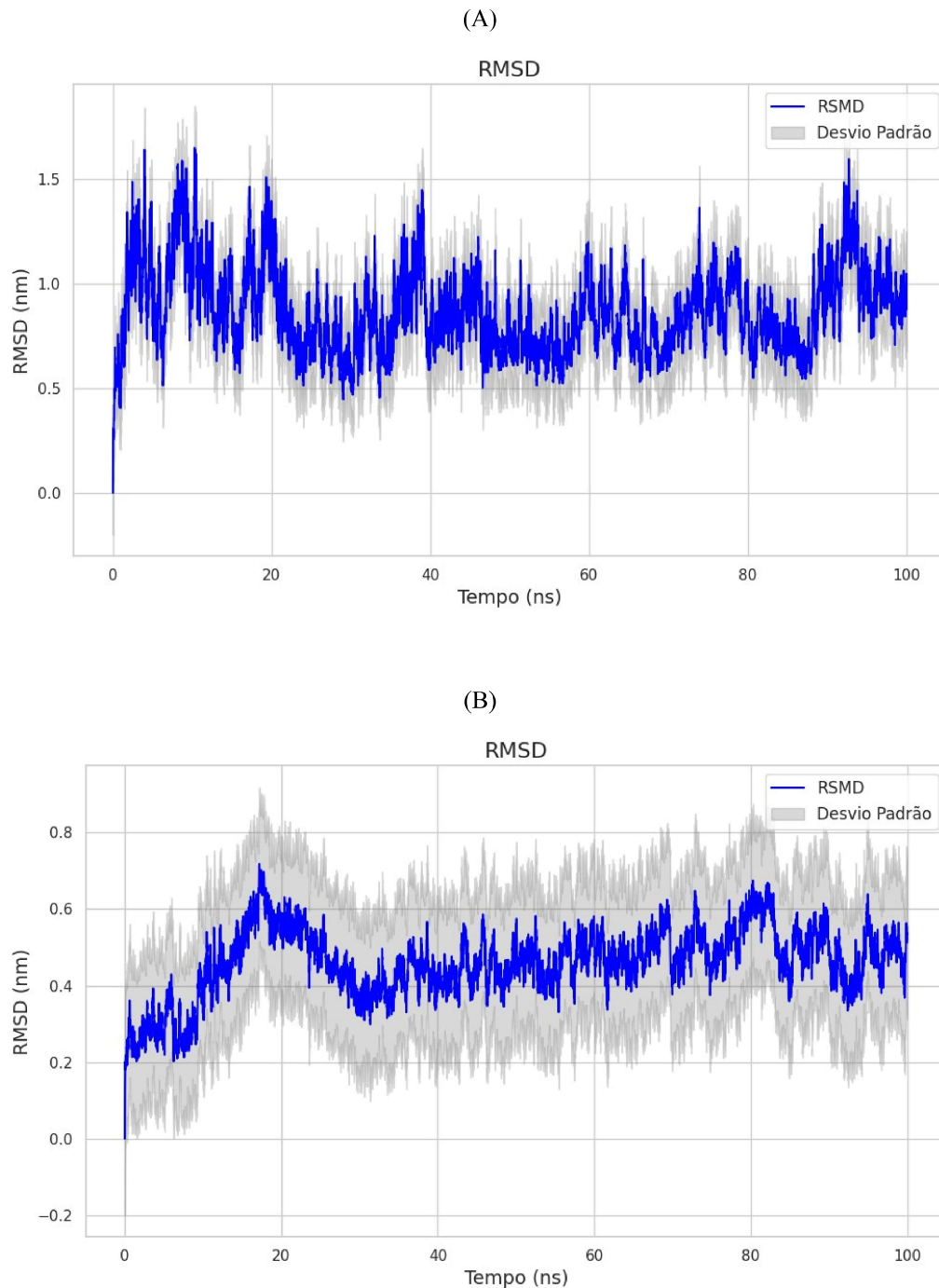
Fonte: elaborado pela autora (2023).

5.9 Avaliação da estabilidade da vacina multi-epítopo por dinâmica molecular

A dinâmica molecular é fundamental para avaliar a estabilidade das moléculas num sistema biológico. Durante as simulações de dinâmica molecular, as variações estruturais da vacina multi-epítopo, quando interagiu com os receptores semelhantes a Toll (TLR2 e TLR3), foram avaliadas utilizando as métricas do RMSD (raiz quadrada do desvio quadrático médio), RMSF (raiz quadrada da flutuação quadrática), Rg (raio de giro) e a SASA (área superficial acessível ao solvente).

O RMSD é o valor usado para calcular o desvio na espinha dorsal da proteína (Ca, C e N) durante os 100ns. Quando a vacina multi-epítopo interagiu com os TLRs apresentou um aumento do RMSD no início da simulação quando ocorreu um aumento da temperatura e depois estabilizou indicando a equilibração do sistema. A vacina-multi-epítopo na interação com TLR2 apresentou um RMSD com valor médio de aproximadamente 0,86 nm (desvio padrão aproximado = 0,20nm), enquanto com o TLR3 o valor médio aproximado foi 0,46nm (desvio padrão aproximado = 0,09nm). Após 20ns de simulação a vacina multi-epítopo tendeu a estabilidade tanto em relação ao TLR2 (valor médio aproximado = 0,83nm e desvio padrão aproximado = 0,17nm) quanto ao TLR3 (valor médio aproximado = 0,47nm e desvio padrão aproximado = 0,07nm) (Figura 23 A-B). Esses resultados indicam que a vacina multi-epítopo apresenta uma maior estabilidade após 20ns, principalmente quando interagiu com o TLR3, pois apresenta o menor valor médio de RMSD.

Figura 23 – Representação gráfica do RMSD da vacina multi-epítoto quando interagindo com TLR2 (A) e TLR3 (B).

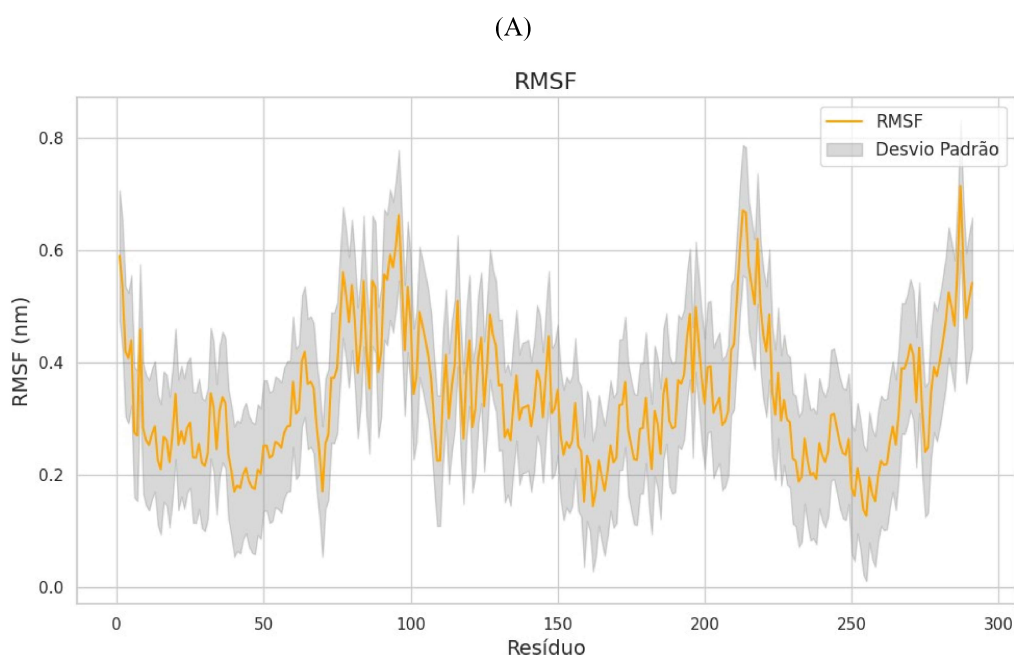


Fonte: elaborado pela autora (2023).

Com o RMSF dos átomos do carbono alfa ($C\alpha$) é possível determinar quais aminoácidos da vacina multi-epítoto são altamente flexíveis ao longo do tempo de simulação. Os valores mais altos de RMSF geralmente estão associados a alças e os menores as hélices. No gráfico da interação vacina multi-epítoto com o TLR2 os resíduos 96(0,7146nm),

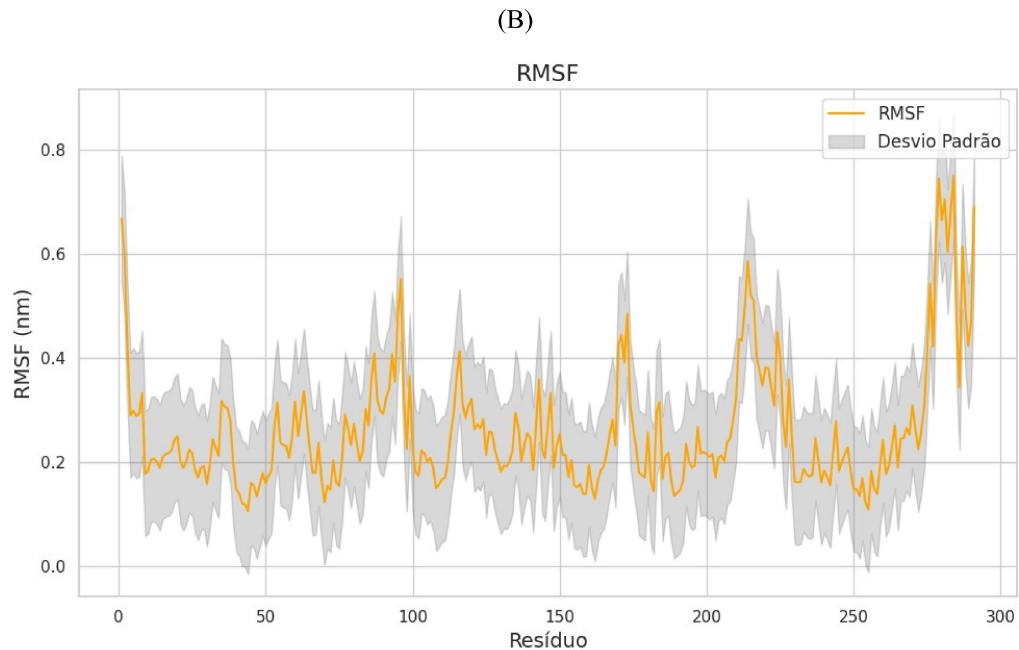
213(0,6714nm), 214(0,6672nm), 218(0.6206nm) e 287(0.6206nm) apresentaram os maiores valores de RMSF que correspondem na maioria desses resíduos a regiões onde predominam alças o que explica a flexibilidade da molécula nessas regiões (Figura 24 A). Já em relação a vacina multi-epítoto com o TLR3, os resíduos 279(0,7442nm), 281(0,7042nm), 283(0,6814nm), 284(0,7506nm) e 291(0.6907nm) localizados mais próximo da porção C-terminal apresentaram os maiores valores de RMSF e correspondem assim como em TLR2 a aminoácidos localizados nas regiões mais flexível da vacina multi-epítoto (Figura 24 B). Tanto na interação com TLR2 quanto TLR3 a vacina multi-epítoto apresenta regiões flexíveis durante a simulação.

Figura 24 – Representação gráfica do RMSF da vacina multi-epítoto quando interagindo com TLR2 (A) e TLR3 (B).



Fonte: elaborado pela autora (2023).

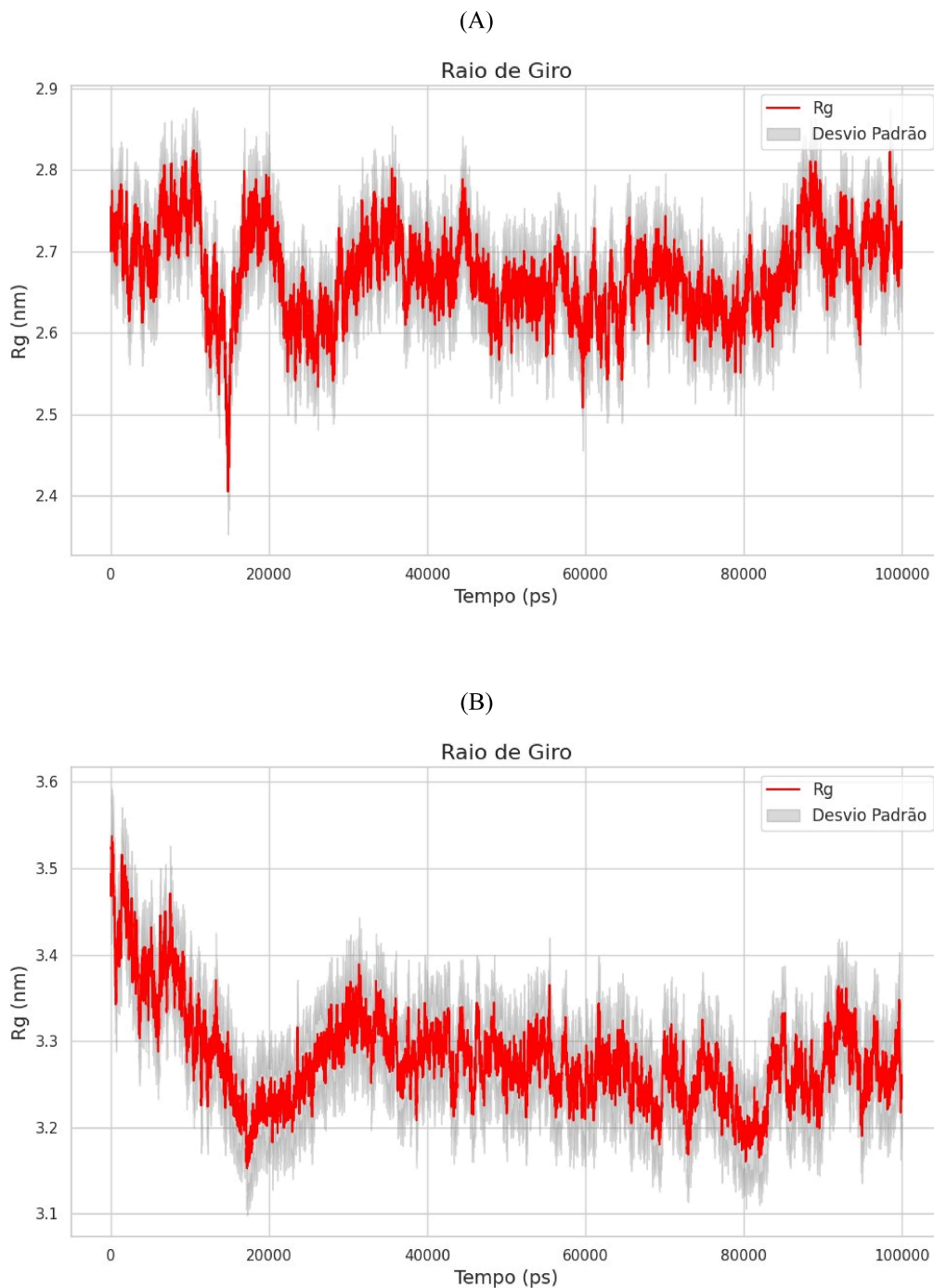
Figura 24 (cont.) – Representação gráfica do RMSF da vacina multi-epítopo quando interagindo com TLR2 (A) e TLR3 (B).



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Já o raio de giro (R_g) está relacionado ao grau de enovelamento da vacina multi-epítopo ao longo da simulação. O valor médio aproximado do raio de giro total da vacina multi-epítopo em relação a interação com o TLR2 foi 2,67nm (desvio padrão aproximado de 0,05nm) e a partir de 20000ps de 2,66nm (desvio padrão aproximado de 0,05nm) (Figura 25 A). Já em relação a interação com o TLR3 o valor médio aproximado foi 3,28nm (desvio padrão aproximado 0,05nm) e a partir de 20000ps de 3,27nm (desvio padrão aproximado 0,04nm) (Figura 25 B). Esses dados revelam que a vacina multi-epítopo quando interage com o TLR2 apresenta um maior grau de enovelamento durante a simulação, pois seu valor de R_g total foi menor do que o valor da interação com TLR3.

Figura 25 – Representação gráfica do raio de giro (Rg) da vacina multi-epítopo quando interagindo com TLR2 (A) e TLR3 (B).



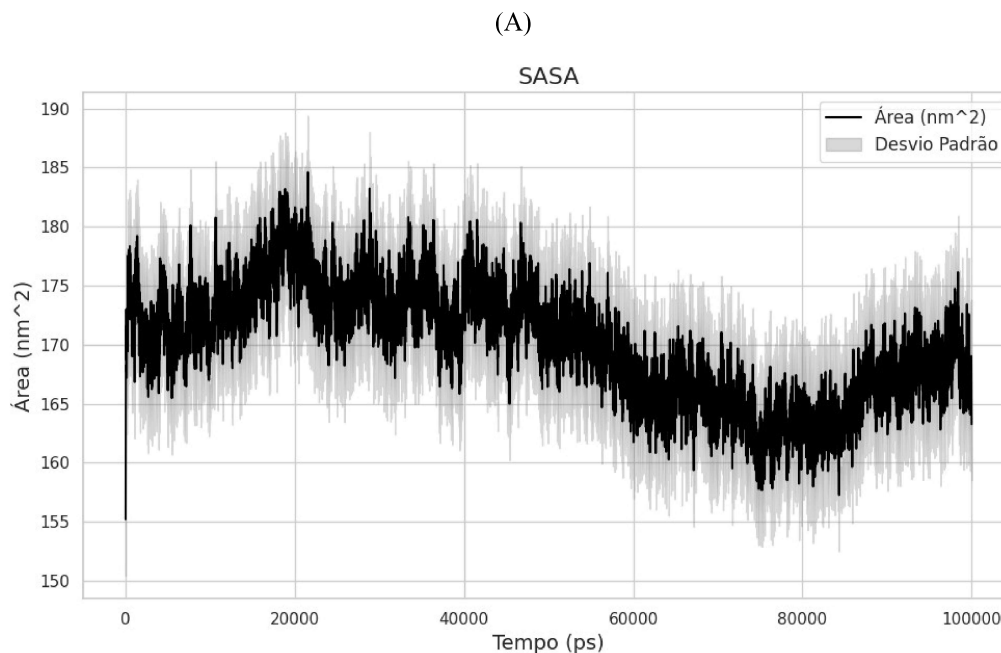
Fonte: elaborado pela autora (2023).

A área superficial acessível ao solvente (SASA) é um parâmetro que determina a superfície da vacina multi-epítopo exposta ao solvente durante a simulação. A SASA na

vacina multi-epítopo em relação a interação com o TLR2 apresentou o valor médio aproximado de 170.02nm^2 (desvio padrão aproximado 4.78nm^2) e com o TLR3, $294,66\text{nm}^2$ (desvio padrão aproximado $3,18\text{nm}^2$) (Figura 26 A-B). Esses resultados indicam que a vacina multi-epítopo quando interage com o TLR3 tem um comportamento mais estável no ambiente com o solvente, pois apresente um valor médio aproximado de SASA maior do que o encontrado para o TLR2.

