

ANÁLISE IN SILICO DE EPÍTOPOS DA PROTEÍNA Ag85A (FbpA) DE MYCOBACTERIUM MARINUM: CONTRIBUIÇÕES PARA A IMUNOLOGIA DE DOENÇAS ZOONÓTICAS AQUÁTICAS.

Marcos Antônio de Queiroz Junior y Francisco Rafael Martins Soto.

Cita:

Marcos Antônio de Queiroz Junior y Francisco Rafael Martins Soto (2025). *ANÁLISE IN SILICO DE EPÍTOPOS DA PROTEÍNA Ag85A (FbpA) DE MYCOBACTERIUM MARINUM: CONTRIBUIÇÕES PARA A IMUNOLOGIA DE DOENÇAS ZOONÓTICAS AQUÁTICAS. XIII Jornada de Produção Científica e Tecnológica, XVI Ciclo de Palestras Tecnológicas, I Semana da Pedagogia e X Semana da Biologia. Instituto Federal de São Paulo - Câmpus São Roque, São Roque.*

Dirección estable: <https://www.aacademica.org/jpctifpsrq/11>

ARK: <https://n2t.net/ark:/13683/paWp/rSP>



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons.
Para ver una copia de esta licencia, visite
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>.

Acta Académica es un proyecto académico sin fines de lucro enmarcado en la iniciativa de acceso abierto. Acta Académica fue creado para facilitar a investigadores de todo el mundo el compartir su producción académica. Para crear un perfil gratuitamente o acceder a otros trabajos visite:
<https://www.aacademica.org>.

ANÁLISE IN SILICO DE EPÍTOPOS DA PROTEÍNA Ag85A (FbpA) DE MYCOBACTERIUM MARINUM: CONTRIBUIÇÕES PARA A IMUNOLOGIA DE DOENÇAS ZOONÓTICAS AQUÁTICAS

Marcos Antônio de Queiroz Junior, discente do Curso de Tecnologia em Gestão Ambiental- Instituto Federal de São Paulo, Campus São Roque, markoqueiroz@hotmail.co.uk,
Francisco Rafael Martins Soto, docente do Instituto Federal de São Paulo, Campus São Roque, sotofrm@ifsp.edu.br

Resumo

O *Mycobacterium marinum* é uma micobactéria ambiental com potencial zoonótico. Este estudo teve como objetivo identificar, por meio de ferramentas de imunoinformática, epítomos da proteína Ag85A (FbpA) capazes de induzir resposta imune mediada por linfócitos T-CD8⁺. A sequência da proteína foi obtida do banco UniProt e analisada com o NetMHCpan 4.1, considerando alelos HLA prevalentes na população brasileira. Foram identificados 24 epítomos únicos, dos quais 10 apresentaram alta afinidade de ligação (Strong Binders). A análise de antigenicidade com VaxiJen v2.0 indicou que 12 epítomos são prováveis antígenos, destacando-se NAAGGHNAV, GMGPSLIGL e FVRTSNMKF. O epítopo multialélico VYSGSLAL demonstrou ampla aplicabilidade imunológica. Os resultados apontaram para um conjunto promissor de epítomos candidatos à formulação de vacinas peptídicas e ao desenvolvimento de biomarcadores imunológicos voltados à vigilância de doenças zoonóticas aquáticas.

Palavras-chave: ambiente aquático, micobactéria, zoonoses, resposta imune, imunoinformática

Modalidade: Resumo Expandido

Apresentação

O estudo das doenças zoonóticas tem ganhado relevância dentro da abordagem integrativa da Saúde Única, especialmente em ambientes aquáticos, onde o contato entre seres humanos e micro-organismos potencialmente patogênicos pode ocorrer por meio da aquicultura, recreação ou exposição ocupacional (ZIARATI, et al. 2022).

O *Mycobacterium marinum* é uma micobactéria ambiental encontrada em ecossistemas de água doce e marinha, reconhecida por causar infecções crônicas e progressivas em peixes, frequentemente letais, com formação de inflamações granulomatosas que podem acometer diversos tecidos do hospedeiro (Austin & Austin, 1993; Smith, 1997). Em seres humanos, essa espécie é responsável por infecções cutâneas conhecidas como "granulomas de aquário", geralmente associadas à manipulação de aquários ou ambientes aquáticos contaminados (AUBRY et al., 2017). Devido à sua capacidade de infectar diferentes hospedeiros e sua similaridade fisiopatológica com *Mycobacterium tuberculosis*, o *M. marinum* tem se destacado como um modelo relevante para estudos de imunologia comparada, desenvolvimento de vacinas e vigilância epidemiológica de doenças zoonóticas (CANETTI et al., 2022).

