



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

Mariana da Silva Ribeiro

Avaliação da Hiperexpressão de Antígenos
Micobacterianos na vacina BCG Moreau Rio
de Janeiro

TESE DE DOUTORADO

Orientadora: Dra.: Izabel Christina Paixão

Coorientadores: Dr.: Paulo Renato Zuquim Antas

Ficha catalográfica automática - SDC/BCV
Gerada com informações fornecidas pelo autor

D111a Da Silva Ribeiro, MARIANA
Avaliação da Hiperexpressão de Antígenos Micobacterianos
na vacina BCG Moreau Rio de Janeiro / MARIANA Da Silva
Ribeiro. - 2026.
110 f.

Orientador: Izabel Christina Nunes De Palmer Paixão.
Coorientador: Paulo Renato Zuquin Antas.
Tese (doutorado)-Universidade Federal Fluminense, Instituto
de Biologia, Niterói, 2026.

1. Mycobacterium tuberculosis. 2. Vacina BCG. 3.
Imunoinformática. 4. Vacinologia reversa. 5. Produção
intelectual. I. Christina Nunes De Palmer Paixão, Izabel,
orientadora. II. Renato Zuquin Antas, Paulo, coorientador.
III. Universidade Federal Fluminense. Instituto de Biologia.
IV. Título.

CDD - XXX



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA
MESTRADO E DOUTORADO



147ª Ata Defesa de Tese de Doutorado

No dia 15 de julho de 2026, às 13h30, a Banca Examinadora reuniu-se no Auditório do Instituto de Biologia, Campus Gragoatá da Universidade Federal Fluminense: Dra. Carolina Oliveira da Silva da Escola Municipal Charles Dickens do Município de Angra dos Reis, Dra. Ana Maria Viana Pinto da Universidade Federal Fluminense, Dr. Maurício Afonso Vericimo da Universidade Federal Fluminense, Dr. Aldo Rodrigues da Silva da Universidade Estácio de Sá, Dr. Gutemberg Gomes Alves da Universidade Federal Fluminense, Dra. Caroline de Souza Barros (Suplente) da Universidade Federal Fluminense, Dra. Juliana Eymara Fernandes (Suplente) da Universidade Federal Fluminense, designada na forma regimental pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Biotecnologia para julgar a tese. Atuou como revisor da tese a Dra. Juliana Eymara Fernandes. Orientada pela professora Dra. Izabel Christina Nunes de Palmer Paixão da Universidade Federal Fluminense, e coorientada pelo Dr. Paulo Renato Zuquin Antas da Fundação Oswaldo Cruz. Apresentada pela aluna: **MARIANA DA SILVA RIBEIRO** sob o Título: **AValiação DA HIPEREXPRESSÃO DE ANTÍGENOS MICROBACTERIAIS NA VACINA BCG MOREAU RIO DE JANEIRO**, requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências e Biotecnologia, área de concentração em Ciências e Biotecnologia – interações biológicas, tecnológicas e sociais. Em sessão pública a candidata teve a oportunidade de expor o trabalho, e uma vez encerrado o exame, o Presidente da Banca atestou a decisão e a participação da aluna e de todos os membros da banca. Após arguição oral da candidata e deliberação, a Banca decidiu pela:

- ☒ **Aprovação com entrega do documento corrigido no prazo máximo de 30 dias**
☐ **Aprovação com restrições condicionada ao atendimento das exigências e sugestões da banca (vide anexo) com entrega do documento corrigido no prazo máximo de _____ dias.**
☐ **Reprovação.**

Nos termos do Regulamento Geral dos Cursos de Pós-Graduação desta Universidade foi lavrada a presente ata, lida e julgada conforme vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Banca Examinadora:  **IZABEL CHRISTINA NUNES DE PALMER PAIXÃO**
Data: 22/07/2026 20:10:31-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Documento assinado digitalmente

CPF: 463222674-53

Dra. Izabel Christina Nunes de Palmer Paixão (Presidente)
Universidade Federal Fluminense – UFF

Documento assinado digitalmente



CAROLINA OLIVEIRA DA SILVA
Data: 29/07/2026 10:18:29-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

12437561790

Dra. Carolina Oliveira
Laboratório de Virologia Molecular e Biotecnologia Marinha
Universidade

Documento assinado digitalmente



ANA MARIA VIANA PINTO
Data: 31/07/2026 09:01:22-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

CPF: 116.102.985-00

Dra. Ana Maria Viana Pinto
Laboratório de Virologia Molecular e Biotecnologia Marinha
Universidade Federal Fluminense – UFF

Documento assinado digitalmente



MAURICIO AFONSO VERICIMO
Data: 31/07/2026 11:26:17-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

CPF: 452.838.697-68

Dr. Maurício
Programa de Pós-Graduação em Ciências e Biotecnologia – PPBI
Universidade Federal Fluminense – UFF

Documento assinado digitalmente



ALDO RODRIGUES DA SILVA
Data: 05/08/2026 08:37:29-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

CPF: 13264024713

Dr. Aldo Rodriq
Universidade Estácio de Sá

CPF: 07324040705

Dr. Gutemberg Gomes Alves
Programa de Pós-Graduação em Ciências e Biotecnologia – PPBI
Universidade Federal Fluminense – UFF

Documento assinado digitalmente



GUTEMBERG GOMES ALVES
Data: 18/08/2026 16:40:19-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>



Documento assinado digitalmente
CAROLINE DE SOUZA BARROS
Data: 26/08/2026 15:33:16-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

CPF: 09909535726

Dra. Caroline de Souza Barros (Suplente)
Programa de Pós-Graduação em Ciências e Biotecnologia – PPBI
Universidade Federal Fluminense – UFF



Documento assinado digitalmente
JULIANA EYNARA FERNANDES BARBOSA PAULA
Data: 08/09/2026 12:12:21-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

CPF: 09710890786

Hospital Universitário Antônio Pedro
Universidade Federal Fluminense – UFF

*Dedico este trabalho à memória das duas pessoas que mais acreditaram em mim e que partiram durante a caminhada deste doutorado, deixando uma saudade imensurável, mas também a força que me sustentou até aqui: meu primeiro amor, meu irmão **Marcos Júnior** e minha amada avó **Jandira Cerqueira**. Mesmo na ausência, continuam sendo minha inspiração diária e parte essencial de cada conquista alcançada.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por ter me concedido a graça de chegar até aqui e por me dar forças para concluir tudo aquilo que iniciei. Agradeço também a intercessão de Nossa Senhora durante todo esse processo, guiando meus passos e fortalecendo minha fé nos momentos mais difíceis.

Sou profundamente grata a todos aqueles que, direta ou indiretamente, torceram pelo meu sucesso. Peço desculpas se não conseguir mencionar todos nominalmente, mas deixo registrada minha eterna gratidão a cada pessoa que fez parte dessa trajetória.

À minha família, meu alicerce e maior fonte de apoio, deixo meu mais sincero agradecimento. Em especial, à minha filha Ana, que, mesmo com poucos anos de vida e sem compreender plenamente o significado desta conquista, foi minha maior motivação. Como mãe, sempre desejei ser o melhor exemplo para ela, e espero que, no futuro, ela compreenda que cheguei até aqui por meio da educação, da perseverança e do trabalho árduo. Que minha trajetória possa abrir caminhos mais suaves e oportunidades ainda maiores para a sua.

Ao meu marido, Lucas, agradeço por compartilhar comigo as rotinas, os desafios e as dificuldades do dia a dia. Obrigada por caminhar ao meu lado em cada etapa desta jornada, dividindo os pesos e celebrando as conquistas.

De maneira muito especial, agradeço aos meus avós, Edison e Jandira (in memoriam), à minha mãe, Viviane, e ao meu padrasto, Manoel. Além de acreditarem em mim, muitas vezes me ofereceram o apoio necessário para que eu pudesse continuar seguindo meus sonhos. Sem vocês, este caminho teria sido muito mais difícil.

Agradeço também à minha tia Sandra e à minha prima Ana Carolynna que, mesmo à distância, estiveram sempre presentes, torcendo pelas minhas conquistas e vibrando a cada vitória.

Por fim, mas jamais menos importante, agradeço ao meu irmão Marcos, a pessoa que mais se orgulhava de mim. Ele tinha enorme prazer em dizer que sua irmã era cientista. Infelizmente, partiu antes de ver a conclusão desta etapa da minha vida, mas seu amor, incentivo e orgulho continuam me acompanhando todos os dias. Esta conquista também é sua.

Ao longo destes anos de estudo, enfrentei momentos extremamente difíceis e dolorosos. Por isso, esta tese possui um valor que vai muito além de seus resultados científicos. Ela representa resistência, superação e a capacidade de seguir em frente mesmo diante das adversidades.

Nesse percurso, tive a sorte de encontrar pessoas que não mediram esforços para me apoiar. Agradeço, primeiramente, aos meus orientadores. Ao Dr. Paulo Antas, por acreditar em mim antes mesmo de eu me tornar sua aluna e por compreender, com generosidade e sensibilidade, os desafios que surgiram ao longo do caminho. À Dra. Izabel Paixão, por aceitar

o convite para me orientar e por ser, em todos os momentos, um exemplo de educação, empatia e compaixão.

Agradeço também a todos os amigos e colegas de laboratório que cruzaram meu caminho durante esta experiência. Em especial, ao meu amigo Carlos Germano, que, além de companheiro de experimentos, foi um grande apoio nos momentos mais difíceis. Estendo meus agradecimentos a Andreon, Matheus e Lawrence, bem como a todos os alunos de iniciação científica que passaram pelo LIC e contribuíram para tornar essa caminhada mais leve e enriquecedora.

No âmbito acadêmico, não poderia deixar de agradecer ao Dr. Cristiano Bizarro, por me receber de forma tão acolhedora em seu laboratório, em Porto Alegre. Da mesma forma, agradeço à Helen, que foi muito mais do que uma amiga durante os dias em que estive longe de casa; em muitos momentos, foi como uma mãe, oferecendo apoio, cuidado e acolhimento.

Por fim, agradeço a mim mesma. À menina nascida em Niterói, que se mudou para o interior aos quatro anos de idade; filha, neta e bisneta de pessoas humildes, que buscaram uma vida melhor por meio do trabalho e do esforço. À menina que estudou sempre em escolas públicas, que fez seus exercícios sozinha porque não havia ninguém em casa que pudesse ajudá-la, mas que jamais deixou de acreditar que a educação transformaria sua vida.

Quem poderia imaginar que Jandira, uma empregada doméstica sem acesso à educação formal, que criou suas filhas e ajudou a criar seus netos com tanto amor e dedicação, teria todos os seus netos formados e, uma doutora — e em breve teremos mais um. Sua história é a prova de que os sonhos de uma geração podem florescer nas conquistas das gerações seguintes.

Gostaria muito de poder agradecer pessoalmente àqueles que já partiram. Tenho certeza de que, onde quer que estejam, estão felizes e orgulhosos desta conquista.

A todos que fizeram parte desta jornada, meu mais sincero obrigada.

Com amor.

LISTA DE ABREVIATURAS

% (v/v)	Percentual volume/volume
% RANK	Percentile rank
°C	Graus Celsius
100x	Aumento de 100 vezes
A260/A230	Razão de absorbância utilizada para avaliação de contaminação por compostos orgânicos e sais
A260/A280	Razão de absorbância utilizada para avaliação da pureza de ácidos nucleicos
AEC/BC02	Formulação vacinal recombinante AEC associada ao adjuvante BC02
AS01E	Sistema adjuvante AS01E
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>
BNT164a1	Candidata vacinal de mRNA BNT164a1
BNT164b1	Candidata vacinal de mRNA BNT164b1
CD4+	Linfócito T auxiliar CD4 positivo
CFP-10	<i>Culture Filtrate Protein 10</i>
CFU	<i>Colony Forming Unit</i> (Unidade Formadora de Colônia)
ChAdOx1.85A	<i>Chimpanzee Adenovirus Oxford 1 expressing antigen 85A</i>
CIATEJ	Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco
CO ₂	Dióxido de carbono
COVID-19	<i>Coronavirus Disease 2019</i>
DAR-901	Vacina DAR-901
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Eppendorf®	Marca comercial de microtubos/equipamentos laboratoriais
ESAT-6	<i>Early Secreted Antigenic Target 6 kDa</i>
ESX-1	<i>ESX Secretion System 1</i>
FAP	Fundação Ataulpho de Paiva
GenBank	Banco de dados genético do National Center for Biotechnology Information
GLA-SE	<i>Glucopyranosyl Lipid Adjuvant – Stable Emulsion</i>
GroEL1	Chaperona molecular GroEL1
GSK	<i>GlaxoSmithKline</i>
HBHA	Hemaglutinina de ligação à heparina

HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA	Antígeno leucocitário humano
HLA-A*01:01	Alelo do antígeno leucocitário humano A*01:01
HLA-A*03:01	Alelo do antígeno leucocitário humano A*03:01
HLA-A*11:01	Alelo do antígeno leucocitário humano A*11:01
IAVI	<i>International AIDS Vaccine Initiative</i>
ID93	Imunógeno recombinante ID93
IFN- γ	Interferon gama
IFNepitope	Ferramenta de predição de epítomos indutores de IFN- γ
IL	Interleucina
IL-6	Interleucina 6
IL-12	Interleucina 12
Immuvac	Nome comercial da vacina MIP
kDa	Quilodalton
kV	Quilovolt
LB	<i>Luria-Bertani</i>
LB-ágar	Meio LB solidificado com ágar
M. bovis	<i>Mycobacterium bovis</i>
M. smegmatis	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
M72/AS01E	Vacina candidata composta pelo antígeno M72 associado ao adjuvante AS01E
MB7H10OADC	Meio Middlebrook 7H10 suplementado com OADC
MB7H9OADC	Meio Middlebrook 7H9 suplementado com OADC
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MHC-I	Complexo principal de histocompatibilidade classe I
MHC-II	Complexo principal de histocompatibilidade classe II
Middlebrook 7H10	Meio de cultura sólido para micobactérias
Middlebrook 7H9	Meio de cultura líquido para micobactérias
MIP	<i>Mycobacterium indicus pranii</i>
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MPB64	<i>Mycobacterial Protein 64</i>
mRNA	RNA mensageiro
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTBVAC	Vacina viva atenuada derivada de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MVA85A	<i>Modified Vaccinia Ankara 85A</i>
NanoDrop	Espectrofotômetro para quantificação de ácidos nucleicos e proteínas

OADC	Oleico, Albumina, Dextrose e Catalase
OD ₆₀₀	Densidade óptica em 600 nm
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	Potencial hidrogeniônico
pMV261	Plasmídeo micobacteriano 261
pMV261-HBHA	Vetor plasmidial pMV261 contendo o gene da HBHA
pMV361	Plasmídeo micobacteriano 361
pMV361-HBHA	Vetor plasmidial pMV361 contendo o gene da HBHA
QTP101	Nome alternativo/formulação do candidato ID93 + GLA-SE
rBCG	BCG recombinante
RD	Região de deleção
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
RUTI	Vacina terapêutica composta por fragmentos inativados de MTB
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SII	<i>Serum Institute of India</i>
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TB	Tuberculose
TB-MDR	Tuberculose multirresistente
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
ToxinPred	Ferramenta de predição de toxicidade de peptídeos
Tris-HCl	Tris hidrocloreto
Tween 80	Polissorbato 80
UFC	Unidade formadora de colônia
UV	Ultravioleta
VaxiJen v2.0	Ferramenta de predição de antigenicidade
VPM1002	Vacina recombinante derivada da BCG
μ F	Microfarad
μ g/mL	Micrograma por mililitro
μ L	Microlitro

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Imagem ilustrando uma série de fotografias históricas do Dr. Guérin em seu laboratório de pesquisa, expostas no Museu do Instituto Pasteur de Lile, França. **2**
- Figura 2** – Imagem ilustrando um esquema representativo da genealogia das vacinas BCG. Onde estão representando o sequenciamento das cepas de BCG, seus novos nomes, datas de aquisição, Regiões de Deleção (RD) e os grupos identificados pelos eventos de duplicação em tandem DU1 e DU2. Fonte: Adaptado de Brosh et al. (2007). **5**
- Figura 3** – FIGURA 3: Representação esquemática dos vetores A:pVm261-MpT64 e B:pVm361-MpT64 resistentes a KanR e contendo o gene do Mpt64 com as enzimas de restrição HindIII e EcoRI. A: vetor cromossomal contém um promotor pHsp60, duas origens de expressão Ori-M (mycobacterium) e Ori-E (Escherichia coli). B: vetor integrativo contém o promotor pHsp60, inserção de integração L5, origem de expressão Ori-M e attP. **22**
- Figura 4** –Representação esquemática do gene de MpT64 contendo 702pb com as enzimas de restrição HindIII e EcoRI, que foi clonado nos plasmídeos de interesse. **23**
- Figura 5** – Representação esquemática do vetor pUc19_MpT64 com resistência AmpR (Ampicilina), com promotor LacZa, origem de expressão Ori-M (mycobacterium), genes do Mpt64 com as enzimas de restrição HindIII e EcoRI. **24**
- Figura 6** – Cobertura populacional global estimada para os complexos epítipo–HLA derivados da proteína MPB64 com afinidade de ligação ao MHC classe I. **37**
- Figura 7** – Cobertura populacional global estimada para os complexos epítipo–HLA derivados da proteína MPB64 com afinidade de ligação ao MHC classe II. **38**
- Figura 8** – Cobertura populacional do Brasil estimada para os complexos epítipo–HLA derivados da proteína MPB64 com afinidade de ligação ao MHC classe I. **39**
- Figura 9** – Cobertura populacional do Brasil estimada para os complexos epítipo–HLA derivados da proteína MPB64 com afinidade de ligação ao MHC classe II. **40**
- Figura 10** – Cobertura populacional global estimada para os complexos epítipo–HLA derivados da proteína HBHA com afinidade de ligação ao MHC classe I. **41**
- Figura 11** – Cobertura populacional global estimada para os complexos epítipo–HLA derivados da proteína HBHA com afinidade de ligação ao MHC classe II. **42**

Figura 12 – Cobertura populacional do Brasil estimada para os complexos epítipo–HLA derivados da proteína HBHA com afinidade de ligação ao MHC classe I.	43
Figura 13 – Cobertura populacional do Brasil estimada para os complexos epítipo–HLA derivados da proteína HBHA com afinidade de ligação ao MHC classe II.	44
Figura 14 – Cobertura populacional global estimada para os complexos epítipo–HLA derivados das proteínas HBHA e MPB64 com afinidade de ligação ao MHC classe I.	45
Figura 15 – Cobertura populacional global estimada para os complexos epítipo–HLA derivados das proteínas HBHA e MPB64 com afinidade de ligação ao MHC classe II.	46
Figura 16 – Cobertura populacional do Brasil estimada para os complexos epítipo–HLA derivados das proteínas MPB64 e HBHA com afinidade de ligação ao MHC classe I.	47
Figura 17 – Cobertura populacional do Brasil estimada para os complexos epítipo–HLA derivados das proteínas MPB64 e HBHA com afinidade de ligação ao MHC classe II.	48
Figura 18 – Distribuição global da frequência alélica do HLA-A*01:01 nas populações mundiais	50
Figura 19 – Distribuição global da frequência alélica do HLA-A*03:01 nas populações mundiais.	51
Figura 20 – Distribuição global da frequência alélica do HLA-A*11:01 nas populações mundiais.	53
Figura 21 – A imagem apresenta oito placas de Petri inoculadas com diferentes concentrações da cepa vacinal BCG, mantidas em meio sólido Middlebrook 7H10.	61
Figura 22 – Imagem representativa da cultura de <i>Mycobacterium bovis</i> BCG em meio sólido, evidenciando a formação de colônias após 60 dias de incubação sob condições experimentais controladas.	62
Figura 23 – A imagem apresenta três tubos de ensaio contendo a cepa vacinal BCG cultivada em meio líquido Middlebrook 7H9, avaliados após 20, 30 e 60 dias de incubação.	63
Figura 24 – A imagem apresenta quatro placas de Petri contendo colônias bacterianas de <i>E. coli</i> DH10B após transformação com os plasmídeos pMV261, pMV261-HBHA, pMV361 e pMV361-HBHA, cultivadas em meio LB acrescido de canamicina.	64
Figura 25 – A imagem ilustra a interface do equipamento de espectrofotometria NanoDrop, da marca <i>Thermo Fisher Scientific</i> , onde pode ser observada a absorbância do DNA plasmidial analisado	66

Figura 26 – Imagem ilustrando o resultado de uma corrida em gel de agarose (0,8%), na qual pode ser observada a presença dos plasmídeos pMV261, pMV261-HBHA, pMV361 e pMV361-HBHA em *Mycobacterium smegmatis* mc²155, 67

Figura 27 – Imagem de quatro placas de Petri (A–D) contendo crescimento de colônias de *Mycobacterium smegmatis* mc²155 transformadas com os plasmídeos pMV261-HBHA (A), pMV261 (B), pMV361-HBHA (C) e pMV361 (D). 68

Figura 28 – Imagem representando o perfil proteico obtido a partir de corrida eletroforética em gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE), evidenciando a fração solúvel de *Mycobacterium smegmatis* mc²155 transformada com diferentes construções plasmidiais. 69

Figura 29 – Imagem representando o perfil proteico obtido a partir de corrida eletroforética em gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE), evidenciando a fração insolúvel de *Mycobacterium smegmatis* mc²155 transformada com diferentes construções plasmidiais. 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – PANORAMA DAS VACINAS CANDIDATAS CONTRA A TB	14
Tabela 2 – ANÁLISE PREDITIVA DE EPÍTOPOS DA PROTEÍNA MPB64 COM CAPACIDADE DE LIGAÇÃO AO MHC-I	32
Tabela 3 – ANÁLISE PREDITIVA DE EPÍTOPOS DA PROTEÍNA MPB64 COM CAPACIDADE DE LIGAÇÃO AO MHC-II	33
Tabela 4 – ANÁLISE PREDITIVA DE EPÍTOPOS DA PROTEÍNA HBHA COM CAPACIDADE DE LIGAÇÃO AO MHC-I	34
Tabela 5 – ANÁLISE PREDITIVA DE EPÍTOPOS DA PROTEÍNA HBHA COM CAPACIDADE DE LIGAÇÃO AO MHC-I	36
Tabela 6 – SELEÇÃO E PRIORIZAÇÃO DE EPÍTOPOS DE MHC-I DA PROTEÍNA MPB64	54
Tabela 7 – SELEÇÃO E PRIORIZAÇÃO DE EPÍTOPOS DE MHC-II DA PROTEÍNA MPB64	55
Tabela 8 – SELEÇÃO E PRIORIZAÇÃO DE EPÍTOPOS DE MHC-I DA PROTEÍNA HBHA	56
Tabela 9 – SELEÇÃO E PRIORIZAÇÃO DE EPÍTOPOS DE MHC-II DA PROTEÍNA HBHA	56
Tabela 10 – EPÍTOPOS PRIORITÁRIOS SELECIONADOS DAS PROTEÍNAS MPB64 E HBHA PARA COMPOSIÇÃO VACINAL MULTIEPITÓPICA	57
Tabela 11 - CONFIGURAÇÕES PROPOSTAS PARA A CONSTRUÇÃO DA VACINA MULTIEPÍTOPO	59
Tabela 12 – EXTRAÇÃO DE DNA	65

RESUMO

A vacina Bacillus Calmette-Guérin (BCG), utilizada há mais de 100 anos na prevenção da tuberculose (TB), apresenta eficácia limitada e variável, especialmente contra a forma pulmonar em adultos. Como a TB, causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, continua sendo um importante problema de saúde pública mundial, com elevados índices de morbidade e mortalidade, torna-se necessária a busca por estratégias vacinais mais eficazes. Nesse contexto, abordagens baseadas em imunoinformática e vacinologia reversa têm possibilitado a identificação de epítomos com potencial imunogênico, embora muitos estudos permaneçam restritos ao nível *in silico*, carecendo de validação experimental. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo desenvolver e caracterizar candidatos vacinais multiepítomo derivados das proteínas MPB64 e HBHA por meio de abordagens imunoinformáticas e experimentais. Inicialmente, foram preditos epítomos de células T MHC classe I e II, os quais foram submetidos a análises de antigenicidade, imunogenicidade, toxicidade, potencial de indução de IFN- γ e cobertura populacional. Ao final das análises, foram selecionados nove epítomos promissores, sendo quatro de MHC-I e cinco de MHC-II, utilizados na construção de sequências multiepítomo. Posteriormente, a proteína HBHA foi clonada nos vetores de expressão micobacterianos pMV261 e pMV361, e as construções recombinantes pMV261, pMV261-HBHA, pMV361 e pMV361-HBHA foram utilizadas para transformar *Mycobacterium smegmatis* mc²155. A expressão das proteínas recombinantes foi avaliada por SDS-PAGE, permitindo avaliar o perfil de expressão, solubilidade e estabilidade dos antígenos produzidos. Os resultados demonstraram que a abordagem integrada foi eficaz na identificação de epítomos com elevado potencial imunogênico e na obtenção de sistemas recombinantes viáveis em *Mycobacterium smegmatis* mc²155, confirmando o sucesso das etapas de clonagem e transformação bacteriana. Além disso, a correlação entre os dados *in silico* e os resultados experimentais reforça a importância da validação funcional no desenvolvimento de vacinas baseadas em epítomos. Dessa forma, o estudo identificou epítomos promissores derivados de MPB64 e HBHA e estabeleceu sistemas recombinantes em *Mycobacterium smegmatis* mc²155, fornecendo uma base experimental para o desenvolvimento futuro de vacinas multiepítomo contra a TB.

Palavras-chave:

Tuberculose; *Mycobacterium tuberculosis*; vacina BCG; imunoinformática; vacinologia reversa; epítomos; vacinas multiepítomo; *Mycobacterium smegmatis*; HBHA; MPB64.

ABSTRACT

The Bacillus Calmette–Guérin (BCG) vaccine, used for more than a century to prevent tuberculosis (TB), exhibits limited and variable efficacy, particularly against pulmonary TB in adults. As TB, caused by *Mycobacterium tuberculosis*, remains a major global public health concern with high morbidity and mortality rates, the development of more effective vaccination strategies is urgently needed. In this context, immunoinformatics and reverse vaccinology approaches have enabled the identification of potentially immunogenic epitopes; however, many studies remain restricted to *in silico* analyses and lack experimental validation. Therefore, the present study aimed to develop and characterize multi-epitope vaccine candidates derived from the MPB64 and HBHA proteins using both immunoinformatics and experimental approaches. Initially, MHC class I and class II T-cell epitopes were predicted and subsequently evaluated for antigenicity, immunogenicity, toxicity, interferon-gamma (IFN- γ) induction potential, and population coverage. Following these analyses, nine promising epitopes were selected, including four MHC-I and five MHC-II epitopes, which were used to construct multi-epitope vaccine sequences. Subsequently, the HBHA gene was cloned into the mycobacterial expression vectors pMV261 and pMV361, and the recombinant constructs pMV261, pMV261-HBHA, pMV361, and pMV361-HBHA were used to transform *Mycobacterium smegmatis* mc²155. Recombinant protein expression was evaluated by SDS-PAGE to assess the expression profile, solubility, and stability of the produced antigens. The results demonstrated that the integrated approach was effective in identifying epitopes with high immunogenic potential and in generating viable recombinant systems in *M. smegmatis* mc²155, confirming the successful completion of the cloning and bacterial transformation steps. Furthermore, the correlation between the *in silico* predictions and the experimental findings highlights the importance of functional validation in the development of epitope-based vaccines. Overall, this study identified promising epitopes derived from MPB64 and HBHA and established recombinant systems in *M. smegmatis* mc²155, providing an experimental foundation for the future development of multi-epitope vaccines against TB.

Keywords:

Tuberculosis; *Mycobacterium tuberculosis*; BCG vaccine; immunoinformatics; reverse vaccinology; epitopes; multi-epitope vaccines; *Mycobacterium smegmatis*; HBHA; MPB64.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Bacillus Calmette-Guérin (BCG) – História	1
1.2 Cepas da vacina BCG	4
1.3 Proteínas contidas na vacina BCG	6
1.4 Imunoinformática e vacinas multiepítipo	8
1.5 Abordagens biotecnológicas para o desenvolvimento de vacinas contra a TB	9
1.6 Sistemas experimentais para expressão heteróloga em micobactérias	12
1.7 Tuberculose	13
1.8 Panorama atual das vacinas candidatas contra a TB	14

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Procedência do material

3.1.1 Bacillus Calmette-Guérin cepa Moreau	20
3.1.2 Plasmídeos pMV261, pMV261-HBHA, pMV361 e pMV361-HBHA	20
3.1.3 <i>Mycobacterium smegmatis</i>	20

3.2 Análises *in silico*

3.2.1 Sequenciamento das proteínas	20
3.2.2 Predição e seleção inicial de epítomos pelo <i>Immune Epitope Database</i> (IEDB)	20
3.2.3 Filtragem dos epítomos	21
3.2.4 Cobertura populacional	21
3.2.5 Frequência de HLA	22
3.2.6 Clonagem das sequências codificadoras da proteína MPB64 nos vetores de expressão pMV261, pMV361, pMV261-HBHA e pMV361-HBHA	22

3.3 Análises *in vitro*

3.3.1 Cultivo da vacina <i>M. bovis</i> BCG Moreau	24
3.3.2 Contagem de <i>M. bovis</i> BCG pela técnica de coloração de Kinyoun	25
3.3.3 Reconstituição dos plasmídeos	25
3.3.4 Preparação das células competentes de <i>E. coli</i> DH10B	25
3.3.5 Eletroporação dos plasmídeos em <i>E. coli</i> DH10B	26
3.3.6 Inóculo de colônia isolada de <i>E. coli</i> DH10B	26
3.3.7 Extração dos plasmídeos em <i>E. coli</i> DH10B	26
3.3.8 Preparação das células competentes de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 e BCG Moreau	27

3.3.9 Eletroporação dos plasmídeos em <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 e BCG Moreau	27
3.3.10 Inóculo de colônia isolada de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 e BCG Moreau	28
3.3.11 Confirmação da presença do plasmídeo	28
3.3.12 Extração de proteínas em <i>M. smegmatis</i> mc ² 155	29
4 RESULTADOS	30
4.1 Dados <i>in silico</i>	30
4.1.1 Sequências genômicas das proteínas MPB64 e HBHA	30
4.1.2 Predição de epítomos	30
4.1.3 Predição de epítomos da proteína MPB64 – ligação com MHC classe I	31
4.1.4 Predição de epítomos da proteína MPB64 – ligação com MHC classe II	32
4.1.5 Predição de epítomos da proteína HBHA – ligação com MHC classe I	34
4.1.6 Predição de epítomos da proteína HBHA – ligação com MHC classe II	35
4.2 Cobertura populacional	36
4.2.1 Avaliação da Cobertura Populacional Global dos Complexos Epítomo–HLA Derivados da Proteína MPB64	36
4.2.2 Avaliação da Cobertura Populacional Brasileira dos Complexos Epítomo–HLA Derivados da Proteína MPB64	38
4.2.3 Avaliação da Cobertura Populacional Global dos Complexos Epítomo–HLA Derivados da Proteína HBHA	40
4.2.4 Avaliação da Cobertura Populacional Brasileira dos Complexos Epítomo–HLA Derivados das Proteínas HBHA	42
4.2.5 Avaliação da Cobertura Populacional Global dos Complexos Epítomo–HLA Derivados das Proteínas HBHA e MPB64	44
4.2.6 Avaliação da Cobertura Populacional Brasileira dos Complexos Epítomo–HLA Derivados das Proteínas HBHA e MPB64	46
4.3 Avaliação da Frequência Global dos Alelos <i>HLA-A01:01</i>, <i>HLA-A03:01</i> e <i>HLA-A*11:01</i>	48
4.3.1 Análise da Frequência Global do Alelo <i>HLA-A*01:01</i>	49
4.3.2 Análise da Frequência Global do Alelo <i>HLA-A*03:01</i>	50
4.3.3 Análise da Frequência Global do Alelo <i>HLA-A*11:01</i>	51
4.4 Seleção e Validação <i>in silico</i> de Epítomos Candidatos com Potencial Vacinal	53
4.5 Peptídeos selecionados	56
4.6 Desenho Estrutural da Vacina Multiepítomo	58
4.6.1 Organização da construção vacinal	58
4.7 Dados <i>in vitro</i>	61
4.7.1 Análise do Crescimento da Cepa Vacinal BCG	61
4.7.2 Análise do Crescimento da Cepa Vacinal BCG em Meio de Cultura Middlebrook 7H10	61
4.7.3 Avaliação do Crescimento Cepa Vacinal BCG em Meio Líquido Middlebrook 7H9	62
4.7.4 Determinação da Contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)	63
4.7.5 Propagação e Amplificação de Construções Plasmidiais em <i>Escherichia coli</i>	64

4.7.6 Extração, Purificação e Quantificação de DNA Plasmidial	65
4.7.7 Confirmação da presença dos plasmídeos em <i>M. smegmatis</i> mc ² 155	66
4.7.8 Propagação <i>M. smegmatis</i> mc2155 recombinantes	68
4.7.9 Análise do perfil proteico de cepas recombinantes de <i>M. smegmatis</i> por SDS-PAGE 12%	69
5 DISCUSSÃO	71
6 CONCLUSÃO	83
7 PERSPECTIVAS	85
8 REFERÊNCIAS	86
9 ANEXO	93

1- INTRODUÇÃO

1.1 Bacillus Calmette-Guérin (BCG) – História

O Bacillus Calmette-Guérin (BCG) é uma vacina centenária que utiliza uma forma atenuada de *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) e é considerada uma medida profilática eficaz para reduzir a incidência da tuberculose (TB) (LUCA; MIHAESCU, 2013). É importante ressaltar que a vacina BCG é atualmente o único imunizante disponível para a prevenção da TB, sendo amplamente reconhecida como a medida de controle mais eficiente para essa doença, incluída no calendário vacinal infantil, e fazendo parte da rotina de imunização de recém-nascidos (OKAFOR & REWANE, 2019).