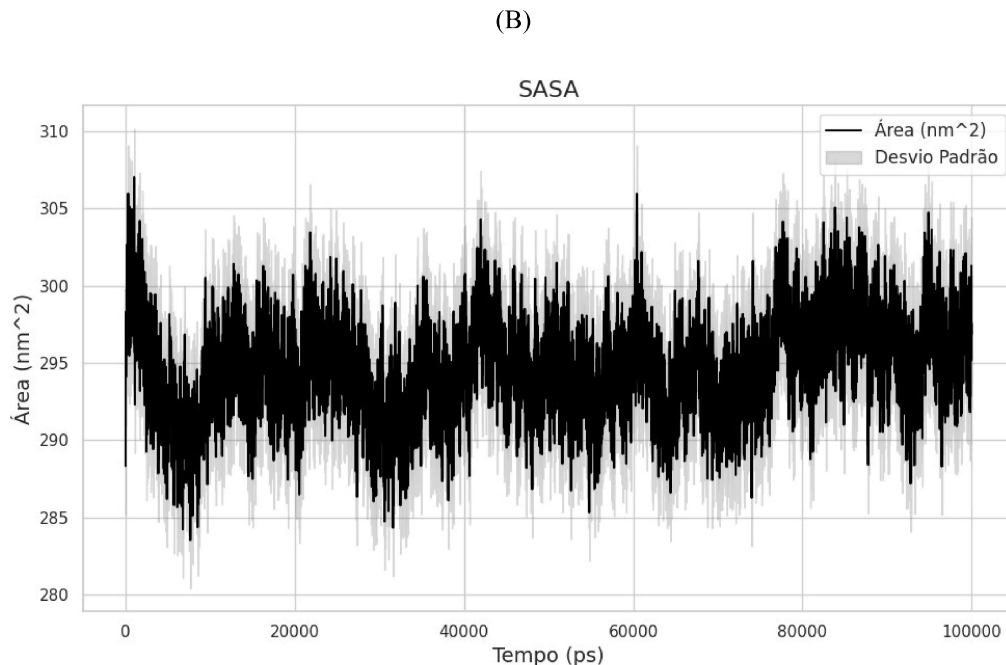
Os parâmetros avaliados na dinâmica molecular demonstraram que as interações da vacina multi-epítopo com o TLR3 são mais estáveis do que com o TLR2 durante a simulação, exceto para o raio de giro total que se apresentou maior em relação ao TLR3, indicando um menor empacotamento. Provavelmente, a natureza de interações estabelecidas entre a vacina multi-epítopo e o TLR3 e as regiões mais flexíveis da vacina multi-epítopos tenham influência nesse empacotamento.

Figura 26 – Representação gráfica do SASA da vacina multi-epítopo quando interagindo com TLR2 (A) e TLR3 (B).



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Figura 26 (cont.) - Representação gráfica do SASA da vacina multi-epítopo quando interagindo com TLR2 (A) e TLR3 (B).



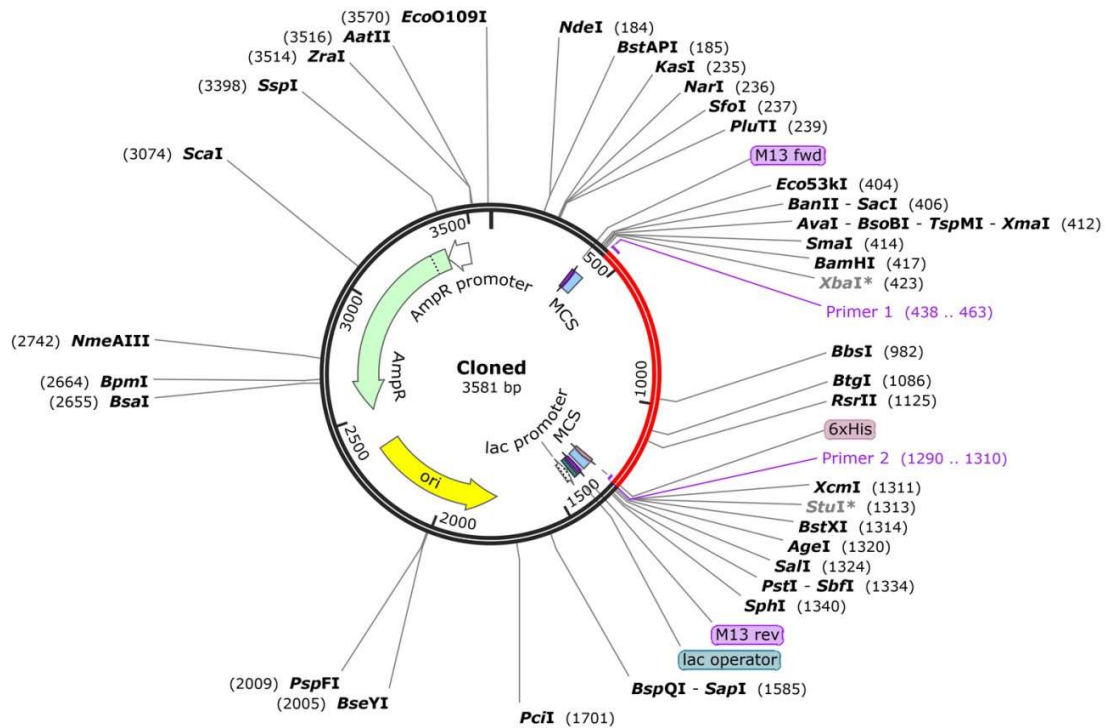
Fonte: elaborado pela autora (2023).

5.10 Adaptação do códon e clonagem *in silico* da vacina multi-epítopo

Geralmente é necessário a adaptação dos códons quando se tem interesse em aumentar a eficiência do gene alvo. Com o servidor JAVA Codon Adaptation a sequência aminoácidos da vacina multi-epítopo convertida em sequência de nucleotídeos foi otimizada em relação a *E. coli* (cepa K12) e obtido com valor aproximado de 50,73% de conteúdo CG contido no intervalo ótimo de 30-70%. Além disso, o índice de adaptação de códons (CAI) foi 1,0 que correspondente a um valor ideal para a expressão proteica eficiente. Ambos os parâmetros reforçam que a vacina desenhada apresenta alta eficiência transcricional e traducional. Após a otimização da vacina multi-epítopo foi realizada a clonagem no vetor Allele TA linearizado de 2707bp utilizando o software SnapGene. O comprimento final do vetor clonado foi 3581bp que corresponde a 2707bp do vetor mais o inserto (amplificado da vacina multi-epítopo) de 873bp (Figura 27 A). A fim de visualizar a distinção do inserto, vetor e vetor clonado ao observar o gel de agarose 1% da simulação de eletroforese (Figura 27 B-C) foi verificado que o tamanho do vetor clonado é inferior ao que se esperava quando em tampão de TBE, mas em tampão de ácido bórico de sódio de baixa força iônica (SB) apresenta alta resolução.

Figura 27 – Clonagem *in silico* da vacina multi-epítopo no vetor linearizado TA (A) e gel de agarose 1% de simulação de eletroforese em solução de TBE (B) e solução de tampão SB (C).
Legenda: Coluna MW: 1 kb DNA ladder; Coluna 1: inserto – vacina multi-epítopo (873bp); Coluna 2: vetor TA linear (2707bp pb); Coluna 3: vetor TA linear clonado (3581pb).

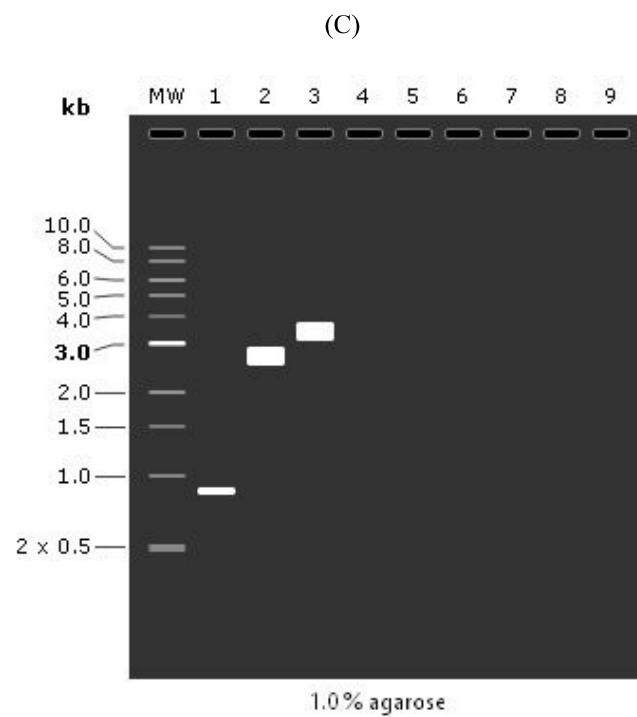
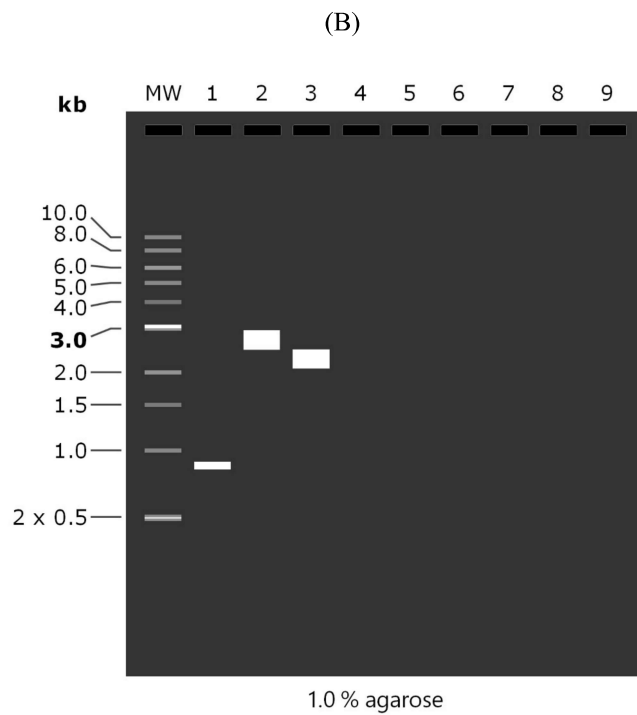
(A)



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Figura 27 (cont.) – Clonagem *in silico* da vacina multi-epítopo no vetor linearizado TA (A) e gel de agarose 1% de simulação de eletroforese em solução de TBE (B) e solução de tampão SB (C).

Legenda: Coluna MW: 1 kb DNA ladder; Coluna 1: inserto – vacina multi-epítopo (873bp); Coluna 2: vetor TA linear (2707bp pb); Coluna 3: vetor TA linear clonado (3581pb).



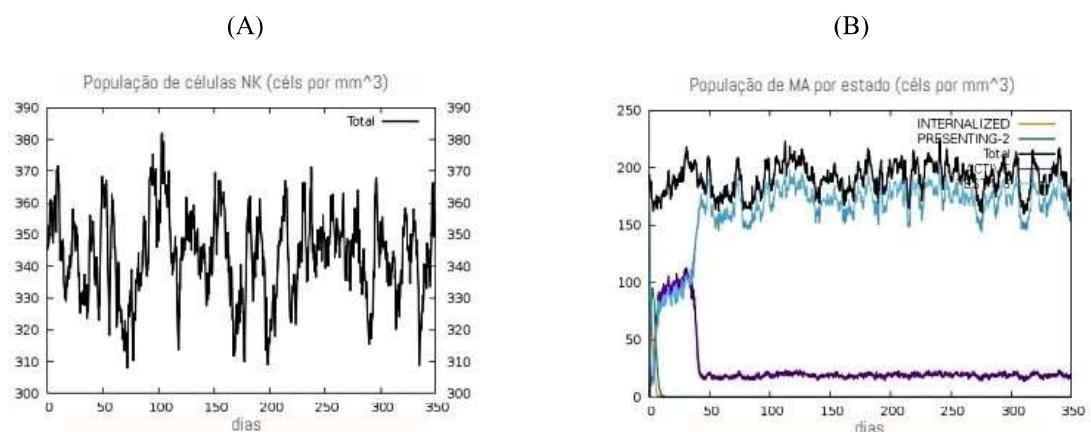
Fonte: elaborado pela autora (2023).

5.11 Simulação da resposta imune após administração da vacina multi-epítopo

Na simulação da resposta imune desencadeada pela administração única e de três doses da vacina multi-epítopo, houve resposta imune duradora e mais robusta na exposição repetida ao antígeno. Tendo em vista que a imunidade inata é a etapa primordial da resposta imune envolvida na apresentação do antígeno e ativação das células-T. A vacina multi-epítopo ativou e estimulou células naturais killer (NK) e macrófagos em ambos esquemas vacinais (Figura 28 A-B; Figura 29 A-B). Também foi observado o aumento do nível de citocinas em ambos esquemas vacinais (Figura 28 C; Figura 29 C). Nas três administrações houve aumento da citocina interferon gama (IFN- γ) com tendência a decrescer nas exposições seguintes e aumento gradual de IL-2 (Figura 29 C).

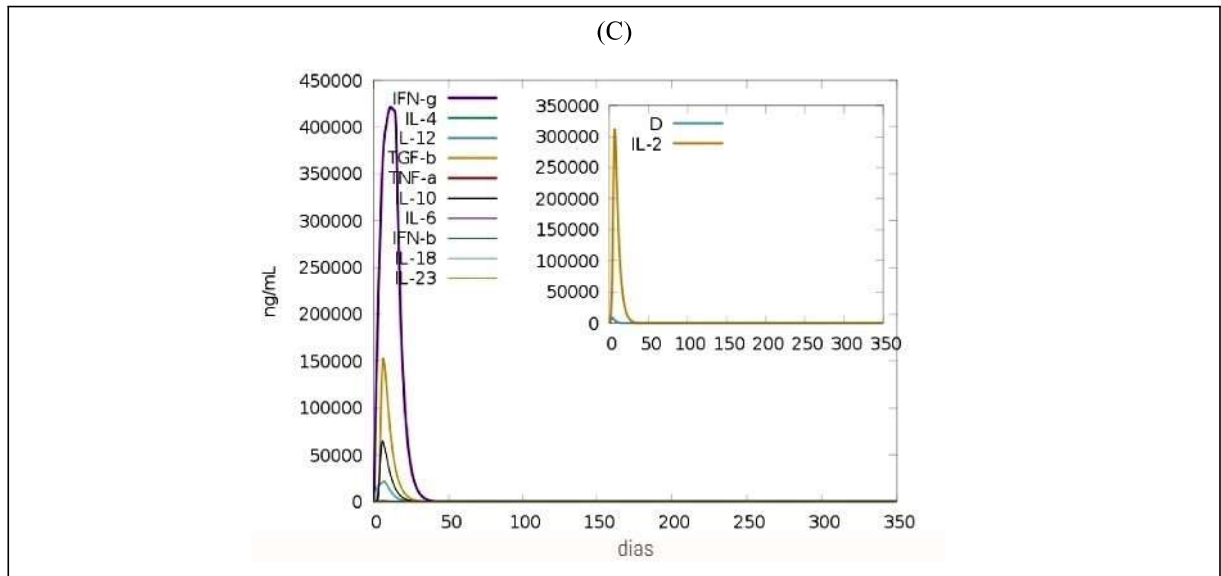
Além disso, após ambos esquemas vacinais houve uma diminuição dos macrófagos ativados que indica a provável ação de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β a fim de controlar a resposta imune e evitar o desenvolvimento de uma resposta inflamatória exacerbada (Figura 28 B, C; Figura 29 B, C).

Figura 28 – Simulação imunológica em relação à imunidade inata e liberação de citocinas após uma administração da vacina multi-epítopo. O gráfico (A) representa a população das células Natural Killer (NK), (B) macrófagos, (C) níveis de citocinas induzidas. Legenda: Active: ativo; Internalized (internalizou o antígeno); Presenting (apresentação do antígeno).



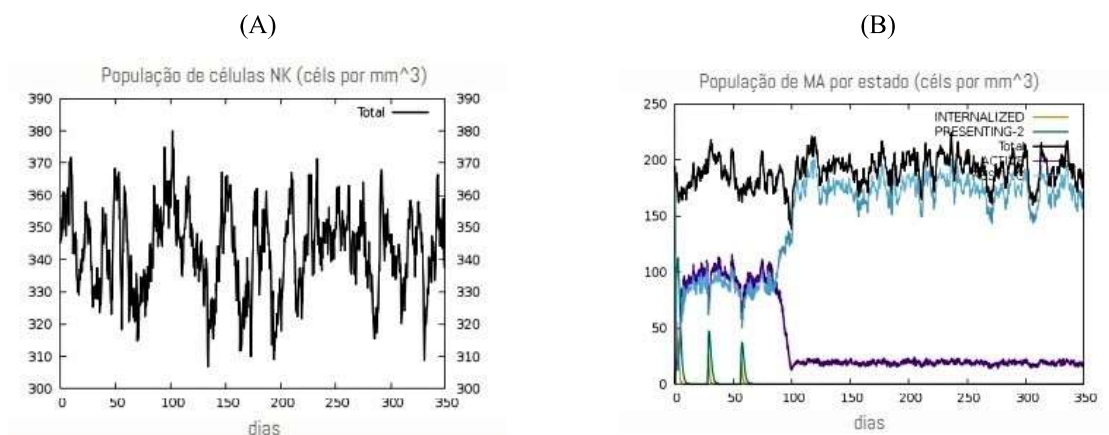
Fonte: elaborado pela autora (2023).

Figura 28 (cont.) - Simulação imunológica em relação à imunidade inata e liberação de citocinas após uma administração da vacina multi-epítipo. O gráfico (A) representa a população das células Natural Killer (NK), (B) macrófagos, (C) níveis de citocinas induzidas. Legenda: Active: ativo; Internalized (internalizou o antígeno); Presenting (apresentação do antígeno).



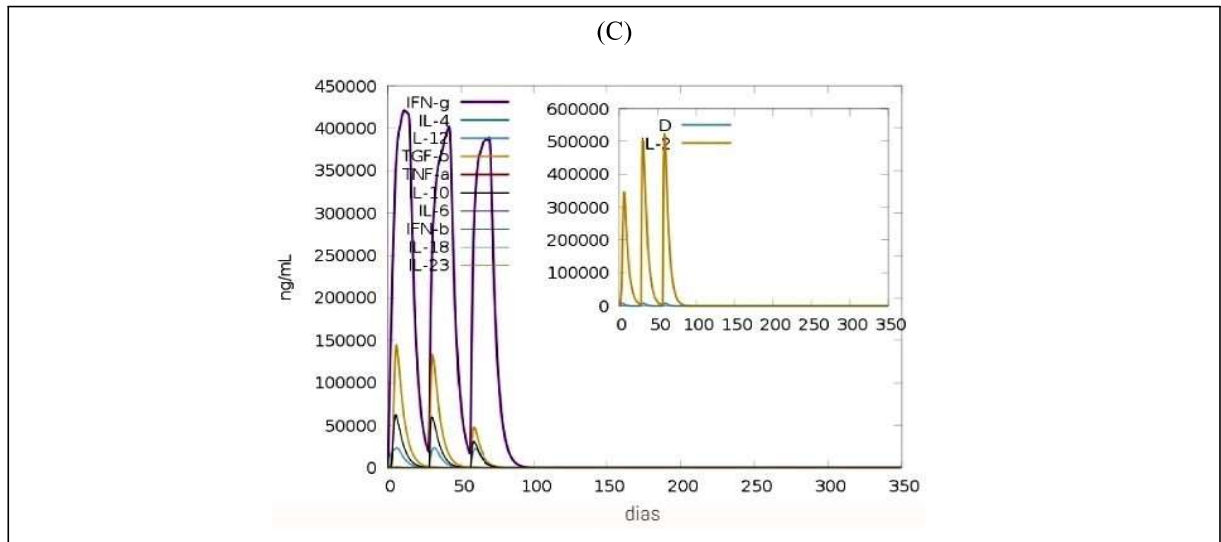
Fonte: elaborado pela autora (2023).

Figura 29 – Simulação imunológica em relação à imunidade inata e liberação de citocinas após três administrações da vacina multi-epítipo. O gráfico (A) representa a população das células Natural Killer (NK), (B) macrófagos, (C) níveis de citocinas induzidas. Legenda: Active: ativo; Internalized (internalizou o antígeno); Presenting (apresentação do antígeno).



Fonte: elaborado pela autora (2023).