Em razão de sua ampla presença, incluindo água e sedimento, o *M. marinum* já foi identificado em mais de 160 espécies de peixes de água doce e salgada ao redor do mundo (Chinabut, 1999). A infecção ocorre geralmente por meio de pequenos traumas na pele durante o contato com ambientes aquáticos contaminados, como tanques de peixes, aquários e águas naturais, ou durante o manuseio de pescado e mariscos (ANG; RATTANA-APIROMYAKIJ; GOH,

2000). Estudos também relataram surtos em animais aquáticos decorrentes da redução da cloração da água (ANG; RATTANA-APIROMYAKIJ; GOH, 2000), o que sugere a importância de práticas adequadas de saneamento. Na Amazônia Brasileira, o contato direto com rios, lagos e pescado é frequente, tanto por atividades de subsistência, quanto recreativas, o que pode ocasionar um potencial risco de exposição humana a micobactérias não tuberculosas como *M. marinum* (ORTIZ-PRADO et al., 2024). Esse cenário evidencia a relevância de estudos voltados à caracterização imunológica dessas micobactérias no contexto amazônico, alinhando-se à vigilância em saúde única.

A imunoinformática tem se consolidado como uma ferramenta rápida e acessível para identificação *in silico* de epítomos imunogênicos em proteínas de patógenos, contribuindo para o desenho racional de vacinas e testes diagnósticos. (OLI et al., 2020). Entre as proteínas-alvo de interesse, a Antigen 85A (Ag85A), também chamada de FbpA, é amplamente conhecida por sua alta imunogenicidade em *Mycobacterium tuberculosis* e outros membros do gênero *Mycobacterium*, desempenhando papel essencial na biossíntese da parede celular e na adesão a macrófagos por meio da interação com fibronectina (TOUCHETTE et al., 2017).

Apesar da similaridade genômica entre *M. tuberculosis* e *M. marinum*, há ainda escassez de dados sobre o perfil de epítomos apresentados por proteínas conservadas como a Ag85A nesse modelo aquático (YUN et al., 2024). Embora uma vacina de DNA baseada na Ag85A tenha demonstrado proteção de curto prazo contra *M. marinum* em robalos listrados, ela não foi capaz de conferir imunidade duradoura (PASNIK; SMITH, 2005), o que reforça a necessidade de identificar epítomos mais imunogênicos e desenvolver estratégias vacinais mais eficazes.

Considerando-se o seu potencial uso em estratégias de imunoprevenção e de vigilância em saúde única, este trabalho teve por objetivo identificar, por meio da ferramenta NetMHCpan, epítomos candidatos a induzir resposta imune mediada por linfócitos T-CD8+, com base na sequência da proteína Ag85A do *Mycobacterium marinum*.

Materiais e métodos

Recuperação e análise da sequência proteica

A sequência de aminoácidos da proteína Ag85A (*fibronectin-binding protein A*) de *Mycobacterium marinum*, foi obtida no formato FASTA a partir do banco de dados UniProt (<https://www.uniprot.org/>). A seleção da Ag85A foi baseada em sua localização superficial, função na adesão e na integridade da parede celular, além de sua reconhecida imunogenicidade em *Mycobacterium tuberculosis* (WANG et al., 2023).

Predição de epítomos MHC classe I

A predição *in silico* de epítomos de linfócitos T citotóxicos (CTLs), restritos ao complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC-I), foi realizada por meio da ferramenta NetMHCpan 4.1 (disponível em <https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetMHCpan-4.1a/>) um dos servidores de predição mais precisos, baseado em um algoritmo de rede neural artificial (MILLER et al., 2008). Para essa análise, foi adotado o comprimento padrão de nove aminoácidos para os peptídeos. Os alelos HLA selecionados foram HLA-A02:01, HLA-A24:02, HLA-B39:01 e HLA-B58:01, devido à sua alta prevalência na população brasileira (CRISPIM et al., 2008; REIS et al., 2018). Os critérios de classificação dos epítomos consideraram como ligantes fortes (Strong Binders, SB) aqueles com valores de %Rank iguais ou inferiores a 0,5, e como ligantes fracos (Weak Binders, WB) aqueles com %Rank iguais ou inferiores a 2,0. O filtro de exibição dos resultados foi ajustado para %Rank $\geq$ -99, permitindo a visualização de todas as predições geradas pela ferramenta.