Historicamente, a vacina BCG foi obtida através de um processo gradual de atenuação de uma cepa virulenta do *M. bovis*, que foi isolada de mastite tuberculosa e doada pelo veterinário e microbiologista francês *Edmond Nocard* (SAKULA, 1983). Após sua criação, a vacina BCG foi clinicamente utilizada pelos pesquisadores franceses *Léon Charles Albert Calmette* e *Jean-Marie Camille Guérin* em estudos sobre a TB humana no Instituto Pasteur de Lille, França (TARSHINOVA *et al.*, 2025). Assim, em 1921, a vacina BCG foi administrada pela primeira vez, por via oral, a uma recém-nascida cuja mãe apresentava tuberculose. Posteriormente, observou-se que a criança não desenvolveu a doença (SAKULA, 1983). Com base nesse resultado promissor, no ano seguinte a vacinação com BCG em recém-nascidos foi realizada em larga escala, sem a ocorrência de efeitos colaterais significativos (LAGRANGE, 1998). Como consequência, a vacina foi gradualmente adotada em diferentes países, tornando-se amplamente disponível para uso humano (LANGE *et al.*, 2022). A partir de 1927, a vacina BCG passou a ser administrada por via intradérmica, e essa mudança na forma de aplicação permitiu uma melhor absorção e eficácia da vacina, contribuindo para sua disseminação e utilização mais ampla no combate à TB (TARSHINOVA *et al.*, 2025).



FIGURA 1: Imagem ilustrando uma série de fotografias históricas do Dr. Guérin em seu laboratório de pesquisa, expostas no Museu do Instituto Pasteur de Lille, França.

Atualmente, a vacina BCG é amplamente utilizada em todo o mundo e oferece diversas vantagens bem evidenciadas: **(1) Administração em uma única dose:** A BCG é administrada em uma única dose no primeiro mês de vida, por via intradérmica. Além disso, ela não é afetada pelos anticorpos maternos, o que significa que pode ser administrada logo após o nascimento (KAUFMANN *et al.*, 2022); **(2) Baixo custo de produção:** A BCG possui um custo de produção relativamente baixo, o que a torna mais acessível em termos de saúde pública (MANGTANI *et al.*, 2014); **(3) Ação adjuvante de componentes da parede celular:** A BCG tem a capacidade de atuar como um adjuvante natural, estimulando uma resposta imunológica mais eficaz. Isso ocorre devido à presença de componentes da parede celular do *M. bovis*, que auxiliam na ativação do sistema imunológico (STOVER *et al.*, 1991).

De modo geral, a imunização da população é considerada uma estratégia de grande relevância econômica e com benefícios de longo prazo para a saúde pública (LANGE *et al.*, 2022). Nesse contexto, a vacina BCG permanece como o único imunizante disponível e

comprovadamente eficaz para a prevenção da tuberculose (KAUFMANN *et al.*, 2022). No entanto, alguns estudos apresentam resultados contraditórios em relação à sua eficácia e descrevem algumas limitações associadas a essa vacina, incluindo: **(1) Ausência de efeitos duradouros:** Estudos sugerem que a eficácia da vacina BCG pode diminuir ao longo do tempo, resultando na necessidade de doses de reforço ou em uma proteção menos duradoura contra a TB (KAUFMANN *et al.*, 2022; LAWRENCE, 2024); **(2) Limitações contra a forma pulmonar em adultos:** Há relatos de que a vacina BCG pode ser menos eficaz na prevenção da forma pulmonar da TB em adultos (MANGTANI *et al.*, 2014; WILSON *et al.*, 2023). Isso significa que sua eficácia pode variar dependendo da faixa etária e da forma clínica da doença. É importante destacar que a eficácia da vacina BCG pode variar em diferentes contextos e populações, e mais estudos são necessários para esclarecer completamente suas limitações e benefícios (KAUFMANN *et al.*, 2022).

Mesmo após mais de um século de utilização, a BCG continua sendo a principal medida de prevenção da tuberculose em escala global (TARSHINOVA *et al.*, 2025). Embora desempenhe um papel importante na proteção contra várias formas clínicas da doença, estudos anteriores sugerem que sua eficácia na prevenção da forma pulmonar, cerca de 80% mais comum em adultos, pode variar amplamente, entre 0% e 80% (MANGTANI *et al.*, 2014). Embora a vacina BCG ofereça proteção significativa contra a meningite tuberculosa infantil (TB meníngea) e a forma miliar disseminada da TB (TB miliar), ela continua sendo ineficaz na prevenção da forma pulmonar da doença em diversos contextos (LANGE *et al.*, 2022). Essa limitação, junto ao advento do HIV e dos bacilos multirresistentes do MTB (TB-MDR), seria um dos principais fatores que contribuíram para o aumento da carga global de TB (Lange *et al.*, 2022).

As razões para a variação na eficácia da BCG são atualmente desconhecidas, mas existem várias hipóteses sobre os fatores que podem contribuir para essa variabilidade. Entre esses fatores, incluem-se: **(1) diferenças entre as cepas vacinais utilizadas; (2) exposição prévia da população a micobactérias ambientais; (3) variações nutricionais e genéticas entre as diferentes populações; e (4) diferenças nos isolados clínicos de MTB** (LANGE *et al.*, 2022).

Apesar de existirem diferentes vacinas BCG baseadas em diversas cepas disponíveis mundialmente (DHANAWADE *et al.*, 2015), no Brasil, até 2018, a cepa BCG utilizada para a vacinação contra a TB era a BCG Moreau, produzida pela Fundação Ataulpho de Paiva - FAP

(BENÉVOLO/BENÉVOLE-DE-ANDRADE *et al.*, 2005). No entanto, a partir daquele ano foi implementada a utilização da cepa BCG Russa, produzida pelo Laboratório *Serum Institute of India* - SII, para a vacinação de recém-nascidos contra a TB (WHO, 2018). Embora compartilhem uma origem comum, as diferentes cepas da vacina BCG acumularam modificações genéticas e fenotípicas ao longo do tempo, resultando em características biológicas distintas que podem influenciar diretamente sua imunogenicidade e desempenho vacinal.

1.2 Cepas da Vacina BCG

Desde 1948, o uso da vacina BCG tem sido amplamente incentivado pela Organização Mundial da Saúde (OMS). No Brasil, sua utilização foi recomendada a partir de 1976, sendo atualmente indicada para todos os recém-nascidos comprovadamente imunocompetentes (WHO, 2018). A distribuição da vacina BCG para mais de 60 países pelo mundo teve início em 1928, com o objetivo de imunizar crianças e adultos no combate à TB extrapulmonar (LANGE *et al.*, 2022). O próprio Dr. Guérin distribuiu cepas do BCG por meio de fatias de batata embebidas em glicerol (SAKULA, 1983). Após sua confirmação da eficácia e da segurança de trabalhar com o bacilo sem risco de doença, o mesmo foi distribuído para diversos laboratórios, que desenvolveram suas próprias cepas a partir da cepa BCG Pasteur original, tornando-as lotes-sementes (ABDALLA *et al.*, 2015). Recomenda-se que, para a preparação das vacinas, não sejam realizadas mais de 12 passagens de cada lote-semente (TARSHINOVA *et al.*, 2025).

Após a distribuição inicial, surgiram 24 cepas da vacina BCG, a maioria delas ainda em uso, com características distintas, sendo as principais diferenças relacionadas à quantidade de células viáveis em cada dose da vacina e ao genoma dos bacilos (ANTAS, 2016). Com o objetivo de compreender a evolução e a atenuação dessas cepas, estudos de comparação genômica foram realizados, os quais revelaram as modificações genéticas ocorridas em cada cepa (LANGE *et al.*, 2022). Atualmente, os principais laboratórios certificados pela OMS para produzirem as cepas de BCG comercializadas incluem o Pasteur-Merieux-Connaught (BCG Pasteur), na França; o Statens Serum Institute (BCG Dinamarques), na Dinamarca; a Evans Medeva (BCG Glaxo), no Reino Unido; e o Japan BCG Laboratory (BCG Japão), no Japão (BENÉVOLE-DE-ANDRADE *et al.*, 2005).

Todas as vacinas em uso atualmente foram derivadas da cepa BCG Pasteur original da França, e foram distribuídas para outros países com modificações, resultando em novas cepas (Figura 2). Durante o processo de atenuação, ocorrido ao longo de 231 passagens, a vacina BCG sofreu diversas modificações genômicas e bioquímicas, resultando na deleção de regiões associadas à virulência, como a RD-1 (LIU *et al.*, 2009). Essa região, presente na maioria das micobactérias virulentas, está relacionada à expressão de proteínas envolvidas na patogenicidade, incluindo CFP-10, ESAT-6 e o sistema de secreção ESX-1 (ABDALLAH *et al.*, 2007). A ausência desses componentes contribui significativamente para o perfil atenuado da cepa vacinal (ABDALLAH *et al.*, 2007; GRÖSCHEL *et al.*, 2021). Devido à falta de interação entre essas proteínas, o bacilo perde sua capacidade de escapar do fagolisossomo, sendo fagocitado e, consequentemente, gerando uma resposta imune mais eficiente (MANGTANI *et al.*, 2014).

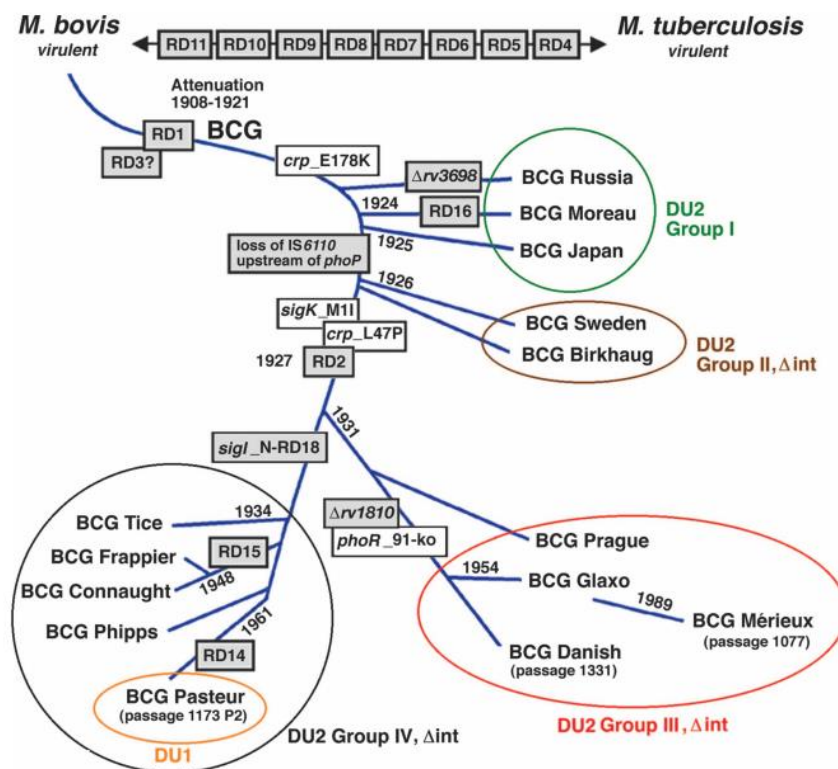


FIGURA 2- Imagem ilustrando um esquema representativo da **genealogia das vacinas BCG**. Onde estão representando o sequenciamento das cepas de BCG, seus novos nomes, datas de aquisição, Regiões de Deleção (RD) e os grupos identificados pelos eventos de duplicação em tandem DU1 e DU2. **Fonte:** Adaptado de Brosh *et al.* (2007).

Ao longo do tempo, alterações e remoções adicionais em diferentes regiões do genoma da BCG foram observadas. A região conhecida como RD-2 também está ausente em determinadas variantes da BCG (LIU *et al.*, 2009). As cepas que se assemelham mais à cepa BCG Pasteur original, como a cepa Moreau, comercializada no Brasil, assim como as produzidas na Rússia e no Japão, ainda possuem bacilos que mantêm a presença da região RD-2 (conforme ilustrado na Figura 2). No entanto, apesar das deleções e das variações genômicas, ainda não existem informações suficientes para estabelecer uma cepa vacinal como superior ou mais protetora em relação às demais (LUCA; HHHMIHAESCU, 2013). Entre os principais fatores associados às diferenças imunológicas observadas entre as cepas vacinais destacam-se as variações na expressão de proteínas micobacterianas envolvidas na antigenicidade e na ativação da resposta imune celular, como HBHA, MPB64 e outros antígenos relacionados à virulência do complexo MTB.

1.3 Proteínas contidas na vacina BCG

A vacina BCG contém várias proteínas com função imunogênica em sua composição. O bacilo completo ou seus componentes isolados podem ativar monócitos, macrófagos ou células dendríticas, desempenhando a função de apresentar antígenos e ativar células T (REYES *et al.*, 2019). A cepa BCG Moreau está mais relacionada filogeneticamente à cepa BCG Pasteur original, e alguns estudos indicam que ela é uma das cepas mais imunogênicas (GOMES *et al.*, 2011; BÊRREDO-PINHO *et al.*, 2011). Como é uma cepa primária, a BCG Moreau ainda mantém em sua composição o gene *rv1980c*, que codifica a proteína imunogênica MPB64, uma proteína específica do complexo MTB e secretada (ABDALLA *et al.*, 2015).

A proteína MPB64 tem demonstrado reatividade *in vivo* e é amplamente utilizada em testes cutâneos para melhorar o diagnóstico da TB latente (CHEN *et al.*, 2018). Essa proteína é codificada na região RD-2 do genoma da bactéria virulenta (GEISBRECHT *et al.*, 2006) e, por ser uma proteína exócrina, pode ser encontrada no meio de cultura (CHEN *et al.*, 2018). A MPB64 tem sido amplamente estudada para melhorar a antigenicidade e a imunogenicidade da vacina BCG (NAKAISHI *et al.*, 2019; SAKASHITA *et al.*, 2020).

Recentemente, as pesquisas para o aprimoramento de vacinas contra a TB têm se concentrado na substituição da BCG, na recombinação por diversos mecanismos ou na

atenuação do próprio MTB (DHANDA *et al.*, 2023; SALAHLOU *et al.*, 2024). Poucos antígenos foram testados nessas abordagens, e um deles é a hemaglutinina de ligação à heparina (HBHA). Estudos têm demonstrado que a HBHA oferece proteção contra a TB, ajudando a evitar o desenvolvimento da forma clínica extrapulmonar da doença. Além disso, essa proteína está associada aos mecanismos de adesão micobacteriana e disseminação extrapulmonar, sendo considerada um importante fator de virulência e persistência do MTB no hospedeiro (VERWAERDE *et al.*, 2014).

A HBHA é um antígeno de superfície da micobactéria que desempenha um papel na patogênese da TB (DELOGU *et al.*, 2004). A resposta imune do hospedeiro à HBHA varia dependendo do estado da doença no paciente (BETTENCOURT *et al.*, 2020). Atualmente, vários estudos apoiam a utilização da HBHA como um biomarcador útil para a identificação da TB e como um potencial antígeno para melhorar a eficácia da vacina BCG (DE MAIO *et al.*, 2019). Essas pesquisas fornecem percepções promissoras para o desenvolvimento de novas estratégias vacinais contra a TB.

A resposta imune do hospedeiro contra MTB é mediada pelo eixo IL-12/IFN- γ (WITT, 2023). No controle da infecção por micobactérias, IL-12, IL-6 e TNF- α desempenham uma função primordial (HOKEY & GINSBERG, 2013). Essas citocinas atuam em conjunto com o IFN- γ , estimulando a função tuberculostática dos macrófagos, e promovendo a migração de células imunes para o local da infecção. Essa interação contribui para a formação do granuloma, que desempenha um papel crucial no controle da progressão da doença (BULL *et al.*, 2019). O IFN- γ é a principal citocina envolvida na resposta imune contra micobactérias, sendo responsável pela ativação dos macrófagos, permitindo que eles exerçam suas propriedades microbidas (CAVALCANTI *et al.*, 2012).

Com os avanços da biotecnologia e da bioinformática, temos agora acesso a uma vasta quantidade de informações sobre o contexto imunogênico do hospedeiro em relação à vacina BCG e ao MTB (KHAN *et al.*, 2022). Isso nos proporciona perspectivas promissoras para o aprimoramento de vacinas. Nesse cenário científico, há uma busca por peptídeos capazes de induzir uma resposta imune efetiva (SÖLLNER *et al.*, 2006). Para atender a essa demanda, várias ferramentas são utilizadas para realizar análises *in silico*, garantindo resultados mais confiáveis (DHANDA *et al.*, 2023). Essas ferramentas incluem previsões populacionais por meio da busca de epítomos, avaliação da produção de citocinas, seleção de peptídeos, entre

outros mecanismos (ANSARI & RAGHAVA, 2010; GAO *et al.*, 2012; NOYA *et al.*, 2003). Essas abordagens computacionais desempenham um papel fundamental no processo de desenvolvimento de vacinas, permitindo uma análise mais precisa e direcionada dos potenciais alvos imunogênicos (KHAN *et al.*, 2022).

Nos cenários mencionados, é evidente que os testes *in vitro* são consistentes com as análises *in silico*, o que auxilia na identificação de candidatos promissores para expressão na vacina BCG Moreau (DHANDA *et al.*, 2023). Essa abordagem permite potencializar a produção de uma resposta imune protetora contra o MTB. Nesse contexto, a bioinformática desempenha um papel crucial ao auxiliar na confirmação dos resultados promissores com os imunizantes a antígenos imunodominantes da vacina BCG (KHAN *et al.*, 2022). Através da análise de dados computacionais, é possível selecionar de forma mais precisa e eficiente os antígenos que têm maior potencial para induzir uma resposta imune protetora contra o MTB, contribuindo para o desenvolvimento de vacinas mais eficazes e seguras (DHANDA *et al.*, 2023).

1.4 Imunoinformática e vacinas multiepítipo

O avanço das ferramentas de imunoinformática e da biotecnologia tem revolucionado o desenvolvimento dos imunizantes, permitindo a identificação de antígenos e epítomos imunogênicos com maior precisão e menor custo experimental (KHAN *et al.*, 2022). Essas abordagens utilizam bancos de dados biológicos, algoritmos preditivos e ferramentas computacionais capazes de avaliar afinidade por moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), antigenicidade, imunogenicidade e potencial de indução de citocinas, contribuindo significativamente para o desenvolvimento de imunizantes mais direcionados e eficientes (ANSARI; RAGHAVA, 2010; GAO *et al.*, 2012).

Nesse contexto, a vacinologia reversa é uma estratégia promissora para identificação sistemática de candidatos vacinais a partir da análise genômica e proteômica de patógenos (RAPPUOLI *et al.*, 2011). Diferentemente das abordagens clássicas, que dependem do cultivo e caracterização experimental dos microrganismos, a vacinologia reversa permite selecionar proteínas potencialmente imunogênicas diretamente a partir de dados genéticos, acelerando o processo de descoberta de antígenos vacinais (TANG *et al.*, 2011). Essa estratégia tem sido

amplamente empregada no desenvolvimento de vacinas contra TB, especialmente devido à elevada complexidade antigênica do complexo MTB (DHANDA *et al.*, 2023).

Entre as principais aplicações da imunoinformática destaca-se o desenvolvimento de vacinas multiepítopo, que consistem na combinação racional de múltiplos epítomos imunogênicos capazes de estimular diferentes populações celulares do sistema imune, incluindo linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e células B (MORTAZAVI; MOLAEI; FARD, 2024). Essas vacinas apresentam vantagens importantes, como maior especificidade imunológica, redução de efeitos adversos associados a componentes desnecessários do patógeno e potencial ampliação da cobertura populacional, considerando a diversidade de moléculas HLA presentes em diferentes populações humanas (ARRIETA-BOLAÑOS; HERNÁNDEZ-ZARAGOZA; BARQUERA, 2023).

Além disso, a seleção adequada de epítomos pode favorecer a indução de respostas imunes do tipo Th1, consideradas fundamentais para o controle da infecção pelo MTB, especialmente por meio da produção de IFN- γ e ativação de macrófagos (WITT, 2023). Nesse cenário, proteínas imunogênicas como MPB64 e HBHA têm despertado interesse crescente devido à sua capacidade de induzir respostas celulares protetoras e à presença de epítomos reconhecidos por diferentes moléculas de MHC (BETTENCOURT *et al.*, 2020).

Embora as abordagens *in silico* tenham ampliado significativamente a velocidade de identificação de candidatos vacinais promissores, a validação experimental permanece indispensável para confirmar a expressão, estabilidade e funcionalidade biológica dos antígenos selecionados (KHAN *et al.*, 2022). Assim, a integração entre imunoinformática e biotecnologia moderna tem possibilitado o desenvolvimento racional de sistemas recombinantes voltados à produção, caracterização e avaliação de antígenos micobacterianos com potencial aplicação vacinal.

1.5 Abordagens biotecnológicas para o desenvolvimento de vacinas contra a TB

O progresso no campo das vacinas tem sido impulsionado por avanços tecnológicos, especialmente no âmbito da biotecnologia, promovendo o desenvolvimento de imunizantes mais seguros, eficazes e direcionados (BRAZ *et al.*, 2014). Essas inovações impactaram diretamente as vacinas de primeira e segunda gerações, tradicionalmente voltadas à

prevenção de doenças, e possibilitaram o surgimento de uma terceira geração, como as vacinas de DNA, ampliando o potencial de aplicação para abordagens terapêuticas, incluindo doenças não infecciosas, como o câncer (BRAZ *et al.*, 2014). Nesse contexto, o desenvolvimento de novas vacinas é considerado uma estratégia essencial para o controle global da TB, uma vez que imunizantes mais eficazes podem reduzir a transmissão, prevenir a progressão da TB latente, diminuir a duração do tratamento e, consequentemente, impactar a mortalidade associada à doença (BRENNAN, 2012; BRENNAN *et al.*, 2012).

Diante das limitações do BCG, diferentes estratégias vêm sendo exploradas, incluindo vacinas recombinantes (rBCG), vacinas de reforço (*booster*), e vacinas terapêuticas (MORTAZAVI, 2024). As abordagens terapêuticas, por sua vez, envolvem desde proteínas de subunidade e fusões proteicas, até fragmentos bacterianos encapsulados em sistemas de entrega, como lipossomos, além do uso de micobactérias inativadas (CUEVAS, 2017). Paralelamente, o avanço da genômica, da proteômica e das ferramentas biotecnológicas tem ampliado significativamente as possibilidades de identificação e produção de antígenos recombinantes com potencial aplicação vacinal (KHAN *et al.*, 2022).

Nesse cenário, abordagens como proteômica e vacinologia reversa têm se destacado como ferramentas essenciais na identificação de novos imunizantes (SALAHLOU *et al.*, 2024). A proteômica permite a análise em larga escala de proteínas expressas em diferentes fases da infecção, ampliando significativamente o número de antígenos potenciais (JENA *et al.*, 2011; KHAN *et al.*, 2022). Contudo, embora essas abordagens acelerem significativamente a identificação de candidatos vacinais promissores, a confirmação experimental da funcionalidade biológica desses antígenos ainda representa um importante desafio no desenvolvimento de vacinas contra a TB (WITT, 2023; COPPOLA *et al.*, 2018).

A aplicação da vacinologia reversa tem acelerado significativamente a identificação de candidatos antigênicos contra MTB, ampliando o repertório de proteínas com potencial utilização em plataformas vacinais recombinantes (RAPPUOLI *et al.*, 2011; TANG *et al.*, 2011). Essa estratégia tem acelerado significativamente o desenvolvimento de vacinas contra a TB, ampliando o repertório de candidatos antigênicos disponíveis para investigação (DHANDA *et al.*, 2023).

Apesar do grande avanço proporcionado pelas abordagens *in silico*, é importante destacar que essas ferramentas apresentam limitações inerentes quando utilizadas de forma

isolada (KHAN *et al.*, 2022). As predições computacionais baseiam-se em modelos matemáticos e bancos de dados previamente disponíveis, não sendo capazes de reproduzir integralmente a complexidade estrutural e funcional dos sistemas biológicos, como o dobramento proteico, modificações pós-transducionais, estabilidade estrutural, e interação com o maquinário celular do hospedeiro (KHAN *et al.*, 2022). Dessa forma, epítomos considerados promissores em nível teórico podem não apresentar o mesmo desempenho quando expressos em sistemas biológicos reais (SLOUKA *et al.*, 2019). Nesse contexto, a validação experimental torna-se uma etapa essencial no desenvolvimento de candidatos vacinais, permitindo confirmar a expressão, a solubilidade e o comportamento das proteínas recombinantes, além de fornecer evidências mais robustas sobre o seu potencial biotecnológico (SINGH *et al.*, 2015). Assim, a integração entre abordagens imunoinformáticas e sistemas experimentais emerge como uma estratégia fundamental para a seleção e caracterização de antígenos mais confiáveis e biologicamente relevantes (KHAN *et al.*, 2022).

Apesar desses avanços, a vacina BCG ainda apresenta eficácia variável, especialmente na prevenção da TB pulmonar em adultos, além de depender de um repertório antigênico limitado e, por vezes, insuficiente para induzir respostas imunes celulares robustas envolvendo linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (MANGTANI *et al.*, 2014; DA COSTA *et al.*, 2014). Paralelamente, embora a imunoinformática e a vacinologia reversa tenham possibilitado a identificação de epítomos altamente promissores, a maioria desses estudos permanece restrita ao nível computacional, sem validação experimental adequada. Dessa forma, evidencia-se uma lacuna crítica na literatura: a ausência de abordagens integradas que associem a predição *in silico* de epítomos com sua validação funcional em sistemas biológicos, particularmente em modelos micobacterianos (BETTENCOURT *et al.*, 2020; MORTAZAVI *et al.*, 2024).

Nesse contexto, torna-se evidente a necessidade de estratégias combinadas que integrem ferramentas imunoinformáticas com sistemas experimentais de expressão heteróloga e caracterização proteica (KHAN *et al.*, 2022). Essa abordagem permite não apenas a identificação de epítomos promissores, mas também a avaliação de sua expressão, estabilidade e comportamento em ambiente biológico, contribuindo de forma mais robusta para o desenvolvimento de candidatos vacinais mais eficazes e biologicamente relevantes (SALAHLOU *et al.*, 2024). Nesse sentido, sistemas de expressão heteróloga em micobactérias

têm sido amplamente utilizados para a validação experimental de proteínas recombinantes derivadas do complexo MTB, permitindo a avaliação de parâmetros fundamentais, como níveis de expressão, estabilidade, solubilidade e potencial imunogênico dos antígenos selecionados (CHAWLA; DAS GUPTA, 1999; NOENS *et al.*, 2011; PARIKH *et al.*, 2013; DA COSTA *et al.*, 2014).

1.6 Sistemas experimentais para expressão heteróloga em micobactérias

A validação experimental de candidatos antigênicos requer sistemas de expressão capazes de reproduzir, de forma confiável, características estruturais e funcionais de proteínas micobacterianas (ROSANO; CECCARELLI, 2014). Nesse contexto, os sistemas heterólogos baseados em micobactérias têm se destacado como ferramentas promissoras para a produção e caracterização de proteínas recombinantes. Essa abordagem apresenta vantagens em relação a sistemas bacterianos convencionais, como *Escherichia coli*, uma vez que estes frequentemente não conseguem reproduzir adequadamente modificações pós-traducionais, padrões de dobramento proteico e outros processos celulares característicos das micobactérias (NOENS *et al.*, 2011). Como resultado, proteínas expressas em hospedeiros micobacterianos tendem a apresentar propriedades mais próximas das observadas em seu contexto biológico original, favorecendo sua aplicação em estudos imunológicos e no desenvolvimento de vacinas.

Dentre os modelos disponíveis, *M. smegmatis mc²155* é amplamente utilizada como organismo hospedeiro para expressão heteróloga (GORDHAN *et al.*, 2006). Essa espécie apresenta crescimento rápido, formando colônias visíveis em poucos dias, além de ser considerada não patogênica, o que facilita seu manuseio em condições laboratoriais padrão (GORDHAN *et al.*, 2006). Adicionalmente, *M. smegmatis* compartilha similaridades fisiológicas e estruturais com micobactérias patogênicas, incluindo maquinaria de secreção e sistemas de modificação proteica, tornando-se um modelo experimental relevante para estudos de expressão e caracterização de proteínas de MTB (NOENS *et al.*, 2011).

Outro aspecto importante é a disponibilidade de vetores de expressão bem caracterizados para micobactérias, como pMV261 e pMV361, amplamente utilizados em estudos de biotecnologia e imunologia (CHAWLA; DAS GUPTA, 1999). O vetor pMV261 é um

plasmídeo replicativo (episomal), que permite altos níveis de expressão gênica devido à sua manutenção em múltiplas cópias dentro da célula hospedeira (DAO *et al.*, 2025). Essa característica o torna particularmente útil para a produção de grandes quantidades de proteína recombinante (STOVER *et al.*, 1991; CHAWLA; DAS GUPTA, 1999; DAO *et al.*, 2025). Por outro lado, o vetor pMV361 é um sistema integrativo, que se incorpora ao genoma bacteriano, garantindo maior estabilidade genética e manutenção da expressão ao longo de sucessivas gerações, ainda que, em geral, com níveis de expressão mais moderados (PARIKH *et al.*, 2013).

A utilização combinada desses sistemas permite avaliar diferentes perfis de expressão proteica, considerando tanto a eficiência de produção quanto a estabilidade da proteína recombinante (SLOUKA *et al.*, 2019). Essa abordagem é especialmente relevante em estudos que envolvem proteínas potencialmente tóxicas ou propensas à agregação, como frequentemente observado em sistemas de expressão heteróloga (ROSANO; CECCARELLI, 2014). Além disso, a escolha do sistema de expressão pode influenciar diretamente a solubilidade, o dobramento e a funcionalidade das proteínas produzidas, fatores críticos para sua aplicação em estudos imunológicos e no desenvolvimento de vacinas (SINGH *et al.*, 2015; SLOUKA *et al.*, 2019).

Dessa forma, a utilização de *M. smegmatis* associada aos vetores pMV261 e pMV361 representa uma estratégia experimental consolidada para a expressão de proteínas micobacterianas recombinantes. Essa abordagem permite não apenas a produção de antígenos em um sistema biologicamente relevante, mas também a avaliação de parâmetros essenciais, como níveis de expressão, solubilidade e estabilidade proteica, estabelecendo uma base experimental sólida para a validação de candidatos vacinais identificados por abordagens *in silico* (DAO *et al.*, 2025).

Apesar dos avanços obtidos no desenvolvimento de plataformas recombinantes e novas estratégias vacinais, a TB permanece como um importante problema de saúde pública mundial, reforçando a necessidade contínua de estudos voltados à compreensão da doença e ao desenvolvimento de métodos mais eficazes de prevenção e controle.

1.7 Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada pelo *Mycobacterium*

tuberculosis (MTB). Embora acometa predominantemente os pulmões, caracterizando a forma pulmonar da doença, o MTB possui a capacidade de infectar praticamente qualquer órgão ou tecido do organismo, dando origem às formas extrapulmonares da TB (Silva et al., 2021). A TB permanece como uma das doenças infecciosas mais letais em escala global, gerando expressivo impacto social, econômico e sanitário (Rahlwes et al., 2023). Em 2020, estimou-se que cerca de 10 milhões de pessoas desenvolveram a forma ativa da doença, resultando em aproximadamente 1,4 milhão de óbitos. Nesse período, a TB ocupou a segunda posição entre as principais causas de morte por um único agente infeccioso, sendo superada apenas pela COVID-19 (Kaufmann et al., 2022). De acordo com o Relatório Global da Tuberculose da Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente um quarto da população mundial apresenta infecção latente pelo MTB, constituindo um importante reservatório para o desenvolvimento futuro da doença ativa (WHO, 2021).

Diante da elevada carga global da tuberculose e das limitações associadas à proteção conferida pela BCG, diversas estratégias vacinais vêm sendo desenvolvidas nas últimas décadas com o objetivo de ampliar a eficácia da prevenção contra diferentes formas da doença (OMS, 2021; KAUFMANN *et al.*, 2022; ZHUANG *et al.*, 2023).

1.8 Panorama atual das vacinas candidatas contra a TB

Atualmente, diversos candidatos vacinais encontram-se em fases ou estágios clínicos promissores, explorando abordagens tecnológicas inovadoras, como vacinas de subunidade proteica, vacinas vivas atenuadas, plataformas baseadas em RNA mensageiro (mRNA), vetores virais e formulações híbridas (LACÁMARA; MARTIN, 2023).

TABELA 1- PANORAMA DAS VACINAS CANDIDATAS CONTRA A TB

A Tabela 1 apresenta um panorama atualizado das principais vacinas candidatas contra a TB atualmente em desenvolvimento em âmbito global, destacando suas plataformas tecnológicas, estágios de desenvolvimento clínico, populações-alvo e os principais resultados obtidos em estudos recentes. A diversidade de estratégias vacinais reflete os esforços

contínuos para superar as limitações da vacina BCG e ampliar a proteção contra diferentes formas da doença.