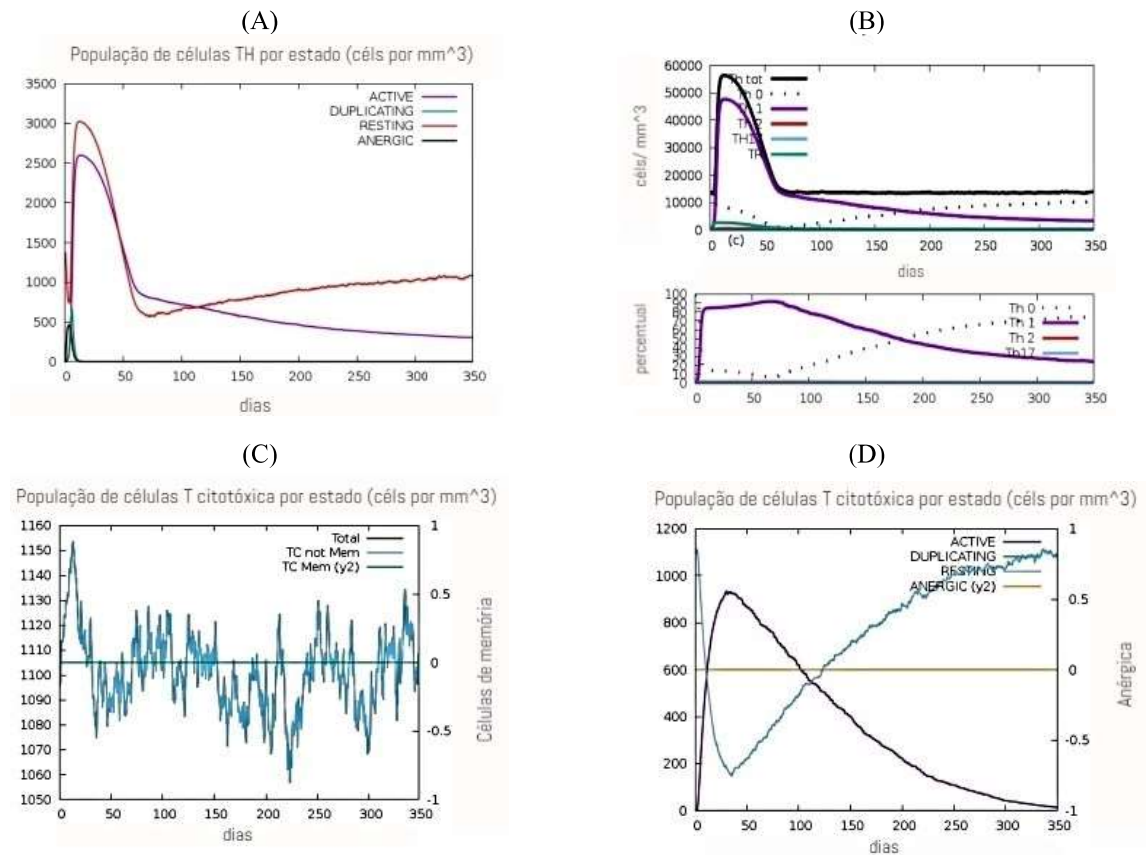
Figura 29 (cont.) - Simulação imunológica em relação à imunidade inata e liberação de citocinas após três administrações da vacina multi-epítopo. O gráfico (A) representa a população das células Natural Killer (NK), (B) macrófagos, (C) níveis de citocinas induzidas. Legenda: Active: ativo; Internalized (internalizou o antígeno); Presenting (apresentação do antígeno).



Fonte: elaborado pela autora (2023).

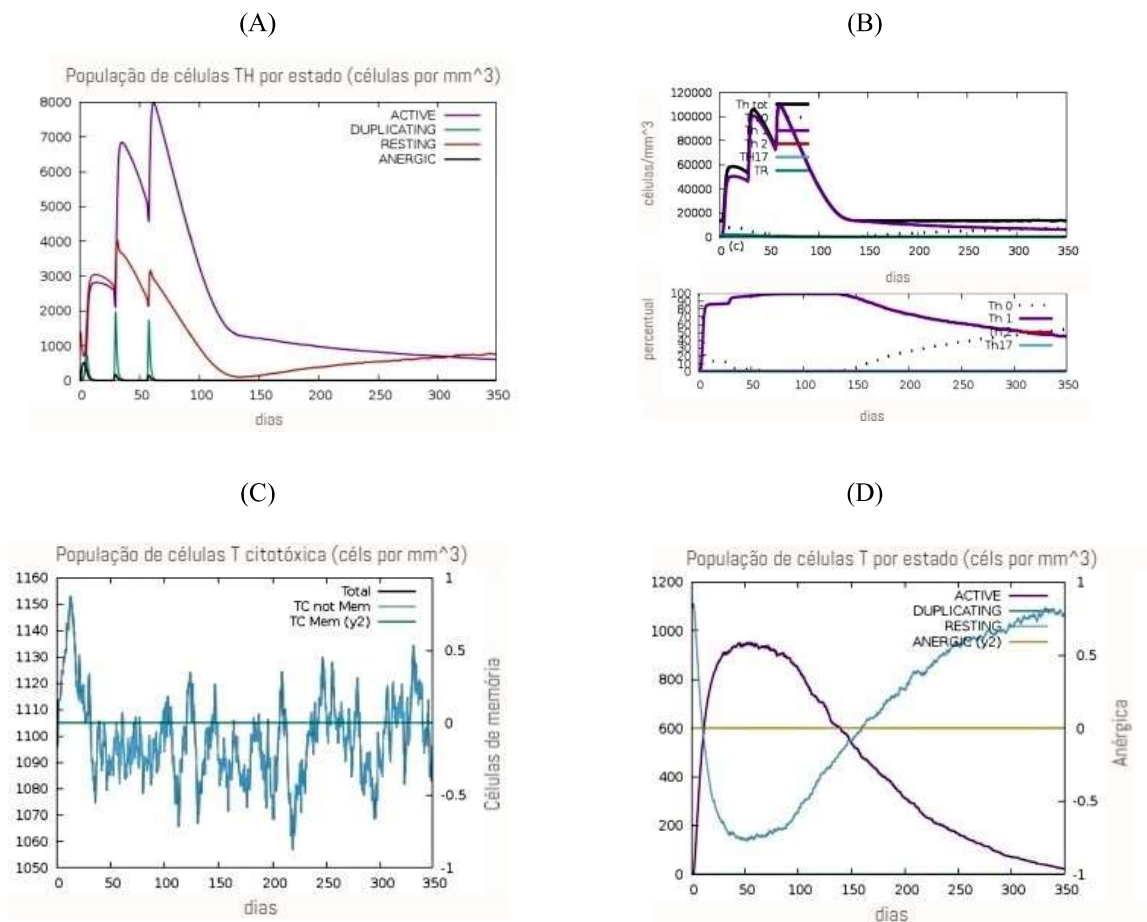
Já em relação às populações de células T, a vacina multi-epítopo aumentou a subpopulação Th1 em ambos os esquemas vacinais (Figura 30 A-B; Figura 31 A-B). Sendo que a exposição sucessiva aos antígenos manteve a quantidade de células Th1 elevadas por mais tempo. Os linfócitos Th1 são induzidos pelos linfócitos T citotóxicos que se proliferam e aumentam a capacidade citotóxica. Esse evento pode ser observado pelo aumento da ativação da população de linfócitos T citotóxicos e decréscimo das células em estado de repouso com a resposta imune induzida pela vacina multi-epítopo em ambos os esquemas vacinais (Figura 30 C-D; Figura 31 C-D). No entanto, em três administrações a população de linfócitos T permaneceram ativados por mais tempo em relação a uma administração (Figura 31 D).

Figura 30 – Simulação imunológica em relação aos linfócitos T após uma administração da vacina multi-epítopo. O gráfico (A-B) representa a população de células T auxiliares por estado, (C) população de células T citotóxicas com memória e naíve e (D) população de células T citotóxicas por estado. Legenda: Active: ativo; Duplicating: duplicado no ciclo mitótico; Resting: inativo; Anergic: anérgico.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Figura 31 – Simulação imunológica em relação aos linfócitos T após três administrações da vacina multi-epítopo. O gráfico (A-B) representa a população de células T auxiliares por estado, (C) população de células T citotóxicas com memória e naíve e (D) população de células T citotóxicas por estado. Legenda: Active: ativo; Duplicating: duplicado no ciclo mitótico; Resting: inativo; Anergic: anérgico.

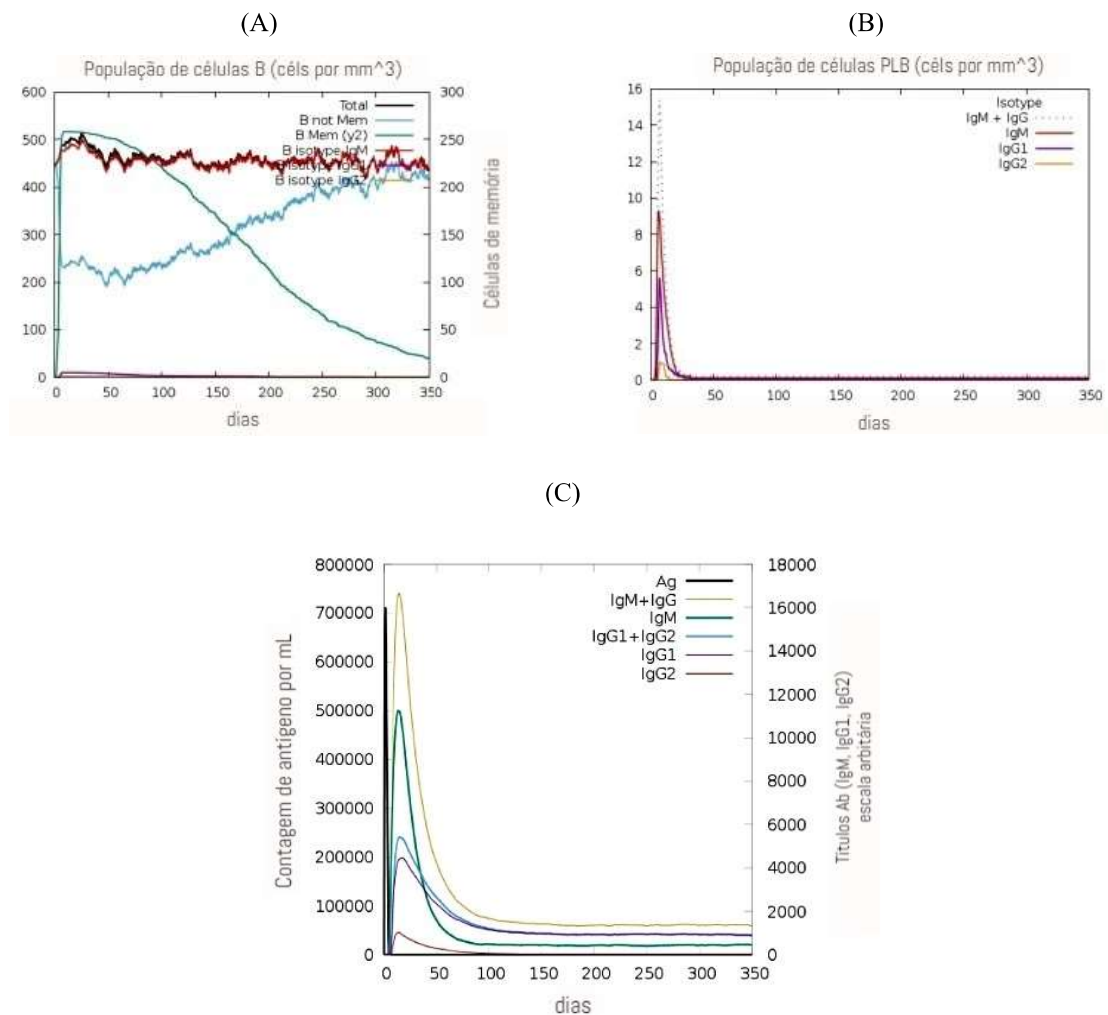


Fonte: elaborado pela autora (2023).

Na resposta imune mediada pela população de linfócitos B houve aumento de células de memória em ambos esquemas vacinais, com diferenciação e produção de IgM e IgG, e com decréscimo de linfócitos B naíve (Figura 32 A-B; Figura 33 A-B). Além disso, foi identificado um aumento gradual da produção de IgM+IgG, IgM, IgG1 e IgG1+IgG2 com a administração das injeções nos intervalos pré-estabelecidos da vacina multi-epítopo (Figura 32 C; Figura 33 C). Na exposição sucessiva da vacina multi-epítopo houve uma reposta imune

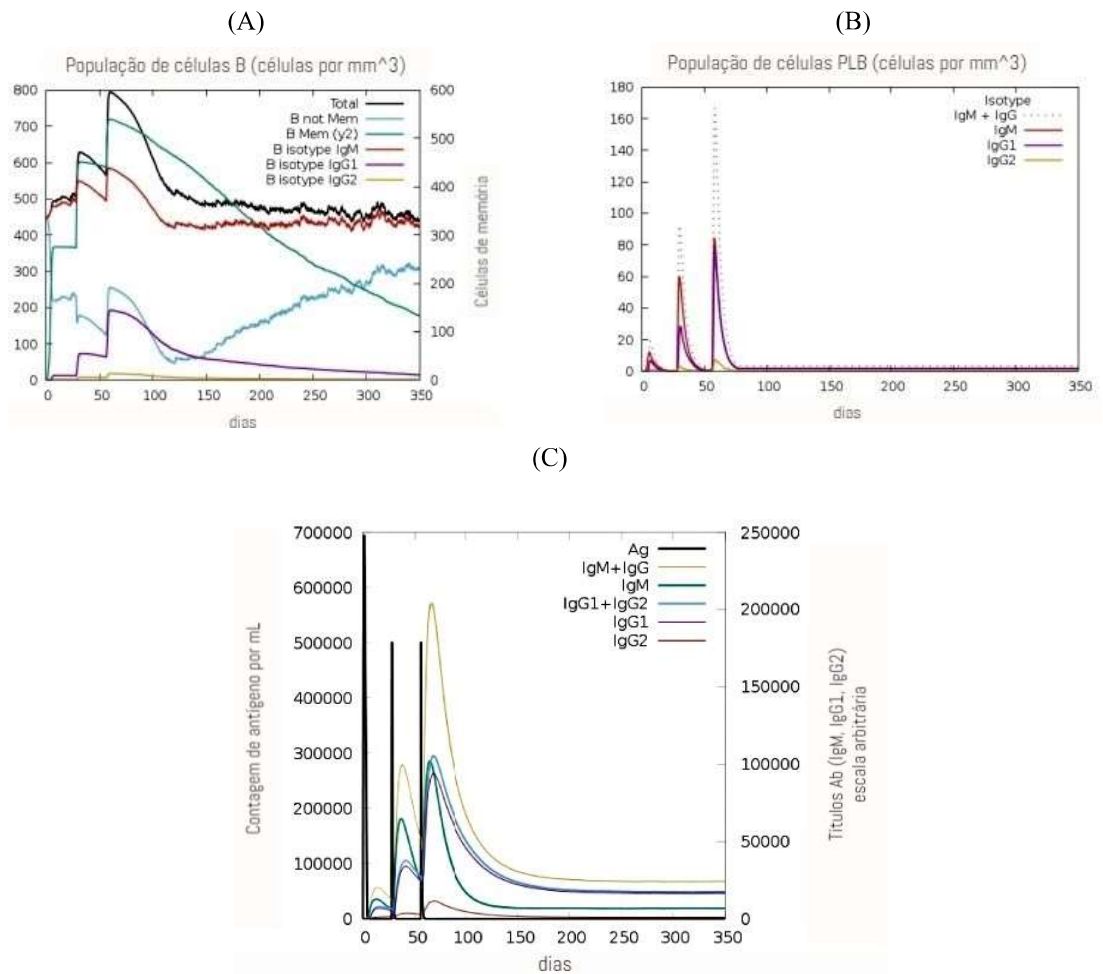
mais robusta. Esses resultados demonstram que a vacina multi-epítipo com exposição sucessiva da vacina tem potencial para causar uma resposta imune efetiva e de longo prazo.

Figura 32 – Simulação imunológica em relação aos linfócitos B e a produção de imunoglobulinas após uma administração da vacina multi-epítipo. O gráfico (A) corresponde a população de linfócitos por estado, (B) população de linfócitos B mediante a administração da vacina multi-epítipo nos intervalos determinados e (C) Nível de imunoglobulinas depois da imunização com a vacina multi-epítipo.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Figura 33 – Simulação imunológica em relação aos linfócitos B e a produção de imunoglobulinas após três administrações da vacina multi-epítopo. O gráfico (A) corresponde a população de linfócitos por estado, (B) população de linfócitos B mediante a administração da vacina multi-epítopo nos intervalos determinados e (C) Nível de imunoglobulinas depois da imunização com a vacina multi-epítopo.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

6. DISCUSSÃO

No desenvolvimento de vacinas terapêuticas contra o câncer, a seleção do antígeno é um dos passos mais importantes do estudo (Liu et al., 2022). Nas vacinas baseadas em peptídeos podem ser utilizados antígenos autólogos, como os antígenos de câncer testicular (CTA), ou seja, os antígenos expressos em células tumorais malignas, nas células embrionárias, nas células germinativas testiculares e apresentam reduzida expressão em outros tecidos normais (Lam et al., 2021).

Existem diversos estudos de imunoinformática que apresentaram resultados promissores de vacinas multi-epítomos baseadas em CTA, como no câncer de ovário (Sufyan et al., 2021), no câncer de mama (Krishnamoorthy, H. R.; Karuppasamy, R., 2023) e no câncer de próstata (Patra, et al., 2020). Em relação a ensaios clínicos, há vacinas de peptídios já avaliadas para melanoma (Hu et al., 2015), câncer de próstata (Sonpavde et al., 2014) e câncer de ovário (Diefenbach et al., 2008) que apresentaram resultados positivos.

O antígeno câncer testicular TFDP3 é um fator de transcrição expresso em testículos normais e em múltiplos câncer, como em câncer de próstata (Ma et al., 2014), leucemia linfoblástica de células T infantil (Chu et al., 2017), carcinoma hepatocelular (Wang et al., 2021) e câncer de mama (Yin et al., 2017; Ding et al., 2018). Além disso, esse CTA está envolvido em importantes processos fisiológicos que favorecem o desenvolvimento do câncer, como na proliferação celular (Huang, J. et al., 2021), regulação da transição epitélio mesenquimal (Yin et al., 2017), modulação de apoptose celular (Ding et al., 2018) e quimioresistência na doença residual (Chu et al., 2017).

A partir disso, nesse estudo o TFDP3 foi considerado para a prospecção de epítomos com a capacidade de desencadear resposta imune humoral e celular, e com a finalidade de construir uma vacina terapêutica multi-epítomo contra o câncer. Diante dos altos custos no desenvolvimento de vacinas, a utilização de ferramentas de imunoinformática foi a escolha para o desenvolvimento da vacina multi-epítomo. A imunoinformática consiste em inúmeras ferramentas *in silico* viáveis, precisas e rápidas para o estudo e desenvolvimento de vacinas multi-epítomos em várias doenças crônicas, incluindo o câncer (Bahrami et al., 2019).

As vacinas baseadas em peptídeos desenvolvidas para o tratamento contra o câncer dependem da interação dos linfócitos T e dos linfócitos B, já que possuem ação antitumoral

(Zhang et al., 2019). Neste estudo as análises de imunoinformática revelaram vários epítomos antigênicos e imunogênicos com a capacidade de estimular a resposta humoral (linfócitos B), celular (linfócito T CD8+ e linfócito T CD4+) e de induzir a produção de INF- γ pelos epítomos dos linfócitos T CD4+. O INF- γ é responsável pela ativação do sistema imune e na resposta antitumoral por diversos mecanismos, como através da indução de apoptose regulada pelas células T, inibição da angiogênese e estimulação de macrófagos pró-inflamatórios M1 (Jorgovanovic et al., 2020).

Os linfócitos T CD8+ e linfócitos T CD4+ estão associados ao MHC de classe I e MHC de classe II, respectivamente, que são altamente polimórficos quantos aos seus alelos (antígenos leucocitários humanos (HLA)) (Rocha; Reitz; Neefjes, 2016). Nas células tumorais a heterogeneidade tumoral e diversos mecanismos que ocorrem com tumores, como a rejeição, escape e dormência, estão associados a diversidade ou perda da expressão de alelos do MHC classe I/II (Garrido; Aptsiauri, 2019). Uma variedade de alelos de HLA expressos para o MHC de classe I e MHC de classe II são expressos em frequências diferentes para diversas etnias (Bui et al., 2006).

Por conta disso, os epítomos associados aos linfócitos T CD8+ e linfócitos T CD4+ precisaram ser avaliados quanto a sua cobertura populacional, ou seja, a previsão de quais populações serão mais beneficiadas com a vacina multi-epítomo constituída por esses epítomos. Os epítomos selecionados neste estudo para compor a vacina multi-epítomo apresentaram uma alta cobertura populacional no mundo (93,55%) e em outras populações variam de 67,87% a 95,88%, enfatizando a vacina multi-epítomo como um potencial agente imunoterapêutico para tipos de câncer que expressão o TFD3.