Análise dos epítomos preditos

Os peptídeos classificados como "Strong Binders" (SB) e "Weak Binders" (WB) foram analisados com base em sua frequência, diversidade de alelos reconhecedores e potencial imunogênico. Os dados foram organizados em planilhas de Excel e tabelas para melhor visualização e interpretação.

Análise de Antigenicidade

Os epítomos previamente selecionados com base na afinidade de ligação ao MHC foram submetidos à análise de antigenicidade por meio da ferramenta VaxiJen v2.0, que utiliza propriedades físico-químicas dos peptídeos para prever seu potencial como antígenos, de forma independente da apresentação por MHC. O valor de corte adotado foi 0,5, considerando-se peptídeos com valores superiores como prováveis antígenos. A avaliação permitiu refinar ainda mais a seleção dos epítomos candidatos, priorizando aqueles com maior probabilidade de induzir resposta imune efetiva.

Resultados

Foram identificados 24 epítomos únicos derivados da proteína Ag85A de *Mycobacterium marinum*, distribuídos em 25 combinações peptídeo-HLA de classe I (tabela 1).

A análise de afinidade foi conduzida com base no parâmetro %Rank_EL, considerando os alelos HLA-A02:01, HLA-A24:02, HLA-B39:01 e HLA-B58:01.

Dentre os pares peptídeo-HLA analisados, 10 foram classificados como Strong Binders (SB), com valores de %Rank_EL inferiores a 0,5, indicando alta afinidade de ligação às moléculas HLA (SHI et al., 2015). Os 15 pares restantes foram classificados como Weak Binders (WB), com valores superiores a esse limiar. Os alelos HLA-A02:01 e HLA-B58:01 concentraram o maior número de ligantes fortes, sugerindo maior compatibilidade com os epítomos da Ag85A e reforçando seu potencial para indução de resposta imune citotóxica (NILSSON et al., 2025). Na tabela 2 é

apresentada a predição de antigenicidade dos epítomos da proteína Ag85A de *Mycobacterium marinum*.

A ocorrência de epítomos com capacidade de ligação multialélica foi observada, como no caso de VYSGLSAL, que apresentou afinidade elevada (SB) para HLA-A24:02 e moderada (WB) para HLA-B39:01. Essa característica é particularmente relevante, pois amplia a aplicabilidade imunológica do epítomo em diferentes perfis genéticos populacionais, favorecendo sua inclusão em formulações vacinais de amplo espectro (KASHIRI et al., 2025).

A análise complementar de antigenicidade, realizada por meio da ferramenta VaxiJen v2.0 com valor de corte de 0.5, indicou que 12 dos 24 epítomos únicos apresentaram scores superiores ao limiar, sendo classificados como prováveis antígenos. Os epítomos NAAGGHNAV (score = 1.9957), GMGPSLIGL (1.1604) e FVRTSNMKF (1.0152) destacaram-se com os maiores valores preditivos, reforçando seu potencial imunogênico. O epítomo multialélico VYSGLSAL, além de sua afinidade HLA, também foi classificado como provável antígeno (score = 0.5271), corroborando sua relevância funcional (ONG et al., 2020).

Outros epítomos, como LVANNRIW, SMAGSSALI, GPSLIGLAM e LSMAGSSAL, também apresentaram scores superiores a 0.5, indicando potencial para ativação imunológica por vias independentes da apresentação por MHC. Por outro lado, 12 epítomos foram classificados como prováveis não antígenos, com scores inferiores ao limiar, e 3 epítomos apresentaram valores limítrofes (entre 0.4 e 0.5), como FVYSGLSA, WGPKDDPAW e YSGLSALL, sugerindo necessidade de avaliação experimental adicional (DHANDA et al., 2019).

É importante destacar que a classificação como WB ou como provável não antígeno não exclui o potencial imunológico dos peptídeos. A resposta imune é multifatorial e pode envolver mecanismos complementares de apresentação, processamento e reconhecimento celular (SETTE; RAPPUOLI, 2010). Portanto, epítomos inicialmente considerados de baixa afinidade ou antigenicidade podem revelar funcionalidade relevante em modelos biológicos (GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ et al., 2024).

Em conjunto, os resultados apontam para um conjunto promissor de epítomos, especialmente aqueles classificados como SB e com altos scores de antigenicidade, que podem ser explorados em estratégias de imunização baseadas em peptídeos contra *Mycobacterium marinum*. A diversidade de alelos HLA contemplados na análise amplia a aplicabilidade desses epítomos em diferentes perfis genéticos populacionais, reforçando a importância de estudos futuros de validação in vitro e in vivo (DIMOU et al., 2021).