VACINA	TIPO	FASE CLÍNICA	ALVO	OBS	REF.
M72/AS01E	Vacina de subunidade proteica contendo os antígenos Mtb32A e Mtb39A associados ao adjuvante AS01E	Fase III	Adultos/adolescentes com infecção latente de <i>M. tuberculosis</i>	Demonstrou aproximadamente 50–54% de eficácia na prevenção da TB pulmonar ativa em indivíduos com TB latente	TAIT <i>et al.</i> , 2019
VPM1002	BCG recombinante geneticamente modificada	Fase III	Recém-nascidos; substituição ou melhoria da BCG tradicional	Busca maior imunogenicidade e segurança em relação à BCG convencional	KAUFMANN <i>et al.</i> , 2020
DAR-901	Vacina de reforço composta por extrato de micobactéria	Fase II	Como reforço para BCG ou para TB latente	Objetiva estimular imunidade de memória contra TB	MUNSERI <i>et al.</i> , 2020
AEC/BC02	Vacina micobacteriana recombinante	Fase I/II	Crianças e adultos	Candidata vacinal ainda em fases iniciais de avaliação clínica	LU <i>et al.</i> , 2022
GamTBvac	Vacina proteica associada a adjuvante	Fase I/II	Populações em países de alta carga de TB	Apresenta resultados promissores de imunogenicidade em estudos iniciais	LACÁMARA; MARTIN, 2023
TB/FLU-05E	Vacina baseada em vetor influenza recombinante	Fase I/II	Adolescentes e adultos	Estratégia voltada para imunidade mucosa pulmonar	STOSMAN <i>et al.</i> , 2023
ID93 + GLA-SE (QTP101)	Vacina proteica recombinante associada a adjuvante imunológico	Fase I/II	Adultos e populações de risco	Demonstrou segurança e elevada imunogenicidade	CHOI <i>et al.</i> , 2023
RUTI	Vacina terapêutica baseada em fragmentos inativados de <i>M. tuberculosis</i>	Fase II	Pacientes com TB latente ou em tratamento	Busca reduzir reativação da doença e auxiliar na resposta imunológica	ZHUANG <i>et al.</i> , 2023
MIP / Immuvac	Vacina baseada em <i>Mycobacterium indicus pranii</i>	Fase II/III	Adultos e populações de alto risco	Avaliada como vacina de reforço e imunoterapia auxiliar	DOGRA <i>et al.</i> , 2023

VACINA	TIPO	FASE CLÍNICA	ALVO	OBS	REF.
MTBVAC	Vacina viva atenuada derivada de <i>M. tuberculosis</i> humano com deleções gênicas de virulência	Fase III	Recém-nascidos, adolescentes e adultos	Induziu respostas imunes comparáveis ou superiores à BCG, apresentando perfil de segurança adequado	TACHETTE <i>et al.</i> , 2024
ChAdOx1.85A-MVA85A	Vacina baseada em vetor viral	Fase I/II	BCG-revacinação ou reforço em pessoas previamente vacinadas com BCG	Estratégia voltada para amplificação da resposta imune celular	GONG; DU, 2024
BNT164a1 / BNT164b1	Vacina baseada em mRNA	Fase I	Indivíduos previamente vacinados com BCG	São candidatas de mRNA para TB; embora promissoras, ainda em fases iniciais	AGRAWAL <i>et al.</i> , 2025

Fonte: Elaborado pela autora

Entre as vacinas candidatas em estágio mais avançado, M72/AS01E, desenvolvida pela GSK em parceria com a Fundação Bill & Melinda Gates, encontra-se atualmente em fase III, após demonstrar cerca de 50–54% de eficácia na prevenção da TB pulmonar ativa em indivíduos com TB latente (TAIT *et al.*, 2019). Se bem-sucedida, representará a primeira vacina nova contra a TB desde a introdução da BCG (TAIT *et al.*, 2019).

Outra vacina candidata de destaque é a MTBVAC, uma vacina viva atenuada derivada de uma cepa humana de MTB com deleções em genes de virulência (TACHETTE *et al.*, 2024). Em ensaios clínicos recentes, demonstrou respostas imunes comparáveis ou superiores à BCG, além de apresentar perfil de segurança adequado em adultos e recém-nascidos. Essa vacina apresenta potencial para substituir a BCG, oferecendo respostas imunes mais duradouras e imunogenicidade aprimorada (TACHETTE *et al.*, 2024; IAVI, 2025).

A VPM1002, uma rBCG geneticamente modificada, busca aumentar a imunogenicidade e segurança em comparação à formulação tradicional (KAUFMANN *et al.*, 2020). Encontra-se atualmente em fase III, sendo testada em múltiplos países africanos, com o objetivo de substituir ou melhorar a BCG aplicada em recém-nascidos (KAUFMANN *et al.*,

2020).

Outras vacinas de subunidade candidatas também têm apresentado resultados promissores. O candidato ID93 + GLA-SE (QTP101) combina múltiplos antígenos recombinantes com um adjuvante imunológico potente, buscando ampliar a resposta imune celular protetora (CHOI *et al.*, 2023). Ensaios clínicos de fase II demonstraram segurança e elevada imunogenicidade em adultos previamente vacinados com BCG (CHOI *et al.*, 2023). Da mesma forma, o imunógeno GamTBvac, em fases I/II, e o candidato AEC/BC02, em etapas iniciais, representam abordagens baseadas em proteínas e micobactérias recombinantes com resultados pré-clínicos animadores, embora ainda careçam de dados robustos de eficácia em humanos (LACÁMARA; MARTIN, 2023; LU *et al.*, 2022).

Além das estratégias clássicas, novas plataformas têm sido incorporadas ao desenvolvimento vacinal. As vacinas de mRNA BNT164a1 e BNT164b1, desenvolvidas pela BioNTech, demonstraram segurança e imunogenicidade em modelos animais, representando uma nova geração de vacinas contra a TB baseadas em tecnologia de RNA mensageiro (AGRAWAL *et al.*, 2025). Já os candidatos ChAdOx1.85A e MVA85A, da Universidade de Oxford, utilizam vetores virais e estratégias combinadas com o objetivo de ampliar a resposta imune em indivíduos previamente vacinados com BCG, ainda que os resultados clínicos de eficácia permaneçam limitados (GONG; DU, 2024).

Vacinas contra a TB com enfoque terapêutico ou de reforço também vêm sendo estudadas, como a DAR-901, destinada a potencializar a imunidade de memória em indivíduos previamente imunizados com BCG ou portadores de TB latente (MUNSERI *et al.*, 2020). Outras formulações, como RUTI, composta por fragmentos inativados de MTB, buscam reduzir o risco de reativação da infecção e melhorar a resposta imunológica durante o tratamento, ainda que em fase experimental (ZHUANG *et al.*, 2023).

Por fim, o candidato MIP (*Mycobacterium indicus pranii*), também conhecido como Immuvac, vem sendo estudado em ensaios clínicos de Fase II/III, especialmente na Índia, como vacina de reforço imunomodulador (DOGRA *et al.*, 2023). Além de potenciais efeitos profiláticos, tem sido explorada como imunoterapia auxiliar em indivíduos com TB ativa, devido à sua capacidade de estimular amplamente a resposta imune celular (DOGRA *et al.*, 2023).

De forma geral, o cenário atual reflete um renascimento do campo vacinal contra a TB,

caracterizado pela diversificação das plataformas tecnológicas, integração entre instituições públicas e privadas, e condução de ensaios multicêntricos. Embora nenhuma candidata tenha ainda substituído a BCG, os avanços recentes indicam perspectivas concretas para o surgimento de uma nova geração de vacinas, potencialmente capazes de impactar significativamente a prevenção global da TB (ZHUANG et al., 2023).

Nesse contexto, a identificação de antígenos imunogênicos associados ao complexo MTB, aliada ao uso de ferramentas de imunoinformática e sistemas recombinantes de expressão heteróloga, representa uma abordagem promissora para o desenvolvimento racional de novos imunizantes. Proteínas como HBHA e MPB64 destacam-se pelo potencial de indução de respostas imunes celulares relevantes contra a TB, reforçando a importância da investigação de estratégias biotecnológicas voltadas à obtenção e avaliação de antígenos recombinantes com potencial aplicação vacinal. Assim, a integração entre predição *in silico* e validação experimental em sistemas micobacterianos surge como uma alternativa relevante para ampliar o desenvolvimento de candidatos vacinais mais seguros, imunogênicos e biologicamente funcionais.

2-OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial imunogênico de candidatos vacinais baseados em epítomos das proteínas MPB64 e HBHA de *Mycobacterium tuberculosis*, por meio de uma abordagem integrada envolvendo ferramentas de imunoinformática, expressão heteróloga em sistema micobacteriano e caracterização bioquímica e proteica dos antígenos recombinantes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Predizer epítomos de células T (MHC classe I e II) das proteínas MPB64 e HBHA utilizando ferramentas de imunoinformática;
- Avaliar os epítomos preditos quanto à antigenicidade, imunogenicidade, toxicidade e capacidade de indução de citocinas, especialmente o IFN- γ ;
- Realizar análise de cobertura populacional dos epítomos selecionados, considerando diferentes populações humanas;
- Construir sequências multiepítomo a partir dos peptídeos selecionados;
- Clonar as sequências de interesse em vetores de expressão micobacterianos (pMV261 e pMV361);
- Expressar heterologamente recombinantes em *Mycobacterium smegmatis* mc²155;
- Avaliar a expressão das proteínas recombinantes por meio de técnicas bioquímicas, como SDS-PAGE;
- Analisar o perfil de solubilidade e a estabilidade das proteínas recombinantes expressas.

3- MATERIAL E METÓDO

3.1 Procedência do Material

3.1.1 Bacillus Calmette-Guérin cepa Moreau

A cepa *Mycobacterium bovis* BCG Moreau RDJ utilizada neste estudo foi gentilmente fornecida pela Fundação Adolfo de Paiva (FAP), por meio da colaboração do Dr. Luiz Roberto Ribeiro Castello-Branco.

3.1.2 Plasmídeo pMv261; pMv261-HBHA; pMv361 e pMv361-HBHA

Os plasmídeos (pMv261, pMv261-HBHA, pMv361 e pMv361-HBHA) integrativos e cromossomais, contendo ou não a proteína HBHA, foram generosamente cedidos pelo Dr. Mario Alberto Flores-Valdez, do *Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco* (CIATEJ), México.

3.1.3 *Mycobacterium smegmatis*

Mycobacterium smegmatis foi gentilmente cedido pelo INCT-TB da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), por meio da colaboração do Dr. Cristino Valim Bizarro.

3.2 Análises *in silico*

3.2.1 Sequenciamento das proteínas

As sequências de aminoácidos das proteínas MPB64 e HBHA foram utilizadas como referência para as análises. Estas sequências foram obtidas no *GenBank* e formatadas para uso *in silico* nas ferramentas de bioinformática, garantindo compatibilidade com os programas de predição e análise de epítomos.

3.2.2 Predição e seleção inicial de epítomos pelo *Immune Epitope Database* (IEDB)

As sequências foram submetidas à plataforma *Immune Epitope Database* (IEDB), permitindo a identificação de epítomos potenciais com base em interações com MHC-I, MHC-II e frequências genotípicas de *antígeno leucocitário humano* (HLA). Para cada

proteína, os resultados foram apresentados em tabelas contendo todos os epítomos identificados, que constituíram a seleção inicial.

3.2.3 Filtragem dos epítomos

Após a seleção inicial, os epítomos foram submetidos a filtros adicionais para avaliar seu potencial imunológico, como (1) eliminação de peptídeos repetidos: epítomos duplicados presentes nas tabelas geradas pelo IEDB foram removidos; (2) a afinidade alelo-epítomo: epítomos com *percentile rank* (% RANK) menor que 1% foram considerados de alta afinidade e priorizados, enquanto valores maiores que 1% foram descartados; (3) a imunogenicidade: avaliada no IEDB; epítomos próximos de 1 no escore de imunogenicidade foram considerados mais confiáveis; (4) a toxicidade: analisada pela ferramenta *ToxinPred*, permitindo a identificação de regiões potencialmente tóxicas. Epítomos classificados como positivos para toxicidade foram descartados; (5) a antigenicidade: determinada pelo programa *VaxiJen v2.0*, onde epítomos com escore $\geq 0,4$ foram considerados imunogênicos; e (6) a produção de IFN- γ : analisada pelo programa *IFNepitope*, para identificar regiões capazes de induzir a produção da citocina. Apenas os epítomos que atenderam a todos os filtros acima foram considerados para a predição populacional final, realizada novamente pelo IEDB, abrangendo populações do Brasil e do mundo.

3.2.4 Cobertura populacional

A análise de cobertura populacional foi realizada na plataforma IEDB, na opção “*Population Coverage*”. Para cada epítomo, foram informados os alelos correspondentes e as interações com MHC-I e MHC-II, conforme obtidos nas etapas anteriores. A plataforma calculou a cobertura populacional com base nesses dados, fornecendo a porcentagem de indivíduos capazes de apresentar resposta imunológica ao epítomo considerado.

3.2.5 Frequência de HLA

A análise de frequência dos alelos do HLA foi realizada para identificar os alelos mais prevalentes no Brasil e no mundo. Considerando que os antígenos bacterianos são apresentados aos linfócitos T CD4+ no contexto do HLA de classe II, a análise teve como objetivo subsidiar a seleção de epítopos capazes de interagir com domínios específicos dessas moléculas. As frequências alélicas foram obtidas utilizando a ferramenta *Allele Frequency Net Database* (www.allelefrequencies.net), que disponibiliza dados derivados de estudos populacionais publicados, permitindo descrever a diversidade genética em nível individual e coletivo. Para análise dos alelos mais recorrentes nas predições de epítopos foram selecionados: HLA-A*01:01, HLA-A*03:01 e HLA-A*11:01. Esses alelos foram avaliados quanto à sua distribuição populacional segundo os parâmetros fornecidos pela plataforma.

3.2.6 Clonagem das sequências codificadoras da proteína MPB64 nos vetores de expressão pMv261, pMv361, pMv261-HBHA e pMv361-HBHA

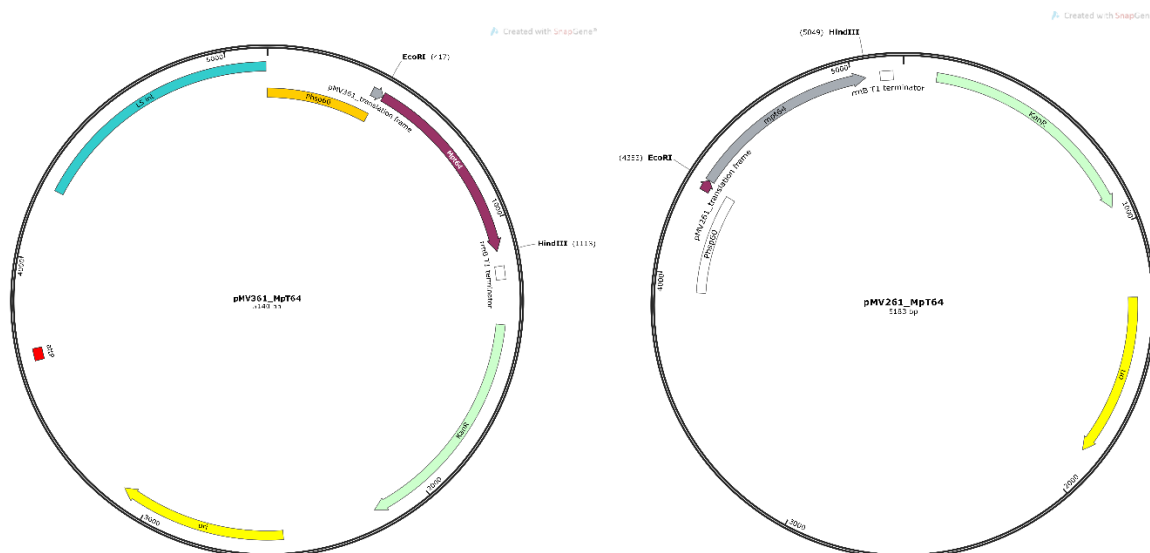


FIGURA 3: Representação esquemática dos vetores **A:**pMv261-MpT64 e **B:**pMv361-MpT64 resistentes a KanR e contendo o gene do Mpt64 com as enzimas de restrição HindIII e EcoRI. **A:** vetor cromossomal contém um promotor pHsp60, duas origens de expressão Ori-M (*mycobacterium*) e Ori-E (*Escherichia coli*). **B:** vetor integrativo contém o promotor pHsp60, inserção de integração L5, origem de expressão Ori-M e attP.

MpT64

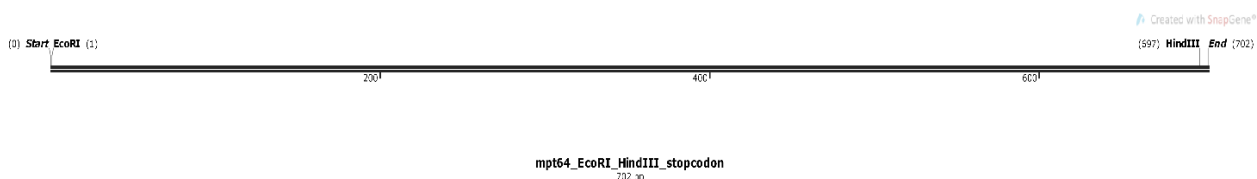


FIGURA 4: Representação esquemática do gene de MpT64 contendo 702pb com as enzimas de restrição HindIII e EcoRI, que foi clonado nos plasmídeos de interesse.

	SEQUENCIAMENTO	PB
MpT64	GAATTCGTGCGCATCAAGATCTTCATGCTGGTCACGGCTGTCGTTTTGCTCTGTTGTTTCGGGTGTGGCCACG GCCGCGCCCAAGACCTACTGCGAGGAGTTGAAAGGCACCGATACCGGCCAGGCGTGCCAGATTCAAATGT CCGACCCGGCCTACAACATCAACATCAGCCTGCCAGTTACTACCCCGACCAGAAGTCGCTGGAAAATTAC ATCGCCAGACGCGCGACAAGTTCCTCAGCGCGGCCACATCGTCCACTCCACGCGAAGCCCCCTACGAATT GAATATCACCTCGGCCACATACCAGTCCGCGATACCGCCGCGTGGTACGCGAGGCCGTGGTGCTCAAGGTCT ACCAGAACGCCGGCGGCACGCACCCAACGACCACGTACAAGGCCCTTCGATTGGGACCAGGCCTATCGCAA GCCAATCACCTATGACACGCTGTGGCAGGCTGACACCGATCCGCTGCCAGTCGTCTTCCCATTTGTGCAAG GTGAACTGAGCAAGCAGACCGGACAACAGGTATCGATAGCGCCGAATGCCGGCTTGGACCCGTTGAATTA TCAGAACTTCGAGTCACGAACGACGGGTGATTTCTTCTTCAACCCGGGGGAGTTGCTGCCCGAAGCAG CCGGCCCAACCCAGGTATTGGTCCCACGT TCCGCGATCGACTCGATGCTGGCCTAGTAAAAGCTT	
Vetor	TCTTCGGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTGCTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCA AAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAG CAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCA TCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCC CTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCTGTTCCGACCTGCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTC GGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGC TGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCA ACCCGGTAAGACAGCACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGT AGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCT GCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAGAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCCGCT GGTAGCGGTGGTTTTTTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTT GATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAACTCACGTAAAGGGATTTTGGTCATGAGATTAT CAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGT AAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTGTTTCATC CATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTG CAATGATACCGCGAGACCCACGCTACCGGCTCCAGATTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCC GAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGT AAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTC GTTTGGTATGGCTTCAATTCAGCTCCGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAA AAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGT TATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTCTGCTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCA ACCAAGTCAATCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGGCCGGCGTCAATACGGGATAATAC CGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAGTGTCTCATATTGGAAAACGTTCTTGGGGCGAAAACTCTCAAGGA TCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAAGTATCTTCAGCATCTTTTACTTT CACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACG GAAATGTTGAATACTCATCTCTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTATTGTCTCATGAGC GGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAAGTGCC ACCTGACGTCTAAGAAACCATTTATATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCAGAGGCCCTTTTCG TCTCGCGCTTTTCGGTGATGACGGTGAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTGTC TGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGCT GGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAG	702

	ATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCCATTGCGCATTAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGA TCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGG TAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAACGACGGCCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGG ATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATT GTTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGA GTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTG CATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGC	
--	--	--

Puc19_MpT64

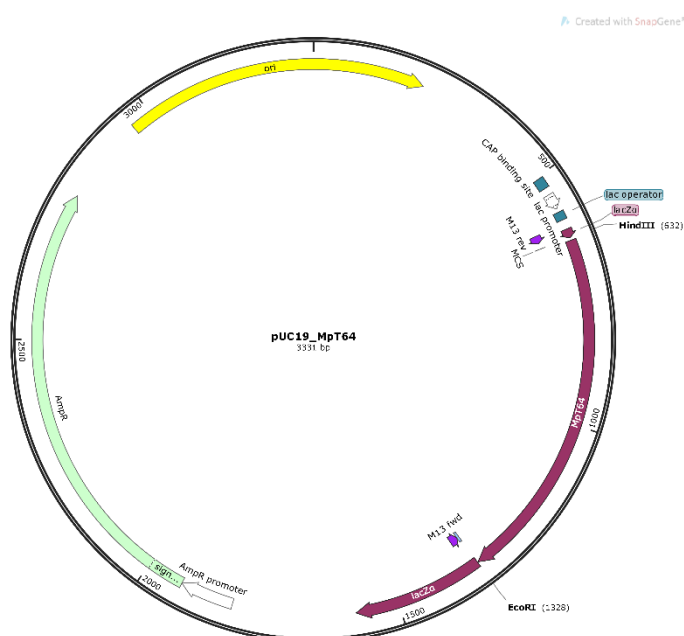


FIGURA 5: Representação esquemática do vetor pUC19_MpT64 com resistência AmpR (Ampicilina), com promotor LacZa, origem de expressão Ori-M (*mycobacterium*), genes do Mpt64 com as enzimas de restrição HindIII e EcoRI.

3.3 Análises *in vitro*

3.3.1 Cultivo da Vacina *M. bovis* BCG Moreau

Os cultivos da vacina BCG cepa Moreau foram realizados em meio líquido *Middlebrook* 7H9, suplementado com 0,5% de glicerol, 0,05% de *Tween* 80 e 10% de OADC (Albumina, Dextrose e Catalase), denominado MB7H9OADC. Para o crescimento em tubos de vidro, os cultivos foram incubados por um período de quatro a seis semanas em estufa a 37°C,

sob atmosfera contendo 5% de CO₂. Os cultivos em meio sólido foram realizados em meio *Middlebrook* 7H10, suplementado com 0,5% de glicerol, 0,05% de *Tween* 80 e 10% de OADC (MB7H10OADC). As placas foram incubadas por um período de quatro a oito semanas nas mesmas condições (37°C e 5% de CO₂) para o crescimento e a contagem das unidades formadoras de colônias (CFU).

3.3.2 Contagem de *M. bovis* BCG pela técnica de coloração de Kinyoun

A contagem de bacilos nas culturas de *M. bovis* BCG foi realizada empregando-se a técnica de coloração de Kinyoun. As lâminas foram observadas em microscópio óptico, utilizando-se objetiva de imersão de 100x e óleo de imersão. Cerca de dez campos microscópicos foram contados dentro de um círculo delimitado, a fim de se obter uma média representativa. Para determinar o valor final de bacilos por círculo, considerou-se a variação decorrente das diluições realizadas. O cálculo final foi obtido por meio da seguinte fórmula: Média de bacilos × Fator de correção × Diluição da amostra × Correção por mL.

3.3.3 Reconstituição dos plasmídeos

O DNA de cada plasmídeo (pMV261, pMV261-HBHA, pMV361 e pMV361-HBHA) foi fornecido em formato liofilizado, acondicionado em folha de papel filtro. Para a reconstituição, adicionou-se água *Milli-Q* estéril ao material contido em tubo de microcentrífuga, mantendo-o a 4°C durante a noite. No dia seguinte, alíquotas de 10 µL de cada plasmídeo reconstituído foram adicionadas a tubos de microcentrífuga contendo células *E. coli DH10B* (*Escherichia coli DH10B* quimio e eletrocompetentes), utilizadas para a propagação dos plasmídeos.

3.3.4 Preparação das células competentes *E. coli DH10B*

Na etapa de propagação dos plasmídeos, células competentes de *E. coli DH10B* foram utilizadas, previamente armazenadas a -80°C. Para a preparação das soluções

transformantes, as células quimio e eletrocompetentes foram descongeladas e cultivadas em meio *LB-Miller*, sob agitação constante de 250 rpm em agitador tipo *shaker*, a 37°C, por um período de 24 horas. A estirpe clonante *E. coli DH10B* foi submetida aos métodos de transformação química e por eletroporação, com o objetivo de promover a inserção e a propagação dos plasmídeos de interesse (SAMBROOK; RUSSELL, 2001; WU *et al.*, 2010).

3.3.5 Eletroporação dos plasmídeos em *E. coli DH10B*

As células quimio e eletrocompetentes de *E. coli DH10B*, juntamente com os plasmídeos, foram mantidas em gelo por um período de 5 minutos. A mistura foi então transferida para cubetas previamente refrigeradas e submetida à eletroporação no equipamento Eporator (Eppendorf®), utilizando as seguintes configurações: 2,45 kV, 250 µF e 200 Ω. Após o processo de transformação, adicionou-se 1 mL de meio SOC, e a suspensão foi incubada por 1 hora em estufa com agitação a 250 rpm. Em seguida, as células foram plaqueadas nas condições de espalhamento e esgotamento, em volumes de 100 µL e 200 µL, respectivamente, em meio ágar LB contendo canamicina. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas (SAMBROOK; RUSSELL, 2001; WU *et al.*, 2010).

3.3.6 Inóculo de colônia isolada de *E. coli DH10B*

Após o período de incubação inicial, o inóculo foi preparado, constituído pela coleta de uma fração correspondente a 1/100 (v/v) do pré-cultivo. Essa alíquota foi transferida para meio de cultura LB-Miller suplementado com Tween e canamicina, sendo mantida a 37°C por 18 horas, sob agitação constante de 150 rpm. Durante esse período, o crescimento da cultura foi monitorado até que fosse atingida uma densidade óptica (OD₆₀₀) de 0,6.

3.3.7 Extração dos plasmídeos em *E. coli DH10B*

A extração do DNA plasmidial foi realizada utilizando o Kit de Extração de DNA de Plasmídeos da *Norgen Biotek Corp*[®]. As amostras bacterianas foram cultivadas em 2 mL de meio LB por um período de 16 a 18 horas, a 37°C, sob agitação constante. Em seguida, as culturas foram transferidas para microtubos *Eppendorf*[®] e centrifugadas a 13.000 rpm por 1 minuto em microcentrífuga da mesma marca. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos ressuspensos em 250 µL de solução *Buffer I*. Adicionaram-se, então, 250 µL de solução *Buffer II*, e a suspensão foi cuidadosamente homogeneizada e incubada em banho de gelo por 5 minutos. Posteriormente, 350 µL de solução *Buffer III* foram adicionados, seguidos de nova incubação em gelo por 5 minutos. As amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante obtido foi transferido para o filtro do kit. O DNA foi lavado sequencialmente com 500 µL e 750 µL de solução *Buffer PE*. Em seguida, o filtro foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga, e o eluente de DNA foi adicionado. O tubo foi novamente centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos. Após a eluição, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro *NanoDrop* (*Invitrogen*[®]), e os DNAs plasmidiais foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

3.3.8 Preparação das células competentes *M. smegmatis mc2155* e BCG Moreau

Na etapa de transformação dos plasmídeos em *M. smegmatis mc2155*, células competentes previamente armazenadas a -80°C foram utilizadas. Para a preparação das soluções transformantes, as células quimio e eletrocompetentes foram descongeladas e cultivadas em 5 mL de meio LB suplementado com 0,05% de *Tween* 80, sendo incubadas em agitador a 37°C, 100 rpm, por um período de 16 a 24 horas. Durante a incubação, o crescimento foi monitorado por meio da densidade óptica (OD₆₀₀).

3.3.9 Eletroporação dos plasmídeos em *M. smegmatis mc2155* e BCG Moreau

Em microtubos distintos, cada um contendo 200 µL de células eletrocompetentes de

M. smegmatis mc2155, 1 µL de DNA plasmidial (pMV261, pMV261-HBHA, pMV361 e pMV361-HBHA) foi adicionado. A transformação por eletroporação foi realizada sob as seguintes condições: 2,5 kV, 25 µF e 200 Ω. Após a aplicação do pulso elétrico, as suspensões foram rapidamente transferidas para tubos *Falcon*® contendo 5 mL de meio LB suplementado com 0,05% de *Tween* 80 e incubadas por 16 a 24 horas a 37°C, sob agitação suave. No dia seguinte, o crescimento das células foi monitorado por meio da leitura da densidade óptica (OD₆₀₀). Posteriormente, alíquotas de 100 µL e 900 µL das células em meio LB-ágar suplementado com canamicina (25 µg/mL) foram plaqueadas. As placas foram incubadas a 37°C por até 4 dias, até a formação de colônias.

3.3.10 Inóculo de colônia isolada de *M. smegmatis mc2155* e BCG Moreau

Após o período de incubação inicial, o inóculo foi preparado, constituído pela coleta de uma fração correspondente a 1/100 (v/v) do pré-cultivo. Essa alíquota foi transferida para meio LB-Miller suplementado com Tween 80 e canamicina, sendo incubada a 37°C por 18 horas, sob agitação constante de 150 rpm. Durante a incubação, o crescimento da cultura foi monitorado por meio da densidade óptica (OD₆₀₀), até atingir o valor de 0,6.

3.3.11 Confirmação da presença do plasmídeo

A presença dos plasmídeos em *M. smegmatis mc2155* foi confirmada por meio de eletroforese em gel de agarose. Inicialmente, os plasmídeos foram extraídos das células utilizando o Kit de Extração de DNA plasmidial (conforme descrito no item 3.4.4). Em seguida, as amostras de DNA foram carregadas em gel de agarose a 0,8%, preparado em tampão TAE, e submetidas a corrente elétrica adequada para separação dos fragmentos. Após a corrida eletroforética, os geis foram corados com brometo de etídio ou outro corante intercalante, e as bandas correspondentes aos plasmídeos esperados foram visualizadas sob luz UV. A presença de bandas com tamanho compatível com os plasmídeos de interesse (pMV261, pMV261-HBHA, pMV361 e pMV361-HBHA) confirmou a transformação bem-sucedida das células.

3.5.12 Extração de proteínas em *M. smegmatis mc2155*

A extração das proteínas foi realizada a partir de culturas *M. smegmatis mc2155*, conforme protocolo validado (PPGMCS/PUCRS, CPBMF-TECNOPUC). Inicialmente, 1 colônia bacteriana foi inoculada em meio LB suplementado com *Tween-80* a 0,05% e incubada a 37°C, sob agitação constante de 180 rpm, por um período de 72 horas. Após o crescimento, as culturas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos, sendo o pellet resultante lavado 2 vezes com tampão Tris-HCl 10 mM (pH 8.0). Cada lavagem foi seguida de centrifugação nas mesmas condições. Em seguida, o pellet foi ressuscitado em 2 mL de tampão Tris-HCl 10 mM (pH 8.0) e submetido à sonicação com 10 pulsos de 10 segundos, mantendo intervalos de 1 minuto no gelo, com 21% de amplitude. Após a lise celular, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e considerado como a fração solúvel, enquanto o pellet foi ressuscitado em 500 µL de tampão Tris-HCl 10 mM (pH 8.0), constituindo a fração insolúvel. As amostras obtidas foram posteriormente aplicadas em gel de SDS-PAGE a 12%, para avaliação do perfil proteico. Como marcador de peso molecular, o *BenchMark™ Protein Ladder* (Cat. nº 10747012) foi utilizado.

4- RESULTADOS

4.1 Dados *in silico*

4.1.1 Sequências genômicas das proteínas MPB64 e HBHA

Para a predição populacional dos epítomos das proteínas MPB64 e HBHA, inicialmente a identificação e o resgate das sequências gênicas correspondentes no banco de dados *GenBank* foram realizados. As sequências completas de aminoácidos das 2 proteínas foram obtidas e utilizadas como entrada para as análises no portal IEDB, que possibilita a predição de epítomos com base na interação com moléculas do MHC de diferentes populações humanas.

MPB64:

*MRIKIFMLVTAVVLLCCSGVATAAPKTYCEELKGTDTGQACQIQMSDPAYNINISLPSYYPDQKSLENYIAQ
TRDKLSAATSSTPREAPYELNITSATYQSAIPPRGTQAVVLKVYQNAGGTHPTTTYKAFDWDQAYRKPTTY
DTLWQADTDPLPVVFPVQVQGELSKQTGQQVSIAPNAGLDPVNYQNFAVTNDGVIFFFNPGELLPEAAGP
TQVLVPRSAIDSMILA*

HBHA:

*MAENPNIDDLAPLLAALGAADLALATVNDLIANLRERAEETRAETRTRVEERRARLTKFQEDLPEQFIELR
DKFTTEELRKAAEGYLEAATNRYNELVERGEAALQRLRSQTAFEDASARAEGYVDQAVELTQEALGTVAS
QTRAVGERAAKLVGIELPGKAEAAAGKKAQKAIKAPAKKASAKKAPAKKAPAKKAAAKKVTQK*

Essas sequências serviram como base para as etapas subsequentes de predição dos epítomos de ligação a MHC classes I e II, bem como para as análises comparativas entre diferentes alelos e populações, utilizando os algoritmos disponíveis no IEDB.