A cobertura populacional no mundo identificada nesse estudo está no intervalo encontrado na predição de vacinas multi-epítomos de câncer de pulmão de células pequenas de 83,81% (Herrera, 2020), câncer de mama de 90,33% (Krishnamoorthy; Ramanathan, 2023), câncer de ovário de 97,59% (Sufyan, et al., 2021) e melanoma entre 93,55% a 99,13% (Safavi et al., 2019). Esses dados revelam que a vacina mutli-epítomo desse estudo apresenta uma ampla cobertura populacional no mundo.

Nesse estudo a vacina multi-epítomo foi composta por 9 epítomos oriundos da sequência de aminoácidos de TFD3 que apresentaram maior probabilidade de desencadear resposta imune, mediada por linfócitos B, linfócitos T CD4+ e linfocitos T CD8+, em

diversas populações. Além desses epítomos, foi necessário inserir na composição da vacina multi-epítomo o adjuvante e os ligantes entre os epítomos e nas extremidades N-terminal e C-terminal. O adjuvante 50S ribossomal L7/L12 da *Mycobacterium tuberculosis* incorporado tem a capacidade de desencadear uma resposta imune adaptativa (Rahmani et al., 2019). Os ligantes utilizados na vacina multi-epítomo auxiliam na manutenção da imunogenicidade dependente da conformação, na separação e no processamento dos epítomos para o processo de apresentação de antígenos (Livingston et al., 2002; Mahdevar et al., 2022).

Além disso, a vacina multi-epítomo apresentou baixo risco de induzir autoimunidade devido ao reduzido percentual de homologia com outras proteínas humanas, antigenicidade, não alergenicidade e baixo risco de toxicidade. Também possui características que podem ser úteis no isolamento por precipitação isoelétrica e ação em sistemas biológicos *in vivo* e *in vitro*, como o ponto isoelétrico de 9,05, boa solubilidade em água, estabilidade térmica e tempo de meia-vida de 1h em reticulócitos de mamíferos (*in vivo*).

A estabilidade e solubilidade de proteínas recombinadas são fatores importantes na produção das vacinas, pós-produção, conservação da atividade biológica e redução de efeitos tóxicos (Vazquez; Corchero; Villaverde, 2011). A partir dessas características incluindo a hidrofiliabilidade da vacina multi-epítomo, a integridade da vacina diante das enzimas metabólicas do ambiente biológico pode ser preservada até ser entregue nas células utilizando como veículo de aplicação da vacina nanopartículas lipídicas, assim como ocorre em vacinas de mRNA (Wilson; Geetha, 2022).

Já em relação ao processamento considerando a biosíntese de MHC classe I, a vacina multi-epítomo apresentou sítios de clivagem por proteossoma e peptídeos com alta afinidade pelos transportadores TAP. Na biosíntese de MHC classe I as proteínas são clivadas pelo proteossoma, podem se deslocar até o retículo endoplasmático e interagir com o transportador TAP que montará o complexo peptídeo-classe I, seguir para o complexo de Golgi, e ser expresso na superfície celular (Rock.; Reits; Neefjes, 2016). Outro aspecto importante avaliado na vacina multi-epítomo foi a identificação de modificações pós-traducionais por O-glicosilação e fosforilação que podem ser utilizados como indicadores de degradação de peptídeos no proteossoma (Zarling et al., 2000; Mahdevar et al., 2022).

Sob o ponto de vista estrutura secundária, a vacina multi-epítomo apresentou predominância de conformação alfa-hélice em relação as folha-beta e regiões sem estrutura

secundária definida. Com a modelagem da estrutura terciária é possível estimar a dinâmica da proteína, função e capacidade de interação com outras proteínas (Sufyan et al., 2021). Na estrutura terciária da vacina multi-epítipo foram previstos os parâmetros de qualidade e realizado o refinamento da estrutura para obter os melhores valores percentuais. Mediante avaliação pelo gráfico de Ramachandran, fator de qualidade Errat e o z-score do ProSA foi revelado que a vacina multi-epítipo apresentou uma estrutura predita compatível biologicamente. A estrutura terciária da vacina multi-epítipo também manteve epítipos capazes de interagir com os linfócitos B e desenvolver uma resposta humoral.

Após a determinação da estrutura terciária, foi identificado a interação da vacina com receptores semelhantes a Toll (TLRs), especificamente o TLR2 e o TLR3 apresentaram mais interações e, posteriormente, realizada a dinâmica molecular. Os receptores TLRs são receptores presentes na membrana plasmática e membranas de células imunes e não imunes cuja ativação por algum agente pode levar a produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que podem ajudar na indução de respostas imunes (McCall; Muccioli; Benencia, 2020).

O TLR2 está expresso comumente na membrana celular, mas após a transformação da célula para displasia e câncer predomina a expressão no citoplasma e pode ter ação anti e pro-tumoral a depender das terapias aplicadas associadas a estimulação (Urban-Wojciuk et al., 2019). Já os TLR3s são mais expressos em endossomos em células imunes apresentadoras de antígenos e células epiteliais assim como em múltiplas neoplasias, como câncer de mama, câncer de próstata e câncer de ovário, e podem ter ação anti e pró-tumoral (Muresan et al., 2020). Tanto em TLR2 quanto em TLR3 foram identificadas a presença de interações (pontes de hidrogênio, pontes salinas e interações sem contato) com a vacina multi-epítipo.

Tendo em vista isso, a dinâmica molecular foi realizada tanto no caso da interação da vacina multi-epítipo-TLR2, assim como na vacina multi-epítipo-TLR3 para avaliar o comportamento da vacina multi-epítipo numa simulação computacional com as condições biológicas equivalentes. Os parâmetros utilizados em ambas as simulações revelaram que as interações da vacina multi-epítipo com o TLR3 são mais estáveis do que as apresentadas com o TLR2. Portanto, destacando a interação da vacina multi-epítipo com TLR3 como mais promissora.

A estimulação de TLR3 pode aumentar a produção de IFNs do tipo I, inibir a proliferação de células tumorais e estimular os fenótipos antitumorais das células imunes (Pahlavanneshan et al., 2021). Alguns ensaios clínicos de agonistas de TLR3 estão na fase II de estudo para câncer de coloretal, melanoma, câncer de próstata, câncer de mama, câncer de cabeça e pescoço de células escamosas e linfoma não Hodgkin, devido à capacidade do TLR 3 regular positivamente vias que estimulam respostas imunes antitumorais (Duan et al. 2022). Esses dados revelam que o estímulo de TLR3 por agonistas tem o potencial antitumoral e podem ser uma opção terapêutica no tratamento do câncer.

Por fim, a clonagem *in silico* da vacina multi-epítipo foi possível mediante a adaptação dos códons e inserção no vetor Allele TA linearizado. Com isso, foi demonstrado que a vacina multi-epítipo pode ser produzida por clonagem. Embora haja vantagens ao se trabalhar com vetores TA linearizados para clonagem, como não haver necessidade do preparo de extremidades coesivas, as conformações (linear e circular) apresentam migração diferente no gel de agarose a 1% em soluções tampões diferentes (Ishido; Ishikawa; Hirano, 2010). Nesse estudo, o tampão de ácido bórico de sódio de baixa força iônica (SB) apresentou melhor resolução na migração em gel de agarose a 1%.

Já na simulação da resposta imune após a administração da vacina multi-epítipo com uma exposição e em três exposições sucessivas em intervalos de tempos, apresentou uma resposta imune favorável. Sendo no esquema vacinal de mais de uma exposição à vacina multi-epítipo que apresentou uma resposta mais duradora e efetiva. O aumento das células NK e macrófagos após cada injeção da vacina multi-epítipo corrobora com o fato das células NK produzirem IFN- γ que ativam macrófagos, e são co-estimuladas a proliferar por IL-2 (Habbanjar et al., 2023).

Em relação a imunidade adaptativa, a subpopulação de linfócito Th1 teve um aumento expressivo que, por sua vez induz os linfócitos T citotóxicos. Além disso, houve o aumento gradual de imunoglobulinas que indica uma resposta humoral dos linfócitos B. Essa resposta humoral é resultado do reconhecimento da vacina multi-epítipo pelo sistema imune e pode ser um biomarcador da resposta imunológica nos pacientes com câncer (Astaneh; Dashti; Esfahani, 2019).

Portanto, a vacina multi-epítipo apresentou ampla cobertura populacional, propriedades físico-químicas que garantem estabilidade à molécula e viabilidade de aplicação

em sistemas biológicos, interações entre o receptor semelhante a Toll, TLR-3, capacidade de síntese por clonagem e resposta imunológica.

7. CONCLUSÃO

Neste estudo foi proposto o desenvolvimento da vacina multi-epítopo com ação antitumoral a partir do antígeno testicular tumoral TFDP3. Essa vacina multi-epítopo apresentou ampla cobertura populacional, baixa homologia com outras proteínas, parâmetros físico-químicos relevantes, capacidade de interação em sistemas biológicos, principalmente com o TLR3, capacidade de clonagem e estímulo da resposta imune que a revelaram como um potencial candidato para a imunoterapia dos tipos de câncer que expressão o TFDP3. Cabe ressaltar que essa é a primeira vacina baseada em peptídeos desenhada contra o antígeno testicular de câncer TFDP3 e que a avaliação foi realizada a partir da triagem de epítomos vacinais através de ferramentas de imunoinformática. Portanto, são necessários estudos futuros para explorar essa vacina multi-epítopo em ensaios *in vitro* e *in vivo* para corroborar com os achados.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT M, USTOYEV Y. Cancer and the Immune System: The History and Background of Immunotherapy. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 35, n. 5, Out. 2019.
- AGHAJANI, J. et al. Molecular Dynamic Simulations and Molecular Docking as a Potential Way for Designed New Inhibitor Drug without Resistance. **Journal of Respiratory Diseases, Thoracic Surgery, Intensive Care and Tuberculosis**, v. 21, n. 1, p. 1-14, Jan. 2022.
- ASTANEH, M.; DASHTI, S.; ESFAHANI, Z. T. (2019). Humoral immune responses against cancer-testis antigens in human malignancies. **Human Antibodies**, v. 27, n. 4, p. 237-240, 2019.
- AYYAGARI, V. S. et al. Design of a multi-epitope-based vaccine targeting M-protein of SARS-CoV2: an immunoinformatics approach. **Journal of biomolecular structure and dynamics**, v. 40, n. 7, p. 2963–2977, 2020.
- AXELROD, M. L. et al. Biological Consequences of MHC-II Expression by Tumor Cells in Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 25, n. 8, p. 2392–2402, 2019.
- BACKERT, L.; KOHLBACHER, O. Immunoinformatics and epitope prediction in the age of genomic medicine. **Genome Medicine**, v. 7, n. 119, nov. 2015.
- BAEK, M. et al. Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. **Science**, v. 373, n. 6557, p. 871-876, Ago. 2021.
- BARZAMAN, K. *et al.* Breast cancer immunotherapy: Current and novel approaches. **International Immunopharmacology**, v. 98, 2021.
- BERENDSEN, H. J. C.; SPOEL, D. V. D.; DRUNEN. R. GROMACS: GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. **Computer Physics Communications**, v. 91, p. 43-56, Set. 1995.
- BAHRAMI, A. A. et al. Immunoinformatics: In Silico Approaches and Computational Design of a Multi-epitope, Immunogenic Protein. **International Reviews of Immunology**, v. 38, n. 6, p. 307-322, Set. 2019.

BHASIN, M.; RAGHAVA, G.P.S. Analysis and prediction of affinity of TAP binding peptides using cascade SVM. **Protein Science**, v. 13, n. 3, p. 596-607, 2004.

BLOM, N.; GAMMELTOFT, S.; BRUNAK, S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. **Journal of Molecular Biology**, v. 294, n. 5, p. 1351-1362, Dez. 1999.

BRAY, F. et al. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. **Cancer**, v. 127, n.16, p. 3029-3030, Jun. 2021.

BROWN, J. S. et al. Updating the Definition of Cancer. **Molecular Cancer Research**, v. 21, n. 11, p. 1142–1147, Nov. 2023.

BUCHAN, D. W. A.; JONES, D. T. The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 years on. **Nucleic Acids Research**, v. 47, p. W402-W407, 2019.

BUI, H. et al. Predicting population coverage of T-cell epitope-based diagnostics and vaccines. **BMC Bioinformatics**, v. 7, n. 153, 2006.

BUJAK, J. K. *et al.* Adoptive cell transfer: New perspective treatment in veterinary oncology. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 60, n. 1, p. 1–13, 2018.

BRAY, F. et al. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. **Cancer**, v. 127, n.16, p. 3029-3030, Jun. 2021.

BROWN, J. S. et al. Updating the Definition of Cancer. **Molecular Cancer Research**, v. 21, n. 11, p. 1142–1147, Nov. 2023.

CASEY, S. C. et al. Cancer prevention and therapy through the modulation of the tumor microenvironment. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, 2015.

CAO, Y. et al. Immunotherapy for Triple-Negative Breast Cancer. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 12, Nov. 2003.

CLIFTON, G. T. et al. Clinical Development of the E75 Vaccine in Breast Cancer. **Breast Care**, v. 11, n. 2, p. 116–121, 2016.

CLARK, D. P.; PAZDERNIK, N. J.; MCGEHEE, M. R. Cloning Genes for Synthetic Biology, In: CLARK, D. P.; PAZDERNIK, N. J.; MCGEHEE, M. R. **Molecular Biology**. 3. ed. Academic Cell, Cap.7, p. 199-239, 2019.

- CHU, M. et al. TFDP3 confers chemoresistance in minimal residual disease within childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Oncotarget**, v. 8, n. 1, p. 1405-1415, 2017.
- COLOVOS, C.; YEATES, T. O. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. **Protein Science**, vol. 2, n. 9, p. 1511-9, Set. 1993.
- COMEAU, S. R. et al. ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. **Bioinformatics**, v. 20, n. 1, p. 45-50, 2004.
- DEO, S. V. S.; SHARMA, J.; KUMAR, S. GLOBOCAN 2020 Report on Global Cancer Burden: Challenges and Opportunities for Surgical Oncologists. **Annals of Surgical Oncology**, v. 29, n. 11, p. 6497-6500, Jul. 2022.
- DESAI, R.; COXON, A. T.; DUNN, Gavin P. Therapeutic applications of the cancer immunoediting hypothesis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 78, p. 63–77, 2022.
- DHANDA, S. K.; VIR, P.; RAGHAVA, G. P. Designing of interferon-gamma inducing MHC class-II binders. **Biology Direct**, v. 8, n. 30, Dez. 2013.
- DHATCHINAMOORTHY, K.; COLBERT, J. D.; ROCK, K. L. Cancer Immune Evasion Through Loss of MHC Class I Antigen Presentation. **Frontiers in immunology**, v.12, n. 636568, 2021.
- DIEFENBACH, C. S. M. et al. Safety and immunogenicity study of NY-ESO-1b peptide and montanide ISA-51 vaccination of patients with epithelial ovarian cancer in high-risk first remission. **Clinical Cancer research**, v. 14, n. 9, p. 2740-8, 2008.
- DIMITROV, I. et al. AllerTOP v.2 – a server for in silico prediction of allergens. **J. Mol. Model.**, v. 20, n. 2278, Maio 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00894-014-2278-5>. Acesso em: 01 de fevereiro de 2022.
- DING, L. et al. TFDP3 regulates the apoptosis and autophagy in breast cancer cell line MDA-MB-231. **PLoS One**, v. 13, n. 9, Set. 2018.
- DOYTCHINOVA, I.; FLOWER, D. R. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. **BMC Bioinformatics**, v. 8, n. 4, Jan. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-4>. Acesso em: 01 de fevereiro de 2022.

DUAN, T. et al. Toll-Like Receptor Signaling and Its Role in Cell-Mediated Immunity.

Frontiers in Immunology, v. 13, n. 812774, 2022. Disponível em:

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.812774> Acesso em: 02 de abril de 2024.

DUNN, G. P. *et al.* Cancer Immunoediting: From Surveillance to Escape. **Cancer**

Immunotherapy: Immune Suppression and Tumor Growth: Second Edition, v. 3, n. 11, p. 85–99, 2013.

EISENBERG, D.; LÜTHY, R.; BOWIE, J. U. VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Methods in Enzymology**, v. 277, p. 396-404, 1997.

ESCRIBESE, M. M; BARBER, D. New insight into cancer immunotherapy. **Allergologia et Immunopathologia**, v. 45, p. 50-55, 2017.

FARRAN, B. *et al.* Folate-targeted immunotherapies: Passive and active strategies for cancer.

Cytokine and Growth Factor Reviews, v. 45, p. 45–52, 2019

GARCIA-LORA, A.; ALGARRA, I.; GARRIDO, F. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. **Journal of Cellular Physiology**, v. 195, n. 3, p. 346-55, 2003.

GARRIDO, F.; APTSIAURI, N. Cancer immune escape: MHC expression in primary tumours versus metastases. **Immunology**, v. 158, n. 4, p. 255-266, Out. 2019.

GASTEIGER, E. et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In **The Proteomics Protocols Handbook**, 1st ed.; Walker, J.M., Ed.; Humana: Totowa, NJ, USA, p. 571-607, 2005.

GOODSWEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. A guide to current methodology and usage of reverse vaccinology towards in silico vaccine discovery. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 47, n. 2, Mar. 2023.

GORDEEVA, O. Cancer-testis antigens: Unique cancer stem cell biomarkers and targets for cancer therapy. **Seminars in Cancer Biology**, v. 53, p. 75-89, Dez. 2018.

GROTE, A. et al. JCat: a novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 2, p. W526–W531, Jul. 2005.

GUPTA, S. et al. In Silico Approach for Predicting Toxicity of Peptides and Proteins. **PLOS ONE**, v. 8, n. 9, Set. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073957>.

Acesso em: 01 de fevereiro de 2022.

HAABETH, O. A. W. et al. How do CD4⁺ T cells detect and eliminate tumor cells that either lack or express MHC class II molecules? **Frontiers in Immunology**, v.5, n. 174, p. 1-13, Abr. 2014.

HABANJAR, O. et al. Crosstalk of Inflammatory Cytokines within the Breast Tumor Microenvironment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 4002., 2023.

HEINSON, A. I.; WOELK, C. H.; NEWELL, M. L. **The promise of reverse vaccinology. International Health**, v. 7, n. 2, p. 85–89, Mar. 2015.

HERRERA, L. R. M. In Silico Approach in Designing a Novel Multi-Epitope Vaccine Candidate against Non-Small Cell Lung Cancer with Overexpressed G Protein-Coupled Receptor 56. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 21, p. 2297-2306, 2020.

HESS, B. et al. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 18, n. 12, p. 1463–1472, 1997.

HILL, A. et al. Vaccine Delivery and Immune Response Basics. **Methods in Molecular Biology**, v. 2183, p. 1-8, 2021.

HUANG, J. et al. TFDP3 as E2F Unique Partner, Has Crucial Roles in Cancer Cells and Testis. **Frontiers in Oncology**, v. 11, 2021.

HU, Y. et al. Long-term outcomes of helper peptide vaccination for metastatic melanoma. **Annals of Surgery**, v. 262, n. 3, p. 456-64, 2015.

INCA. **Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil**, Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA, 2022.

ISAKOFF, S. J. et al. Abstract P2-14-17: A phase 1b study of PVX-410 vaccine in combination with pembrolizumab in metastatic triple negative breast cancer (mTNBC). **Cancer Research**, v. 82, n. 4, 2022.

ISHIDO, T.; ISHIKAWA, M.; HIRANO, K. Analysis of supercoiled DNA by agarose gel electrophoresis using low-conducting sodium threonine medium. **Analytical Biochemistry**, v. 400, n.1, p. 148-50, 2010.

IZUMOTO, S. Peptide Vaccine. **Glioma. Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 746. Springer, New York, NY, 2012.

JAHANGIRIAN, E. et al. Novel Multiepitope Vaccine Against Bladder Cancer Based on CTL and HTL Epitopes for Induction of Strong Immune Using Immunoinformatics Approaches. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 28, n. 71, 2022.