A identificação desses peptídeos representa um avanço na seleção racional de candidatos vacinais e biomarcadores imunológicos, com potencial aplicação em modelos de doenças zoonóticas associadas a ambientes aquáticos.

Considerações Finais

Os resultados obtidos indicam que a análise de afinidade e antigenicidade dos epítomos da proteína Ag85A de *Mycobacterium marinum* identificou candidatos promissores para desenvolvimento vacinal. Epítomos "Strong Binders" e com altos scores de antigenicidade, como NAAGGHNAV, GMGPSLIGL e FVRTSNMKF, destacam-se pelo potencial imunogênico, enquanto epítomos multialélicos, como VYSGLSAL, ampliando seu alcance a diferentes perfis genéticos.

Embora alguns peptídeos tenham apresentado afinidade ou antigenicidade mais baixa, a resposta imune multifatorial pode revelar funcionalidade relevante em experimentos futuros. Por

tanto, estudos complementares *in vitro* e *in vivo* são recomendados para validar os epítomos selecionados e explorar seu uso.

Referências

ZIARATI, M. et al. Zoonotic diseases of fish and their prevention and control. *The Veterinary quarterly*, v. 42, n. 1, p. 95–118, 2022.

ORTIZ-PRADO, E. et al. Integrating environmental conservation and public health strategies to combat zoonotic disease emergence: a call to action from the Amazon rainforest. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 14, 24 abr. 2024.

AUBRY, A. et al. *Mycobacterium marinum*. *Microbiology Spectrum*, v. 5, n. 2, 1 abr. 2017.

CANETTI, D. et al. *Mycobacterium marinum*: A brief update for clinical purposes. *European Journal of Internal Medicine*, v. 105, p. 15–19, 1 nov. 2022.

ANG, P.; RATTANA-APIROMYAKIJ, N.; GOH, C.-L. Retrospective study of *Mycobacterium marinum* skin infections. *International Journal of Dermatology*, v. 39, n. 5, p. 343–347, maio 2000.

OLI, A. N. et al. Immunoinformatics and vaccine development: An overview. *ImmunoTargets and therapy*, v. 9, p. 13–30, 2020.

TOUCHETTE, M. H. et al. A Screen for Protein–Protein Interactions in Live *Mycobacteria* Reveals a Functional Link between the Virulence-Associated Lipid Transporter LprG and the Mycolyltransferase Antigen 85A. *ACS infectious diseases*, v. 3, n. 5, p. 336–348, 21 mar. 2017.

PASNIK, D. J.; SMITH, S. A. Immunogenic and protective effects of a DNA vaccine for *Mycobacterium marinum* in fish. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 103, n. 3-4, p. 195–206, 1 fev. 2005.

NUNES, K. et al. Population variation of HLA genes in rural communities in Brazil, the Quilombos from the Vale do Ribeira, São Paulo – Brazil. *Human Immunology*, v. 77, n. 6, p. 447–448, 6 abr. 2016.

REIS, P. G. et al. HLA-A, -B, -DRB1, -DQA1, and -DQB1 profile in a population from southern Brazil. *HLA*, v. 92, n. 5, p. 298–303, nov. 2018.

STERN, L. J. et al. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature*, v. 368, n. 6468, p. 215–221, 1 mar. 1994.

WANG, N. et al. Mechanisms of ag85a/b DNA vaccine conferred immunotherapy and recovery from *Mycobacterium tuberculosis*-induced injury. *Immunity, inflammation and disease*, v. 11, n. 5, 1 maio 2023.

MILLER, M. R. et al. Motif Decomposition of the Phosphotyrosine Proteome Reveals a New N-terminal Binding Motif for SHIP2. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 7, n. 1, p. 181–192, 1 jan. 2008.

SHI, J. et al. Epitope-Based Vaccine Target Screening against Highly Pathogenic MERS-CoV: An In Silico Approach Applied to Emerging Infectious Diseases. PLOS ONE, v. 10, n. 12, p. e0144475, 7 dez. 2015.

DHANDA, S. K. et al. IEDB-AR: immune epitope database—analysis resource in 2019. Nucleic Acids Research, v. 47, n. W1, p. W502–W506, 22 maio 2019.

KASHIRI, L. et al. In silico multi-epitope-based vaccine design for Mycobacterium avium complex species. Frontiers in Immunology, v. 16, 5 jun. 2025.