4.1.2 Predição de epítomos

A predição de epítomos foi realizada para as proteínas MPB64 e HBHA, com o objetivo de identificar sequências peptídicas com maior potencial imunogênico e antigênico, visando sua aplicação no desenvolvimento de candidatos vacinais. Para ambas as proteínas, as análises contemplaram a predição de epítomos com capacidade de ligação às moléculas MHC-I e MHC-II.

II, permitindo a avaliação de potenciais respostas imunológicas mediadas por linfócitos T CD8+ e T CD4+, respectivamente.

Os resultados gerados pela plataforma foram inicialmente apresentados em formato de tabela, contendo os epítomos preditos, seus respectivos alelos de ligação do sistema HLA e os valores de *%Rank*, parâmetro que estima a afinidade de ligação entre cada peptídeo e a molécula de HLA correspondente. Valores menores de *%Rank* indicam maior afinidade predita, sendo, portanto, associados à maior probabilidade de reconhecimento imunológico (KHAN *et al.*, 2022).

Após a obtenção dos dados brutos, realizou-se uma etapa de curadoria, que incluiu a remoção de peptídeos redundantes e a seleção dos epítomos com base no critério de *%Rank* $\leq 1,0$. Esse procedimento permitiu priorizar os peptídeos com maior afinidade de ligação e maior relevância imunológica, os quais foram subsequentemente submetidos às análises complementares descritas a seguir.

4.1.3 Predição de epítomos da proteína MPB64 – ligação com MHC classe I

Após a submissão da sequência da proteína MPB64 à plataforma IEDB, os peptídeos candidatos à ligação com moléculas de MHC classe I foram identificados. A análise baseou-se no algoritmo de predição de ligação a HLA e considerou os diferentes alelos humanos disponíveis na base de dados.

A Tabela 2 apresenta os principais epítomos preditos da proteína MPB64 com potencial de ligação ao complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC-I). São apresentados os peptídeos selecionados, seu comprimento em aminoácidos (aa), os respectivos alelos de HLA aos quais demonstraram capacidade de ligação, o número de alelos reconhecidos, o melhor valor de *%Rank* obtido e a classificação de afinidade predita. Os epítomos destacados apresentaram valores de *%Rank* variando entre 0,01 e 0,14, indicando elevado potencial de interação com moléculas de MHC-I e, conseqüentemente, relevância para o reconhecimento por linfócitos T citotóxicos.

TABELA 2 – ANÁLISE PREDITIVA DE EPÍTOPOS DA PROTEÍNA MPB64 COM CAPACIDADE DE LIGAÇÃO AO MHC-I

Epítopo	Comprimento (aa)	Alelos de ligação (HLA)	Nº de alelos	Melhor %Rank	Classificação de afinidade
GTHPTTTYK	9	HLA-A11:01, HLA-A03:01, HLA-B*30:01	3	0,01	Alta
GGTHPTTTYK	10	HLA-A11:01, HLA-A03:01	2	0,02	Alta
QAYRKPITY	9	HLA-B35:01, HLA-A15:01	2	0,04	Alta
TPREAPYEL	9	HLA-B*07:02	1	0,01	Alta
STPREAPYEL	10	HLA-B*07:02	1	0,03	Alta
VPRSAIDSM	9	HLA-B*07:02	1	0,01	Alta
VPRSAIDSMML	10	HLA-B*07:02	1	0,04	Alta
TQAVVLKVY	9	HLA-A*15:01	1	0,01	Alta
HPTTTYKAF	9	HLA-B*35:01	1	0,02	Alta
KAFDWDQAY	9	HLA-B*35:01	1	0,03	Alta
YKAFDWDQAY	10	HLA-B*35:01	1	0,04	Alta
ITYDTLWQA	9	HLA-A*02:06	1	0,04	Alta
KPITYDTLW	9	HLA-B*53:01	1	0,03	Alta
REAPYELNI	9	HLA-B*40:01	1	0,08	Alta
EAAGPTQVLV	10	HLA-B*68:02	1	0,02	Alta
SAATSSTPR	9	HLA-A*68:01	1	0,14	Alta

Fonte: Elaborado pela autora a partir de dados do *Immune Epitope Database* (IEDB).

Para cada epítopo, os alelos de ligação correspondentes, o número de interações observadas e o menor valor de %Rank, utilizado como indicador da maior afinidade de ligação, foram considerados. Todos os epítopos apresentados exibiram alta afinidade predita (%Rank < 1,0), sendo, portanto, selecionados para as etapas subsequentes de análise.

4.1.4 Predição de epítopos da proteína MPB64 – ligação com MHC classe II

Após a identificação dos epítopos da proteína MPB64 com potencial de ligação ao MHC-I, foi realizada a predição de epítopos capazes de interagir com moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3, que reúne os principais peptídeos selecionados, seu comprimento em aminoácidos (aa), os respectivos alelos de HLA de classe II aos quais demonstraram capacidade de ligação, o melhor valor de %Rank observado e a classificação de afinidade

predita. A análise desses parâmetros permite identificar epítomos com maior potencial imunogênico para ativação de linfócitos T auxiliares (CD4+), contribuindo para a avaliação do potencial da proteína MPB64 como alvo em estratégias vacinais e imunodiagnósticas.

TABELA 3- ANÁLISE PREDITIVA DE EPÍTOPOS DA PROTEÍNA MPB64 COM CAPACIDADE DE LIGAÇÃO AO MHC-II

Epítopo	Comprimento (aa)	Alelos de ligação (HLA)	Nº de alelos	Melhor %Rank	Classificação de afinidade
SDPAYNINISLPSYY	15	HLA-DRB302:02, HLA-DRB109:01	2	0,05	Alta
DPAYNINISLPSYYP	15	HLA-DRB3*02:02	1	0,05	Alta
PAYNINISLPSYYPD	15	HLA-DRB3*02:02	1	0,05	Alta
AYNINISLPSYYPDQ	15	HLA-DRB3*02:02	1	0,11	Alta
QMSDPAYNINISLPS	15	HLA-DRB3*02:02	1	0,79	Alta
MSDPAYNINISLPSY	15	HLA-DRB3*02:02	1	0,12	Alta
IKIFMLVTAVVLLCC	15	HLA-DRB107:01, HLA-DRB101:01	2	0,12	Alta
KIFMLVTAVVLLCCS	15	HLA-DRB107:01, HLA-DRB101:01	2	0,12	Alta
MRIKIFMLVTAVVLL	15	HLA-DRB107:01, HLA-DRB101:01	2	0,12	Alta
RIKIFMLVTAVVLLC	15	HLA-DRB107:01, HLA-DRB101:01	2	0,12	Alta
RDKFLSAATSSTPRE	15	HLA-DRB1*04:01	1	0,25	Alta
TRDKFLSAATSSTPR	15	HLA-DRB1*04:01	1	0,25	Alta
DKFLSAATSSTPREA	15	HLA-DRB1*04:01	1	0,49	Alta
QTRDKFLSAATSSTP	15	HLA-DRB1*04:01	1	0,64	Alta
GVIFFFNPGELLPEA	15	HLA-DRB302:02, HLA-DPA103:01	2	0,70	Alta
DGVIFFFNPGELLPE	15	HLA-DPA103:01, HLA-DRB302:02	2	0,85	Alta
VIFFFNPGELLPEAA	15	HLA-DPA103:01, HLA-DRB302:02	2	0,77	Alta
QNFAVTNDGVIFFFN	15	HLA-DRB3*01:01	1	0,76	Alta
YQNFAVTNDGVIFFF	15	HLA-DRB3*01:01	1	0,76	Alta
NFAVTNDGVIFFNP	15	HLA-DRB3*01:01	1	0,88	Alta
REAPYELNITSATYQ	15	HLA-DRB3*02:02	1	0,99	Alta
EAPYELNITSATYQS	15	HLA-DRB3*02:02	1	0,90	Alta

Fonte: Elaborado pela autora a partir de dados do *Immune Epitope Database* (IEDB).

Durante a predição de epítomos de MHC-II para a proteína MPB64, 11.853 peptídeos potenciais foram identificados. Após a aplicação do critério de seleção baseado em %Rank <

1,0, 290 peptídeos foram considerados elegíveis. Posteriormente, os peptídeos redundantes foram removidos e os resultados consolidados em epítomos únicos. Para cada epítomo, os alelos de ligação correspondentes, o número de interações observadas e o menor valor de %Rank, utilizado como indicador da maior afinidade de ligação, foram considerados. Todos os epítomos apresentados exibiram alta afinidade predita, sendo, portanto, selecionados para as análises subsequentes.

4.1.5 Predição de epítomos da proteína HBHA – ligação com MHC classe I

A análise preditiva dos epítomos da proteína HBHA foi realizada utilizando o mesmo protocolo empregado para a proteína MPB64, permitindo a identificação de peptídeos com potencial de ligação ao complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC-I). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4, que reúne os principais epítomos selecionados, seu comprimento em aminoácidos (aa), os respectivos alelos de HLA aos quais demonstraram capacidade de ligação, o número de alelos reconhecidos, o melhor valor de %Rank observado e a classificação de afinidade predita. A avaliação desses parâmetros possibilita identificar epítomos com maior potencial de reconhecimento por linfócitos T citotóxicos, contribuindo para a caracterização imunológica da proteína HBHA e sua aplicabilidade em estudos voltados ao desenvolvimento de vacinas e imunodiagnósticos.

TABELA 4 - ANÁLISE PREDITIVA DE EPÍTOPOS DA PROTEÍNA HBHA COM CAPACIDADE DE LIGAÇÃO AO MHC-I

Epítomo	Comprimento (aa)	Alelos de ligação (HLA)	Nº de alelos	Melhor %Rank	Classificação de afinidade
LPAPLLAAL	9	HLA-B07:02, HLA-B35:01, HLA-B*51:01	3	0,02	Alta
AIAKAPAKK	9	HLA-A03:01, HLA-A11:01	2	0,02	Alta
AAAKKVTQK	9	HLA-A03:01, HLA-A11:01	2	0,03	Alta
ETRTRVEER	9	HLA-A68:01, HLA-A33:01	2	0,02	Alta
TVNDLIANLR	10	HLA-A*68:01	1	0,03	Alta
TVNDLIANL	9	HLA-B*68:02	1	0,02	Alta
TAFEDASAR	9	HLA-A*68:01	1	0,03	Alta

QTAFEDASAR	10	HLA-A*68:01	1	0,06	Alta
YLEAATNRY	9	HLA-A*01:01	1	0,02	Alta
AENPNIDDL	9	HLA-B*40:01	1	0,06	Alta
KAIKAPAK	9	HLA-B*30:01	1	0,01	Alta
KAIKAPAKK	10	HLA-A*03:01	1	0,06	Alta
EAAGKKAQK	9	HLA-A*68:01	1	0,14	Alta
ETRAETRTR	9	HLA-A*68:01	1	0,20	Alta
LQRLRSQTAF	10	HLA-A*15:01	1	0,07	Alta
EELRKAAEGY	10	HLA-A*44:03	1	0,08	Alta

Fonte: Elaborado pela autora a partir de dados do *Immune Epitope Database* (IEDB).

A análise imunoinformática da proteína HBHA para epítomos de MHC-I identificou inicialmente um grande conjunto de peptídeos candidatos. Após a aplicação do critério de seleção baseado em $\%Rank < 1,0$, os peptídeos elegíveis foram filtrados e os redundantes removidos. Os resultados foram então consolidados em epítomos únicos. Para cada epítomo, os alelos de ligação correspondentes, o número de interações observadas e o menor valor de $\%Rank$, utilizado como indicador da maior afinidade de ligação, foram considerados. Todos os epítomos apresentados exibiram alta afinidade predita, sendo selecionados para as etapas subsequentes de análise.

4.1.6 Predição de epítomos da proteína HBHA – ligação com MHC classe II

Após a identificação dos epítomos da proteína HBHA com potencial de ligação ao complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC-I), foi realizada a análise preditiva de epítomos capazes de interagir com moléculas de MHC classe II (MHC-II). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5, que reúne os principais peptídeos selecionados, seu comprimento em aminoácidos (aa), os respectivos alelos de HLA de classe II aos quais demonstraram capacidade de ligação, o melhor valor de $\%Rank$ observado e a classificação de afinidade predita. A avaliação desses parâmetros permite identificar epítomos com maior potencial de ativação de linfócitos T auxiliares (CD4+), contribuindo para a caracterização imunológica da proteína HBHA e para a investigação de sua aplicabilidade em estratégias de desenvolvimento vacinal e imunodiagnóstico.

TABELA 5 - ANÁLISE PREDITIVA DE EPÍTOPOS DA PROTEÍNA HBHA COM CAPACIDADE DE LIGAÇÃO AO MHC-II

Epítopo	Comprimento (aa)	Alelos de ligação (HLA)	Nº de alelos	Melhor %Rank	Classificação de afinidade
LTKFQEDLPEQFIEL	15	HLA-DRB3*01:01	1	0,70	Alta
RLTKFQEDLPEQFIE	15	HLA-DRB3*01:01	1	0,76	Alta
ARLTKFQEDLPEQFI	15	HLA-DRB3*03:01	1	0,82	Alta
EGYVDQAVELTQEAL	15	HLA-DQA1*01:01	1	0,96	Alta
TKFQEDLPEQFIELR	15	HLA-DRB3*01:01	1	0,98	Alta

Fonte: Elaborado pelos autores a partir de dados do *Immune Epitope Database* (IEDB).

Durante a análise de epítomos de MHC-II da proteína HBHA, 5.161 peptídeos candidatos foram inicialmente identificados. Após a aplicação do critério de seleção baseado em %Rank < 1,0, apenas 5 peptídeos atenderam aos critérios estabelecidos. Como não foram observadas redundâncias entre os epítomos selecionados, todos foram mantidos na análise final. Para cada epítopo, o alelo de ligação correspondente e o valor de %Rank, utilizado como indicador da afinidade predita de ligação, foram considerados. Todos os epítomos selecionados apresentaram alta afinidade, sendo, portanto, considerados promissores para as etapas subsequentes de avaliação imunoinformática.

4.2 Cobertura populacional

A análise de cobertura populacional foi conduzida por meio da ferramenta *Population Coverage*, disponibilizada pelo banco de dados IEDB, a qual estima a proporção de indivíduos potencialmente capazes de apresentar uma resposta imune mediada por moléculas do MHC em diferentes populações humanas (BUI *et al.*, 2006). Para cada epítopo selecionado, foram inseridos os alelos HLA respondentes e suas respectivas interações preditas com moléculas de MHC de classe I e II, obtidas nas etapas anteriores. A ferramenta calcula a cobertura populacional com base nas frequências alélicas de HLA descritas para distintas regiões geográficas e grupos étnicos, permitindo estimar a porcentagem de indivíduos com potencial para reconhecer e apresentar os epítomos avaliados (BUI *et al.*, 2006; ARRIETA-BOLAÑOS; HERNÁNDEZ-ZARAGOZA; BARQUERA, 2023).

4.2.1. Avaliação da Cobertura Populacional Global dos Complexos Epítopo–HLA Derivados da Proteína MPB64

A análise de cobertura populacional dos epítomos da proteína MPB64 restritos a ligação de MHC-I, revelou uma abrangência elevada, conforme ilustrado na Figura 5. Observou-se uma cobertura populacional de 98,55%, indicando que a maioria dos indivíduos nas populações avaliadas apresenta potencial para reconhecer ao menos um dos epítomos preditos. Esse resultado foi obtido a partir da análise de um conjunto de 290 peptídeos, evidenciando a ampla representatividade dos alelos de MHC-I considerados. Esses dados sugerem um elevado potencial imunogênico dos epítomos selecionados para indução de resposta mediada por linfócitos T CD8⁺.

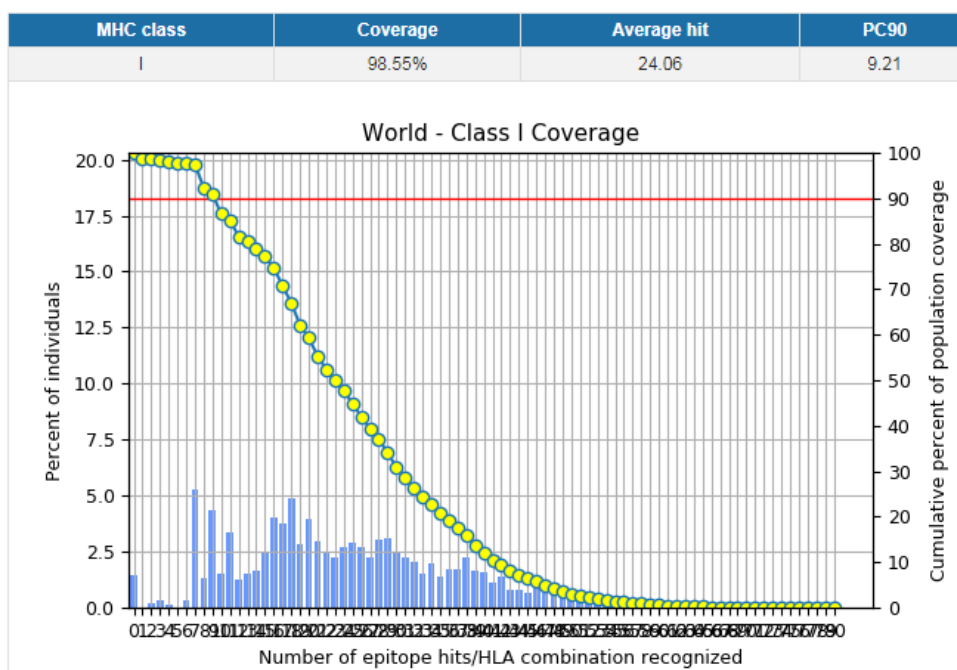


FIGURA 6 – Cobertura populacional global estimada para os complexos epítomo–HLA derivados da proteína MPB64 com afinidade de ligação ao MHC classe I. O gráfico apresenta a distribuição da cobertura populacional mundial calculada a partir dos epítomos preditos, em que as barras representam a frequência de indivíduos (%) em função do número de combinações epítomo/HLA reconhecidas (eixo X), enquanto a linha cumulativa indica a porcentagem acumulada da população coberta (eixo Y secundário). A análise revelou cobertura populacional global estimada de 98,55%, com média de 24,06 reconhecimentos epítomo/HLA por indivíduo e valor de PC90 igual a 9,21.

Fonte: Elaborado pelos autores a partir de dados obtidos e analisados por meio da ferramenta Population Coverage do Immune Epitope Database (IEDB). Disponível em: <https://www.iedb.org>. Acesso em: mar. 2022.

A análise de cobertura populacional global dos epítomos da proteína MPB64 também foi realizada para MHC-II, resultando em uma cobertura de 48,8%, com base nas interações

com moléculas dessa classe. Dos 30 epítopos inicialmente submetidos à análise, 11 foram reconhecidos pela plataforma e, portanto, considerados no cálculo final da cobertura. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 6.

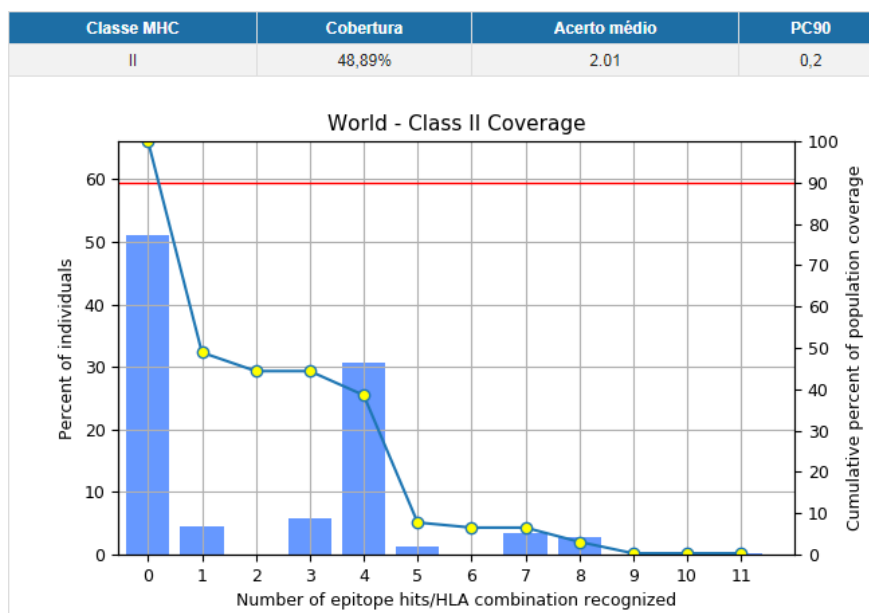


FIGURA 7 – Cobertura populacional global estimada para os complexos epítipo–HLA derivados da proteína MPB64 com afinidade de ligação ao MHC classe II. O gráfico apresenta a distribuição da cobertura populacional mundial calculada a partir dos epítopos preditos, em que as barras representam a frequência de indivíduos (%) em função do número de combinações epítipo/HLA reconhecidas (eixo X), enquanto a linha cumulativa indica a porcentagem acumulada da população coberta (eixo Y secundário). A análise revelou cobertura populacional global estimada de 98,55%, com média de 24,06 reconhecimentos epítipo/HLA por indivíduo e valor de PC90 igual a 9,21.

Fonte: Elaborado pelos autores a partir de dados obtidos e analisados por meio da ferramenta *Population Coverage do Immune Epitope Database (IEDB)*. Disponível em: <https://www.iedb.org>. Acesso em: mar. 2022.

4.2.2 Avaliação da Cobertura Populacional Brasileira dos Complexos Epítipo–HLA Derivados da Proteína MPB64

Após a avaliação da cobertura populacional em escala global, realizou-se à análise específica para a população brasileira. Essa abordagem teve como objetivo comparar os resultados obtidos no Brasil com aqueles previamente observados em nível global, permitindo uma avaliação mais direcionada da aplicabilidade dos epítopos no contexto nacional.

A análise de cobertura populacional dos epítomos da proteína MPB64 para MHC-I, considerando a população brasileira, demonstrou uma cobertura de 96,1%. Esse resultado indica ampla capacidade de reconhecimento pelos alelos HLA mais frequentes no país, sugerindo alto potencial imunológico dos epítomos selecionados nesse contexto populacional.

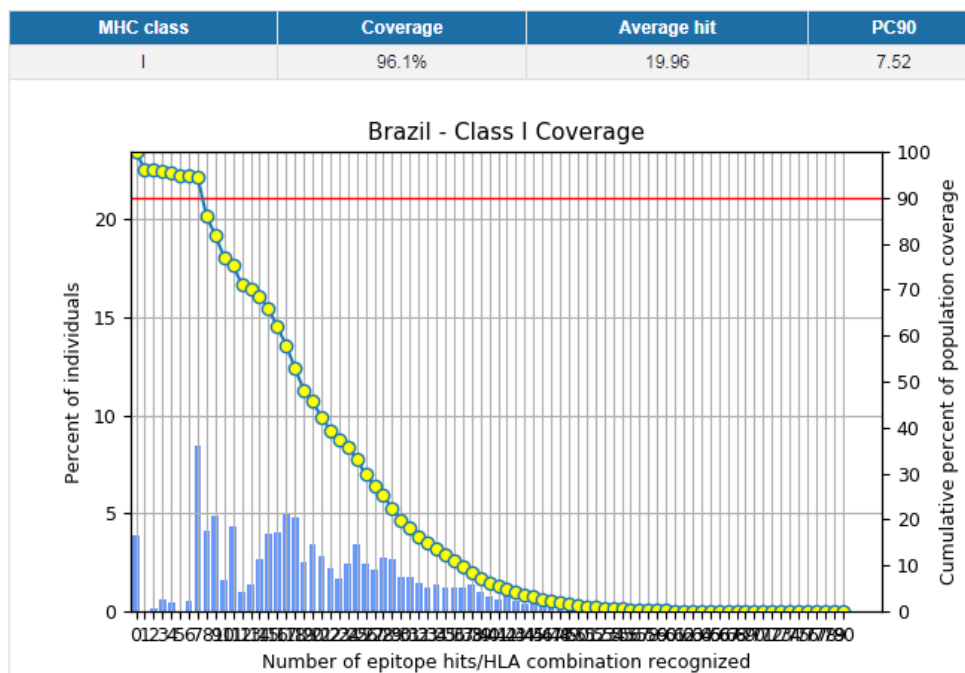


FIGURA 8 – Cobertura populacional do Brasil estimada para os complexos epítomo–HLA derivados da proteína MPB64 com afinidade de ligação ao MHC classe I. O gráfico apresenta a distribuição da cobertura populacional do território brasileiro calculada a partir dos epítomos preditos, em que as barras representam a frequência de indivíduos (%) em função do número de combinações epítomo/HLA reconhecidas (eixo X), enquanto a linha cumulativa indica a porcentagem acumulada da população coberta (eixo Y secundário). A análise revelou cobertura populacional estimada de 96,1%, com média de 19,96 reconhecimentos epítomo/HLA por indivíduo e valor de PC90 igual a 7,52.

Fonte: Elaborado pelos autores a partir de dados obtidos e analisados por meio da ferramenta *Population Coverage do Immune Epitope Database (IEDB)*. Disponível em: <https://www.iedb.org>. Acesso em: mar. 2022.

A análise de cobertura populacional dos epítomos da proteína MPB64 para MHC-II, restrita à população brasileira, revelou uma cobertura inferior à média global, correspondendo a menos da metade do valor observado mundialmente. Dos 30 epítomos avaliados, 8 foram reconhecidos na população brasileira, enquanto 3 epítomos previamente identificados na análise global não apresentaram reconhecimento nesse cenário específico.

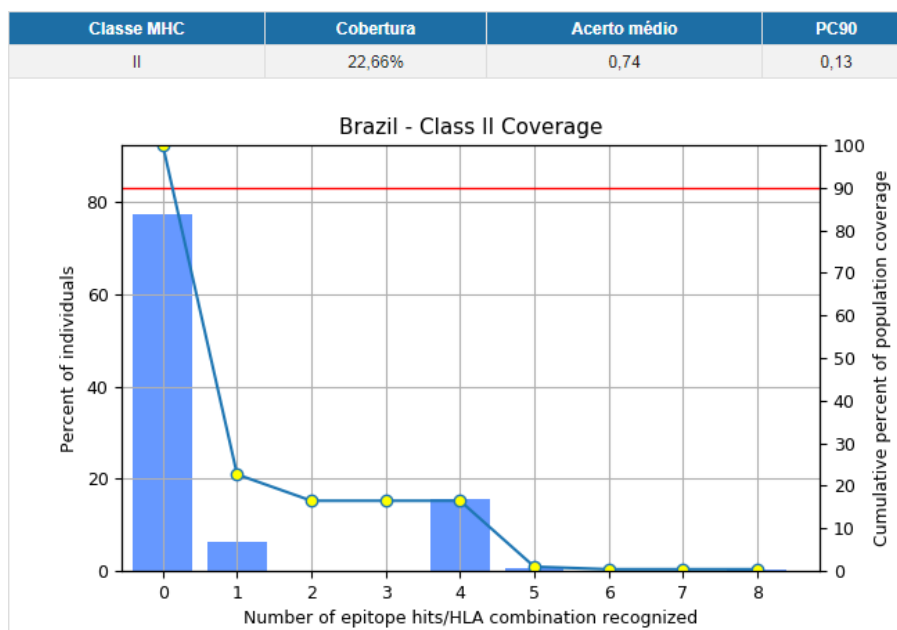


FIGURA 9 – Cobertura populacional do Brasil estimada para os complexos epítipo–HLA derivados da proteína MPB64 com afinidade de ligação ao MHC classe II. O gráfico apresenta a distribuição da cobertura populacional do território brasileiro calculada a partir dos epítopos preditos, em que as barras representam a frequência de indivíduos (%) em função do número de combinações epítipo/HLA reconhecidas (eixo X), enquanto a linha cumulativa indica a porcentagem acumulada da população coberta (eixo Y secundário). A análise revelou cobertura populacional global estimada de 98,55%, com média de 24,06 reconhecimentos epítipo/HLA por indivíduo e valor de PC90 igual a 9,21.

Fonte: Elaborado pelos autores a partir de dados obtidos e analisados por meio da ferramenta Population Coverage do Immune Epitope Database (IEDB). Disponível em: <https://www.iedb.org>. Acesso em: mar. 2022.

4.2.3 Avaliação da Cobertura Populacional Global dos Complexos Epítipo–HLA Derivados da Proteína HBHA

De forma semelhante às análises anteriores, o mesmo procedimento foi aplicado à proteína HBHA para epítopos de ligação a MHC-I. O resultado da cobertura populacional em escala global é apresentado na Figura 9, evidenciando uma cobertura de 98,36%, indicando ampla abrangência dos epítopos preditos na população mundial.

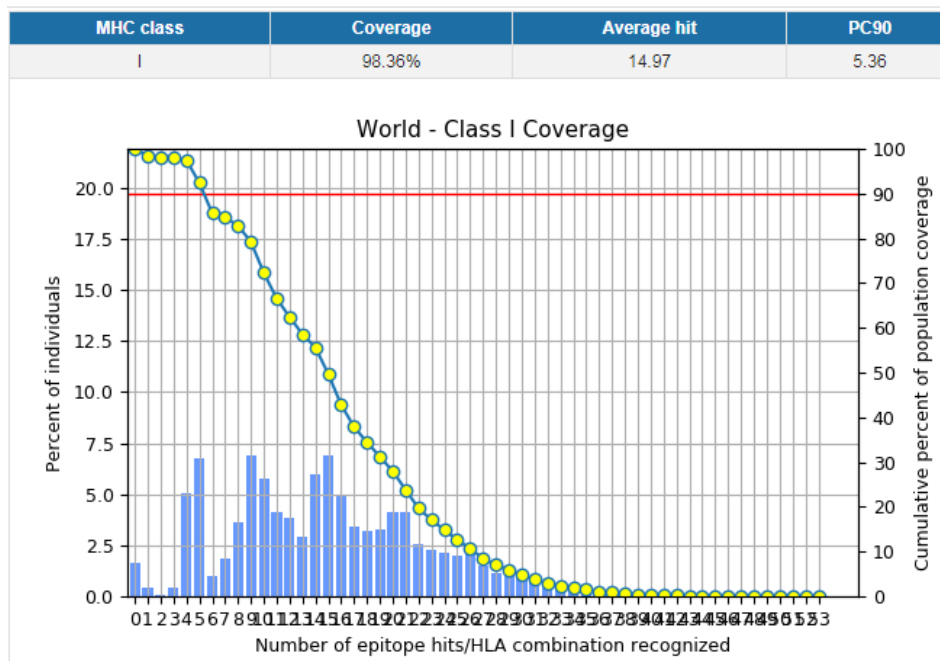


FIGURA 10 – Cobertura populacional global estimada para os complexos epítipo–HLA derivados da proteína HBHA com afinidade de ligação ao MHC classe I. O gráfico apresenta a distribuição da cobertura populacional mundial calculada a partir dos epítopos preditos, em que as barras representam a frequência de indivíduos (%) em função do número de combinações epítipo/HLA reconhecidas (eixo X), enquanto a linha cumulativa indica a porcentagem acumulada da população coberta (eixo Y secundário). A análise revelou cobertura populacional global estimada de 98,36%, com média de 14,976 reconhecimentos epítipo/HLA por indivíduo e valor de PC90 igual a 5,36.

Fonte: Elaborado pelos autores a partir de dados obtidos e analisados por meio da ferramenta *Population Coverage do Immune Epitope Database (IEDB)*. Disponível em: <https://www.iedb.org>. Acesso em: mar. 2022.

A análise de predição populacional global dos epítopos da proteína HBHA para MHC-II revelou uma cobertura de 23,43%, indicando baixa amplitude de reconhecimento imunológico. Entre os cinco epítopos avaliados, apenas 1 apresentou reconhecimento pela plataforma, o que contribui diretamente para a reduzida cobertura observada (Figura 9). Esses resultados evidenciam a limitação do conjunto de epítopos identificados e reforçam a importância de considerar a variabilidade genética e populacional na avaliação da imunogenicidade da proteína HBHA em diferentes contextos geográficos.

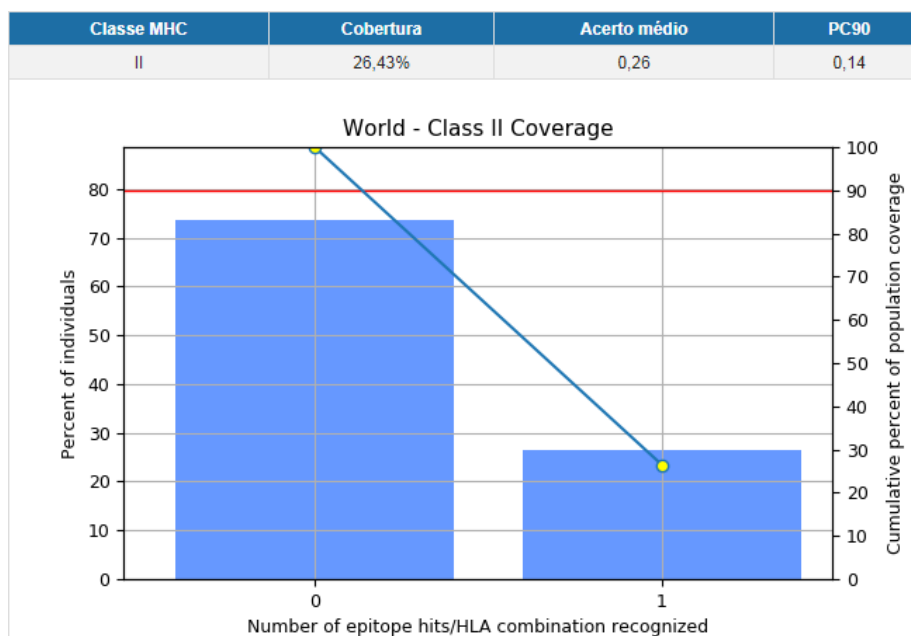


FIGURA 11 - Cobertura populacional global estimada para os complexos epítipo–HLA derivados da proteína HBHA com afinidade de ligação ao MHC classe II. O gráfico apresenta a distribuição da cobertura populacional mundial calculada a partir dos epítipos preditos, em que as barras representam a frequência de indivíduos (%) em função do número de combinações epítipo/HLA reconhecidas (eixo X), enquanto a linha cumulativa indica a porcentagem acumulada da população coberta (eixo Y secundário). A análise revelou cobertura populacional global estimada de 26,43 com média de 0,26 reconhecimentos epítipo/HLA por indivíduo e valor de PC90 igual a 0,14.