JONES, D. T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. **Journal of Molecular Biology**, v. 292, n. 2, p. 195–202, 1999.

JOHNSON, M. et al. NCBI BLAST: a better web interface. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 2, p. W5–W9, Jul. 2008.

JORGENSEN, W. L. et al. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water, **The Journal of Chemical Physics**, v. 79, p. 926–935, Jul. 1983.

JORGOVANOVIC, D. et al. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review. **Biomarker Research**, v. 8, n. 49, Set. 2020.

KESHAVARZ-FATHI, M.; REZAEI, N. **Cancer Immunology**. [S.l.]: Nima Rezaei and Mahsa Keshavarz-Fathi, 2018.

KESMIR, C. Prediction of proteasome cleavage motifs by neural networks. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 15, n. 4, p. 287-296, Abr. 2002.

KIRNER, A.; MAYER-MOKLER, A.; REINHARDT, C. IMA901: A multi-peptide cancer vaccine for treatment of renal cell cancer. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, [S. l.], v. 10, n. 11, p. 3179–3189, 2014. DOI: 10.4161/21645515.2014.98385

KRINGELUM, J. V. et al. Reliable B cell epitope predictions: impacts of method development and improved benchmarking. **PLoS Computational Biology**, v. 8, n.12, 2012.

KRISHNAMOORTHY, H. R.; RAMANATHAN K. Design and In Silico Validation of a Novel MZF-1-Based Multi-Epitope Vaccine to Combat Metastatic Triple Negative Breast Cancer. **Vaccines**, v. 11, n. 3, Mar. 2023.

KUMAR, S. et al. A candidate triple-negative breast cancer vaccine design by targeting clinically relevant cell surface markers: an integrated immuno and bio-informatics approach.

3 Biotech, v. 12, n. 3, 2022.

KRISHNAMOORTHY, H. R.; KARUPPASAMY, R. Design and In Silico Validation of a Novel MZF-1-Based Multi-Epitope Vaccine to Combat Metastatic Triple Negative Breast Cancer. **Vaccines**, v. 11, n. 3, Mar. 2023.

LAM, R. A. et al. Cancer-testis antigens in triple-negative breast cancer: Role and potential utility in clinical practice. **Cancers**, v. 13, n. 15, p. 1-22, 2021.

LASEK, W. Cancer immunoediting hypothesis: history, clinical implications and controversies. **Central-European Journal of Immunology**, v. 47, n. 2, p. 168–174, 2022.

LASKOWSKI, R. A. PDBsum new things. **Nucleic Acids Research**, n. 37, p. D355–D359, 2009.

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; THORNTON, J. M. PROCHECK: validation of protein-structure coordinates. **International Tables for Crystallography**, p. 684–687, 2012.

LEE, S. J. et al. A Potential Protein Adjuvant Derived from Mycobacterium tuberculosis Rv0652 Enhances Dendritic Cells-Based Tumor Immunotherapy. **PLOS ONE**, v. 9, n.8, 2014.

LEE, G. R.; HEO, L.; SEOK, C. Effective protein model structure refinement by loop modeling and overall relaxation. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 84, n. S1, p. 293-301, Jul. 2015.

LIU, J. Cancer vaccines as promising immuno-therapeutics: platforms and current progress. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 15, n. 1, p. 1-26, 2022.

LIVINGSTON, B. et al. A Rational Strategy to Design Multiepitope Immunogens Based on Multiple Th Lymphocyte Epitopes. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 11, p. 5499–5506, Jun. 2002.

MA, Y. et al. TFDP3 was expressed in coordination with E2F1 to inhibit E2F1-mediated apoptosis in prostate cancer. **Gene**, v. 537, n. 2, p. 253-259, 2014.

- MAHDEVAR, E. et al. Exploring the cancer-testis antigen BORIS to design a novel multi-epitope vaccine against breast cancer based on immunoinformatics approaches. **Journal of Biomolecular Structure & Dynamics**, v. 40, n. 14, p. 6363-6380, 2022.
- MAGNAN, C. N.; RANDALL, A.; BALDI, P. SOLpro: Accurate sequence-based prediction of protein solubility. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 25, n. 17, p. 2200–2207, 2009.
- MAMOOR, Shahan. Differential expression of transcription factor Dp family member 3 in triple negative breast cancer. 2021.
- MATTIUZZI, C.; LIPPI, G. Current Cancer Epidemiology. **Journal of Epidemiology and Global Health**, v. 9, n. 4, p. 217-222, 2019.
- MCCALL, K.D., MUCCIOLI, M., BENENCIA, F. Toll-Like Receptors Signaling in the Tumor Microenvironment. **Tumor Microenvironment. Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1223. ed. Springer, Cham., 2020.
- MENG, X. et al. A novel era of cancer/testis antigen in cancer immunotherapy. **International Immunopharmacology**, v. 98, Set. 2021.
- MERLO, L. et al. Cancer as an evolutionary and ecological process. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, p. 924–935, Nov, 2006.
- MONTEERRUBIO-LÓPEZ, G. P.; DELGADILLO-GUTIÉRREZ, K. Reverse vaccinology: strategy against emerging pathogens. **Revista Medica del Instituto Mexicano del Seguro Social**, v. 59, n. 3, p. 233-241, Ago. 2021.
- MURESAN, X. M. et al. (2020). Toll-Like Receptor 3 in Solid Cancer and Therapy Resistance. **Cancers**, v. 12, n. 11, Nov. 2020.
- NELDE, A.; RAMMENSEE, H.; WALZ, J. S. The Peptide Vaccine of the Future. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 20, p. 100022, 2021.
- NEZAFAT, N. et al. A novel multi-epitope peptide vaccine against cancer: an in silico approach. **Journal of Theoretical Biology**, n. 349, p. 121-134, Jan. 2014.
- NIN, D. S.; DENG, L. W. (2023). Biology of Cancer-Testis Antigens and Their Therapeutic Implications in Cancer. **Cells**, v. 12, n. 6, 2023.

NOWELL, P. C. The clonal Evolution of Tumor Cell Populations. **Science**, v. 194, n. 4260, Out. 1976.

OMS – Organização Mundial da Saúde. **Temas de saúde: câncer**. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1. Acesso em: 23 de janeiro de 2024.

O'SHEA, A. E.; CLIFTON, G. T.; PEOPLES, G. E. Results from a randomized trial combining trastuzumab with a peptide vaccine suggest a role for HER2-targeted therapy in triple-negative breast cancer. **Oncotarget**, v. 12, n. 23, p. 2318–2319, 2021.

PAHLAVANNESHAN, S. et al. Toll-Like Receptor-Based Strategies for Cancer Immunotherapy. **Journal of Immunology Research**, v. 2021, n. 9912188, 2021.

PALGEN, J. L. et al. Optimize Prime/Boost Vaccine Strategies: Trained Immunity as a New Player in the Game. *Frontiers in immunology*, v. 12, Mar. 2021.

PARVIZPOUR, S. *et al.* Epitope-based vaccine design: a comprehensive overview of bioinformatics approaches.pdf. **Drug Discovery Today**, v. 25, n. 6, p. 1034–1042, 2020

PARRINELLO, M.; RAHMAN, A. (1981). Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. **Journal Applied Physics**, v. 52, n. 12, Dez. 1981.

PATRA, P. et al. Identification and Design of a Next-Generation Multi Epitopes Bases Peptide Vaccine Candidate Against Prostate Cancer: An In Silico Approach. **Cell Biochemistry and Biophysics**, n. 78, p. 495-509, 2020.

PEARLMAN, D. A. et al. AMBER, um pacote de programas de computador para aplicação de mecânica molecular, análise de modo normal, dinâmica molecular e cálculos de energia livre para simular as propriedades estruturais e energéticas das moléculas. **Computer Physics Communications**, v. 91, p. 1–41, Set. 1995.

PITT, J M et al. Targeting the tumor microenvironment: removing obstruction to anticancer immune responses and immunotherapy. **Annals of Oncology**, v. 27, n. 8, p. 1482-92, Ago. 2016.

PONOMARENKO, J. et al. ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 514, 2008.

PRAWININGRUM, A. F.; PARAMITA, R. I.; PANIGORO, S. S. Immunoinformatics Approach for Epitope-Based Vaccine Design: Key Steps for Breast Cancer Vaccine. **Diagnostics (Basel)**, v. 12, n. 12, Nov. 2022.

RAHMANI, A. et al. Development of a conserved chimeric vaccine based on helper T-cell and CTL epitopes for induction of strong immune response against *Schistosoma mansoni* using immunoinformatics approaches. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 141, p. 125-136, 2019.

RAO, S.; GHARIB, K.; HAN, A. **Cancer Immunosurveillance by T Cells**. [S.l.]: Elsevier Ltd, v. 342, 2019.

RAOUI, E. et al. Epitope Prediction by Novel Immunoinformatics Approach: A State-of-the-art Review. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 26, n. 2, p. 1155–1163, Ago. 2020.

RAPIN, N. et al. 2010 Computational Immunology Meets Bioinformatics: The Use of Prediction Tools for Molecular Binding in the Simulation of the Immune System. **PLoS ONE**, v. 5, n. 4, Abr. 2010.

REYNISSON, B. et al. NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data. **Nucleic Acids Res.**, v. 4, n. W1, p. W449-W454, Jul. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa379>. Acesso em: 01 de julho de 2022.

ROCK, K. L.; REITS, E.; NEEFJES, J. Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules. **Trends in Immunology**, v. 37, n. 11, p. 724-734, Nov. 2016.

SAHA, S.; BHASIN, M.; RAGHAVA, G. P. Bcipep: a database of B-cell epitopes. **BMC Genomics**, v. 6, n. 1, 2005.

SAHA, S.; RAGHAVA, G. P. S. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 65, n. 1, p. 40-48, Ago. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/prot.21078>. Acesso em: 01 de julho de 2022.

SALAVATY, A. et al., Clonal selection parallels between normal and cancer tissues. **Trends in Genetics**, v.39, n. 5, p. 358-380, Maio 2023.

- SALMANINEJAD, A. et al. Cancer/Testis Antigens: Expression, Regulation, Tumor Invasion, and Use in Immunotherapy of Cancers. **Immunological Investigations**, v. 45, n. 7, p. 619-40, Out. 2016.
- SAFAVI, A. et al. In silico analysis of transmembrane protein 31 (TMEM31) antigen to design novel multiepitope peptide and DNA cancer vaccines against melanoma. **Molecular Immunology**, v. 112, p. 93-102, 2019.
- SCANLAN, M. J et al. Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. **Immunological Reviews**, v. 188, p. 22-32, 2002.
- SCHRÖDINGER, L.; DELANO, W. (2020). PyMOL. Disponível em: <http://www.pymol.org/pymol>. Acesso em: 14 de setembro de 2023.
- SnapGene Software**. Disponível em: <https://www.snapgene.com/>. Acesso em: 27 de novembro de 2023.
- SHARMA, P. et al. Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. **Cell**, v. 9, n. 168, p. 707-723, Fev. 2017.
- SHLYAKHTINA; Y., MORAN, K. L.; PORTAL, M. M. Genetic and Non-Genetic Mechanisms Underlying Cancer Evolution. **Cancers**, v. 13, n. 6, Mar. 2021.
- SONPAVDE, G. et al. HLA-restricted NY-ESO-1 peptide immunotherapy for metastatic castration resistant prostate cancer. **Investigational New Drugs**, v. 32, n. 2, p. 235-242, 2014.
- STEENTOFT, C. et al. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. **The EMBO Journal**, v. 32, n. 10, Abr. 2013.
- SUFYAN, M. et al. Implementation of Vaccinomics and In-Silico Approaches to Construct Multimeric Based Vaccine Against Ovarian Cancer. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 27, n. 4, p. 2845-2859, 2021.
- TANG, Sha *et al.* Mechanisms of immune escape in the cancer immune cycle. **International Immunopharmacology**, v. 86, 2020.
- TENG, M. W. L.; KERSHAW, M. H.; SMYTH, M. J. **Cancer Immunoediting: From Surveillance to Escape**. Second Edition ed. [S.l.]: Elsevier, 2013.

- TOMAR, N.; RAJAT, K. Immunoinformatics: an integrated scenario. **Immunology**, v. 131, n. 2, p. 153–68, jun. 2010.
- TOH, U. et al. Early phase II study of mixed 19-peptide vaccine monotherapy for refractory triple-negative breast cancer. **Cancer Science**, v. 111, n. 8, p. 2760–2769, 2020.
- TSENG, D. *et al.* Cancer Immunology. **Abeloff's Clinical Oncology**, p. 84-96, 2019.
- VIEIRA, I. H. P. et al. Dinâmica visual: uma aplicação WEB para simulação de dinâmica molecular usando GROMACS. **BMC Bioinformatics**, v. 24, n.107, Mar. 2023.
- WANG, X. et al. Development and validation of epithelial mesenchymal transition-related prognostic model for hepatocellular carcinoma. **Aging**, v. 13, n. 10, p. 13822-13845, Abr. 2021.
- WIECZOREK, M. et al. Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. **Frontiers in Immunology**, v.8, n. 292, Mar. 2017.
- WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. W407-10, Jul. 2007.
- WILSON, B.; GEETHA, K. M. (2022). Lipid nanoparticles in the development of mRNA vaccines for COVID-19. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 74, n. 103553, 2022.
- WU, X. et al. Targeting MHC-I molecules for cancer: function, mechanism, and therapeutic prospects. **Molecular Cancer**, v. 22, n. 194, 2023.
- YIN, K. et al. TFDP3 Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer. **PloS one**, v. 12, n. 1, Jan. 2017.
- ZARLING, A. L. et al. Phosphorylated peptides are naturally processed and presented by major histocompatibility complex class I molecules in vivo. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 12, p. 1755–1762, 2000.
- ZHANG, L. et al. Peptide-based materials for cancer immunotherapy. **Theranostics**, v. 9, n. 25, p. 7807–7825, 2019.

- ZHOU, F. Molecular mechanisms of IFN-gamma to up-regulate MHC class I antigen processing and presentation. **International Reviews of Immunology**, v. 28, p. 239-60, 2009.
- URBAN-WOJCIUK, Z. et al. The Role of TLRs in Anti-cancer Immunity and Tumor Rejection. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. 2388, Out. 2019.
- VASAN, N.; BASELGA, J.; HYMAN, D. M. A view on drug resistance in cancer. **Nature**, v. 575, p. 299–309, Nov. 2019.
- VAZQUEZ, E.; CORCHERO, J.L.; VILLAYERDE, A. Post-production protein stability: trouble beyond the cell factory. **Microbial Cell Factories**, v. 10, n. 60, Agosto 2011.
- WU, T.; XIAO, Y.; YU, D. Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer. **Pharmacology & therapeutics**, v. 221, Maio 2021.
- WANG, X. et al. Development and validation of epithelial mesenchymal transition-related prognostic model for hepatocellular carcinoma. **Aging**, v. 13, n. 10, p. 13822-13845, Abr. 2021.
- World Health Organization (WHO). **GLOBOCAN v. 2022. Cancer Incidence and Mortality Worldwide**. Disponível em: <https://gco.iarc.who.int/en>. Acesso em: 01 de fevereiro de 2024.
- WU, T.; DAI, Y. Tumor microenvironment and therapeutic response. **Cancer Letters**, v. 387, p. 61-68, 2017.

APÊNDICE A – PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS DOS LINFÓCITOS B

Tabela 01 – Predição de antigenicidade dos epítomos lineares dos linfócitos B identificados a partir da sequência de aminoácidos de TFDP3 (Id. Uniprot: Q5H9I0) pelo servidor ABCPred.

Nº epítopo	Rank	Sequência	Posição inicial	Score
01	1	QVVIGMPQRPAASNIP	56	0.95
02	2	EQVSRPLPNSVIHVP	240	0.93
03	3	TPAVEEEEEEDNNDDD	382	0.92
04	3	TSSGGSQYSGSRVETP	368	0.92
05	4	VGSPNPPSTHFASQNQ	73	0.91
06	5	YVTEMAQGTGGVFTT	328	0.90
07	6	RVERQKRLERIKQKQS	201	0.88
08	7	CSISDDKSEYLFKFNS	269	0.87
09	8	SSPPWAGQHNRRKGEKN	92	0.86
10	8	DVKNIKRRTYDALNVL	156	0.86
11	9	EVLWMGMFTFGLESGS	293	0.84
12	10	SGSCSAEDLKMARNLV	306	0.83
13	11	AGSRNGTWLSASDLT	344	0.82
14	11	PKALEPYVTEMAQGTG	322	0.82
15	12	FGGVFTTAGSRNGTW	337	0.81
16	12	RRTYDALNVLMAMNII	162	0.81
17	13	KWIGLTTNSAQNCQNL	185	0.80

Fonte: elaborado pela autora (2023).

Tabela 01 (cont.) – Predição de antigenicidade dos epítópos lineares dos linfócitos B identificados a partir da sequência de aminoácidos de TFDp3
(Id. Uniprot: Q5H9I0) pelo servidor ABCPred.

Nº epítopo	Rank	Sequência	Posição inicial	Score
18	14	LGKQLLPKTFGQSSVN	37	0.79
19	14	LMDENQTSRPVAVHTS	17	0.79
20	14	LSMKVWETVQRKGTTT	114	0.79
21	15	HNKGEKNGMGLCRLS	100	0.78
22	16	EDLKMARNLVPKALEP	312	0.77
23	16	MAMNIISREKKKKIKWI	172	0.77
24	17	EANEELKVLMDENQTS	9	0.76
25	18	PQRPAAASNIPVVGSPN	62	0.73
26	18	PFIISSSKKTVINCS	255	0.73
27	18	TNSAQNCQNLRVERQK	191	0.73
28	18	NGMGLCRLSMKVWETV	107	0.73
29	19	PNESAYDVKNIKRRTY	150	0.71
30	19	FRAASNHASPNESAYD	141	0.71
31	19	CQEVVGELVAKFRAAS	130	0.71
32	20	PSTHFASQNQHSYSSP	79	0.70
33	20	SFEIHDDTEVLMWIMG	285	0.70
34	20	PVAVHTSTVNPLGKQL	26	0.70
35	20	LILQQIAFKNLVLRNQ	221	0.70
36	21	EEEEENNDDDLSENDE	388	0.68
37	21	TWLSASDLTNIAIGML	351	0.68
38	22	IAIGMLATSSGGSQYS	361	0.67

Fonte: elaborado pela autora (2023).

Tabela 01 (cont.) – Predição de antigenicidade dos epítomos lineares dos linfócitos B identificados a partir da sequência de aminoácidos de TFDP3 (Id. Uniprot: Q5H9I0) pelo servidor ABCPred.

Nº epítopo	Rank	Sequência	Posição inicial	Score
39	23	QRKGTTSQEVVGELV	123	0.66
40	24	KTFGQSSVNIDQQVVI	44	0.60

Fonte: elaborado pela autora (2023).

Tabela 02 – Predição de antigenicidade dos epítos lineares dos linfócitos B identificados a partir do servidor ABCPred pelo servidor VaxiJen v2.0 da sequência de aminoácidos de TFDP3 (Id. Uniprot: Q5H9I0).

Nº epítipo	Ra nk	Sequência	Posição inicial	Antigenicidade
01	1	QVVIGMPQRPAAASNIP	56	0.1440 (provável não antigênico)
02	2	EQVSRPLPNSVIHVP	240	0.2557 (provável não antigênico)
03	3	TPAVEEEEEEDNDDDD	382	-0.3379 (provável não antigênico)
04	3	TSSGGSQYSGSRVETP	368	1.0805 (Provável antigênico)
05	4	VGSPNPPSTHFASQNQ	73	0.3871 (provável não antigênico)
06	5	YVTEMAQGTFGGVFTT	328	0.2100 (provável não antigênico)
07	6	RVERQKRLERIKQKQS	201	1.6392 (Provável antigênico)
08	7	CSISDDKSEYLFKFNS	269	0.7976 (Provável antigênico)
09	8	SSPPWAGQHNRKGEKN	92	0.7683 (Provável antigênico)
10	8	DVKNIKRRTYDALNVL	156	1.0012(Provável antigênico)
11	9	EVLMWMGMTFGLES GS	293	0.3762 (Provável não antigênico)
12	10	SGSCSAEDLKMARNLV	306	0.7467 (Provável antigênico)
13	11	AGSRNSGTWLSASDLT	344	0.5759 (Provável antigênico)
14	11	PKALEPYVTEMAQGT F	322	0.5497 (Provável antigênico)
15	12	FGGVFTTAGSRNSGTW	337	0.4762 (Provável não antigênico)
16	12	RRTYDALNVLMAMNII	162	0.3039 (Provável não antigênico)

Fonte: elaborado pela autora (2023).