ONG, E. et al. Vaxign-ML: Supervised Machine Learning Reverse Vaccinology Model for Improved Prediction of Bacterial Protective Antigens. Bioinformatics, 25 fev. 2020.

SETTE, A.; RAPPUOLI, R. Reverse Vaccinology: Developing Vaccines in the Era of Genomics. Immunity, v. 33, n. 4, p. 530–541, out. 2010.

DIMOU, A. et al. HLA class I binding of mutant EGFR peptides in NSCLC is associated with improved survival. Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer, v. 16, n. 1, p. 104–112, 1 jan. 2021.

GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ, I. et al. Preclinical evaluation of a universal inactivated influenza B vaccine based on the mosaic hemagglutinin-approach. npj Vaccines, v. 9, n. 1, 17 nov. 2024.

Apêndice

Tabela 1-Epítomos preditos da proteína Ag85A de *Mycobacterium marinum* com afinidade para moléculas HLA de classe I

Peptídeo	Alelo HLA	%Rank_EL	Classificação
AAGGHNAVW	HLA-B*58:01	0.155	SB
AAYPDQFV	HLA-A*02:01	1.914	WB
ALLDPSQGM	HLA-A*02:01	0.108	SB
ARNDPMLQV	HLA-B*39:01	0.446	SB
AWARNPML	HLA-A*24:02	1.111	WB
AYHPDQFVY	HLA-A*24:02	0.369	SB
DQFVYSGSL	HLA-B*39:01	0.299	SB
FVRTSNMKF	HLA-B*58:01	1.893	WB
FVYSGLSA	HLA-A*02:01	0.269	SB
GGYKASDMW	HLA-B*58:01	0.348	SB
GMGPSLIGL	HLA-A*02:01	0.199	SB
GPSLIGLAM	HLA-B*39:01	1.185	WB

XIII Jornada de Produção Científica e Tecnológica

XVI Ciclo de Palestras Tecnológicas

I Semana da Pedagogia

X Semana da Biologia

KLVANNTRI	HLA-A*02:01	1.164	WB
LAAYHPDQF	HLA-B*58:01	0.859	WB
LSMAGSSAL	HLA-B*39:01	1.859	WB
LVANNTRIW	HLA-B*58:01	0.129	SB
NAAGGHNAV	HLA-B*39:01	1.497	WB
SMAGSSALI	HLA-A*02:01	1.434	WB
SSALILAAY	HLA-B*58:01	0.766	WB
VYSGLSLAL	HLA-A*24:02	0.175	SB
VYSGLSLAL	HLA-B*39:01	1.884	WB
WGPKDDPAW	HLA-B*58:01	1.866	WB
YHPDQFVYS	HLA-B*39:01	1.807	WB
YSGLSLALL	HLA-B*58:01	1.659	WB

Tabela 2 - Predição de antigenicidade dos epítomos da proteína Ag85A de *Mycobacterium marinum* utilizando VaxiJen v2.0

Peptídeo	Score VaxiJen	Classificação
AAGGHNAVW	0.9364	Provável Antígeno
AAAYHPDQFV	0.0874	Provável Não Antígeno
ALLDPSQGM	0.2135	Provável Não Antígeno
ARNDPMLQV	0.8787	Provável Antígeno
AWARNDPML	0.1956	Provável Não Antígeno
AYHPDQFVY	0.1951	Provável Não Antígeno
DQFVYSGSL	0.0857	Provável Não Antígeno
FVRTSNMKF	1.0152	Provável Antígeno
FVYSGSLSA	0.4118	Limítrofe (Não Antígeno)
GGYKASDMW	0.1844	Provável Não Antígeno
GMGPSLIGL	1.1604	Provável Antígeno
GPSLIGLAM	0.6079	Provável Antígeno
KLVANNTRI	0.1485	Provável Não Antígeno
LAAYHPDQF	0.2671	Provável Não Antígeno
LSMAGSSAL	0.5021	Provável Antígeno
LVANNTRIW	0.564	Provável Antígeno
NAAGGHNAV	1.9957	Provável Antígeno
SMAGSSALI	0.7468	Provável Antígeno
SSALILAAY	0.2476	Provável Não Antígeno
VYSGLSLAL	0.5271	Provável Antígeno
WGPKDDPAW	0.4759	Limítrofe (Não Antígeno)

XIII Jornada de Produção Científica e Tecnológica
XVI Ciclo de Palestras Tecnológicas
I Semana da Pedagogia
X Semana da Biologia

YHPDQFVYS	0.2495	Provável Não Antígeno
YSGSLALL	0.4128	Limítrofe (Não Antígeno)