Fonte: Elaborado pelos autores a partir de dados obtidos e analisados por meio da ferramenta *Population Coverage do Immune Epitope Database (IEDB)*. Disponível em: <https://www.iedb.org>. Acesso em: mar. 2022.

4.2.4 Avaliação da Cobertura Populacional Brasileira dos Complexos Epítipo–HLA Derivados da Proteínas HBHA

A análise de predição populacional no Brasil para os epítipos da proteína HBHA de MHC-I foi realizada de forma semelhante às etapas previamente descritas. Conforme observado nos resultados anteriores (figura 6 até 11), as coberturas populacionais associadas à ligação de MHC-I foram consistentemente superiores às obtidas para MHC-II. Essa diferença também se reflete no maior número de epítipos identificados para MHC-I em comparação com MHC-II. Tal disparidade destaca a importância de considerar as especificidades das interações entre epítipos e moléculas de MHC-I e MHC-II na avaliação da imunogenicidade de antígenos em diferentes populações.

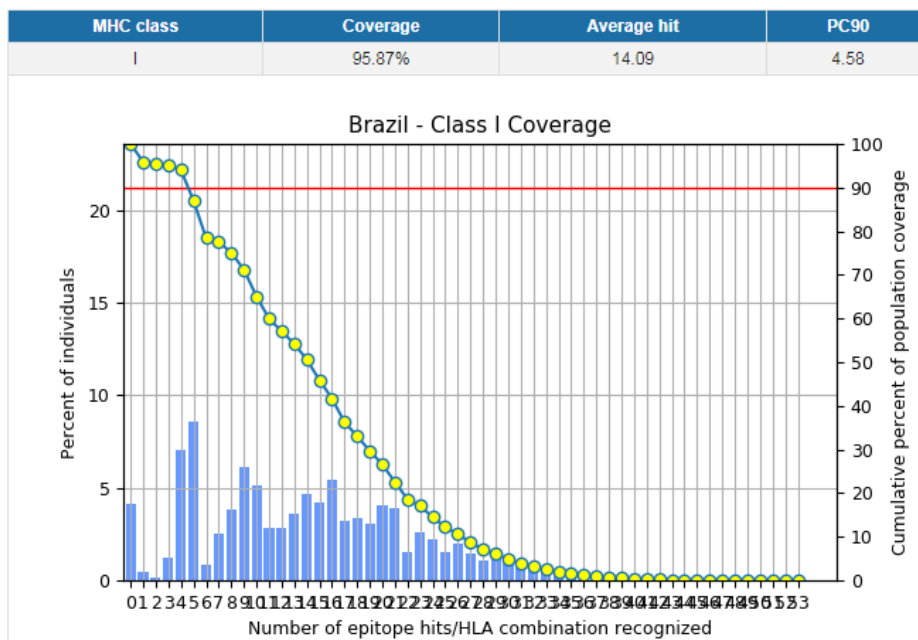


FIGURA 12 – Cobertura populacional do Brasil estimada para os complexos epítipo–HLA derivados da proteína HBHA com afinidade de ligação ao MHC classe I. O gráfico apresenta a distribuição da cobertura populacional do território brasileiro calculada a partir dos epítopos preditos, em que as barras representam a frequência de indivíduos (%) em função do número de combinações epítipo/HLA reconhecidas (eixo X), enquanto a linha cumulativa indica a porcentagem acumulada da população coberta (eixo Y secundário). A análise revelou cobertura populacional global estimada de 95,87%, com média de 14,09 reconhecimentos epítipo/HLA por indivíduo e valor de PC90 igual a 4,58.

Fonte: Elaborado pelos autores a partir de dados obtidos e analisados por meio da ferramenta Population Coverage do Immune Epitope Database (IEDB). Disponível em: <https://www.iedb.org>. Acesso em: mar. 2022.

A análise de predição populacional no Brasil para os epítopos da proteína HBHA restritos ao MHC-II, conduzida de forma semelhante às etapas previamente descritas (figura 6 até 12), resultou em uma cobertura de 60,09%. Dos 5 epítopos avaliados, apenas 1 apresentou reconhecimento na população brasileira.

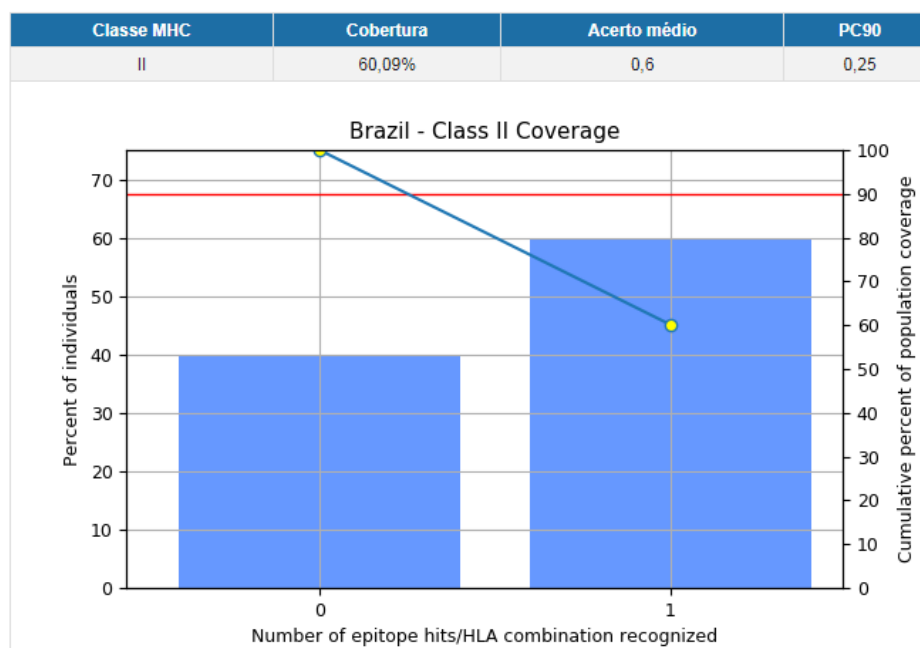


FIGURA 13 – Cobertura populacional do Brasil estimada para os complexos epítipo–HLA derivados da proteína HBHA com afinidade de ligação ao MHC classe II. O gráfico apresenta a distribuição da cobertura populacional do território brasileiro calculada a partir dos epítomos preditos, em que as barras representam a frequência de indivíduos (%) em função do número de combinações epítipo/HLA reconhecidas (eixo X), enquanto a linha cumulativa indica a porcentagem acumulada da população coberta (eixo Y secundário). A análise revelou cobertura populacional global estimada de 60,09%, com média de 0,6 reconhecimentos epítipo/HLA por indivíduo e valor de PC90 igual a 0,25.

Fonte: Elaborado pelos autores a partir de dados obtidos e analisados por meio da ferramenta Population Coverage do Immune Epitope Database (IEDB). Disponível em: <https://www.iedb.org>. Acesso em: mar. 2022.

4.2.5 Avaliação da Cobertura Populacional Global dos Complexos Epítipo–HLA Derivados das Proteínas HBHA e MPB64

Ao avaliar a combinação das 2 proteínas na plataforma, seguindo os mesmos procedimentos descritos anteriormente, observou-se um aumento na cobertura populacional global em comparação às análises realizadas de forma isolada. Esse resultado sugere que a inclusão conjunta das proteínas pode potencializar a resposta imunológica, ampliando o conjunto de epítomos reconhecidos em uma população mais abrangente. Dessa forma, os achados reforçam a importância da utilização de múltiplos antígenos em estratégias vacinais e em estudos de imunogenicidade (DHANDA *et al.*, 2023).

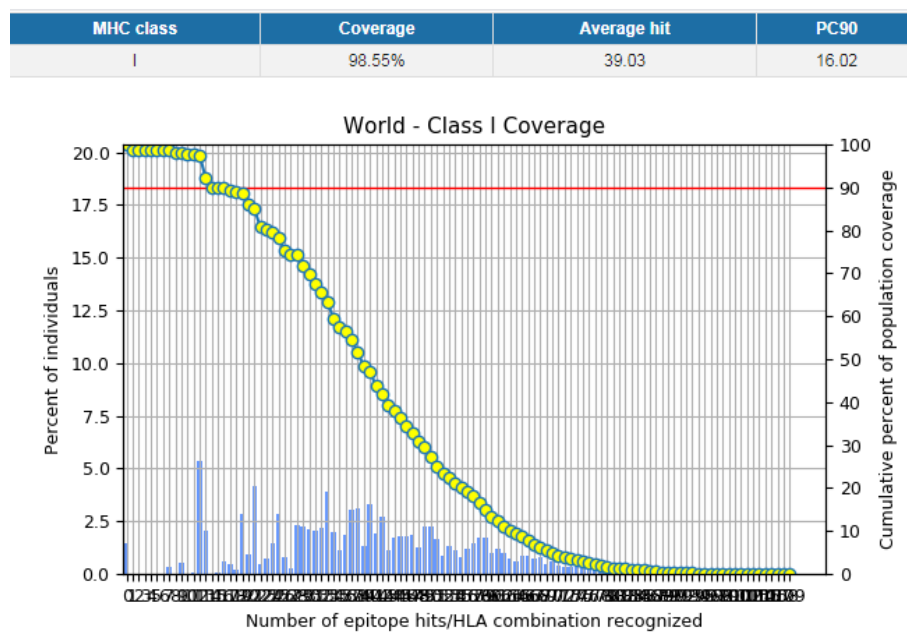


FIGURA 14 - Cobertura populacional global estimada para os complexos epítipo–HLA derivados das proteínas HBHA e MPB64 com afinidade de ligação ao MHC classe I. O gráfico apresenta a distribuição da cobertura populacional mundial calculada a partir dos epítomos preditos, em que as barras representam a frequência de indivíduos (%) em função do número de combinações epítipo/HLA reconhecidas (eixo X), enquanto a linha cumulativa indica a porcentagem acumulada da população coberta (eixo Y secundário). A análise revelou cobertura populacional global estimada de 98,55% com média de 39,03 reconhecimentos epítipo/HLA por indivíduo e valor de PC90 igual a 16,02.

Fonte: Elaborado pelos autores a partir de dados obtidos e analisados por meio da ferramenta *Population Coverage do Immune Epitope Database (IEDB)*. Disponível em: <https://www.iedb.org>. Acesso em: mar. 2022.

A análise conjunta das 2 proteínas para epítomos de ligação ao MHC-I resultou em uma cobertura populacional de 98,55%. Esse valor elevado está predominantemente associado ao desempenho dos epítomos da proteína MPB64, que apresentaram maiores percentuais de cobertura. No entanto, esse achado não invalida o potencial da combinação dos epítomos de ambas as proteínas, que pode contribuir para resultados ainda mais promissores em termos de amplitude de reconhecimento imunológico.

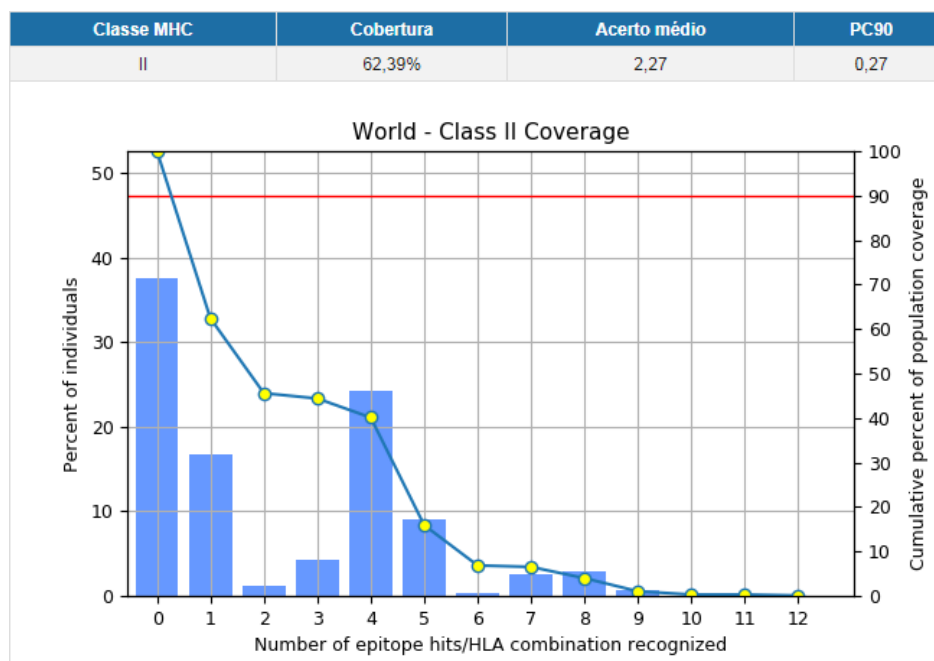


FIGURA 15 - Cobertura populacional global estimada para os complexos epítipo–HLA derivados das proteínas HBHA e MPB64 com afinidade de ligação ao MHC classe II. O gráfico apresenta a distribuição da cobertura populacional mundial calculada a partir dos epítomos preditos, em que as barras representam a frequência de indivíduos (%) em função do número de combinações epítipo/HLA reconhecidas (eixo X), enquanto a linha cumulativa indica a porcentagem acumulada da população coberta (eixo Y secundário). A análise revelou cobertura populacional global estimada de 62,39 % com média de 2,27 reconhecimentos epítipo/HLA por indivíduo e valor de PC90 igual a 0,27.

Fonte: Elaborado pelos autores a partir de dados obtidos e analisados por meio da ferramenta *Population Coverage do Immune Epitope Database (IEDB)*. Disponível em: <https://www.iedb.org>. Acesso em: mar. 2022.

A análise conjunta das proteínas MPB64 e HBHA quanto à ligação ao MHC-II resultou em uma cobertura populacional mundial de 62,39%, indicando uma ampliação na distribuição dos epítomos reconhecidos. Ao todo, 12 epítomos dentre os 35 avaliados (30 provenientes da MPB64 e 5 da HBHA) foram identificados (Figura 15).

4.2.6 Avaliação da Cobertura Populacional Brasileira dos Complexos Epítipo–HLA Derivados das Proteínas HBHA e MPB64

Repetindo o processo realizado anteriormente, porém considerando exclusivamente a cobertura populacional no Brasil, observou-se um desempenho ainda mais expressivo, com maior alcance nas interações de MHC-I quando ambas as proteínas foram analisadas em conjunto. Destaca-se, novamente, a contribuição significativa da proteína MPB64 para esse resultado.

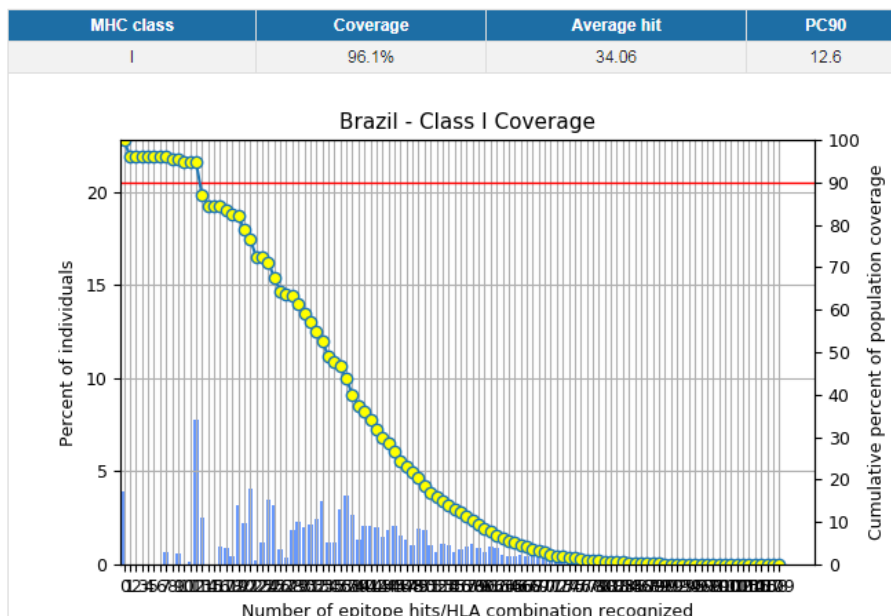


FIGURA 16 – Cobertura populacional do Brasil estimada para os complexos epítipo–HLA derivados das proteínas MPB64 e HBHA com afinidade de ligação ao MHC classe I. O gráfico apresenta a distribuição da cobertura populacional do território brasileiro calculada a partir dos epítomos preditos, em que as barras representam a frequência de indivíduos (%) em função do número de combinações epítipo/HLA reconhecidas (eixo X), enquanto a linha cumulativa indica a porcentagem acumulada da população coberta (eixo Y secundário). A análise revelou cobertura populacional global estimada de 96,1% com média de 34,06 reconhecimentos epítipo/HLA por indivíduo e valor de PC90 igual a 12,6.

Fonte: Elaborado pelos autores a partir de dados obtidos e analisados por meio da ferramenta *Population Coverage do Immune Epitope Database (IEDB)*. Disponível em: <https://www.iedb.org>. Acesso em: mar. 2022.

Finalizando as análises de cobertura populacional para MHC-II, obteve-se um percentual de 69,13%, evidenciando o potencial promissor da combinação dos epítomos na ampliação da resposta imunológica.

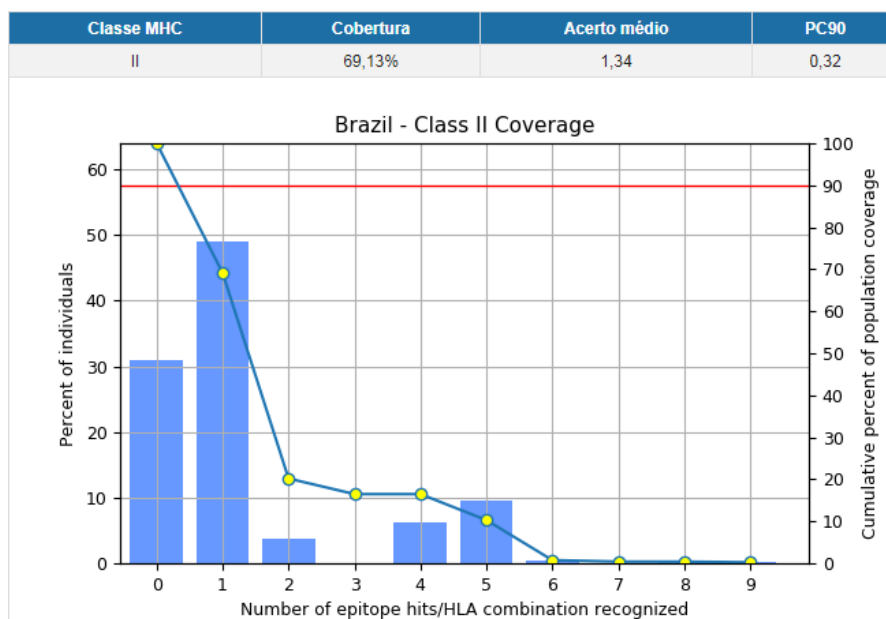


FIGURA 17 – Cobertura populacional do Brasil estimada para os complexos epítipo–HLA derivados das proteínas MPB64 e HBHA com afinidade de ligação ao MHC classe II. O gráfico apresenta a distribuição da cobertura populacional do território brasileiro calculada a partir dos epítopos preditos, em que as barras representam a frequência de indivíduos (%) em função do número de combinações epítipo/HLA reconhecidas (eixo X), enquanto a linha cumulativa indica a porcentagem acumulada da população coberta (eixo Y secundário). A análise revelou cobertura populacional global estimada de 69,13% com média de 1,34 reconhecimentos epítipo/HLA por indivíduo e valor de PC90 igual a 0,32.

Fonte: Elaborado pelos autores a partir de dados obtidos e analisados por meio da ferramenta *Population Coverage do Immune Epitope Database (IEDB)*. Disponível em: <https://www.iedb.org>. Acesso em: mar. 2022.

4.3 Avaliação da Frequência Global dos Alelos *HLA-A*01:01*, *HLA-A*03:01* e *HLA-A*11:01*

A análise de frequência dos alelos do HLA foi realizada utilizando a plataforma *Allele Frequency Net Database*, com o objetivo de identificar os alelos mais prevalentes no Brasil e no mundo. Considerando que os antígenos bacterianos são apresentados aos linfócitos T CD4⁺ no contexto de moléculas HLA de classe II, esta etapa buscou subsidiar a seleção de epítopos capazes de interagir com domínios específicos dessas moléculas.

Na análise, os alelos mais recorrentes nas predições de epítopos foram incluídos: *HLA-A*01:01*, *HLA-A*03:01* e *HLA-A*11:01*. As frequências alélicas foram determinadas com base em dados populacionais provenientes de estudos publicados (BUI *et al.*, 2006; ARRIETA-BOLAÑOS; HERNÁNDEZ-ZARAGOZA; BARQUERA, 2023), permitindo caracterizar a diversidade genética e a distribuição desses alelos nas populações avaliadas.

4.3.1 Análise da Frequência Global do Alelo HLA-A*01:01

O alelo HLA-A*01:01 apresentou ampla distribuição entre as populações analisadas, com variações regionais observadas em diferentes continentes. Os dados indicaram presença significativa desse alelo em múltiplos grupos populacionais, representando parcela relevante da diversidade genética global (Figura 18). A heterogeneidade observada na frequência alélica pode ser atribuída a fatores históricos, demográficos e evolutivos, incluindo processos migratórios, miscigenação, deriva genética, seleção natural e efeitos fundadores, que influenciam a composição genética das populações humanas (MACK *et al.*, 2009; SOLBERG *et al.*, 2008).

De modo geral, maiores frequências do HLA-A*01:01 foram identificadas em determinadas populações europeias e em grupos com ancestralidade europeia, enquanto frequências reduzidas foram observadas em algumas populações africanas, asiáticas e indígenas. Esse padrão de distribuição reforça a natureza altamente polimórfica do sistema HLA e evidencia a importância de considerar as especificidades genéticas regionais em estudos de imunoinformática e no desenvolvimento de estratégias vacinais (ROBINSON *et al.*, 2020; SIDNEY *et al.*, 2010).

A ampla dispersão geográfica do HLA-A*01:01 sugere que epítomos capazes de interagir com esse alelo podem contribuir significativamente para a cobertura populacional global, ampliando o potencial de reconhecimento imunológico em diferentes contextos étnicos e geográficos. Nesse sentido, a inclusão de alelos amplamente distribuídos nas etapas de predição e seleção de epítomos constitui uma estratégia relevante para o desenvolvimento de vacinas multiepitópicas com maior abrangência populacional (BUI *et al.*, 2006; DE GROOT; MARTIN, 2009).

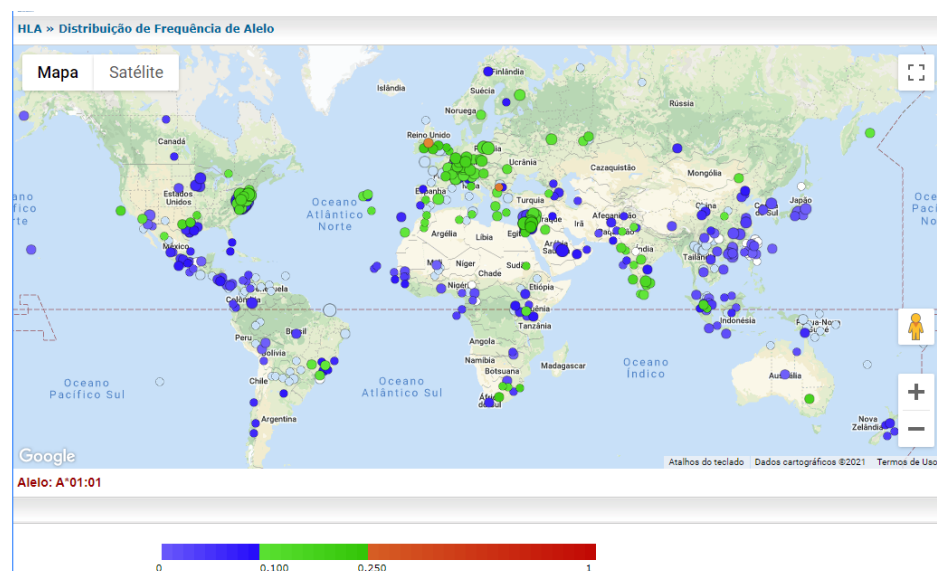


FIGURA 18 – Distribuição global da frequência alélica do HLA-A*01:01 nas populações mundiais. O mapa apresenta a distribuição geográfica da frequência do alelo HLA-A*01:01 em diferentes populações ao redor do mundo, com base nos registros disponíveis na plataforma *Allele Frequency Net Database*. Os círculos representam as populações amostradas, enquanto a escala de cores indica a frequência alélica observada, variando de menores frequências (tons de azul) a maiores frequências (tons de vermelho). Os dados evidenciam a variabilidade na distribuição do alelo entre diferentes regiões geográficas e grupos populacionais.

Fonte: Elaborado pelos autores a partir de dados obtidos e analisados por meio da plataforma *Allele Frequency Net Database*. Acesso em: jun. 2023

4.3.2 Análise da Frequência Global do Alelo HLA-A*03:01

O alelo HLA-A*03:01 apresentou distribuição moderada, sendo identificado em diferentes regiões geográficas com frequências variáveis. A presença desse alelo em múltiplas populações reforça sua relevância nas análises de reconhecimento antigênico e resposta imune (Figura 19). As variações observadas em sua frequência podem estar associadas a fatores demográficos, históricos e evolutivos, incluindo eventos migratórios, processos de miscigenação, deriva genética e pressões seletivas exercidas por patógenos ao longo da evolução humana (MACK *et al.*, 2009; SOLBERG *et al.*, 2008).

De maneira geral, o HLA-A*03:01 apresenta maior prevalência em populações europeias e em grupos com ancestralidade europeia, embora também seja detectado em frequências variáveis em populações da Ásia, África e Américas. Esse padrão evidencia o elevado polimorfismo do sistema HLA e ressalta a importância de considerar a distribuição alélica em diferentes contextos populacionais para o desenvolvimento de estratégias imunoterapêuticas e vacinais mais abrangentes (ROBINSON *et al.*, 2020).

A ampla ocorrência geográfica do HLA-A03:01 sugere que epítomos com capacidade de interação com esse alelo podem contribuir significativamente para a ampliação da cobertura populacional em estudos de predição imunoinformática. Dessa forma, a inclusão do HLA-A03:01 na seleção de epítomos candidatos pode favorecer o reconhecimento imunológico em diferentes grupos étnicos, aumentando o potencial de eficácia de vacinas multiepitópicas (BUI *et al.*, 2006; SIDNEY *et al.*, 2008).

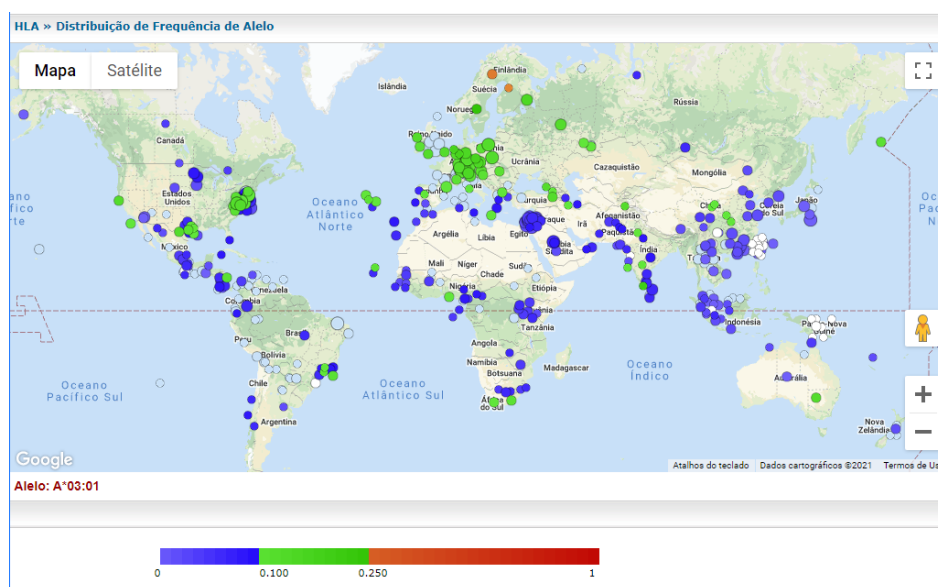


FIGURA 19 – Distribuição global da frequência alélica do HLA-A*03:01 nas populações mundiais. O mapa apresenta a distribuição geográfica da frequência do alelo HLA-A*03:01 em diferentes populações ao redor do mundo, com base nos registros disponíveis na plataforma *Allele Frequency Net Database*. Os círculos representam as populações amostradas, enquanto a escala de cores indica a frequência alélica observada, variando de menores frequências (tons de azul) a maiores frequências (tons de vermelho). Os dados evidenciam a variabilidade na distribuição do alelo entre diferentes regiões geográficas e grupos populacionais.

Fonte: Elaborado pelos autores a partir de dados obtidos e analisados por meio da plataforma *Allele Frequency Net Database*. Acesso em: jun. 2023

4.3.3 Análise da Frequência Global do Alelo HLA-A*11:01

A frequência do alelo HLA-A*11:01 apresentou variações significativas entre as populações analisadas, com maior prevalência observada em grupos específicos (Figura 20). Essa heterogeneidade evidencia a influência de fatores genéticos, demográficos e geográficos na distribuição global desse alelo, refletindo processos evolutivos como migrações

populacionais, deriva genética, efeito fundador e seleção natural mediada por patógenos (MACK *et al.*, 2009; SOLBERG *et al.*, 2008).

Os dados indicam maiores frequências do HLA-A*11:01 em populações do leste e sudeste asiático, incluindo regiões da China, Japão, Coreia e países do Sudeste Asiático, enquanto frequências mais baixas foram observadas em grande parte das populações europeias, africanas e americanas. Esse padrão de distribuição reforça o elevado polimorfismo do sistema HLA e destaca a importância da ancestralidade genética na composição do repertório imunogenético das populações humanas (ROBINSON *et al.*, 2020).

Considerando sua elevada prevalência em regiões geográficas específicas, epítomos com potencial de ligação ao HLA-A*11:01 podem desempenhar papel estratégico na ampliação da cobertura populacional em estudos voltados ao desenvolvimento de vacinas multiepitópicas direcionadas a populações asiáticas. Dessa forma, a inclusão desse alelo nas etapas de predição e seleção de epítomos contribui para o aumento da abrangência e da eficácia potencial de estratégias vacinais baseadas em imunoinformática, especialmente em contextos de elevada diversidade genética (BUI *et al.*, 2006; SIDNEY *et al.*, 2008).

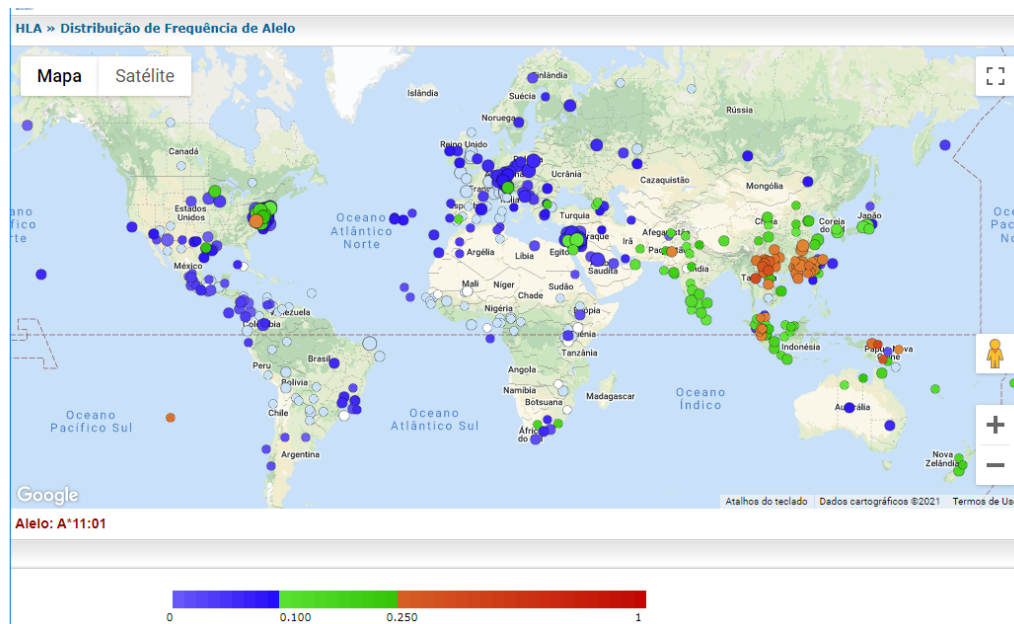


FIGURA 20 – Distribuição global da frequência alélica do HLA-A*11:01 nas populações mundiais. O mapa apresenta a distribuição geográfica da frequência do alelo HLA-A*11:01 em diferentes populações ao redor do mundo, com base nos registros disponíveis na plataforma *Allele Frequency Net Database*. Os círculos representam as populações amostradas, enquanto a escala de cores indica a frequência alélica observada, variando de menores frequências (tons de azul) a maiores frequências (tons de vermelho). Os dados evidenciam a variabilidade na distribuição do alelo entre diferentes regiões geográficas e grupos populacionais.