Tabela 02 (cont.) – Predição de antigenicidade dos epítomos lineares dos linfócitos B identificados a partir do servidor ABCPred pelo servidor VaxiJen v2.0 da sequência de aminoácidos de TFDp3 (1d. Uniprot: Q5H9I0).

Nº epítopo	Ra nk	Sequência	Posição inicial	Antigenicidade
17	13	KWIGLTTNSAQNCQNL	185	0.9308 (Provável antigénico)
18	14	LGKQLLPKTFGQSSVN	37	-0.2896 (Provável não antigénico)
19	14	LMDENQTSRPVAVHTS	17	0.5233 (Provável antigénico)
20	14	LSMKVWETVQRKGTTS	114	0.7633 (Provável antigénico)
21	15	HNKGEKNGMGLCRLS	100	0.6524 (Provável antigénico)
22	16	EDLKMARNLVPKALEP	312	0.5484 (Provável antigénico)
23	16	MAMNIISREKKKIKWI	172	0.3109 (Provável não antigénico)
24	17	EANEELKVLMDENQTS	9	0.8283 (Provável antigénico)
25	18	PQPAASNIPVVGSPN	62	0.8037 (Provável antigénico)
26	18	PFIISSSKKTVINCS	255	0.9013 (Provável antigénico)
27	18	TNSAQNCQLRVERQK	191	0.9420 (Provável antigénico)
28	18	NGMGLCRLSMKVWETV	107	0.0887 (Provável não antigénico)
29	19	PNESAYDVKNIKRRTY	150	0.6101 (Provável antigénico)
30	19	FRAASNHASPNESAYD	141	0.5059 (Provável antigénico)
31	19	CQEVVGELVAKFRAAS	130	0.2476 (Provável não antigénico)
32	20	PSTHFASQNHQHSYSSP	79	0.0757 (Provável não antigénico)
33	20	SFEIHDDTEVLMWMGM	285	0.5467 (Provável antigénico)
34	20	PVAVHTSTVNPLGKQL	26	0.3596 (Provável não antigénico)
35	20	LILQQIAFKNLVLRNQ	221	0.0429 (Provável não antigénico)
36	21	EEEEEDNDDDLSENDE	388	-0.5297 (Provável não antigénico)

Fonte: elaborado pela autora (2023).

Tabela 02 (cont.) – Predição de antigenicidade dos epítomos lineares dos linfócitos B identificados a partir do servidor ABCPred pelo servidor VaxiJen v2.0 da sequência de aminoácidos de TFDp3 (Id. Uniprot: Q5H9I0).

Nº epítopo	Ra nk	Sequência	Posição inicial	Antigenicidade
37	21	TWLSASDLTNIAIGML	351	-0.1230 (Provável não antigénico)
38	22	IAIGMLATSSGGSQYS	361	0.3029 (Provável não antigénico)
39	23	QRKGTTSQCQEVVGELV	123	0.4868 (Provável não antigénico)
40	24	KTFGQSSVNIDQQVVI	44	0.0683 (Provável não antigénico)

Fonte: elaborado pela autora (2023).

Tabela 03 – Predição da alergenidade dos epítomos lineares dos linfócitos B identificados a partir do servidor Vaxijen pelo servidor AllerTop v2.0 da sequência de aminoácidos de TFDP3 (Id. Uniprot: Q5H9I0).

Nº epítopo	Ra nk	Sequência	Posição inicial	Predição
04	3	TSSGGSQYSGSRVETP	368	Provável não alergênico
07	6	RVERQKRLERIKQKQS	201	Provável não alergênico
08	7	CSISDDKSEYLFKFNS	269	Provável não alergênico
09	8	SSPPWAGQHNRKGEKN	92	Provável não alergênico
10	8	DVKNIKRRTYDALNVL	156	Provável não alergênico
12	10	SGSCSAEDLKMARNLV	306	Provável não alergênico
13	11	AGRSNGTWLSASDLT	344	Provável alergênico
14	11	PKALEPYVTEMAQGTf	322	Provável não alergênico
17	13	KWIGLTTNSAQNCQNL	185	Provável alergênico
19	14	LMDENQTSRPVAVHTS	17	Provável não alergênico
20	14	LSMKVWETVQRKGTTs	114	Provável não alergênico
21	15	HNrkGEKNGMGLCRL	100	Provável alergênico
22	16	EDLKMARNLVPKALEP	312	Provável não alergênico
24	17	EANEELKVLMDENQTS	9	Provável alergênico
25	18	PQRPAASNIPVVGSPN	62	Provável não alergênico
26	18	PFIHSSSKKTVINCS	255	Provável alergênico
27	18	TNSAQNCQNLrVERQK	191	Provável não alergênico
29	19	PNESAYDVKNIKRRTY	150	Provável não alergênico
30	19	FRAASNHASPNESAYD	141	Provável não alergênico
33	20	SFEIHDDTEVLMWMG	285	Provável alergênico

Fonte: elaborado pela autora (2023).

Tabela 04 – Predição da toxicidade dos epítomos lineares dos linfócitos B identificados a partir do servidor AllerTop v2.0 pelo servidor ToxinPred da sequência de aminoácidos de TFDP3 (Id. Uniprot: Q5H9I0).

Nº epítopo	Ra nk	Sequência	Posição inicial	Predição
04	3	TSSGGSQYSGSRVETP	368	Provável não tóxico
07	6	RVERQKRLERIKQKQS	201	Provável não tóxico
08	7	CSISDDKSEYLFKFNS	269	Provável não tóxico
09	8	SSPPWAGQHNRKGEKN	92	Provável não tóxico
10	8	DVKNIKRRRTYDALNVL	156	Provável não tóxico
12	10	SGSCSAEDLKMARNLV	306	Provável não tóxico
14	11	PKALEPYVTEMAQGTf	322	Provável não tóxico
19	14	LMDENQTSRPVAVHTS	17	Provável não tóxico
20	14	LSMKVWETVQRKGTTs	114	Provável não tóxico
22	16	EDLKMARNLVPKALEP	312	Provável não tóxico
25	18	QRPAAASNIPVVGSPN	62	Provável não tóxico
27	18	TNSAQNCQNLRVERQK	191	Provável não tóxico
29	19	PNESAYDVKNIKRRTY	150	Provável não tóxico
30	19	FRAASNHASPNESAYD	141	Provável não tóxico

Fonte: elaborado pela autora (2023).

APÊNDICE B – PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS DOS LINFÓCITOS T

Tabela 01 – Epítomos de MHC de classe I preditos pelo método NetMHC I pan EL version 4.1b do servidor DTU Health Tech, antigenicidade pelo servidor Vaxijen v2.0, alergenicidade pelo Vaxijen, AllerTOP v. 2.0 e toxicidade pelo ToxinPred da sequência de aminoácidos de TFDp3 (Id. Uniprot: Q5H9I0).

Nº epítopo	Sequência	Posição	Alelos	Score_EL	%Rank_EL	Vaxijen Score	AllerTOP	ToxinPred
01	SLTEANEEL	06-14	HLA-A*02:01	0.8332	0.091	1.1362	alergênico	não tóxico
02	NQTSRPVAV	21-29	HLA-B*08:01 HLA-B*39:01	0.3514 0.4856	0.409 0.235	0.7491	alergênico	não tóxico
03	RPVAVHTST	25-33	HLA-B*07:02	0.6647	0.247	0.6800	alergênico	não tóxico
04	KVWETVQRK	117-125	HLA-A*03:01 HLA-A*11:01 HLA-A*30:01 HLA-A*31:01	0.9684 0.9484 0.7264 0.6212	0.009 0.013 0.034 0.271	0.7471	não alergênico	não tóxico
05	ELVAKFRAA	136-144	HLA-B*08:01	0.3110	0.482	0.7327	alergênico	não tóxico
06	SAYDVKNIK	153-161	HLA-A*03:01 HLA-A*11:01 HLA-A*30:01 HLA-A*68:01	0.5224 0.7552 0.5448 0.7907	0.412 0.128 0.127 0.273	0.6891	alergênico	não tóxico
07	TYDALNVLM	164-172	HLA-A*24:02	0.3598	0.454	0.9859	alergênico	não tóxico
08	DALNVLMAM	166-174	HLA-A*26:01 HLA-B*35:01	0.2776 0.6781	0.391 0.216	0.8599	não alergênico	não tóxico
09	KRLRIKQK	206-214	HLA-B*27:05	0.8870	0.081	1.5955	não alergênico	não tóxico

Fonte: elaborado pela autora (2023).

Tabela 01 (continuação) – Epítomos de MHC de classe I preditos pelo método NetMHCII pan EL version 4.1b do servidor DTU Health Tech, antigenicidade pelo servidor VaxiJen v2.0, alergenidade pelo Vaxijen , AllerTOP v. 2.0 e toxicidade pelo ToxinPred da sequência de aminoácidos de TFDp3 (Id. Uniprot: Q5H9I0).

Nº epítopo	Sequência	Posição	Alelos	Score_EL	%Rank_EL	Vaxijen Score	AllerTOP	ToxinPred
10	RIKQKQSEL	210-218	HLA-B*07:02 HLA-B*08:01 HLA-A*30:01	0.6583 0.8827 0.4942	0.252 0.022 0.174	1.5326	não alergênico	não tóxico
11	KQSELQQLI	214-222	HLA-A*02:01 HLA-A*02:06	0.5099 0.8048	0.381 0.085	1.2705	alergênico	não tóxico
12	SISDDKSEY	270-278	HLA-A*01:01 HLA-A*26:01 HLA-B*15:01 HLA-B*35:01	0.4878 0.4824 0.6114 0.4737	0.305 0.181 0.303 0.412	0.6114	não alergênico	não tóxico
13	ISDDKSEYL	271-279	HLA-A*01:01	0.5920	0.291	0.9410	não alergênico	não tóxico
14	YLFKFNSSF	278-286	HLA-A*23:01 HLA-B*15:01 HLA-B*35:01	0.3216 0.8997 0.4225	0.463 0.046 0.471	0.5255	alergênico	não tóxico
15	IHDDTEVLM	288-296	HLA-B*39:01	0.8435	0.041	1.1254	alergênico	não tóxico
16	AGRSNGTW	344-352	HLA-B*58:01	0.6239	0.352	0.5672	não alergênico	não tóxico
17	ATSSGGSQY	367-375	HLA-A*01:01 HLA-A*11:01 HLA-A*26:01 HLA-B*15:01	0.9469 0.4950 0.5364 0.7334	0.033 0.384 0.142 0.171	1.3318	não alergênico	não tóxico

Fonte: elaborado pela autora (2023).

Tabela 02 – Epítomos de MHC de classe II preditos pelo método NetMHCIIpan EL version 4.0 do servidor DTU Health Tech, antigenicidade pelo servidor VaxiJen v2.0, alergenicidade pelo Vaxijen , AllerTOP v. 2.0, toxicidade pelo ToxinPred e indução de IFN-gama pelo IFNepitope da sequência de aminoácidos de TFDp3 (Id. Uniprot: Q5H9I0).

Nº epítopo	Sequência	Posição	Alelos (HLA)	Score_EL	%Rank_EL	Vaxijen Score	AllerTOP	ToxinPred	IFNepitope Score
01	EELKVLMDENQTSRP	90-104	DRB1*04:03	0.7720	0.63	0.8142	alergênico	não tóxico	0.2358
			DRB1*04:04	0.8830	0.30				
			DRB1*04:08	0.7095	0.93				
			DRB4*01:01	0.3089	1.07				
			DRB4*01:03	0.3089	1.07				
02	ELKVLMDENQTSRPV	91-105	DRB1*03:01	0.7958	0.59	0.6150	não	não tóxico	0.1279
			DRB1*03:05	0.3441	1.18		alergênico		
			DRB1*04:01	0.8463	0.30				
			DRB1*04:02	0.4481	1.98				
			DRB1*14:02	0.2754	1.40				
			DRB3*01:01	0.3527	1.58				
03	SPPWAGQHNRKGEKN	171-185	DRB1*01:03	0.5155	1.49	0.8473	não	não tóxico	0.0991
			DRB1*04:01	0.6320	1.17		alergênico		
			DRB1*04:02	0.5223	1.40				
			DRB1*04:08	0.6226	1.47				
04	VGELVAKFRAASNHA	212-226	DRB1*11:01	0.7823	1.06	0.6633	não	não tóxico	0.3296
			DRB1*11:04	0.8736	0.49		alergênico		
			DRB1*13:01	0.7578	0.88				

Fonte: elaborado pela autora (2023).

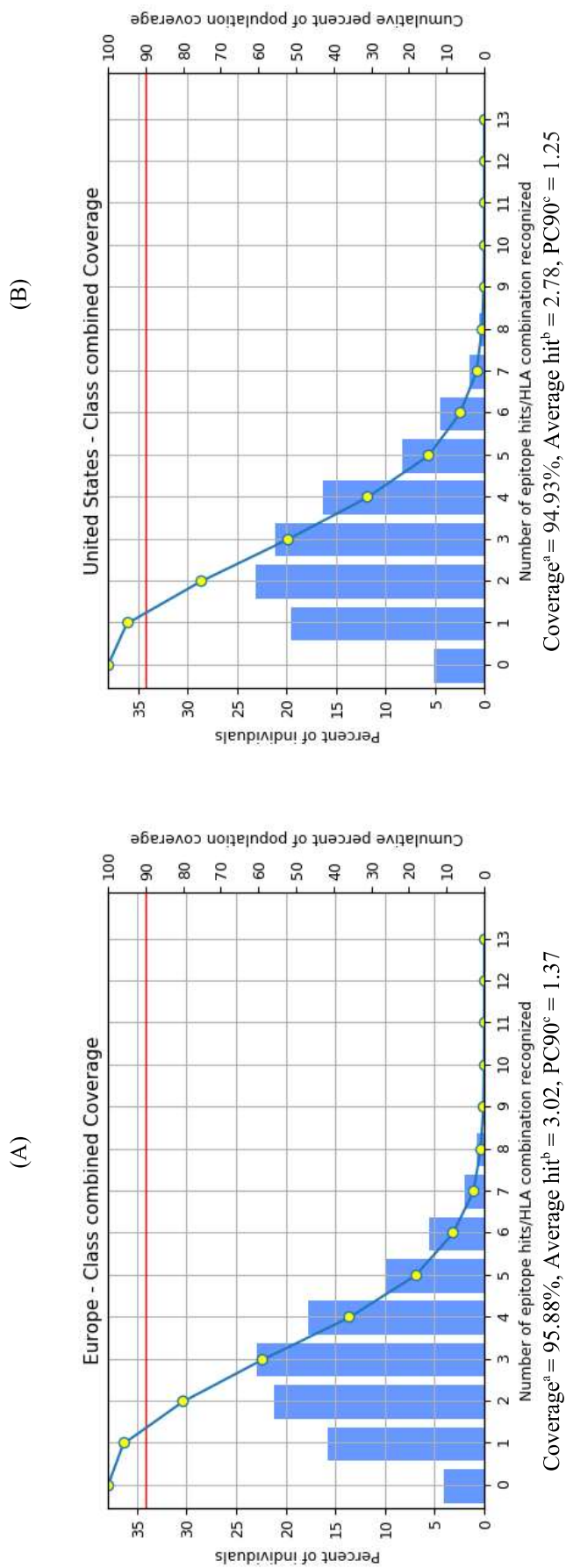
Tabela 02 (continuação)– Epítopos de MHC de classe II preditos pelo método NetMHCIIpan EL version 4.0 do servidor DTU Health Tech, antigenicidade pelo servidor Vaxijen v2.0, alergenicidade pelo Vaxijen , AllerTOP v. 2.0, toxicidade pelo ToxinPred e indução de IFN-gama pelo IFNepitope da sequência de aminoácidos de TFDp3 (Id. Uniprot: Q5H9I0).

Nº epítipo	Sequência	Posição	Alelos	Score_EL	%Rank_EL	Vaxijen Score	AllerTOP	ToxinPred	IFNepitope Score
05	VAKFRAASNHPNE	216-230	DRB1*01:01	0.8185	0.79	0.6149	não alergênico	não tóxico	0.4843
			DRB1*01:02	0.6749	1.63				
			DRB1*01:03	0.8596	0.17				
			DRB1*04:01	0.9648	0.03				
			DRB1*04:02	0.7936	0.26				
			DRB1*04:03	0.8369	0.33				
			DRB1*04:04	0.8137	0.60				
			DRB1*04:05	0.7747	0.58				
			DRB1*04:08	0.9705	0.02				
			DRB1*07:01	0.5955	1.19				
			DRB1*08:01	0.8039	0.60				
			DRB1*08:03	0.6552	0.32				
			DRB1*09:01	0.7627	0.34				
			DRB1*10:01	0.8818	0.19				
			DRB1*11:01	0.8945	0.47				
			DRB1*13:02	0.5445	0.68				
			DRB1*13:03	0.5673	1.79				
			DRB1*14:02	0.4478	0.25				
			DRB3*16:01	0.9201	0.09				
			DRB3*02:02	0.6220	0.38				
			DRB5*01:01	0.8515	0.19				
06	KWIGLTTNSAQNCQN	263-277	DRB3*02:02	0.4246	0.85	0.8402	alergênico	tóxico	0.0223

Fonte: elaborado pela autora (2023).

APÊNDICE C – COBERTURA POPULACIONAL DE MHC DE CLASSE I E CLASSE II

Figura 01– Frequência da cobertura populacional dos epítomos para MHC de classe I e classe II na Europa (A), Estados Unidos (B), China (C), Japão (D) e América do Sul (E). No gráfico, a linha (–o–) representa a percentagem acumulada da população cobertura de informação dos epítomos; as barras representam a cobertura populacional para cada epítomo.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Figura 01 (cont.) – Frequência da cobertura populacional dos epítomos para MHC de classe II na Europa (A), Estados Unidos (B), China (C), Japão (D) e América do Sul (E). No gráfico, a linha (–o–) representa a percentagem acumulada da população cobertura de informação dos epítomos; as barras representam a cobertura populacional para cada epítomo.

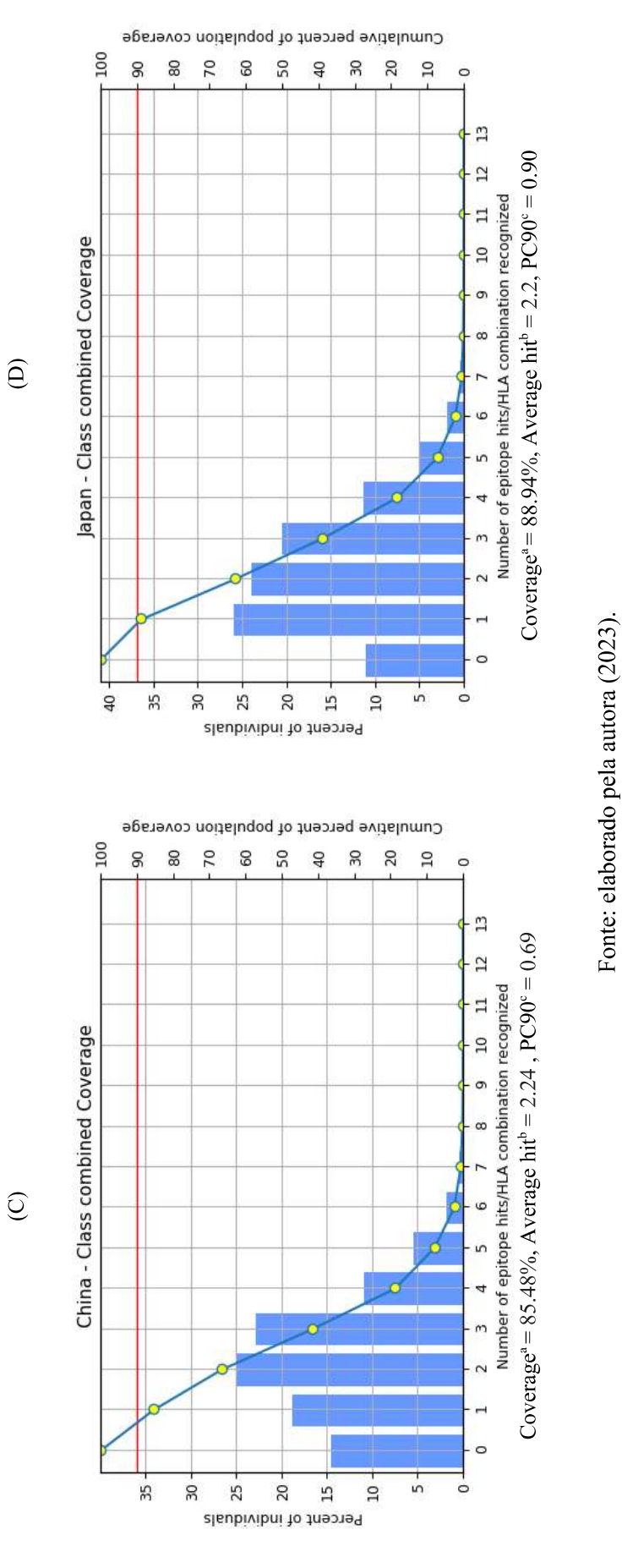
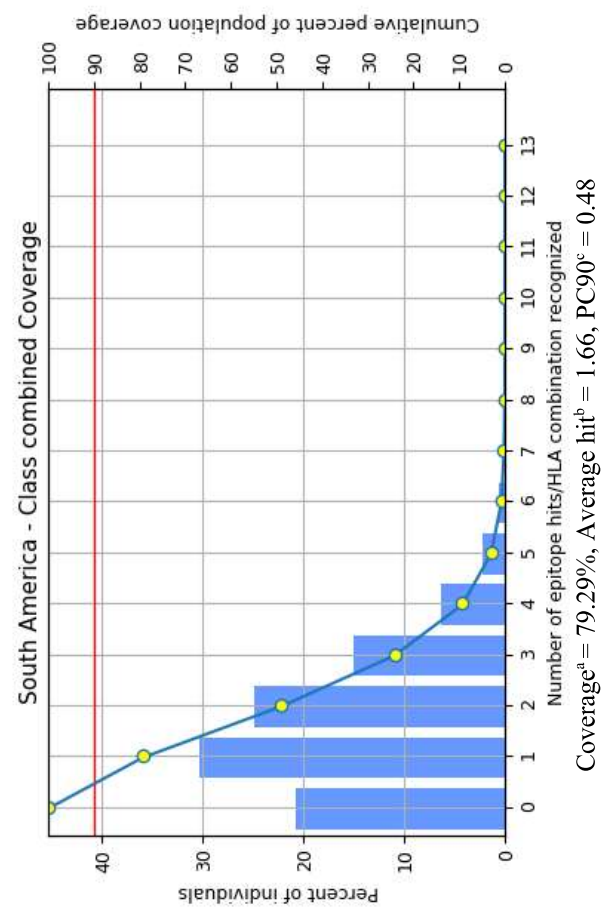
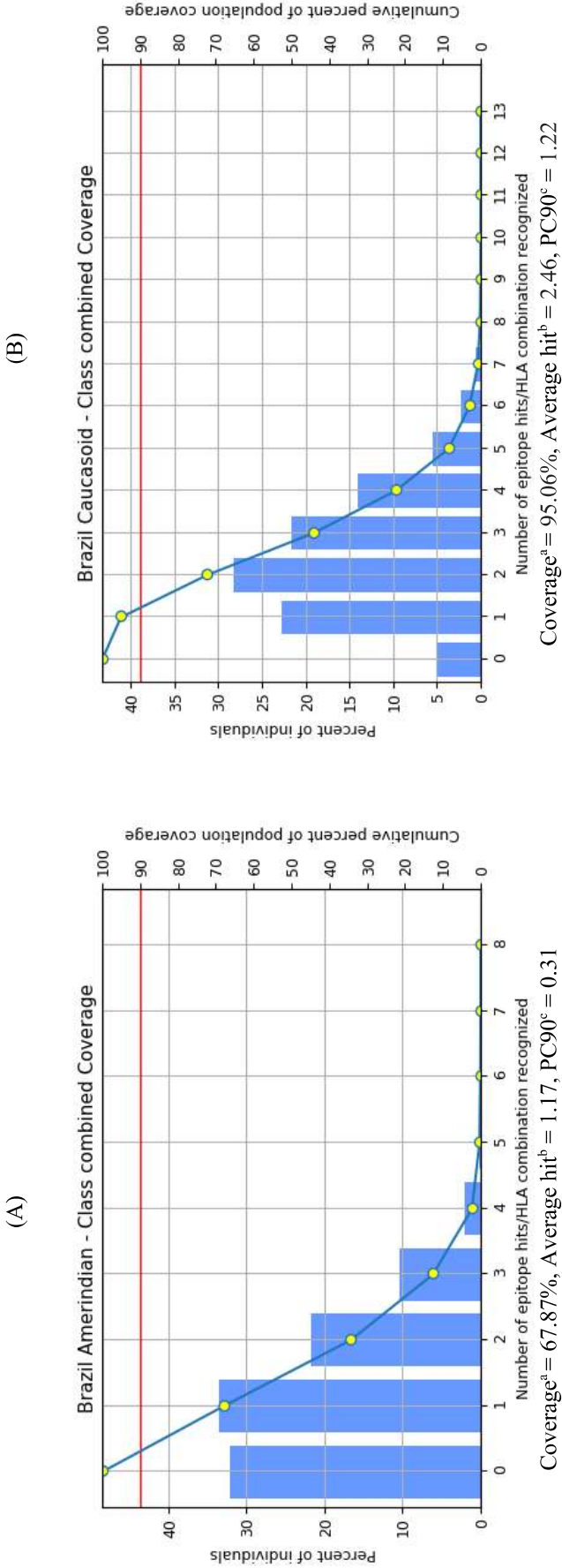


Figura 01 (cont.) – Frequência da cobertura populacional dos epítomos para MHC de classe I e classe II na Europa (A), Estados Unidos (B), China (C), Japão (D) e América do Sul (E). No gráfico, a linha (–o–) representa a percentagem acumulada da população cobertura de informação dos epítomos; as barras representam a cobertura populacional para cada epítomo.
(E)



Legenda: a – cobertura populacional projetada; b – número médio de ocorrências de epítomos/combinções HLA reconhecidas pela população; c – número mínimo de ocorrências de epítomos/combinções HLA reconhecidas por 90% da população.
Fonte: elaborado pela autora (2023).

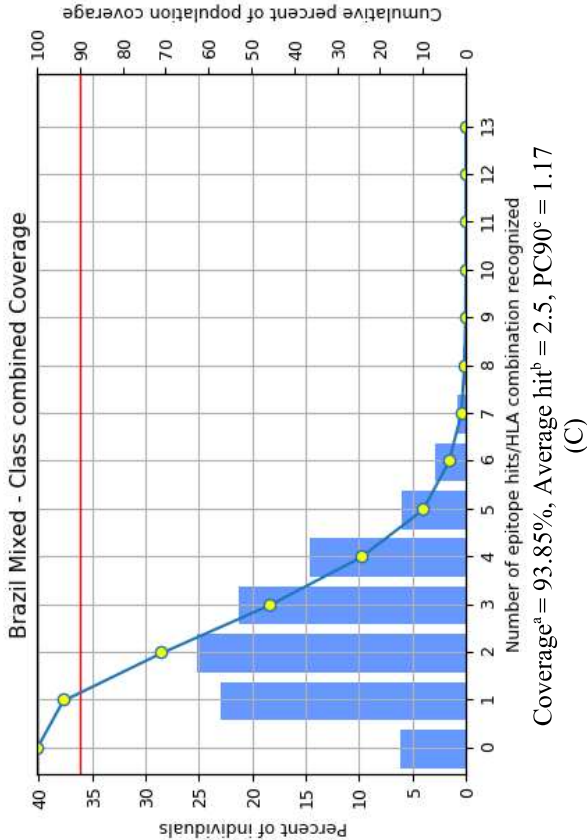
Figura 02– Frequência da cobertura populacional dos epítomos para MHC de classe II no Brasil em relação as etnias: (A) ameríndios (indígenas do continente americano), (B) caucasóide, (C) miscigenado e (D) mulato. No gráfico, a linha (–o–) representa a percentagem acumulada da população cobertura de informação dos epítomos; as barras representam a cobertura populacional para cada epítopo.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

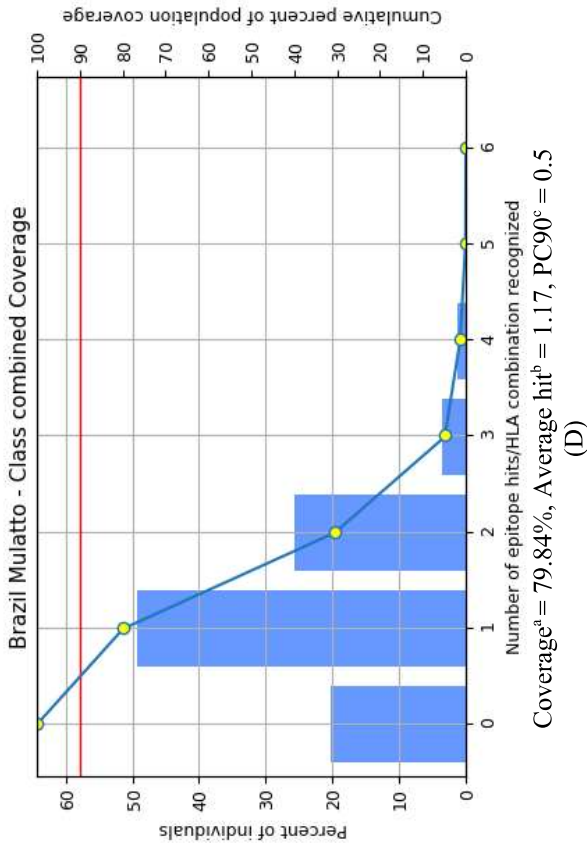
Figura 02 (cont.) – Frequência da cobertura populacional dos epítomos para MHC de classe I e classe II no Brasil em relação as etnias: (A) ameríndios (indígenas do continente americano), (B) caucasóide, (C) miscigenado e (D) mulato. No gráfico, a linha (-o-) representa a percentagem acumulada da população cobertura de informação dos epítomos; as barras representam a cobertura populacional para cada epítomo.

(C)



(C)

(D)



(D)

Legenda: a – cobertura populacional projetada; b – número médio de ocorrências de epítomos/combinções HLA reconhecidas pela população; c – número mínimo de ocorrências de epítomos/combinções HLA reconhecidas por 90% da população.

Fonte: elaborado pela autora (2023).

APÊNDICE D – PROCESSAMENTO DA VACINA PARA APRESENTAÇÃO NO MHC DE CLASSE I

**Tabela 01 – Regiões de clivagem via proteossoma na vacina multi-epítopo determinadas pelo
servidor NetChop-3.1.**

Posição	Aminoácido	Score
6	M	0.767197
9	L	0.948119
14	L	0.772514
15	L	0.606073
21	M	0.958705
23	L	0.814710
24	L	0.945871
31	K	0.877920
32	K	0.894004
33	F	0.973249
37	F	0.888499
39	V	0.944204
47	V	0.747797
49	A	0.866138
50	A	0.597946
59	V	0.954352
61	A	0.927086
68	F	0.520760
72	L	0.971231
74	A	0.969401
85	V	0.893616
87	R	0.645251
89	I	0.552810
93	L	0.935110
95	L	0.889264
96	K	0.782071
102	V	0.877142
109	L	0.813520
110	L	0.672621
112	K	0.941753
113	V	0.963759
115	K	0.962449
125	L	0.971433
132	V	0.756099
134	V	0.947510

Fonte: elaborado pela autora (2023).

Tabela 01 (cont.) - Regiões de clivagem via proteossoma na vacina multi-epítopo determinadas pelo servidor NetChop-3.1.

Posição	Aminoácido	Score
135	K	0.798438
136	K	0.949445
137	K	0.761428
139	V	0.813104
141	R	0.798186
143	K	0.534378
145	L	0.964939
148	I	0.611520
151	K	0.967083
154	K	0.822561
155	K	0.803758
159	A	0.924226
165	L	0.605385
167	V	0.838117
172	K	0.895885
173	K	0.948912
186	R	0.736181
189	V	0.722297
196	L	0.968505
198	V	0.970855
199	L	0.691823
200	M	0.968905
207	R	0.962489
209	V	0.954901
218	W	0.976589
222	H	0.613734
223	N	0.660432
224	R	0.970029
225	K	0.967816
228	K	0.884997
237	K	0.769446
238	F	0.978322
240	A	0.931184
252	Y	0.925987
254	V	0.942242
255	W	0.580737
258	V	0.926708
260	R	0.562747
261	K	0.966924
264	Y	0.960613

Fonte: elaborado pela autora (2023).

Tabela 01 (cont.) - Regiões de clivagem via proteossoma na vacina multi-epítopo determinadas pelo servidor NetChop-3.1.

Posição	Aminoácido	Score
266	I	0.737522
273	Y	0.971492
274	A	0.708001
275	A	0.576302
276	Y	0.962084
277	A	0.720212
285	Y	0.973769
287	H	0.613209
289	H	0.694461
291	H	0.662215

Símbolo dos aminoácidos: Alanina (A), Fenilalanina (F), Histidina (H), Isoleucina (I), Lisina (K), Leucina (L), Metionina (M), Asparagina (N), Arginina (R), Valina (V), Triptofano (W) e Tirosina (Y).

Fonte: elaborado pela autora (2023).

Tabela 02 – Peptídeos com alta afinidade de ligação com o TAP preditos pelo servidor TAPPred.

Rank	Posição	Sequência	Score
1	153	SKKTNSAQN	8.645
2	245	ASPNEAAYK	8.644
3	28	DFVKKFEET	8.636
4	242	SNHASPNEA	8.636
5	116	EAADEAKAK	8.634
6	102	VDGAPKPLL	8.634
7	162	CQNL RVERQ	8.633
8	269	DKSEYAAYA	8.623
9	205	TSRPVGPGP	8.616
10	247	PNEAAYK VW	8.612
11	138	RVERQKRLE	8.593
12	115	KEAADEAKA	8.590
13	60	EAAEEQSEF	8.584
14	255	WETVQRKAA	8.555
15	261	KAAYSISDD	8.533
16	32	KFEETFEVT	8.524
17	37	FEVTAAAPV	8.523
18	48	AAAGAAPAG	8.516
19	188	LVGPGPGEL	8.490

Fonte: elaborado pela autora (2023).

Tabela 02 (cont.) - Peptídeos com alta afinidade de ligação com o TAP preditos pelo servidor**TAPPred.**

Rank	Posição	Sequência	Score
20	129	GATVTVKKK	8.472
21	181	DLKMARNLV	8.434
22	266	ISDDKSEYA	8.427
23	75	AGDKKIGVI	8.413
24	122	KAKLEAAGA	8.385
25	105	APKPLLEKV	8.345
26	197	KVLMDENQT	8.339
27	33	FEETFEVTA	8.328
28	268	DDKSEYAAY	8.318
29	64	EQSEFDVIL	8.311
30	81	GVIKVVREI	8.291
31	270	KSEYAAYAT	8.289
32	36	TFEVTAAAP	8.276
33	167	VERQKKKSG	8.276
34	235	VAKFRAASN	8.263
35	23	LLELSDFVK	8.259
36	67	EFDVILEAA	8.234
37	42	AAPVAVAAA	8.144
38	100	DLVDGAPKP	8.130
39	84	KVVREIVSG	8.127
40	158	SAQNCQNLR	8.059
41	97	EAKDLVDGA	8.056
42	200	MDENQTSRP	8.048
43	155	KTNSAQNCQ	8.048
44	163	QNLVERQK	8.002
45	113	VAKEAADEA	7.972
46	53	APAGAAVEA	7.935
47	39	VTAAAPVAV	7.888
48	21	MTLLELSDF	7.865
49	259	QRKAAYSI	7.865
50	168	ERQKKKSGS	7.828
51	6	MAKLSTDEL	7.807
52	22	TLLELSDFV	7.762
53	123	AKLEAAGAT	7.702
54	170	QKKKSGSCS	7.638
55	257	TVQRKAAYS	7.634
56	180	EDLKMARNL	7.562
57	175	AYATSSGGS	7.560

Fonte: elaborado pela autora (2023).

Tabela 02 (cont.) - Peptídeos com alta afinidade de ligação com o TAP preditos pelo servidor**TAPPred.**

Rank	Posição	Sequência	Score
58	9	LSTDELLDA	7.552
59	128	AGATVTVKK	7.544
60	125	LEAAGATVT	7.527
61	25	ELSDFVKKF	7.500
62	50	AGAAPAGAA	7.488
63	110	LEKVAKEAA	7.480
64	126	EAAGATVTV	7.469
65	150	QKQSKKTNS	7.305
66	243	NHASPNEAA	7.084
67	201	DENQTSRPV	7.080
68	44	PVAVAAAGA	7.068
69	218	WAGQHNRKG	6.957
70	149	KQKQSKKTN	6.813
71	63	EEQSEFDVI	6.745
72	61	AAEEQSEFD	6.709
73	104	GAPKPLLEK	6.651
74	49	AAGAAPAGA	6.650
75	98	AKDLVDGAP	6.627
76	154	KKTNSAQNC	6.604
77	132	VTVKKKRVE	6.583
78	51	GAAPAGAAV	6.583
79	57	AAVEAAEEQ	6.573
80	120	EAKAKLEAA	6.555
81	237	KFRAASNHA	6.550
82	121	AKAKLEAAG	6.532
83	29	FVKKFEETF	6.411
84	171	KKKSGSCSA	6.382
85	145	LERIKQKQS	6.352
86	199	LMDENQTSR	6.330
87	147	RIKQKQSKK	6.281
88	18	KEMTLLELS	6.279
89	114	AKEAADEAK	6.254
90	151	KQSKKTNSA	6.197
91	62	AEEQSEFDV	6.185
92	234	GVAKFRAAS	6.157
93	176	SCSAEDLKM	6.155
94	267	SDDKSEYAA	6.143
95	46	AVAAAGAAP	6.118
96	77	DKKIGVIKV	6.004

Fonte: elaborado pela autora (2023).

APÊNDICE E – MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS DA VACINA MULTI-EPÍTOPO

Tabela 01 – Sítios de fosforilação na vacina multi-epítipo pelo servidor NetPhos v.3.1.

Posição	Resíduo	Sequência	Quinases	Score
10	S	MAKLSTDEL	inespecífica	0.972
10	S	MAKLSTDEL	PKA	0.639
10	S	MAKLSTDEL	CKII	0.579
10	S	MAKLSTDEL	PKG	0.526
11	T	AKLSTDELL	CKII	0.502
22	T	FKEMTLLEL	inespecífica	0.580
22	T	FKEMTLLEL	CKII	0.513
36	T	KFEETFEVT	inespecífica	0.727
66	S	AEEQSEFDV	CKII	0.584
66	S	AEEQSEFDV	inespecífica	0.569
66	S	AEEQSEFDV	CKI	0.515
131	T	AAGATVTVK	PKC	0.821
133	T	AAGATVTVK	PKC	0.939
133	T	AAGATVTVK	inespecífica	0.814
153	S	KQKQSKKTN	inespecífica	0.984
153	S	KQKQSKKTN	PKC	0.895
153	S	KQKQSKKTN	cdc2	0.512
156	T	QSKKTNSAQ	PKC	0.600
158	S	KKTNSAQNC	PKA	0.531
174	S	QKKKSGSCS	inespecífica	0.995
174	S	QKKKSGSCS	PKA	0.526
174	S	QKKKSGSCS	RSK	0.502
176	S	KKSGSCSAE	inespecífica	0.982
176	S	KKSGSCSAE	PKA	0.647
178	S	SGSCSAEDL	inespecífica	0.996
205	T	DENQTSRPV	inespecífica	0.986
205	T	DENQTSRPV	PKC	0.647
215	S	PGPGSPPWA	cdk5	0.694
215	S	PGPGSPPWA	inespecífica	0.693
215	S	PGPGSPPWA	GSK3	0.536
215	S	PGPGSPPWA	p38MAPK	0.519
242	S	FRAASNHAS	inespecífica	0.964
242	S	FRAASNHAS	PKC	0.656
242	S	FRAASNHAS	RSK	0.563
242	S	FRAASNHAS	PKA	0.556
246	S	SNHASPNEA	inespecífica	0.938
246	S	SNHASPNEA	GSK3	0.501

Fonte: elaborado pela autora (2023).