Fonte: Elaborado pelos autores a partir de dados obtidos e analisados por meio da plataforma *Allele Frequency Net Database*. Acesso em: jun. 2023

4.4 Seleção e Validação *in silico* de Epítomos Candidatos com Potencial Vacinal

Após a etapa de predição inicial, os epítomos identificados para as proteínas MPB64 e HBHA foram submetidos a uma análise de filtragem complementar, com o objetivo de selecionar apenas aqueles com maior potencial imunológico e perfil seguro para aplicações vacinais. Essa triagem foi conduzida com o auxílio de diferentes ferramentas bioinformáticas, que avaliaram parâmetros fundamentais como toxicidade, antigenicidade, imunogenicidade e capacidade de indução de IFN- γ .

A ferramenta *ToxinPred* foi utilizada para excluir epítomos potencialmente tóxicos, garantindo a segurança da sequência. Em seguida, a antigenicidade foi analisada no *VaxiJen v2.0*, sendo mantidos apenas os peptídeos com escore $\geq 0,4$, considerados preditivamente imunogênicos. A imunogenicidade foi avaliada no *IEDB*, selecionando os epítomos com escores mais próximos de 1, indicativos de maior potencial de reconhecimento imunológico. Por fim, a produção de IFN- γ foi verificada por meio da ferramenta *IFN epitope*, permitindo identificar peptídeos capazes de induzir resposta celular do tipo Th1.

Os resultados apresentados na Tabela 6 correspondem à triagem dos peptídeos da

proteína MPB64 com potencial de ligação ao MHC-I. Essa etapa de filtragem permitiu a obtenção de um conjunto reduzido de epítomos que apresentam os parâmetros mais favoráveis para indução de resposta imune.

Seleção de epítomos de MHC-I da proteína MPB64 avaliados quanto à toxicidade, antigenicidade, imunogenicidade e capacidade de indução de IFN- γ (tabela 6). O perfil final foi definido pela integração desses parâmetros, considerando como prioritários os epítomos que apresentaram simultaneamente elevada antigenicidade, imunogenicidade positiva e indução de IFN- γ . Os epítomos classificados como promissores apresentaram resultados favoráveis na maioria dos parâmetros avaliados, porém com menor desempenho em um ou mais critérios. Os epítomos moderados corresponderam àqueles com potencial imunológico intermediário ou parcialmente limitado, enquanto os de baixa prioridade apresentaram menor antigenicidade e/ou imunogenicidade predita, reduzindo seu potencial como candidatos vacinais.

TABELA 6- SELEÇÃO E PRIORIZAÇÃO DE EPÍTOPOS DE MHC-I DA PROTEÍNA MPB64

Epítopo	Toxicidade	Antigenicidade (VaxiJen)	Imunogenicidade (IEDB)	IFN- γ	Perfil final
QIQMSDPAY	Não tóxico	0,7914	0,3410	Positivo	Prioritário
MSDPAYNIN	Não tóxico	0,5297	0,1030	Positivo	Promissor
QAYRKPTY	Não tóxico	0,4897	0,0346	Positivo	Promissor
ELNITSATY	Não tóxico	1,1433	0,0696	Negativo	Promissor
SSTPREAPY	Não tóxico	0,5218	0,1726	Negativo	Promissor
QADTDLPV	Não tóxico	0,7877	0,0416	Negativo	Promissor
DTDPLPVVF	Não tóxico	0,6986	0,0338	Negativo	Promissor
TSATYQSAI	Não tóxico	0,6157	-0,1776	Positivo	Moderado
VTNDGVIFF	Não tóxico	0,4483	0,2728	Negativo	Moderado
KAFDWDQAY	Não tóxico	0,2014	0,2220	Negativo	Baixa prioridade

Fonte: Elaborado pela autora com base nos resultados obtidos nas ferramentas bioinformáticas *Immune Epitope Database (IEDB)*, *ToxinPred*, *VaxiJen v2.0* e *IFNepitope*.

A Tabela 7 apresenta os resultados da triagem dos peptídeos da proteína MPB64 quanto ao seu potencial de ligação ao MHC-II. Os mesmos parâmetros de seleção e priorização adotados anteriormente, diferenciando-se apenas pelo tipo de molécula de apresentação antigênica avaliada, foram utilizados.

TABELA 7- SELEÇÃO E PRIORIZAÇÃO DE EPÍTOPOS DE MHC-II DA PROTEÍNA MPB64

Epítipo	Toxicidade	Antigenicidade (VaxiJen)	Imunogenicidade (IEDB)	IFN-γ	Perfil final
DPAYNINISLPSYYP	Não tóxico	1,3183	0,5843	Positivo	Prioritário
SDPAYNINISLPSYY	Não tóxico	1,0888	0,4056	Positivo	Prioritário
MSDPAYNINISLPSY	Não tóxico	1,0193	0,2461	Positivo	Prioritário
QMSDPAYNINISLPS	Não tóxico	1,0013	0,0281	Positivo	Prioritário
YQNFAVTNDGVIFFF	Não tóxico	0,5169	0,0105	Positivo	Prioritário
PAYNINISLPSYYPD	Não tóxico	1,5020	0,2185	Negativo	Promissor
AYNINISLPSYYPDQ	Não tóxico	1,0888	0,0191	Negativo	Promissor
MRIKIFMLVTAVVLL	Não tóxico	0,7450	0,0630	Negativo	Promissor
RIKIFMLVTAVVLLC	Não tóxico	0,4709	0,0370	Negativo	Promissor
NFAVTNDGVIFFFNP	Não tóxico	0,7428	0,0011	Negativo	Promissor
REAPYELNITSATYQ	Não tóxico	0,7941	0,1443	Negativo	Promissor
RDKFLSAATSSTPRE	Não tóxico	0,1884	0,6223	Negativo	Moderado
TRDKFLSAATSSTPR	Não tóxico	0,3089	0,4802	Negativo	Moderado
DKFLSAATSSTPREA	Não tóxico	0,3124	0,2583	Negativo	Moderado
QTRDKFLSAATSSTP	Não tóxico	0,3567	0,2193	Negativo	Moderado
VIFFFNPGELLPEAA	Não tóxico	0,1884	0,4137	Negativo	Moderado
QNFAVTNDGVIFFFN	Não tóxico	0,3529	0,0035	Negativo	Moderado
GVIFFNPGELLPEA	Não tóxico	-0,1790	0,7328	Negativo	Baixa prioridade
DGVIFFNPGELLPE	Não tóxico	-0,2573	0,6366	Negativo	Baixa prioridade

Fonte: Elaborado pela autora com base nos resultados obtidos nas ferramentas bioinformáticas Immune Epitope Database (IEDB), ToxinPred, VaxiJen v2.0 e IFNepitope.

Após a avaliação dos peptídeos da proteína MPB64, iniciaram-se as análises da proteína HBHA. Os mesmos critérios e parâmetros, permitindo a comparação entre os resultados e a seleção dos epítopos mais promissores, foram aplicados. A Tabela 8 apresenta os resultados da seleção e priorização dos epítopos da proteína HBHA com potencial de ligação ao MHC-I.

TABELA 8- SELEÇÃO E PRIORIZAÇÃO DE EPÍTOPOS DE MHC-I DA PROTEÍNA HBHA

Epítopo	Toxicidade	Antigenicidade (VaxiJen)	Imunogenicidade (IEDB)	IFN- γ	Perfil final
DASARAEGY	Não tóxico	1,2338	0,1772	Positivo	Prioritário
YLEAATNRY	Não tóxico	0,4683	0,1713	Positivo	Prioritário
YVDQAVELT	Não tóxico	-0,0310	0,0456	Positivo	Moderado
ATNRYNELV	Não tóxico	0,0217	0,1183	Negativo	Baixa prioridade

Fonte: Elaborado pela autora com base nos resultados obtidos nas ferramentas bioinformáticas Immune Epitope Database (IEDB), ToxinPred, VaxiJen v2.0 e IFNepitope.

Seguindo a mesma abordagem metodológica adotada para MHC-I, as análises para MHC-II da proteína HBHA foram realizadas. A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos.

TABELA 9- SELEÇÃO E PRIORIZAÇÃO DE EPÍTOPOS DE MHC-II DA PROTEÍNA HBHA

Epítopo	Toxicidade	Antigenicidade (VaxiJen)	Imunogenicidade (IEDB)	IFN- γ	Perfil final
EGYVDQAVELTQEAL	Não tóxico	0,1432	0,0593	Positivo	Promissor
TKFQEDLPEQFIELR	Não tóxico	0,4593	-0,0110	Negativo	Moderado
LTKFQEDLPEQFIEL	Não tóxico	-0,1043	0,3209	Negativo	Moderado
RLTKFQEDLPEQFIE	Não tóxico	-0,1933	0,2982	Negativo	Baixa prioridade
ARLTKFQEDLPEQFI	Não tóxico	-0,1222	0,1503	Negativo	Baixa prioridade

Fonte: Elaborado pela autora com base nos resultados obtidos nas ferramentas bioinformáticas Immune Epitope Database (IEDB), ToxinPred, VaxiJen v2.0 e IFNepitope.

4.5 Seleção Final e Caracterização dos Epítomos Candidatos com Potencial Vacinal.

Após as análises de filtragem baseadas em toxicidade, antigenicidade, imunogenicidade e capacidade de indução de IFN- γ , os epítomos que apresentaram o conjunto mais favorável de características imunoinformáticas, tanto para as proteínas MPB64 quanto HBHA, e para as classes MHC-I e MHC-II, foram selecionados. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 8.

Para a proteína MPB64, destacaram-se epítomos de MHC-I com bom desempenho global e indução de IFN- γ , além de epítomos de MHC-II com elevada antigenicidade e forte potencial de resposta imune T auxiliar, evidenciado pelos altos escores e positividade para

IFN- γ . Em relação à proteína HBHA, epítomos de MHC-I com perfil promissor para resposta imune T citotóxica, bem como epítomos de MHC-II com potencial de indução de resposta imune do tipo Th1, mesmo apresentando variações nos demais parâmetros, foram selecionados.

TABELA 10 - EPÍTOPOS PRIORITÁRIOS SELECIONADOS DAS PROTEÍNAS MPB64 E HBHA PARA COMPOSIÇÃO VACINAL MULTIEPITÓPICA

Proteína	Classe	Epítopo	Toxicidade	Antigenicidade	Imunogenicidade	IFN- γ	Justificativa para seleção
MPB64	MHC-I	QIQMSDPAY	Não tóxico	0,7914	0,3410	Positivo	Melhor desempenho global entre os epítomos de MHC-I
MPB64	MHC-I	MSDPAYNIN	Não tóxico	0,5297	0,1030	Positivo	Elevada antigenicidade e indução de IFN- γ
MPB64	MHC-II	DPAYNINISLP SYYP	Não tóxico	1,3183	0,5843	Positivo	Alta antigenicidade e forte potencial imune T auxiliar
MPB64	MHC-II	MSDPAYNINI SLPSY	Não tóxico	1,0193	0,4056	Positivo	Excelente perfil imunológico integrado
MPB64	MHC-II	QMSDPAYNI NISLPS	Não tóxico	1,0013	0,2461	Positivo	Alta conservação do motivo imunogênico
HBHA	MHC-I	DASARAEGY	Não tóxico	1,2338	0,1772	Positivo	Melhor epítopo de HBHA para resposta imune T citotóxica
HBHA	MHC-I	YLEAATNRY	Não tóxico	0,4683	0,1713	Positivo	Perfil equilibrado e promissor
HBHA	MHC-II	EGYVDQAVE LTQEAL	Não tóxico	0,1432	0,0593	Positivo	Potencial de indução de resposta imune do tipo Th1
HBHA	MHC-II	TKFQEDLPEQ FIELR	Não tóxico	0,4593	-0,0110	Negativo	Melhor antigenicidade entre os epítomos de MHC-II

Fonte: Elaborado pela autora com base nos resultados obtidos nas ferramentas bioinformáticas Immune Epitope Database (IEDB), ToxinPred, VaxiJen v2.0 e IFNepitope.

A seleção final considerou a integração desses critérios, priorizando epítomos não tóxicos, antigênicos, com potencial imunogênico e capacidade de indução de IFN- γ , visando sua aplicação na composição de uma vacina multiepitópica.

4.6- Desenho Estrutural da Vacina Multiepitópo

Após a identificação dos epítomos selecionados das proteínas MPB64 e HBHA, foi realizada a construção da vacina multiepitópo. A sequência vacinal foi composta por epítomos de MHC-I e MHC-II previamente selecionados nas etapas de predição e filtragem imunoinformática. Foram incluídos quatro epítomos de MHC-I e cinco epítomos de MHC-II derivados das proteínas MPB64 e HBHA. Os epítomos foram organizados em uma estrutura modular utilizando linkers específicos entre os diferentes blocos da construção.

O linker AAY foi empregado entre os epítomos de MHC-I, enquanto o linker GP GPG foi utilizado entre os epítomos de MHC-II e entre os diferentes blocos funcionais da construção. Quando utilizado adjuvante molecular na extremidade N-terminal, foi inserido o linker EAAAK para separação estrutural entre o adjuvante e os epítomos. A sequência vacinal final foi submetida à avaliação antigênica utilizando a plataforma VaxiJen.

4.6.1 Organização da construção vacinal

Epítomos MHC-I

- Epítomo 1 (MPB64): QIQMSDPAY
- Epítomo 2 (MPB64): MSDPAYNIN
- Epítomo 3 (HBHA): DASARAEGY
- Epítomo 4 (HBHA): YLEAATNRY

Epítomos MHC-II

- Epítomo 1 (MPB64): DPAYNINISLPSYYP

- Epítopo 2 (MPB64): MSDPAYNINISLPSY
- Epítopo 3 (MPB64): QMSDPAYNINISLPS
- Epítopo 4 (HBHA): EGYVDQAVELTQEAL
- Epítopo 5 (HBHA): TKFQEDLPEQFIELR

Linkers empregados

- AAY: entre epítomos de MHC-I
- GP GPG: entre epítomos de MHC-II e blocos funcionais
- EAAAK: entre o adjuvante molecular e o primeiro epítopo

Configurações propostas para a construção da vacina multiepítopo contendo epítomos derivados das proteínas MPB64 e HBHA da BCG vaccine, apresentando as diferentes estratégias de organização da sequência vacinal, incluindo versões sem adjuvante, com linker estrutural e com incorporação de β -defensina como adjuvante molecular.

TABELA 11 – CONFIGURAÇÕES PROPOSTAS PARA A CONSTRUÇÃO DA VACINA MULTIEPÍTOPO

CONSTRUÇÃO VACINAL	SEQUÊNCIA
Sequência vacinal sem adjuvante	QIQMSDPAYAAYMSDPAYNINAAYDASARAEGYAAYYLEAATNRYGP GPGDPAYNINISLPSYYPGP GPGMSDPAYNINISLPSYGP GPGQMSDPAYNINISLPSGP GPGEGYVDQAVELTQEALGP GPGTKFQEDLPEQFIELR
Sequência vacinal com linker estrutural	EAAAKQIQMSDPAYAAYMSDPAYNINAAYDASARAEGYAAYYLEAATNRYGP GPGDPAYNINISLPSYYPGP GPGMSDPAYNINISLPSYGP GPGQMSDPAYNINISLPSGP GPGEGYVDQAVELTQEALGP GPGTKFQEDLPEQFIELR
Estrutura geral com adjuvante molecular	[Adjuvante]-EAAAK-QIQMSDPAY-AAY-MSDPAYNIN-AAY-DASARAEGY-AAY-YLEAATNRY-GP GPG-DPAYNINISLPSYYP-GP GPG-MSDPAYNINISLPSY-GP GPG-QMSDPAYNINISLPS-GP GPG-EGYVDQAVELTQEAL-GP GPG-TKFQEDLPEQFIELR
Construção vacinal com β -defensina como adjuvante	β -defensina-EAAAK-QIQMSDPAY-AAY-MSDPAYNIN-AAY-DASARAEGY-AAY-YLEAATNRY-GP GPG-DPAYNINISLPSYYP-GP GPG-MSDPAYNINISLPSY-GP GPG-QMSDPAYNINISLPS-GP GPG-EGYVDQAVELTQEAL-GP GPG-TKFQEDLPEQFIELR

Fonte: Elaborado pela autora com base nos resultados obtidos por meio da ferramenta bioinformática VaxiJen v2.0.

Essa construção representa um candidato vacinal racionalmente projetado, reunindo epítomos derivados das proteínas MPB64 e HBHA em uma única sequência quimérica. Tal abordagem possibilita a integração de diferentes determinantes antigênicos em uma mesma formulação, potencializando a indução de respostas imunes específicas e complementares. Além disso, a construção obtida apresenta características adequadas para as etapas subsequentes de avaliação *in silico*, incluindo análises de antigenicidade, propriedades físico-químicas, modelagem estrutural tridimensional, estudos de *docking* molecular e simulações de dinâmica molecular, etapas fundamentais para a caracterização do potencial imunogênico e da estabilidade estrutural do candidato vacinal.

4.7 Dados *in vitro*

4.7.1 Análise do Crescimento da Cepas Vacinal BCG

Durante o crescimento da cepa Moreau RDJ nos meios de cultivo sólido 7H9 e líquido 7H10, os testes de viabilidade da vacina foram feitos. Esse crescimento se torna necessário para obter informações do crescimento da vacina BCG na sua forma vacinal, para avaliarmos os crescimentos após a inserção do plasmídeo.

4.7.2 Análise do Crescimento da Cepas Vacinal BCG em Meio de Cultura Middlebrook 7H10

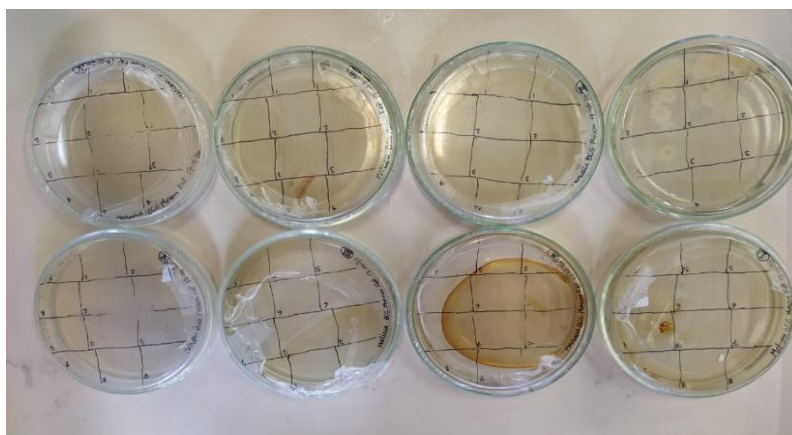


FIGURA 21: A imagem apresenta oito placas de Petri inoculadas com diferentes concentrações da cepa vacinal BCG, mantidas em meio sólido Middlebrook 7H10. Após 30 dias de incubação, não foi observado crescimento microbiano visível em nenhuma das condições avaliadas.

Fonte: Elaborado pela autora.

Regularmente, o crescimento de *M. bovis* BCG é feito em 30 dias (BENÉVOLE-DE-ANDRADE *et al.*, 2005). Porém, inicialmente com este prazo não havia colônia formada. As placas retornaram para a estufa por mais 30 dias onde então obtivemos um crescimento de colônias para fazer a contagem de UFC e a viabilidade da vacina.

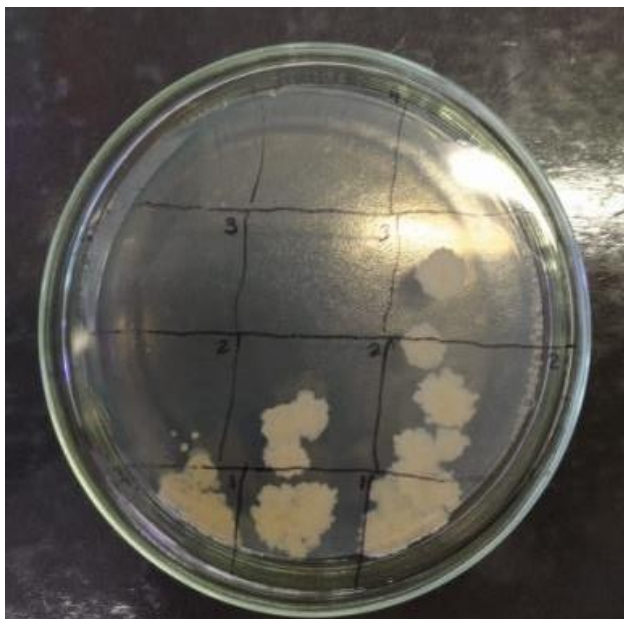


FIGURA 22: Imagem representativa da cultura de *Mycobacterium bovis* BCG em meio sólido, evidenciando a formação de colônias após 60 dias de incubação sob condições experimentais controladas.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.7.3 Avaliação do Crescimento Cepa Vacinal BCG em Meio Líquido Middlebrook 7H9

Paralelamente ao crescimento em meio sólido 7H10, o crescimento em meio líquido 7H9 foi feito. Novamente, com 30 dias de cultivo, a BCG vacinal não obteve crescimento, somente após os 60 dias de cultivo. Desta maneira um crescimento da BCG na sua forma vacinal requer mais tempo.

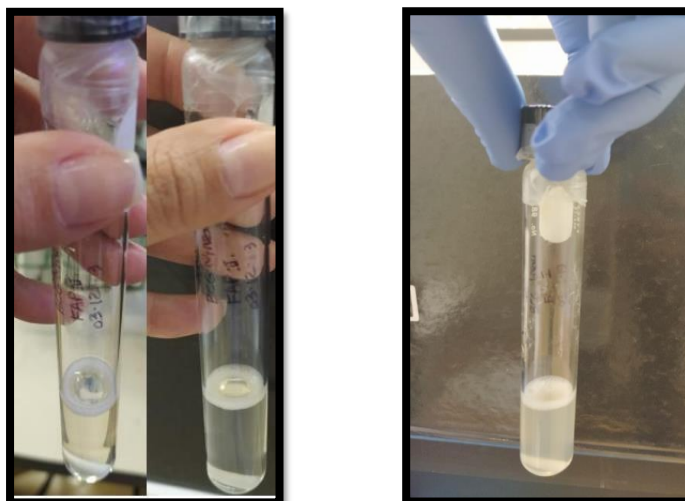


FIGURA 23: A imagem apresenta três tubos de ensaio contendo a cepa vacinal BCG cultivada em meio líquido Middlebrook 7H9, avaliados após 20, 30 e 60 dias de incubação. Observa-se a presença de turbidez, indicativa de crescimento microbiano, apenas no tubo correspondente ao período de 60 dias.

Fonte: Elaborado pela autora.

A Figura 23 (A e B) apresenta o crescimento da cepa vacinal BCG em meio líquido Middlebrook 7H9 ao longo de 20, 30 e 60 dias de incubação. Observa-se que, nos tempos iniciais (20 e 30 dias), os meios de cultura permanecem límpidos, sem evidência de turbidez, indicando ausência de crescimento detectável. Em contraste, após 60 dias de incubação (B), verifica-se a presença de turbidez, característica de crescimento bacteriano e aumento da densidade celular no meio.

4.7.4 Determinação da Contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

Com os resultados apresentados no crescimento em meio sólido, procedemos na UFC. Esse resultado será utilizado para determinar a quantidade de bacilos a ser empregada nos experimentos de imunização, bem como para estimar o tempo necessário para a obtenção dos microrganismos em quantidade adequada para os ensaios. O cálculo estatístico é analisado com a multiplicação da UFC encontrada pelo inverso da diluição que foi realizada a cultura, e multiplicado pelo fator de correção para que o resultado final seja em mL. Sendo assim o número encontrado foi de $4,3 \times 10^4$ UFC/mL.

4.7.5 Propagação e Amplificação de Construções Plasmidiais em *Escherichia coli*

A transformação das células competentes de *Escherichia coli* DH10B por eletroporação foi bem-sucedida, conforme evidenciado pelo crescimento de colônias nas placas de ágar LB suplementadas com canamicina (Figura 24). As colônias foram obtidas a partir da incorporação das construções plasmidiais pMV261, pMV261-HBHA, pMV361 e pMV361-HBHA, apresentando morfologia típica de *E. coli*, com coloração esbranquiçada e bordas regulares, indicando viabilidade celular e expressão do marcador de resistência ao antibiótico. A ausência de crescimento nas placas controle negativas confirmou a eficiência do antibiótico e a ausência de contaminações externas durante o processo de transformação.

Após a confirmação do crescimento, colônias isoladas foram selecionadas para preparo de inóculo e posterior extração de DNA plasmidial. As culturas apresentaram crescimento homogêneo em meio LB sob agitação, atingindo densidade óptica (OD₆₀₀) de aproximadamente 0,6, valor ideal para a coleta e extração do material genético.

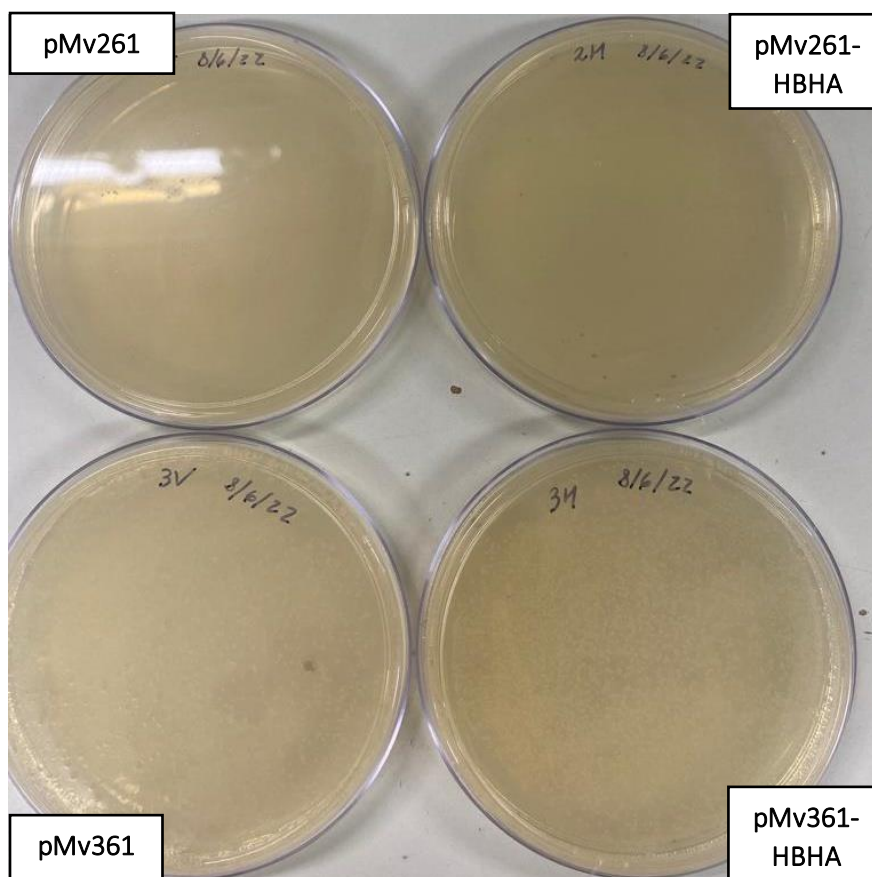


FIGURA 24: A imagem apresenta quatro placas de Petri contendo colônias bacterianas de *E. coli* DH10B após transformação com os plasmídeos pMV261, pMV261-HBHA, pMV361 e pMV361-HBHA, cultivadas em meio LB acrescido de canamicina. O crescimento observado indica a eficiência da transformação e a manutenção dos plasmídeos sob pressão seletiva do antibiótico.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.7.6 Extração, Purificação e Quantificação de DNA Plasmidial

A extração do DNA plasmidial a partir das culturas transformadas foi realizada utilizando o kit Norgen Biotek Corp®, resultando em amostras com concentrações entre **23,6 e 35,0 ng/μL**. As razões de pureza **A260/A280** variaram entre **1,84 e 1,88**, enquanto as razões **A260/A230** oscilaram entre **1,57 e 1,90** (tabela 12). Esses valores indicam boa qualidade do DNA extraído, com mínima contaminação por proteínas ou resíduos de solventes.

TABELA 12- EXTRAÇÃO DE DNA

Amostra	Concentração (ng/μL)	A260/A280	A260/A230
1	34,4	1,88	1,82
2	28,3	1,85	1,64
3	23,6	1,84	1,57
4	35,0	1,88	1,90

Fonte: Elaborado pela autora com base nos resultados obtidos na quantificação de DNA plasmidial utilizando o equipamento Thermo Fisher Scientific (linha Thermo Scientific NanoDrop).

O espectro de absorbância revelou um pico máximo em 260 nm, característico de ácidos nucleicos, confirmando a presença predominante de DNA de dupla fita (dsDNA). A forma simétrica da curva e a ausência de absorção significativa na região de 230 nm reforçam a pureza do material genético obtido (Figura 25) .



FIGURA 25: A imagem ilustra a interface do equipamento de espectrofotometria NanoDrop, da marca Thermo Fisher Scientific, onde pode ser observada a absorvância do DNA plasmidial analisado, utilizada para determinação da concentração e avaliação da pureza da amostra por meio de leitura espectrofotométrica.

Fonte: Elaborado pela autora com base nos resultados obtidos por meio do equipamento NanoDrop (Thermo Fisher Scientific).

4.7.7 Confirmação da presença dos plasmídeos em *M. smegmatis* mc²155

Após a eletroporação dos plasmídeos pMV261, pMV261-HBHA, pMV361 e pMV361-HBHA em *M. smegmatis* mc²155, a presença das construções recombinantes foi confirmada por eletroforese em gel de agarose a 0,8%. O DNA plasmidial foi extraído das colônias selecionadas em meio LB-ágar suplementado com canamicina (25 µg/mL) e analisado quanto ao perfil de migração eletroforética (Figura 26).

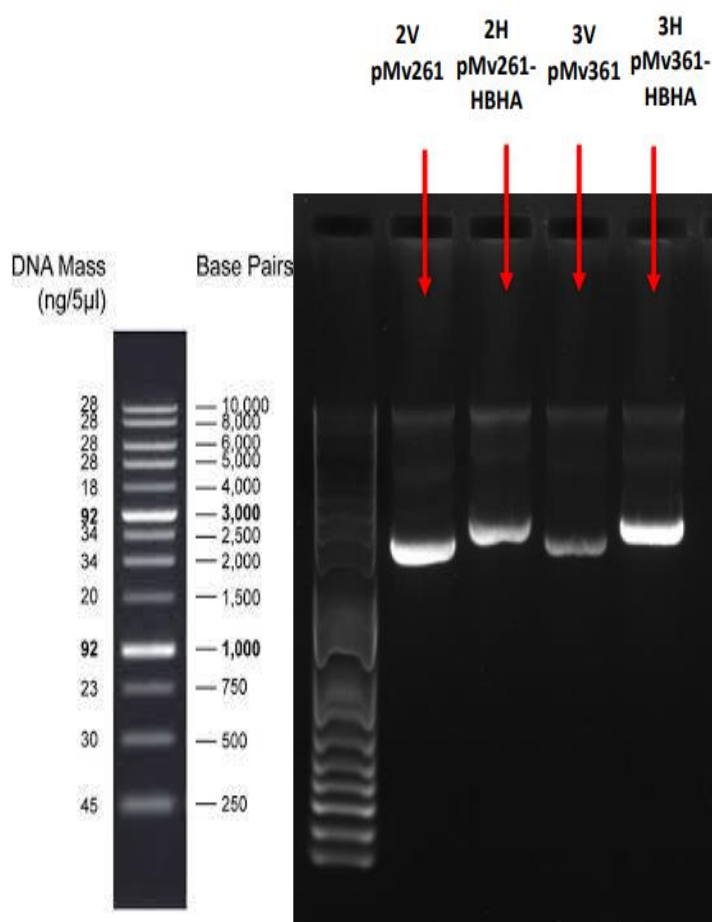


FIGURA 26- Imagem ilustrando o resultado de uma corrida em gel de agarose (0,8%), na qual pode ser observada a presença dos plasmídeos pMV261, pMV261-HBHA, pMV361 e pMV361-HBHA em *Mycobacterium smegmatis* mc²155, evidenciada pelos perfis de bandas obtidos após a eletroforese.

Na Figura 26, é possível observar bandas correspondentes às amostras de DNA plasmidial recuperadas das transformações com os vetores pMV261 e pMV361, tanto nas versões controle (2V e 3V), quanto nas contendo o inserto HBHA (2H e 3H). As amostras apresentaram bandas nítidas e com mobilidade compatível com o tamanho esperado para os respectivos plasmídeos (~5,7 kb para pMV261 e ~6,8 kb para pMV361), indicando que a etapa de transformação e propagação em *M. smegmatis* foi bem-sucedida.

A presença de bandas adicionais em algumas amostras pode ser atribuída a diferentes conformações do DNA plasmidial (superenovelado, relaxado ou linearizado), fenômeno comumente observado em análises de plasmídeos extraídos de micobactérias. Esses resultados confirmam a manutenção e a integridade das construções pMV261-HBHA e pMV361-HBHA após a transformação, assegurando a disponibilidade dos vetores recombinantes para as etapas subsequentes de expressão e caracterização.

4.7.8 Propagação *M. smegmatis* mc2155 recombinantes

A formação de colônias foi observada após um período de incubação de até 4 dias a 37°C, indicando o sucesso na transformação e a manutenção dos plasmídeos de interesse. Na Figura 26, observa-se o crescimento de colônias em todas as placas contendo os vetores controle (pMV261 e pMV361) e os plasmídeos recombinantes com o gene HBHA (pMV261-HBHA e pMV361-HBHA). A densidade e o tamanho das colônias variaram entre as construções, sendo visivelmente menores nas amostras transformadas com os plasmídeos contendo o inserto HBHA.

Esses resultados confirmam que as células de *M. smegmatis* mc²155 foram competentemente transformadas, mantendo os vetores pMV261 e pMV361, bem como suas respectivas versões recombinantes contendo o gene HBHA, o que permitiu a continuidade dos experimentos de expressão e análise funcional.

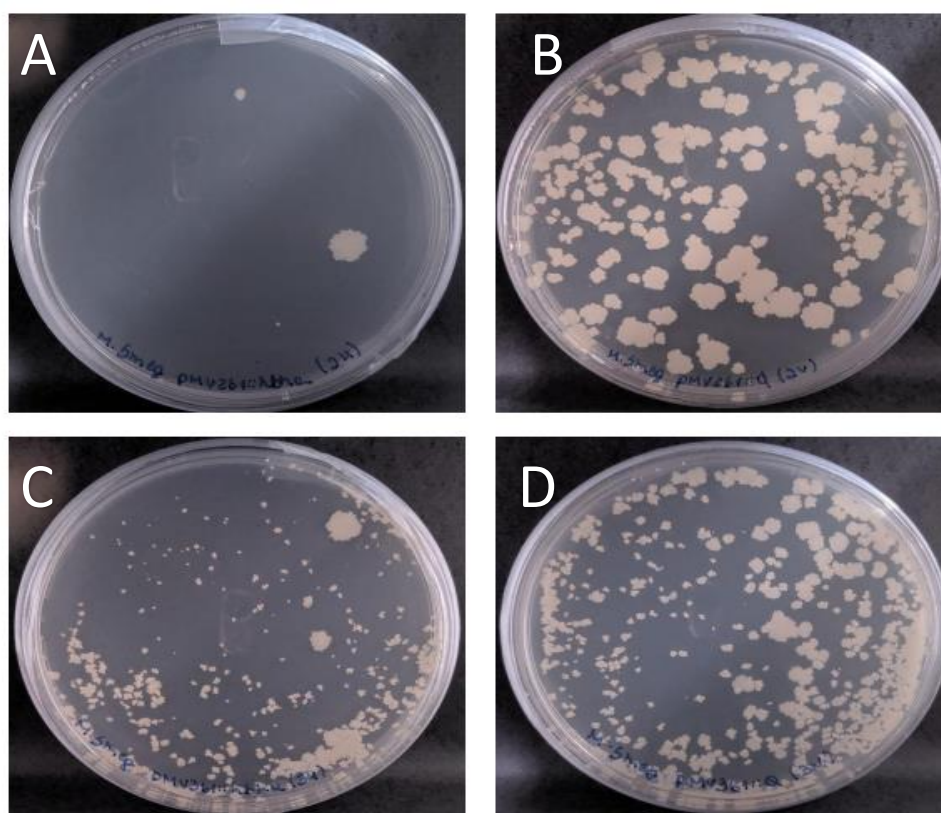


FIGURA 27: Imagem de quatro placas de Petri (A–D) contendo crescimento de colônias de *Mycobacterium smegmatis* mc²155 transformadas com os plasmídeos pMV261-HBHA (A), pMV261 (B), pMV361-HBHA (C) e pMV361 (D), evidenciando a viabilidade celular e a eficiência do processo de transformação bacteriana.

4.7.9 Análise do perfil proteico de cepas recombinantes de *M. smegmatis* por SDS-PAGE 12%

A análise do perfil proteico das cepas de *M. smegmatis* mc²155 transformadas com os plasmídeos pMV261, pMV261-HBHA, pMV361 e pMV361-HBHA foi realizada por eletroforese em gel de poliácridamida a 12% (SDS-PAGE). As amostras correspondentes às frações solúveis e insolúveis foram obtidas após lise celular por sonicação, conforme descrito nos Materiais e Métodos.

Na Figura 28, observa-se o padrão de bandas proteicas referente às frações solúveis das culturas recombinantes. As amostras apresentaram perfis similares, caracterizados pela presença de múltiplas bandas correspondentes às proteínas endógenas de *M. smegmatis* mc²155. Contudo, nas amostras referentes às cepas transformadas com os plasmídeos contendo o gene HBHA (pMV261-HBHA e pMV361-HBHA), é possível notar o surgimento de uma banda adicional com peso molecular aproximado de 22–24 kDa, compatível com o tamanho esperado para a proteína HBHA recombinante.

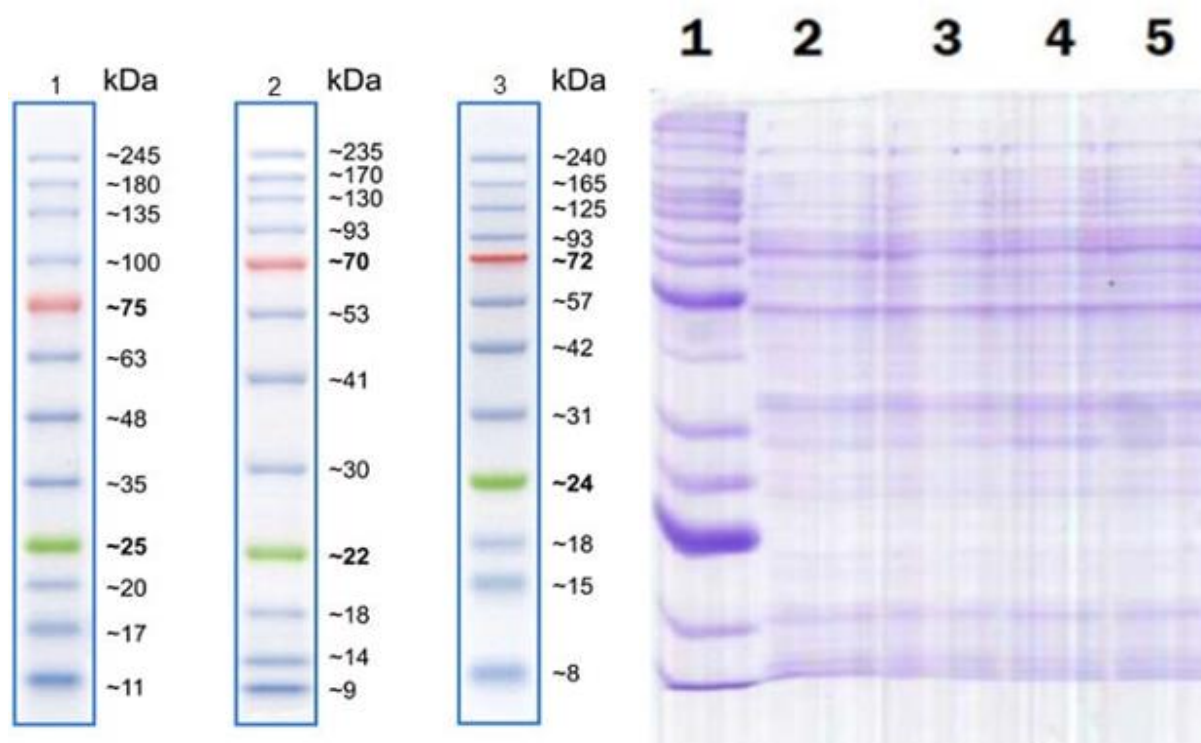


FIGURA 28 - Imagem representando o perfil proteico obtido a partir de corrida eletroforética em gel de poliácridamida a 12% (SDS-PAGE), evidenciando a fração solúvel de *Mycobacterium smegmatis* mc²155 transformada com diferentes construções plasmidiais. Observam-se cinco bandas (1 a 5), permitindo a comparação do padrão de expressão proteica entre os diferentes clones recombinantes.

De modo semelhante, a análise das frações insolúveis (Figura 29) evidenciou um padrão de bandas mais concentrado, sugerindo a presença de proteínas agregadas e/ou parcialmente insolúveis. A banda de aproximadamente 24 kDa também pôde ser observada nessas frações, indicando que parte da proteína HBHA expressa pode estar associada à fração insolúvel, possivelmente em forma de corpúsculos de inclusão ou agregados proteicos.

Esses resultados confirmam a expressão da proteína HBHA em *M. smegmatis* mc²155 e indicam que a estratégia de clonagem empregada nos vetores pMV261 e pMV361 foi eficiente para promover a produção da proteína recombinante, ainda que parte dela se apresente em fração insolúvel.

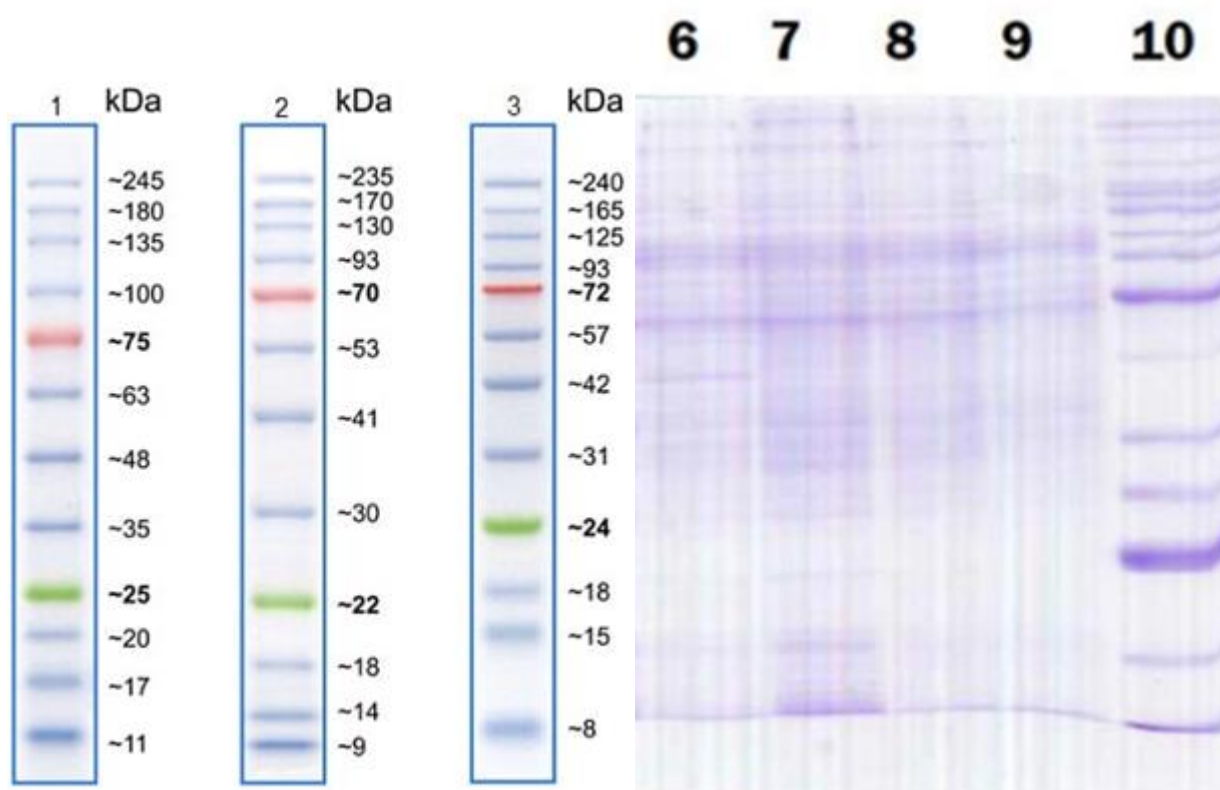


FIGURA 29: Imagem representando o perfil proteico obtido a partir de corrida eletroforética em gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE), evidenciando a fração insolúvel de *Mycobacterium smegmatis* mc²155 transformada com diferentes construções plasmidiais. Observam-se cinco bandas (6 a 10), permitindo a comparação do padrão de expressão proteica entre os diferentes clones recombinantes na fração insolúvel.

5- DISCUSSÃO

Por mais de 100 anos, a vacina BCG continua sendo a única medida profilática contra a TB licenciada pela OMS, e mesmo sendo utilizada há tanto tempo, pouco se sabe sobre seu mecanismo de proteção. Assim, o mecanismo de indução de resposta imune contra a TB proporcionada pela vacina BCG, ainda não é de amplo conhecimento. Alguns parâmetros, tais como o nível de morte celular em macrófagos infectados pelo *M. bovis* BCG e o perfil de citocinas induzido pelas subcepas de BCG em linfócitos, podem ser bons marcadores comparativos de resposta imunológica nas células provenientes da população estudada (DA SILVA *et al.*, 2022).

Neste estudo, a escolha das proteínas MPB64 e HBHA fundamentam-se diretamente nas diferenças evolutivas entre as subcepas da vacina BCG e no impacto dessas variações sobre o repertório antigênico (KAUFMANN *et al.*, 2022). Ao longo dos anos, após o início da sua produção em massa, a vacina BCG passou a ser distribuída pelo mundo, e a falta de padronização na forma de transporte, armazenamento e cultivo, propiciou variabilidade genética e bioquímica, seguido do surgimento de variadas subcepas da vacina BCG (RITZ *et al.*, 2008; DA COSTA *et al.*, 2014). Como já mencionado, uma outra RD-2 destaca-se por codificar antígenos relevantes, como a proteína MPB64, cuja presença é característica de cepas consideradas “antigas”, como a BCG Moreau, e ausente em cepas mais recentes, como a BCG Pasteur (ANGELIDOU *et al.*, 2020).

Nesse contexto, a manutenção de regiões como RD-2 e RD-14 na cepa BCG Moreau confere um perfil antigênico mais completo e fidedigno à subcepa BCG Pasteur original, permitindo a expressão de proteínas imunologicamente relevantes (ASADIAN *et al.*, 2022). Por outro lado, deleções adicionais, como a RD-16, contribuem para diferenças no proteoma dessas subcepas de BCG (ABDALLA *et al.*, 2015). Essas variações genômicas refletem diretamente na diversidade da resposta imune induzida, uma vez que influenciam a presença ou ausência de epítomos capazes de serem reconhecidos pelo sistema imune (KAUFMANN *et al.*, 2020). Estudos demonstram que proteínas associadas a essas regiões, como a MPB64, contêm epítomos imunologicamente relevantes; porém, sujeitos à pressão seletiva, podendo ser perdidos ao longo da evolução das cepas vacinais (LE HANG *et al.*, 2021; ASADIAN *et al.*, 2022).

A perda progressiva de antígenos imunologicamente relevantes ao longo da evolução das subcepas de BCG levanta uma questão central para o desenvolvimento de vacinas de nova geração: até que ponto a redução do repertório antigênico contribui para a variabilidade da proteção observada mundialmente? Embora a eficácia da BCG seja multifatorial, a ausência de proteínas como MPB64 em determinadas subcepas pode limitar o reconhecimento de epítomos específicos por populações geneticamente distintas. Nesse contexto, a reintrodução racional desses antígenos em plataformas vacinais modernas representa uma estratégia potencial para ampliar a amplitude e a qualidade da resposta imune induzida (KAUFMANN *et al.*, 2020; ASADIAN *et al.*, 2022). Dessa forma, a seleção de antígenos conservados, como da proteína MPB64, representa uma estratégia racional para o desenvolvimento de vacinas mais abrangentes (KAUFMANN SHE *et al.*, 2020).

Além disso, a HBHA destaca-se por apresentar elevado grau de conservação entre espécies do complexo MTB, diferentemente de antígenos suscetíveis a perdas durante a evolução de determinadas subcepas vacinais, característica que reforça seu potencial como alvo imunológico e vacinal (BETTENCOURT *et al.*, 2020; DEL NOGAL *et al.*, 2022). A relevância da HBHA transcende sua conservação genética. Estudos demonstram que respostas robustas contra essa proteína são frequentemente observadas em indivíduos com infecção latente, mas não em pacientes com TB ativa (HOUGARDY *et al.*, 2007; TEMMERMAN *et al.*, 2004). Esse padrão sugere que a HBHA pode estar associada a mecanismos imunológicos naturalmente protetores, tornando sua inclusão em formulações vacinais particularmente interessante (HOUGARDY *et al.*, 2007). Assim, além de atuar como fonte de epítomos conservados, a HBHA pode contribuir para reproduzir componentes da resposta imune observada em indivíduos capazes de controlar a infecção de forma eficiente (BETTENCOURT *et al.*, 2020; HOUGARDY *et al.*, 2007).

Estudos demonstram que essa proteína desempenha papel relevante na indução da imunidade celular, sendo capaz de estimular respostas imunes mediadas por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, além de promover produção significativa de IFN- γ , citocina essencial para a ativação de macrófagos e para o controle da infecção micobacteriana (DHANDA *et al.*, 2023).

A partir dessa seleção, a predição de epítomos com capacidade de ligação às moléculas do MHC classes I e II constitui etapa central no desenho de vacinas multiepítomo. As moléculas de MHC desempenham papel essencial na imunidade adaptativa ao apresentar peptídeos antigênicos para linfócitos T, sendo o MHC classe I responsável pela ativação de células T CD8⁺ citotóxicas, e o MHC classe II pela ativação de células T CD4⁺ auxiliares (WITT, 2023). A indução simultânea dessas respostas imunes é considerada fundamental para o controle de infecções intracelulares, como a TB, uma vez que envolve tanto a eliminação de células infectadas, quanto a ativação de respostas inflamatórias mediadas por citocinas, especialmente IFN- γ (CHEN *et al.*, 2018).

Os resultados obtidos na predição e filtragem dos epítomos derivados das proteínas MPB64 e HBHA se apresentaram consistentes com a literatura, evidenciando que, embora a triagem inicial identifique um grande número de peptídeos candidatos, apenas uma fração apresenta características adequadas para aplicação vacinal. Esse processo de refinamento, baseado em critérios como antigenicidade, imunogenicidade, ausência de toxicidade e potencial de indução de IFN- γ , permite a seleção de um conjunto reduzido e mais robusto de epítomos (DHANDA *et al.*, 2023).

A magnitude da redução observada durante o processo de filtragem evidencia a robustez da estratégia empregada neste estudo. Embora a predição inicial tenha identificado um número expressivo de peptídeos, especialmente para as moléculas de MHC-II, com 11.853 candidatos derivados da proteína MPB64 e 5.161 derivados da HBHA, a aplicação sequencial dos critérios de antigenicidade, imunogenicidade, não toxicidade e potencial de indução de IFN- γ reduziu substancialmente esse conjunto. Após as etapas de filtragem, apenas 290 peptídeos da MPB64 e 5 da HBHA permaneceram elegíveis, demonstrando que a maioria dos peptídeos inicialmente preditos não apresenta simultaneamente todas as características desejáveis para aplicação vacinal. A seleção final resultou em um conjunto de nove epítomos, sendo cinco derivados da MPB64 e quatro da HBHA. Esses resultados evidenciam o elevado rigor da estratégia de triagem empregada e reforçam a necessidade de abordagens multifatoriais na seleção de candidatos vacinais. Além disso, a predominância de epítomos derivados da MPB64 sugere que essa proteína apresenta um repertório antigênico particularmente promissor, enquanto a inclusão dos epítomos da HBHA contribui para ampliar a diversidade antigênica e potencialmente a cobertura imunológica da formulação proposta.

Dessa forma, os achados não apenas corroboram a literatura sobre a eficiência das ferramentas de imunoinformática na redução de grandes conjuntos de candidatos, mas também demonstram a capacidade da abordagem utilizada em identificar um número restrito de epítomos com elevado potencial para futuras etapas de validação experimental (DHANDA *et al.*, 2023).

Entretanto, embora as ferramentas de imunoinformática apresentem elevada capacidade preditiva, a afinidade teórica de ligação ao MHC não garante, necessariamente, o processamento antigênico, a apresentação eficiente dos epítomos ou seu reconhecimento imunológico *in vivo*. Além disso, fatores como a estabilidade do complexo peptídeo-MHC, o repertório de receptores de células T e o contexto imunológico do hospedeiro podem influenciar significativamente a resposta imune final. Dessa forma, os epítomos identificados devem ser interpretados como candidatos promissores, cuja relevância biológica depende de validação experimental subsequente (DHANDA *et al.*, 2023; MORTAZAVI *et al.*, 2024).

O número de epítomos selecionados neste estudo está em consonância com estratégias adotadas em vacinas multiepítomo descritas na literatura, as quais geralmente incorporam entre 10 e 30 epítomos de forma a equilibrar amplitude da resposta imune, cobertura populacional e viabilidade estrutural da construção vacinal (MORTAZAVI *et al.*, 2024). Nesse contexto, diversos estudos têm demonstrado o potencial da imunoinformática na identificação racional de epítomos candidatos ao desenvolvimento de vacinas multiepitópicas. Como exemplo, Campelo *et al.* (2025) desenvolveram uma vacina *in silico* baseada na proteína de espícula do SARS-Cov-2, selecionando epítomos com elevada imunogenicidade, potencial de indução de IFN- γ e ampla cobertura populacional. Esses resultados reforçam a aplicabilidade das abordagens computacionais na seleção inicial de candidatos vacinais e corroboram a estratégia empregada no presente estudo. Embora desenvolvido em um contexto viral distinto, esse trabalho ilustra como ferramentas de imunoinformática podem ser utilizadas para selecionar, de forma racional, epítomos com elevado potencial imunogênico e ampla representatividade populacional. De maneira semelhante, a estratégia adotada neste estudo permitiu identificar epítomos derivados de MPB64 e HBHA com características favoráveis para compor futuras formulações vacinais contra a tuberculose.

Além disso, evidências experimentais indicam que as vias de apresentação antigênica de MHC-I e MHC-II exibem conjuntos distintos, porém complementares, de peptídeos derivados de micobactérias (BETTENCOURT *et al.*, 2020; WITT, 2023). Estudos demonstram que há, frequentemente, maior diversidade de peptídeos apresentados por moléculas de MHC classe II, refletindo sua capacidade de acomodar peptídeos mais longos e estruturalmente diversos. Essa característica reforça o papel central da resposta imune mediada por linfócitos T CD4⁺ na imunidade contra MTB, sem excluir a contribuição da resposta citotóxica mediada por células T CD8⁺, que também participa do controle da infecção por meio da produção de citocinas e da eliminação de células infectadas (KAUFMANN, 2002; SAKAI *et al.*, 2014; MURPHY; WEAVER, 2022). Assim, a identificação de epítomos capazes de ativar ambas as vias representam um elemento-chave para o desenvolvimento de vacinas mais eficazes (BETTENCOURT *et al.*, 2020; WITT, 2023).

A análise da cobertura populacional reforça a relevância da abordagem adotada, ao evidenciar diferenças significativas entre as proteínas avaliadas (ARRIETA-BOLAÑOS *et al.*, 2023). A proteína MPB64 apresentou a maior cobertura global, enquanto a HBHA demonstrou melhor desempenho na população brasileira, destacando a influência da diversidade genética do sistema HLA sobre o potencial imunogênico dos epítomos selecionados. Esse achado pode ser explicado pelo elevado polimorfismo das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), cuja variabilidade determina a capacidade de apresentação de diferentes epítomos aos linfócitos T e, conseqüentemente, influencia a magnitude e a abrangência da resposta imune entre populações distintas (MORTAZAVI *et al.*, 2024). Nesse contexto, estudos recentes demonstram que a cobertura populacional de epítomos varia substancialmente entre regiões geográficas devido à distribuição heterogênea dos alelos HLA, ressaltando a importância da consideração dessas diferenças genéticas durante o desenvolvimento de vacinas baseadas em epítomos (ARRIETA-BOLAÑOS *et al.*, 2023).

O elevado polimorfismo do sistema HLA representa um dos principais desafios para o desenvolvimento de vacinas com ampla aplicabilidade populacional (DHANDA *et al.*, 2023). Os resultados obtidos neste estudo ilustram claramente essa limitação, uma vez que as proteínas MPB64 e HBHA apresentaram desempenhos distintos quando avaliadas em diferentes populações. Um epítomo altamente imunogênico em determinado grupo populacional pode apresentar reconhecimento reduzido em outras regiões geográficas devido às diferenças na

frequência e distribuição dos alelos HLA (ARRIETA-BOLAÑOS *et al.*, 2023; BLACKWELL *et al.*, 2009). Essa variabilidade genética influencia diretamente a apresentação antigênica e a magnitude da resposta imune, podendo contribuir, ao menos em parte, para as diferenças observadas na eficácia das vacinas contra a tuberculose entre populações distintas (MANGTANI *et al.*, 2014; TRUNZ *et al.*, 2006). Nesse contexto, a incorporação de análises de cobertura populacional nas etapas iniciais do desenvolvimento vacinal representa uma estratégia promissora, pois permite considerar aspectos imunogenéticos já na fase de seleção dos candidatos vacinais, antes mesmo de sua validação experimental. Dessa forma, torna-se possível otimizar a escolha de antígenos com potencial de induzir respostas imunes mais abrangentes e efetivas em diferentes cenários populacionais.

Nesse cenário, a combinação de antígenos com perfis imunológicos complementares, como MPB64 e HBHA, configura uma estratégia promissora para ampliar a cobertura populacional. A incorporação de múltiplos epítomos provenientes de diferentes proteínas permite contornar limitações associadas à variabilidade individual da resposta imune, aumentando a proporção de indivíduos potencialmente responsivos (DHANDA *et al.*, 2023). Essa abordagem é corroborada por evidências recentes que demonstram que vacinas multiepítopo, quando baseadas na seleção criteriosa de epítomos, podem alcançar elevados níveis de cobertura populacional (SALAHLOU *et al.*, 2024).

Um aspecto relevante deste estudo reside na integração de abordagens e antígenos que permanecem pouco explorados de forma integrada na literatura. Embora diversos trabalhos tenham investigado individualmente o potencial imunogênico das proteínas MPB64 e HBHA, bem como uso múltiplos antígenos em estratégias vacinais contra a TB, estudos associando especificamente essas duas proteínas em uma abordagem que integra imunoinformática, análise de cobertura populacional e validação experimental inicial ainda são escassos (YAO *et al.*, 2012; VERWAERDE *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2023). Nesse contexto, o presente trabalho reúne antígenos com características biológicas complementares: MPB64, cuja presença está associada a subcepas de BCG que preservaram regiões genômicas importantes, como a BCG Moreau, enquanto a HBHA, uma proteína altamente conservada relacionada a mecanismos imunológicos observados durante a infecção latente. Além disso, a avaliação da cobertura populacional com destaque para a população brasileira amplia a relevância translacional dos resultados, uma vez que a distribuição dos alelos HLA influencia

diretamente o reconhecimento dos epítomos vacinais. Dessa forma, este estudo contribui para o desenvolvimento racional de vacinas multiepítomo ao integrar, em uma única estratégia investigativa, aspectos antigênicos, imunogenéticos e experimentais.

As vacinas multiepítomo diferem das abordagens convencionais baseadas em microrganismos inteiros ou proteínas completas por direcionarem a resposta imune a regiões antigênicas específicas, reduzindo a exposição a componentes potencialmente associados a efeitos adversos (DHANDA *et al.*, 2023; SALAHLOU *et al.*, 2024). Nesse contexto, a combinação de epítomos derivados das proteínas MPB64 e HBHA configura uma estratégia racional para ampliar a cobertura populacional e a diversidade das respostas imunológicas induzidas, ao integrar antígenos com propriedades imunológicas complementares (MORTAZAVI *et al.*, 2024).

Apesar dessas vantagens teóricas, persistem desafios críticos relacionados ao processamento antigênico, à estabilidade estrutural, à eficiência de expressão e à imunogenicidade *in vivo*, que ainda limitam a plena tradução dessas plataformas em candidatos vacinais eficazes (NEZAMABADI *et al.*, 2024; SALAHLOU *et al.*, 2024). A análise da frequência alélica dos principais alelos envolvidos na apresentação dos epítomos preditos reforça essa interpretação ao evidenciar uma distribuição heterogênea em escala global. Alelos como HLA-A01:01, HLA-A03:01 e HLA-A*11:01 apresentam padrões distintos de prevalência entre diferentes regiões geográficas, refletindo processos evolutivos, migratórios e demográficos que moldaram a diversidade genética humana (GONZÁLEZ-GALARZA *et al.*, 2020; BLACKWELL *et al.*, 2009). Essa variabilidade, intrínseca ao sistema HLA — um dos loci mais polimórficos do genoma humano — resulta em diferenças substanciais na eficiência de apresentação antigênica e, consequentemente, na magnitude e no repertório das respostas imunes entre indivíduos e populações (ARRIETA-BOLAÑOS *et al.*, 2023). O sistema HLA é reconhecido como um dos mais polimórficos do genoma humano, e essa diversidade influencia diretamente a capacidade de reconhecimento antigênico (ARRIETA-BOLAÑOS *et al.*, 2023). Nesse cenário, limitações de cobertura populacional não constituem apenas uma consequência técnica do desenho de epítomos, mas um reflexo direto da arquitetura imunogenética humana. Assim, estratégias vacinais baseadas em epítomos devem necessariamente incorporar análises populacionais robustas, sob pena de apresentarem eficácia desigual entre diferentes grupos étnico-geográficos (DHANDA *et al.*, 2023).

Embora as análises *in silico* tenham permitido identificar candidatos promissores, a validação experimental permanece uma etapa indispensável no desenvolvimento vacinal, uma vez que as predições computacionais não são suficientes para confirmar imunogenicidade, processamento antigênico ou capacidade protetora *in vivo* (DHANDA *et al.*, 2023; MORTAZAVI *et al.*, 2024). Nesse contexto, a expressão heteróloga dos antígenos selecionados constitui um passo fundamental para futuras avaliações imunológicas e funcionais. A utilização de *M. smegmatis* como hospedeiro de expressão apresenta vantagens importantes para estudos envolvendo antígenos micobacterianos, uma vez que compartilha características estruturais e fisiológicas com espécies do complexo MTB (SNAPPER *et al.*, 1990; SHILOH; CHAMPION, 2010). Essa proximidade biológica favorece a produção de proteínas em um ambiente celular mais semelhante ao encontrado naturalmente, podendo contribuir para a obtenção de produtos recombinantes com propriedades mais próximas das observadas em micobactérias patogênicas, quando comparado a sistemas heterólogos convencionais, como *E. coli* (SNAPPER *et al.*, 1990; SHILOH; CHAMPION, 2010).

Neste estudo, os resultados obtidos *in vitro* demonstram a consistência e a eficiência das etapas experimentais, desde a extração do DNA plasmidial, até a expressão proteica em *M. smegmatis*. A etapa inicial de extração plasmidial apresentou concentrações entre 23,6 e 35,0 ng/μL, compatíveis com preparações de ‘miniprep’ e adequadas para aplicações moleculares subsequentes. As razões de pureza A260/A280 (1,84–1,88) e A260/A230 (1,57–1,90) indicam baixa contaminação por proteínas, compostos orgânicos e sais, estando dentro dos parâmetros considerados ideais para DNA de alta qualidade (BOGOŽALEC KOŠIR *et al.*, 2023; GAND *et al.*, 2023). Valores de A260/A280 próximos de 1,8 são classicamente utilizados como indicativo de DNA purificado e apropriado para aplicações como clonagem e transformação (LUTZ *et al.*, 2023).

A confirmação da presença dos plasmídeos em *M. smegmatis*, por meio de eletroforese em gel de agarose, revelou bandas compatíveis com os pesos moleculares esperados, além de variações no padrão de migração entre vetores com e sem inserto, refletindo o aumento do tamanho molecular após a inserção do gene HBHA (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). A presença de diferentes conformações plasmidiais está de acordo com o comportamento típico de DNA plasmidial, reforçando a integridade das construções (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Esses resultados indicam o sucesso da transformação e a estabilidade

dos vetores empregados. Nesse contexto, os plasmídeos pMV261 e pMV361 são amplamente descritos como sistemas eficientes para expressão em micobactérias, permitindo manutenção episomal ou integração cromossômica, respectivamente, o que contribui para sua robustez em aplicações de expressão heteróloga (STOVER et al., 1991; CHAWLA; DAS GUPTA, 1999).

A propagação das linhagens recombinantes evidenciou crescimento bacteriano consistente, com formação de colônias em até quatro dias de incubação a 37°C. Esse comportamento está em concordância com a literatura, que descreve *M. smegmatis* como uma micobactéria de crescimento relativamente rápido e alta eficiência de transformação, características que a tornam um modelo amplamente utilizado para estudos de expressão gênica (GORDHAN et al., 2006). A expressão de proteínas recombinantes, especialmente aquelas associadas à superfície ou relacionadas à virulência, pode influenciar negativamente o crescimento celular, fenômeno frequentemente observado em sistemas bacterianos (NOENS et al., 2011). Esse efeito pode ser atribuído ao aumento da demanda energética associada aos processos de transcrição e tradução, bem como a possíveis perturbações na homeostase celular (ROSANO; CECCARELLI, 2014).