Tabela 01 (cont.) - Sítios de fosforilação na vacina multi-epítopo pelo servidor NetPhos v.3.1.

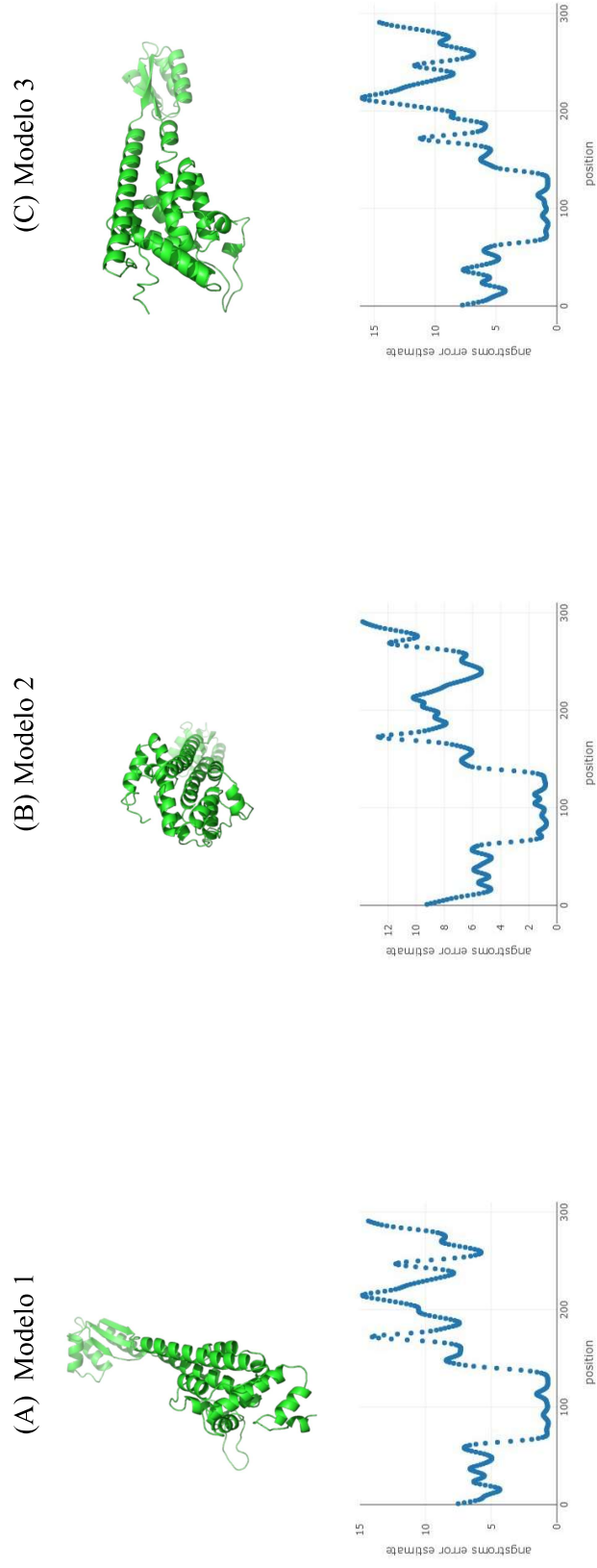
Posição	Resíduo	Sequência	Quinases	Score
252	Y	NEAAYKVWE	inespecífica	0.606
257	T	KVWETVQRK	PKC	0.700
264	Y	RKAAYSISD	inespecífica	0.741
265	S	KAAYSISDD	inespecífica	0.997
267	S	KAAYSISDD	CKII	0.615
271	S	SDDKSEYAA	inespecífica	0.990
271	S	SDDKSEYAA	CKII	0.508
273	Y	DKSEYAAYA	inespecífica	0.952
273	Y	DKSEYAAYA	SRC	0.533
273	Y	DKSEYAAYA	EGFR	0.506
273	Y	DKSEYAAYA	INSR	0.503
280	S	YATSSGGSQ	PKC	0.663
280	S	YATSSGGSQ	inespecífica	0.515
283	S	SSGGSQYHH	inespecífica	0.971
283	S	SSGGSQYHH	DNAPK	0.636
283	S	SSGGSQYHH	ATM	0.540
283	S	SSGGSQYHH	PKC	0.540

Sigla das quinases: PKA (proteína quinase A), CKII (caseína quinase 2), PKG (proteína quinase dependente de CGMP), CKI (proteína quinase 1), PKC (proteína quinase C), cdc2 (quinase dependente de ciclina 2), RSK (proteína quinase ribossomal), cdk5 (quinase dependente de ciclina 5), GSK3 (glicogenio sintase quinase 3), p38MAPK (proteínas quinases ativadas por mitógenos p38), SRC (receptor tirosina quinase), EGFR (Receptor do fator de crescimento epidérmico), INSR (receptor de insulina), DNAPK (proteína quinase dependente de DNA) e ATM (proteína quinase serina-treonina).

Fonte: elaborado pela autora (2023).

APÊNDICE F – PREDIÇÃO DA ESTRUTURA TERCIÁRIA DA VACINA MULTI-EPÍTOPO

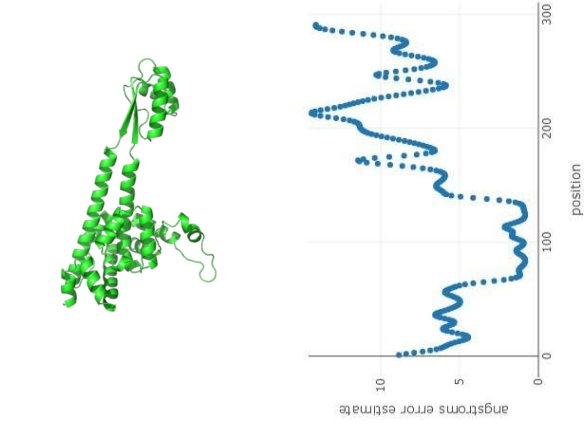
Figura 01– Modelos de estrutura terciária preditos pelo servidor ROSETTA (método RoseTTAFold) e suas estimativas de erro em relação a posição dos aminoácidos (A-E).



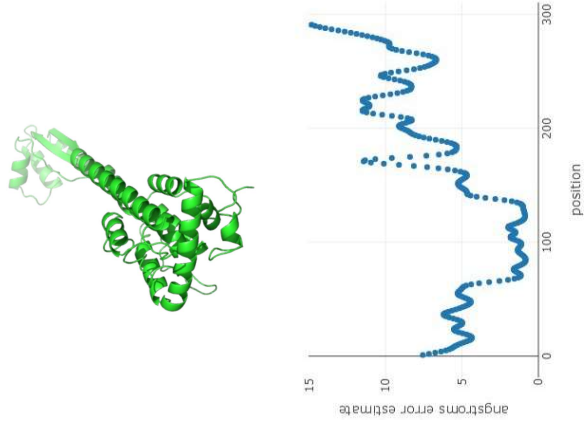
Fonte: elaborado pela autora (2023).

Figura 01 (cont.) – Modelos de estrutura terciária preditos pelo servidor ROBETTA (método RoseTTAFold) e suas estimativas de erro em relação a posição dos aminoácidos (A-E).

(D) Modelo 4



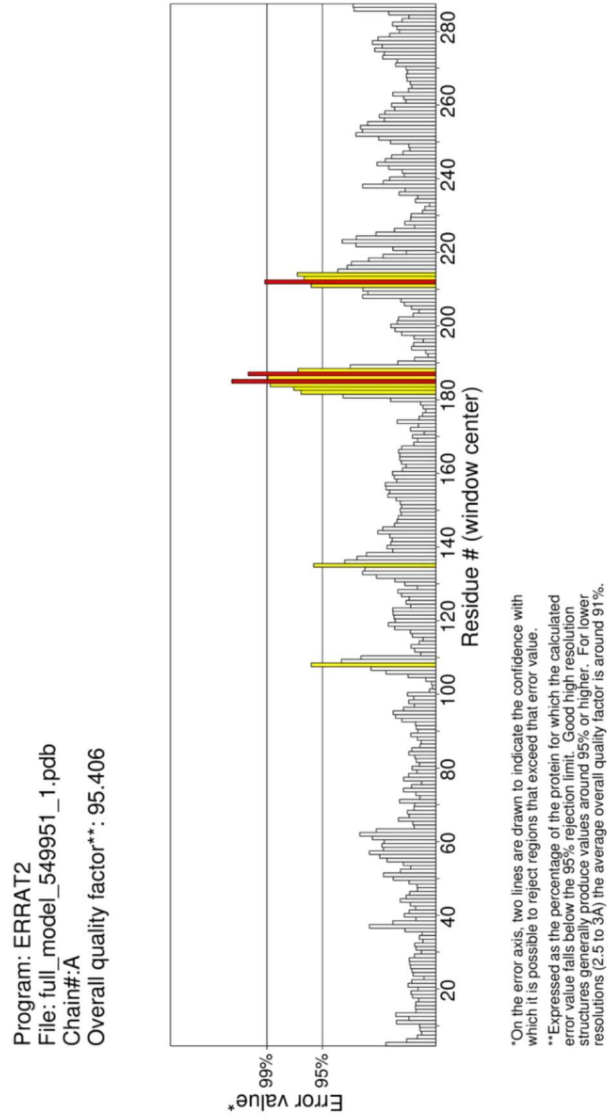
(E) Modelo 5



Fonte: elaborado pela autora (2023).

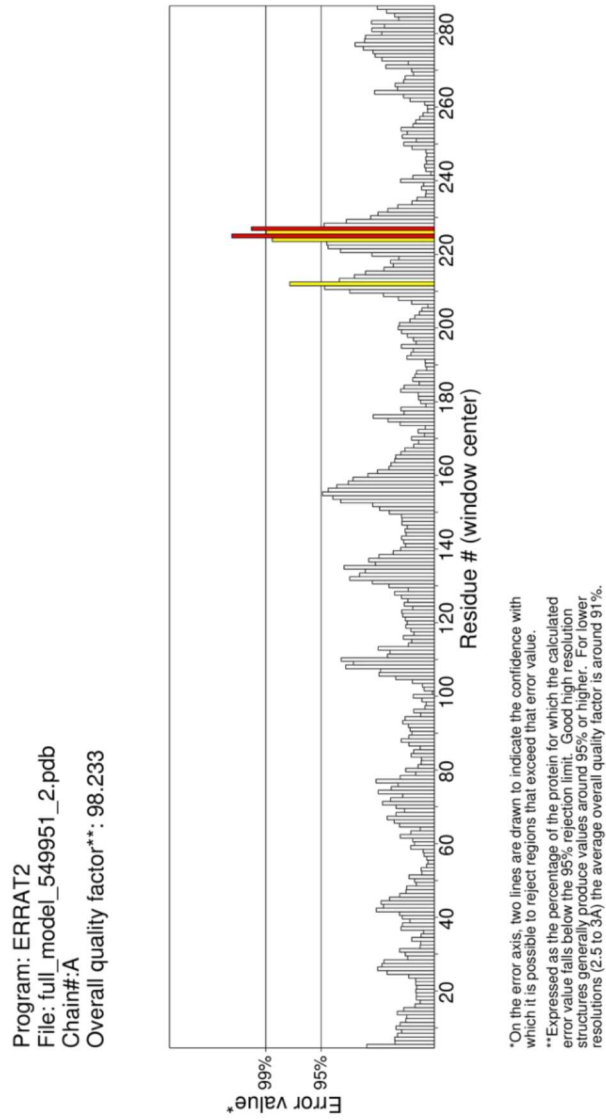
Figura 02– Gráfico representativo do valor dos erros dos resíduos determinados pelo servidor ERRAT de cada modelo (A-E).

(A) Modelo 1



Fonte: elaborado pela autora (2023).

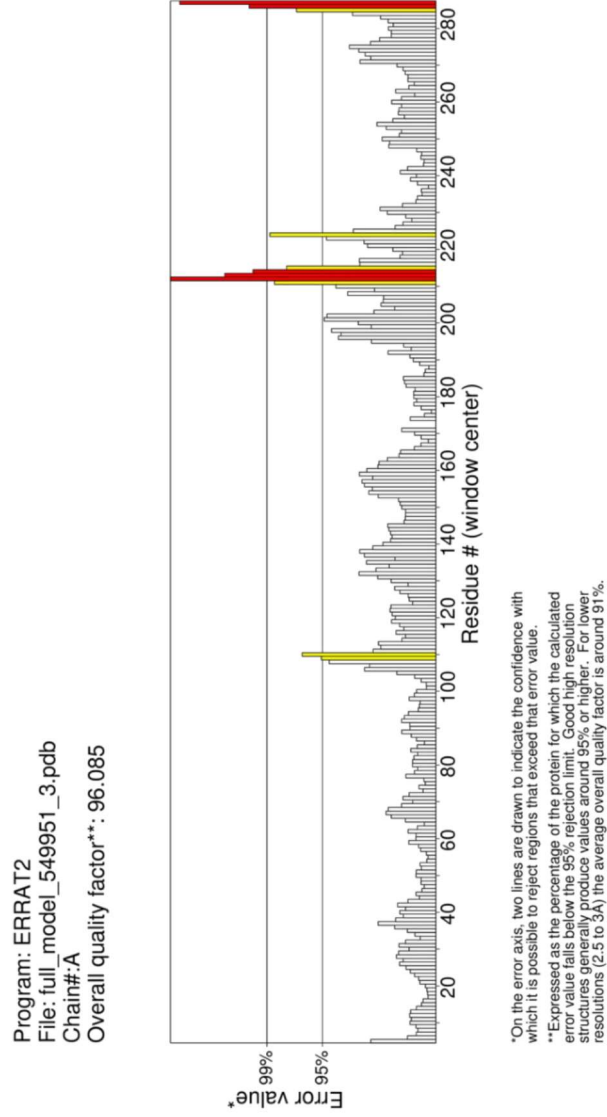
Figura 02 (Cont.) – Gráfico representativo do valor dos erros dos resíduos determinados pelo servidor ERRAT de cada modelo (A-E).
(B) Modelo 2



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Figura 02 (Cont.) – Gráfico representativo do valor dos erros dos resíduos determinados pelo servidor ERRAT de cada modelo (A-E).

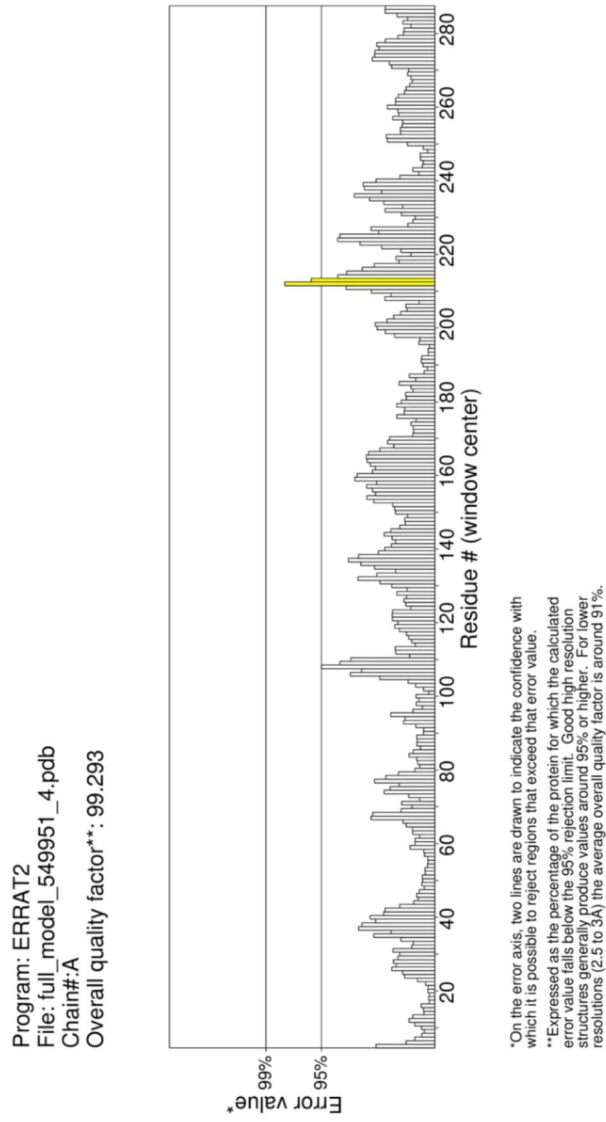
(C) Modelo 3



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Figura 02 (Cont.) – Gráfico representativo do valor dos erros dos resíduos determinados pelo servidor ERRAT de cada modelo (A-E).

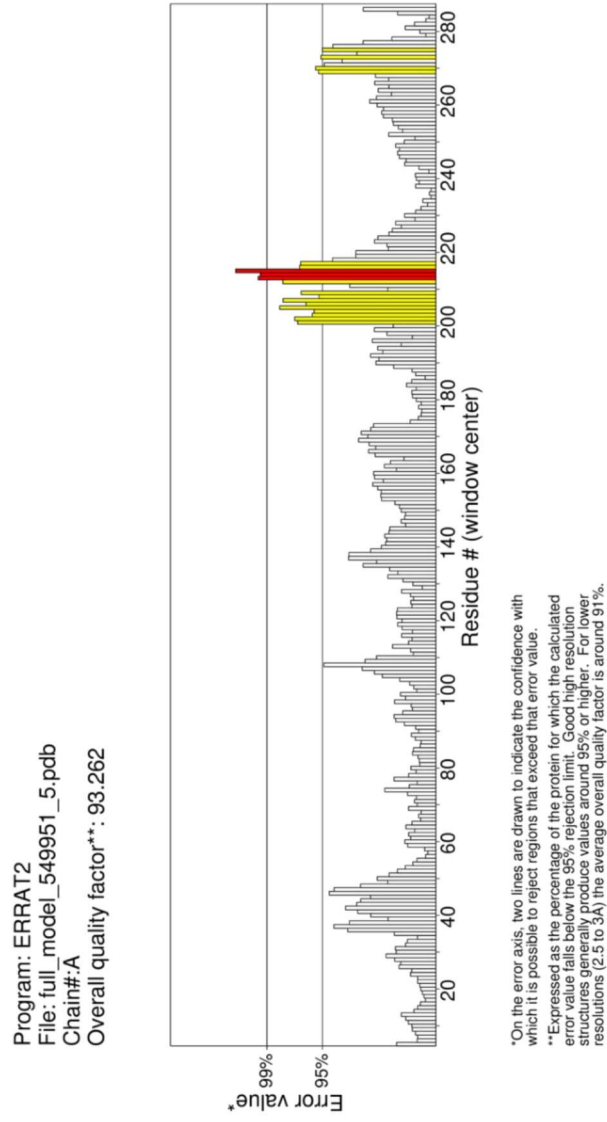
(D) Modelo 4



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Figura 02 (Cont.) – Gráfico representativo do valor dos erros dos resíduos determinados pelo servidor ERRAT de cada modelo (A-E).

(E) Modelo 5



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Tabela 01 – Parâmetros dos modelos obtidos após o refinamento da estrutura do modelo 4 pelo servidor GalaxyRefine.

Model	GDT-HA	RMSD	MolProbability	Clash score	Poor rotamers	Rama favored
Initial	1.0000	0.000	1.259	1.7	0.0	95.2
MODEL 1	0.9957	0.240	1.866	12.5	0.9	96.2
MODEL 2	0.9880	0.256	1.848	14.3	0.4	96.9
MODEL 3	0.9923	0.241	1.873	13.8	0.0	96.5
MODEL 4	0.9828	0.291	1.788	11.2	0.4	96.5
MODEL 5	0.9905	0.263	1.919	14.3	0.4	96.2

Fonte: elaborado pela autora (2023).