Adicionalmente, a heterogeneidade no tamanho das colônias entre as diferentes construções pode refletir variações nos níveis de expressão gênica e na adaptação fisiológica das células, comportamento já descrito para populações de *M. smegmatis* sob condições experimentais semelhantes (BLOKPOEL et al., 2005; GHOS et al., 2010).

A análise do perfil proteico por SDS-PAGE revelou um padrão complexo nas frações solúvel e insolúvel, característico de sistemas de expressão heteróloga em bactérias (SINGH et al., 2015). Observou-se a presença de múltiplas bandas distribuídas ao longo de diferentes faixas de peso molecular, refletindo a coexistência de proteínas endógenas e recombinantes (SLOUKA et al., 2019). Em particular, a detecção de bandas na faixa de aproximadamente 25–30 kDa em ambas as frações é compatível com a massa molecular aparente da proteína HBHA em SDS-PAGE (DELOGU et al., 2004; NOENS et al., 2011). Apesar de sua massa teórica ser inferior (~21 kDa), a migração anômala dessa proteína é amplamente descrita e atribuída à sua composição rica em lisina e às modificações pós-traducionais, como metilação (DELOGU et al., 2004; NOENS et al., 2011). A presença dessas bandas sugere que o sistema empregado foi capaz de produzir a proteína recombinante em níveis detectáveis, corroborando a adequação de *M. smegmatis* como hospedeiro para a expressão de proteínas micobacterianas

(SHILOH; CHAMPION, 2010; NOENS *et al.*, 2011). Esse resultado é particularmente relevante, uma vez que a obtenção experimental do antígeno constitui uma etapa fundamental para futuras análises imunológicas e funcionais, permitindo avançar da predição computacional para a validação biológica dos candidatos vacinais identificados por imunoinformática (DHANDA *et al.*, 2023; MORTAZAVI *et al.*, 2024).

Dessa forma, a expressão bem-sucedida da HBHA representa um passo importante na caracterização experimental desse antígeno e amplia as perspectivas para estudos subsequentes de imunogenicidade e potencial protetor. A comparação entre as frações evidenciou diferenças estruturais importantes. A fração solúvel apresentou bandas mais definidas, sugerindo a presença de proteínas em estado dobrado ou parcialmente funcional (SLOUKA *et al.*, 2019). Em contraste, a fração insolúvel apresentou padrão difuso e baixa resolução, indicando agregação proteica (KÖSZAGOVÁ; NAHÁLKA, 2020). Esse comportamento é típico da formação de corpos de inclusão, estruturas compostas por proteínas mal dobradas que se acumulam no citoplasma bacteriano durante a superexpressão (SINGH *et al.*, 2015; KÖSZAGOVÁ; NAHÁLKA, 2020). Entretanto, a distribuição observada entre as frações solúvel e insolúvel não deve ser interpretada de maneira separada. Estudos demonstram que proteínas recombinantes podem apresentar diferentes estados estruturais, incluindo formas corretamente dobradas, agregados solúveis e agregados insolúveis (SLOUKA *et al.*, 2019). Esse modelo explica a presença simultânea de sinais atribuíveis à HBHA em ambas as frações, indicando que parte da proteína pode estar funcionalmente ativa, enquanto outra fração se encontra agregada (SINGH *et al.*, 2015).

O sistema de expressão em *M. smegmatis* apresenta limitações relacionadas ao dobramento proteico. Embora seja mais adequado do que sistemas como *Escherichia coli* para a expressão de proteínas micobacterianas, a superexpressão pode levar à saturação das chaperonas celulares, favorecendo o acúmulo de proteínas mal dobradas (SINGH *et al.*, 2015). Além disso, chaperonas endógenas altamente abundantes, como GroEL1, podem interferir na análise eletroforética ao co-migrar com proteínas recombinantes, dificultando a discriminação precisa de bandas específicas (NOENS *et al.*, 2011).

Outro fator relevante é a possível degradação proteolítica da HBHA, que pode resultar na geração de fragmentos de menor peso molecular, contribuindo para padrões difusos

observados em SDS-PAGE (DELOGU *et al.*, 2004). Esse conjunto de eventos — agregação proteica e proteólise parcial — limita a interpretação baseada exclusivamente em eletroforese, reforçando a necessidade de abordagens complementares para confirmação estrutural e funcional da proteína recombinante (ROSANO; CECCARELLI, 2014).

Em conjunto, os resultados *in silico* obtidos neste estudo demonstram que a seleção de antígenos conservados associada à identificação criteriosa de epítomos capazes de interagir com múltiplas moléculas de MHC constitui uma estratégia robusta para o desenvolvimento de vacinas multiepítomo (SALAHLOU *et al.*, 2024). A integração entre predição de epítomos, análise de cobertura populacional e avaliação da diversidade alélica fornece uma base sólida para a construção racional de candidatos vacinais com potencial de ampla eficácia, tanto em nível global quanto regional (DHANDA *et al.*, 2023). Por sua vez, os resultados *in vitro* corroboram o comportamento descrito na literatura para sistemas de expressão heteróloga em micobactérias e reforçam a relevância de abordagens integradas para a caracterização estrutural e funcional de proteínas candidatas a vacinas (NOENS *et al.*, 2011; DA COSTA *et al.*, 2014; DAO *et al.*, 2025).

Assim, os resultados desse estudo fornecem evidências consistentes de que a abordagem integrada adotada é eficaz para a identificação e validação preliminar de candidatos vacinais contra a TB. A combinação de dados *in silico* e *in vitro* fortalece as evidências obtidas e contribui para o avanço do desenvolvimento de estratégias vacinais mais eficazes e abrangentes.

Apesar dos resultados promissores obtidos neste estudo, algumas limitações devem ser consideradas: (i) A validação funcional dos epítomos preditos não foi realizada, de modo que a confirmação experimental da imunogenicidade e da capacidade de indução de resposta imune específica permanece necessária; (ii) Da mesma forma, análises complementares para confirmação da identidade e expressão das proteínas recombinantes, como ensaios de *Western Blot*, não puderam ser conduzidas devido às limitações relacionadas à disponibilidade de reagentes e insumos laboratoriais; (iii) Além disso, a continuidade dos experimentos envolvendo a proteína MPB64 foi restringida por limitações financeiras e logísticas, incluindo os elevados custos associados à construção plasmidial e à necessidade de utilização de infraestrutura localizada em outro estado. Embora sistemas alternativos tenham sido

considerados, a ausência de recursos e infraestrutura adequada inviabilizou a execução dessas etapas adicionais; (iv) Deve-se considerar ainda que parte do desenvolvimento experimental foi impactada pelo período de paralisação das atividades laboratoriais decorrente da pandemia de COVID-19, o que resultou em restrições de acesso à infraestrutura e atraso na continuidade das análises; (v) Adicionalmente, as abordagens de imunoinformática empregadas, embora robustas e amplamente utilizadas na triagem inicial de candidatos vacinais, apresentam limitações inerentes às predições *in silico*, tornando indispensável a realização de ensaios imunológicos e estudos *in vivo* para validação da eficácia e segurança dos epítomos selecionados.

Mesmo diante dessas limitações, os achados obtidos neste estudo constituem uma base relevante para o avanço no desenvolvimento de estratégias vacinais contra a TB.

6- CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que as abordagens *in silico* e *in vitro* constituem uma estratégia robusta e complementar para o desenvolvimento racional de candidatos vacinais baseados em proteínas micobacterianas. A seleção das proteínas MPB64 e HBHA mostrou-se fundamentada em aspectos evolutivos e imunológicos relevantes, considerando as diferenças genômicas entre subcepas de BCG e seu impacto direto no repertório antigênico. A preservação de regiões como a RD2 em cepas como a BCG Moreau reforça a importância da escolha de antígenos conservados e potencialmente imunogênicos, capazes de ampliar a eficácia de estratégias vacinais.

As análises imunoinformáticas permitiram a identificação de epítomos com elevado potencial de ligação às moléculas de MHC classes I e II, sustentando a viabilidade da construção de uma vacina multiepítomo capaz de induzir respostas imunes celulares integradas. A aplicação de critérios rigorosos de filtragem — incluindo antigenicidade, imunogenicidade, ausência de toxicidade e potencial de indução de IFN- γ — resultou na seleção de um conjunto refinado de epítomos com perfil imunológico favorável. Adicionalmente, a análise de cobertura populacional destacou a influência da diversidade do sistema HLA na resposta imune, evidenciando diferenças entre distribuição global e regional. Nesse contexto, a combinação das proteínas MPB64 e HBHA mostrou-se estratégica para ampliar a cobertura populacional, reforçando o potencial dessas estratégias vacinais em alcançar maior abrangência imunológica.

No âmbito experimental, os resultados *in vitro* confirmaram a eficiência do sistema de expressão baseado em *M. smegmatis*. A obtenção de DNA plasmidial com alta pureza e integridade, aliada à confirmação da presença e estabilidade dos plasmídeos recombinantes, valida a estratégia de construção genética adotada. A capacidade de transformação e propagação dessa cepa, amplamente descrita na literatura, foi corroborada pelos resultados observados, incluindo o crescimento consistente das linhagens recombinantes.

A análise do perfil proteico por SDS-PAGE sugeriu a expressão da proteína HBHA, indicada pela presença de sinais na faixa de peso molecular esperada (~25–30 kDa), embora com resolução insuficiente para confirmação definitiva. A distribuição da proteína entre

frações solúvel e insolúvel revelou um padrão típico de expressão heteróloga, no qual proteínas recombinantes coexistem em diferentes estados conformacionais. A fração solúvel indicou a presença de formas potencialmente funcionais, enquanto a fração insolúvel sugeriu agregação proteica, possivelmente associada à formação de corpos de inclusão. Esses resultados refletem limitações comuns em sistemas bacterianos de expressão e sugerem que a produção da proteína ainda não se encontra plenamente otimizada.

Dessa forma, os dados obtidos indicam que, embora a expressão da HBHA tenha sido alcançada, a obtenção da proteína em forma predominantemente solúvel e funcional requer ajustes nas condições experimentais. Estratégias como modulação da expressão gênica, otimização das condições de cultivo e coexpressão de chaperonas devem ser consideradas em estudos futuros. Adicionalmente, a confirmação definitiva da identidade e funcionalidade da proteína recombinante depende da aplicação de técnicas complementares, como *Western blot*, purificação por afinidade e espectrometria de massas. Além disso, investigações futuras envolvendo a proteína MPB64 serão importantes para a validação experimental dos dados *in silico* apresentados neste estudo, contribuindo para a ampliação da caracterização e do potencial imunobiotecnológico dos antígenos selecionados.

7- PERSPECTIVAS

Como perspectiva futura, os achados deste estudo abrem caminho para a construção e validação de candidatos vacinais multiepítipo derivados das proteínas MPB64 e HBHA. Estudos subsequentes poderão incluir a avaliação da estabilidade estrutural das construções vacinais, análises de interação com receptores do sistema imunológico e ensaios capazes de confirmar a ativação de respostas imunes celulares e humorais específicas.

Além disso, estudos *in vivo* serão fundamentais para investigar o potencial protetor dessas construções frente à infecção por MTB, bem como sua possível aplicação como estratégia complementar ou de reforço à vacinação com BCG. Nesse contexto, a integração entre ferramentas computacionais, biologia molecular e imunologia experimental constitui uma abordagem promissora para o desenvolvimento racional de novas vacinas contra a TB.

8- REFERÊNCIAS

- ABDALLA, Daniel R. et al. Genomic and proteomic differences between Brazilian BCG Moreau and other BCG vaccine strains. *PLoS ONE*, v. 10, n. 8, p. e0133887, 2015.
- ABDALLAH, Ayman M. et al. Type VII secretion—mycobacteria show the way. *Nature Reviews Microbiology*, v. 5, p. 883-891, 2007.
- AGRAWAL, Neha et al. mRNA-based tuberculosis vaccines BNT164a1 and BNT164b1 are immunogenic, well-tolerated and efficacious in rodent models. *bioRxiv*, p. 2025.09.30.679428, 2025.
- ANGELIDOU, A. et al. BCG as a case study for precision vaccine development: lessons from vaccine heterogeneity, trained immunity and immune ontogeny. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, p. 332, 2020.
- ANSARI, H. R.; RAGHAVA, G. P. S. Identification of T-cell epitopes using quantitative matrices. *Immunome Research*, v. 6, p. 1-9, 2010.
- ANTAS, P. R. Z. Crucial requirement for standardization during the development of novel recombinant BCG vaccines: does the corresponding substrain background matter? *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, v. 12, n. 12, p. 3099-3102, 2016.
- ARRIETA-BOLAÑOS, E.; HERNÁNDEZ-ZARAGOZA, D. I.; BARQUERA, R. An HLA map of the world: a comparison of HLA frequencies in 200 worldwide populations reveals diverse patterns for class I and class II. *Frontiers in Genetics*, v. 14, p. 866407, 2023.
- ASADIAN, M. et al. Genomic characteristics of two most widely used BCG vaccine strains: Danish 1331 and Pasteur 1173P2. *BMC Genomics*, v. 23, n. 1, p. 609, 2022.
- BARRETO, M. L.; PEREIRA, S. M.; FERREIRA, A. A. Vacina BCG: eficácia e indicações da vacinação e da revacinação. *Jornal de Pediatria*, v. 82, n. 3, p. 51-55, 2006.
- BEHR, M.; SMALL, P. M. A historical and molecular phylogeny of BCG strains. *Vaccine*, v. 17, n. 7-8, p. 915-922, 1999.
- BENÉVOLE-DE-ANDRADE, Tania C. et al. BCG Moreau Rio de Janeiro: historical aspects and molecular characterization of an old Brazilian vaccine strain. *Vaccine*, v. 23, n. 47-48, p. 5478-5483, 2005.
- BETTENCOURT, P. et al. Identification of antigens presented by MHC for vaccines against tuberculosis. *npj Vaccines*, v. 5, n. 1, p. 2, 2020.
- BÊRREDO-PINHO, M. et al. Proteomic profile of *Mycobacterium bovis* BCG Moreau compared with other BCG vaccine strains. *Journal of Proteomics*, v. 74, n. 9, p. 1394-1404, 2011.

BLOKPOEL, M. C. J. et al. Global analysis of proteins synthesized by *Mycobacterium smegmatis* provides direct evidence for physiological heterogeneity in stationary-phase cultures. *Journal of Bacteriology*, Washington, v. 187, n. 19, p. 6691-6700, 2005.

BLOOM, B. R.; FINE, P. E. M. The BCG experience: implications for future vaccines against tuberculosis. In: *Tuberculosis*. Washington: American Society of Microbiology, 1994. p. 531-557.

BOGOŹALEC KOŠIR, Alexandra et al. Evaluation of DNA extraction methods for reliable quantification of *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosensors*, v. 13, n. 4, p. 463, 2023.

BRAZ, Maria Luiza et al. New generation vaccines and DNA vaccines: biotechnological advances and therapeutic perspectives. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 35, n. 1, p. 1-10, 2014.

BRENNAN, Michael J. The tuberculosis vaccine pipeline: a new direction in vaccine development. *Tuberculosis*, v. 92, n. 1, p. S68-S74, 2012.

BRENNAN, Michael J. et al. Tuberculosis vaccines: evidence and current developments. *Current Opinion in Immunology*, v. 24, n. 3, p. 374-384, 2012.

BRITTON, W. J.; PALENDIRA, U. Improving vaccines against tuberculosis. *Immunology and Cell Biology*, v. 81, n. 1, p. 34-45, 2003.

BULL, N. C. et al. Enhanced protection conferred by mucosal BCG vaccination associates with presence of antigen-specific lung tissue-resident PD-1⁺ KLRG1⁺ CD4⁺ T cells. *Mucosal Immunology*, v. 12, n. 2, p. 555-564, 2019.

CAMPELO, Thales Alves et al. Development of a peptide-based multiepitope vaccine from the SARS-CoV-2 spike protein for targeted immune response against COVID-19. *Protein & Peptide Letters*, v. 32, n. 4, p. 299-311, 2025.

CAVALCANTI, Y. V. N. et al. Role of cytokines in the immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 38, n. 2, p. 255-262, 2012.

CHAWLA, A.; DAS GUPTA, S. K. Mycobacterial expression vectors and their applications. *FEMS Microbiology Letters*, v. 178, n. 1, p. 1-9, 1999.

CHEN, J. et al. Assessing and screening for T-cell epitopes from *Mycobacterium tuberculosis* RD2 proteins for the diagnosis of active tuberculosis. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 22, n. 6, p. 462-471, 2018.

CHOI, Yu Hwa et al. Safety and immunogenicity of the ID93+ GLA-SE tuberculosis vaccine in BCG-vaccinated healthy adults: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. *Infectious Diseases and Therapy*, v. 12, n. 6, p. 1605-1624, 2023.

CONSTANTINO, J. M. R. *Imunoterapia com células dendríticas: uma promessa para terapia de cancro*. 2014.

COPPOLA, Mariateresa et al. Application of reverse vaccinology in the design of vaccines against tuberculosis. *Frontiers in Immunology*, v. 9, p. 775, 2018.

COSGROVE, C. A. et al. Boosting of cellular immunity against *Mycobacterium tuberculosis* and modulation of skin cytokine responses in healthy human volunteers by *Mycobacterium bovis* BCG Moreau Rio de Janeiro oral vaccine. *Infection and Immunity*, v. 74, n. 4, p. 2449-2452, 2006.

CUEVAS, Luis E. New approaches for tuberculosis vaccines. *Clinical Medicine Insights: Circulatory, Respiratory and Pulmonary Medicine*, v. 11, p. 1-9, 2017.

DA COSTA, A. C. et al. Recombinant BCG: innovations on an old vaccine. *Frontiers in Immunology*, v. 5, p. 152, 2014.

DAO, Thi Oanh et al. Advances and challenges in mycobacterial genetic engineering: techniques for knockout, knockdown and overexpression. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 35, p. e2507051, 2025.

DE MAIO, Francesco et al. The mycobacterial HBHA protein as a biomarker and vaccine candidate against tuberculosis. *Pathogens and Disease*, v. 77, n. 3, p. ftz020, 2019.

DELOGU, G. et al. Expression and purification of recombinant methylated HBHA in *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 239, n. 1, p. 33-39, 2004.

DHANDA, Sandeep Kumar et al. Current status and future direction of epitope-based vaccines for tuberculosis. *Frontiers in Immunology*, v. 14, 2023.

DHANAWADE, Shweta S. et al. Comparison of the immunogenicity and protective efficacy of various BCG vaccine strains against tuberculosis. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, v. 11, n. 6, p. 1528-1535, 2015.

DOGRA, Sunil et al. *Mycobacterium indicus pranii* (MIP) vaccine: pharmacology, indication, dosing schedules, administration, and side effects in clinical practice. *Indian Dermatology Online Journal*, v. 14, n. 6, p. 753-761, 2023.

FIGUEIREDO, L. A. *Vacinas, novas perspectivas*. 2014. Tese (Doutorado).

GAO, Jianxiong et al. Prediction and analysis of immunogenic epitopes for vaccine development. *BMC Bioinformatics*, v. 13, p. S17, 2012.

GAND, Mathieu et al. Comparison of 6 DNA extraction methods for isolation of high yield of high molecular weight DNA suitable for shotgun metagenomics Nanopore sequencing to detect bacteria. *BMC Genomics*, v. 24, p. 438, 2023.

GEISBRECHT, Brian V. et al. Structure of the *Mycobacterium tuberculosis* antigen MPB64 from the RD2 region. *Protein Science*, v. 15, n. 4, p. 905-914, 2006.

GHOSH, S. et al. Phenotypic heterogeneity in mycobacterial stringent response. 2010.

GOMES, L. H. F. et al. Comparative analysis of the immunogenicity of BCG Moreau and other BCG vaccine strains. *Vaccine*, v. 29, n. 47, p. 8477-8485, 2011.

GÓMEZ, L. A.; CONDINO, N. A. O que há de novo em vacinas contra tuberculose. *Revista Brasileira de Alergia e Immunopatologia*, v. 29, n. 1, p. 9-13, 2006.

GONG, Wenping; DU, Jingli. Optimising the vaccine strategy of BCG, ChAdOx1 85A, and MVA85A for tuberculosis control. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 24, n. 3, p. 224-226, 2024.

GORDHAN, B. G. et al. *Mycobacterium smegmatis* as a model organism for tuberculosis research. *Tuberculosis*, v. 86, n. 2, p. 101-110, 2006.

GRÖSCHEL, Matthias I. et al. Pathogenomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nature Reviews Microbiology*, v. 19, p. 185-198, 2021.

HOKEY, D. A.; GINSBERG, A. M. The current state of the art in tuberculosis vaccine development. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v. 93, n. 5, p. 413-423, 2013.

INTERNATIONAL AIDS VACCINE INITIATIVE (IAVI). *Phase 1b/2a clinical trial in adults of novel TB vaccine candidate MTBVAC shows promising results*. New York: IAVI, 2025.

JENA, Lingaraj et al. Proteomics and reverse vaccinology approaches for vaccine development against tuberculosis. *Expert Review of Proteomics*, v. 8, n. 5, p. 561-574, 2011.

KAUFMANN, Stefan H. E. et al. The BCG vaccine: 100 years and counting. *Nature Reviews Immunology*, v. 22, p. 171-182, 2022.

KAUFMANN, Stefan H. E. et al. Vaccination against tuberculosis: revamping BCG by molecular genetics guided by immunology. *Frontiers in Immunology*, v. 11, p. 316, 2020.

KHAN, M. T. et al. Applications of immunoinformatics in vaccine design against infectious diseases. *Frontiers in Immunology*, v. 13, 2022.

KIMURA, T. F. E. *Análise da capacidade migratória de células dendríticas na cromoblastomicose experimental*. 2012. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo.

KÖSZAGOVÁ, R.; NAHÁLKA, J. Inclusion bodies in biotechnology: recent advances. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, v. 9, n. 5, p. 1035-1041, 2020.

LACÁMARA, Sergio; MARTIN, Carlos. MTBVAC: a tuberculosis vaccine candidate advancing towards clinical efficacy trials in TB prevention. *Archivos de Bronconeumología*, v. 59, n. 12, p. 821-828, 2023.

LAGRANGE, P. H. Vaccination antituberculeuse par le BCG: historique d'une découverte et de ses controverses. *Medecine et Maladies Infectieuses*, v. 28, p. 314-319, 1998.

LANGE, Christoph et al. 100 years of *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 22, n. 1, p. e2-e12, 2022.

LAWRENCE, A. Bacillus Calmette-Guérin (BCG) revaccination and protection against tuberculosis: a systematic review. *Cureus*, v. 16, n. 3, p. e56643, 2024.

LE HANG, N. T. et al. Genotypic and phenotypic characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* lineage 1. *Scientific Reports*, v. 11, p. 13609, 2021.

LIU, J. et al. BCG vaccines: their mechanisms of attenuation and impact on safety and protective efficacy. *Human Vaccines*, v. 5, n. 2, p. 70-78, 2009.

LU, Jinbiao et al. Therapeutic effect of subunit vaccine AEC/BC02 on *Mycobacterium tuberculosis* post-chemotherapy relapse using a latent infection murine model. *Vaccines*, v. 10, n. 5, p. 825, 2022.

LUCA, S.; MIHAESCU, T. History of BCG vaccine. *Maedica (Buchar)*, v. 8, n. 1, p. 53-58, 2013.

LUTZ, Ítalo et al. Quality analysis of genomic DNA and authentication of fisheries products based on distinct methods of DNA extraction. *PLoS ONE*, v. 18, n. 2, p. e0282369, 2023.

MANGTANI, Punam et al. Protection by BCG vaccine against tuberculosis: a systematic review of randomized controlled trials. *Clinical Infectious Diseases*, v. 58, n. 4, p. 470-480, 2014.

MORTAZAVI, B.; MOLAEI, A.; FARD, N. A. Multi-epitope vaccines: from design to expression. *Human Immunology*, v. 85, n. 3, p. 110804, 2024.

MUNSERI, Patricia et al. DAR-901 vaccine for the prevention of infection with *Mycobacterium tuberculosis* among BCG-immunized adolescents in Tanzania: a randomized controlled, double-blind phase 2b trial. *Vaccine*, v. 38, n. 46, p. 7239-7245, 2020.

NAKAISHI, Y. et al. Enhancement of BCG vaccine immunogenicity by recombinant expression of MPB64 antigen. *Vaccine*, v. 37, n. 12, p. 1689-1697, 2019.

NOENS, E. E. et al. Improved mycobacterial protein production using expression systems. *BMC Biotechnology*, v. 11, p. 27, 2011.

NOYA, O. et al. Immunoinformatics and prediction of T-cell epitopes in infectious diseases. *Parasite Immunology*, v. 25, n. 7, p. 373-381, 2003.

OKAFOR, Chukwudi N.; REWANE, Ahmed. Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccine. In: *STATPEARLS*. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). *Global tuberculosis report 2021*. Geneva: World Health Organization, 2021.

- PARIKH, Aditi et al. Development of integrated expression vectors for mycobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 79, n. 15, p. 4995-5002, 2013.
- RAHLWES, Katharina C. et al. Tuberculosis control and global public health challenges. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 9, p. 15, 2023.
- RAPPUOLI, Rino et al. Reverse vaccinology 2.0: human immunology instructs vaccine antigen design. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 208, n. 3, p. 469-481, 2011.
- REYES, Sandra et al. BCG vaccination induces dendritic cell activation and antigen presentation capacity. *Frontiers in Immunology*, v. 10, p. 1169, 2019.
- RITZ, N.; CURTIS, N. Mapping the global use of different BCG vaccine strains. *Tuberculosis*, v. 89, n. 4, p. 248-251, 2009.
- ROSANO, Germán L.; CECCARELLI, Eduardo A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, Lausanne, v. 5, p. 172, 2014.
- SAKASHITA, Haruka et al. Recombinant BCG expressing MPB64 enhances protective immunity against tuberculosis infection. *Infection and Immunity*, v. 88, n. 9, p. e00227-20, 2020.
- SAKULA, A. BCG: who were Calmette and Guérin? *Thorax*, v. 38, n. 11, p. 806-812, 1983.
- SALAHLOU, R. et al. Development of a novel multi-epitope vaccine using reverse vaccinology. *BMC Infectious Diseases*, v. 24, n. 1, p. 177, 2024.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SILVA, Diego R. et al. Tuberculosis: epidemiology, diagnosis and treatment. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 47, n. 2, p. e20210115, 2021.
- SINGH, A. et al. Inclusion bodies: formation, recovery and applications. *Microbial Cell Factories*, v. 14, p. 41, 2015.
- SLOUKA, C. et al. Inclusion bodies: formation and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 103, p. 1143-1155, 2019.
- SOARES, B. S. et al. *Segundo informe técnico sobre a vacinação/revacinação BCG*. Brasília: Ministério da Saúde, 1994.
- SÖLLNER, Johannes et al. Analysis and prediction of protective continuous B-cell epitopes on pathogen proteins. *Immunome Research*, v. 2, p. 1, 2006.
- STOSMAN, Kira I. et al. Evaluation of the immunotoxicity and allergenicity of a new intranasal influenza vector vaccine against tuberculosis carrying TB10.4 and HspX antigens. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, v. 26, n. 5, p. 558-566, 2023.

STOVER, C. K. et al. New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature*, v. 351, p. 456-460, 1991.

TACHETTE, Vincent et al. Safety and immunogenicity of the MTBVAC tuberculosis vaccine in adults and neonates: a systematic review. *The Lancet Infectious Diseases*, 2024.

TAIT, David R. et al. Final analysis of a trial of M72/AS01E vaccine to prevent tuberculosis. *New England Journal of Medicine*, v. 381, n. 25, p. 2429-2439, 2019.

TANG, Siyang T. et al. Reverse vaccinology in the design of vaccines against infectious diseases. *Trends in Biotechnology*, v. 29, n. 7, p. 376-384, 2011.

TARSHINOVA, Anna et al. BCG vaccination: historical role, modern applications, and future perspectives in tuberculosis and beyond. *Frontiers in Pediatrics*, v. 13, p. 1603732, 2025.

TRUNZ, B.; FINE, P. E. M.; DYE, C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. *The Lancet*, v. 367, n. 9517, p. 1173-1180, 2006.

VERWAERDE, Caroline et al. HBHA vaccination may induce protection against extrapulmonary tuberculosis. *Frontiers in Immunology*, v. 5, p. 407, 2014.

WILFINGER, W. W.; MACKAY, I. M.; CHOMCZYNSKI, P. Effect of pH and ionic strength on nucleic acid purity ratios. *BioTechniques*, v. 22, n. 3, p. 474-481, 1997.

WILSON, Lydia et al. Safety and efficacy of tuberculosis vaccine candidates in low- and middle-income countries: a systematic review of randomised controlled clinical trials. *BMC Infectious Diseases*, v. 23, n. 1, p. 120, 2023.

WITT, K. D. Role of MHC class I pathways in *Mycobacterium tuberculosis* antigen presentation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 13, 2023. DOI: 10.3389/fcimb.2023.1107884.

ZHUANG, Li et al. Next-generation TB vaccines: progress, challenges, and prospects. *Vaccines*, v. 11, n. 8, p. 1304, 2023.

9- ANEXO

Os resultados referentes à tentativa de propagação dos plasmídeos em *Mycobacterium bovis* BCG Moreau são apresentados em seção de anexo deste trabalho, em razão de questões relacionadas à condução experimental e à autoria parcial das etapas subsequentes. O experimento foi inicialmente iniciado pela autora desta dissertação, porém sua continuidade e conclusão foram realizadas por uma colaboradora do grupo de pesquisa. Dessa forma, visando preservar os princípios éticos e a adequada atribuição das contribuições experimentais, optou-se por apresentar tais dados em seção complementar.

Os resultados obtidos são relevantes para a compreensão da viabilidade das construções plasmidiais no sistema micobacteriano, especialmente considerando as particularidades de crescimento do BCG Moreau. As informações apresentadas no anexo incluem as condições experimentais utilizadas e a análise do crescimento bacteriano ao longo do período de incubação.

Propagação dos plasmídeos em BCG Moreau

Não foi observado crescimento bacteriano em nenhum dos meios utilizados (sólido e líquido) após o período inicial de incubação. Considerando o tempo de duplicação mais lento do *M. bovis* BCG Moreau em comparação com *M. smegmatis* mc²155, as culturas foram mantidas em incubação por até 60 dias adicionais, tanto nas placas de LB-ágar suplementadas com canamicina quanto nos meios líquidos correspondentes. Mesmo após esse período estendido, não houve formação de colônias visíveis nem turvação no meio líquido, indicando ausência de crescimento sob as condições testadas.

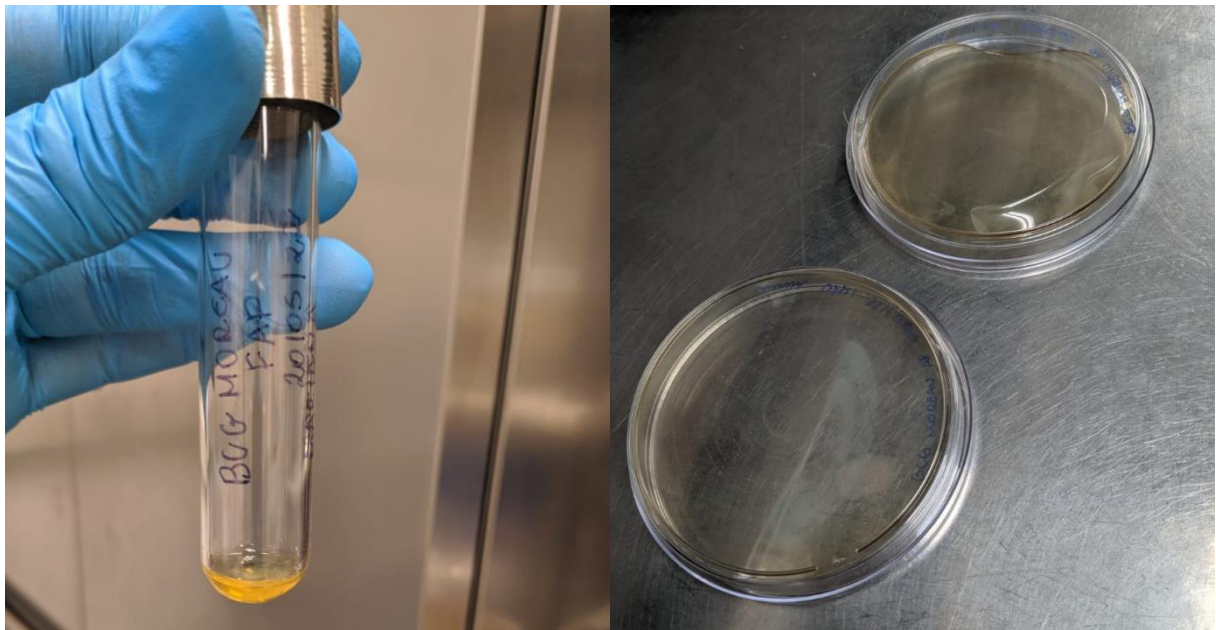


Figura 1: Cultivo de *Mycobacterium bovis* BCG Moreau após tentativa de transformação plasmidial. À esquerda, tubo contendo meio líquido LB suplementado com Tween 80 e canamicina, sem evidência de crescimento após o período de incubação. À direita, placas de LB-ágar nas mesmas condições experimentais, nas quais também não foi observada formação de colônias após 60 dias de incubação a 37 °C.