

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA**  
**MOLECULAR**

Gabriela Guerrero Soares

Vacinologia Reversa e Imunoinformática Aplicadas à Identificação de  
Candidatos Vacinais contra *Enterobacter cloacae*

**São Carlos**

**2025**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA**  
**MOLECULAR**

Gabriela Guerrera Soares

Vacinologia Reversa e Imunoinformática Aplicadas à Identificação de  
Candidatos Vacinais contra *Enterobacter cloacae*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de Mestre em Genética e Evolução.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dra. Maria Cristina da Silva Pranchevicius.

**São Carlos**

**2025**



# UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

## Relatório de Defesa de Dissertação

Candidata: **Gabriela Guerrero Soares**

Aos 05/11/2025, às 08:00, realizou-se na Universidade Federal de São Carlos, nas formas e termos do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, a defesa de dissertação de mestrado sob o título: Vacinologia Reversa e Imunoinformática Aplicadas à Identificação de Candidatos Vacinais contra Enterobacter cloacae, apresentada pela candidata Gabriela Guerrero Soares. Ao final dos trabalhos, a banca examinadora reuniu-se em sessão reservada para o julgamento, tendo os membros chegado ao seguinte resultado:

### Participantes da Banca

Profa. Dra. Maria Cristina da Silva Pranchevicius  
Profa. Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes  
Prof. Dr. André Pitondo da Silva

Função	Instituição
Presidente	UFSCar
Titular	UFSCar
Titular	UNAERP

Conceito
<u>Aprovada</u>
<u>Aprovada</u>
<u>Aprovada</u>

Resultado Final
<u>Aprovada</u>

### Parecer da Comissão Julgadora\*:

A aluna apresentou os resultados de forma clara e segura. Na arguição, apresentando domínio do tema, respondendo as perguntas de forma consistente. Portanto, a banca **considerou a aluna aprovada.**

Encerrada a sessão reservada, o presidente informou ao público presente o resultado. Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada e, para constar, eu, Ivanildes Menezes, representante do Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, lavrei o presente relatório, assinado por mim e pelos membros da banca examinadora.

Documento assinado digitalmente  
**MARIA CRISTINA DA SILVA PRANCHEVICIUS**  
Data: 05/11/2025 10:27:20-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof

chevicius

Representante do PPG: Ivanildes Menezes

Documento assinado digitalmente  
**ANDREA SOARES DA COSTA FUENTES**  
Data: 05/11/2025 10:23:11-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof

ntes

Documento assinado digitalmente  
**ANDRE PITONDO DA SILVA**  
Data: 05/11/2025 10:21:02-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Certifico que a defesa realizou-se com a participação à distância do(s) membro(s) André Pitondo da Silva e, depois das arguições e deliberações realizadas, o(s) participante(s) à distância está(ao) de acordo com o conteúdo do parecer da banca examinadora redigido neste relatório de defesa.

Documento assinado digitalmente  
**MARIA CRISTINA DA SILVA PRANCHEVICIUS**  
Data: 05/11/2025 10:25:40-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Maria Cristina da Silva Pranchevicius

Não houve alteração no título  Houve alteração no título. O novo título passa a ser:

## AGRADECIMENTOS

A meus pais, Débora e Luis, e a meu padrasto, Fábio, que me apoiaram nas minhas decisões, me inspirando todos os dias a ser uma pessoa melhor e que sempre estiveram presentes me ajudando de todas as formas possíveis durante o período desse trabalho.

À minha irmã, que esteve ao meu lado em todos os momentos, compartilhando apoio e incentivo para que eu seguisse em frente.

A minha avó e minha tia por acreditarem em mim mesmo quando eu desacreditei. A minha família por terem me dado forças nos momentos difíceis.

A minha querida orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Cristina Pranchevicius, por confiar a mim este trabalho, por ser uma mentora exemplar e me guiar nesta etapa fundamental da minha vida acadêmica.

Aos meus amigos que me deram forças e me ajudaram a relaxar para que eu pudesse manter o foco no projeto.

Aos meus colegas de laboratório, principalmente ao Marcelo Silvas Folhas Damas, pelo apoio inestimável durante o desenvolvimento deste projeto.

À CAPES, pelo financiamento concedido, fundamental para a realização desta pesquisa.

Aos membros da banca, pela dedicação de seu tempo e conhecimento na avaliação deste trabalho.

## RESUMO

A resistência antimicrobiana associada ao complexo *Enterobacter cloacae* representa um desafio crescente em ambientes hospitalares, especialmente diante da escassez de novos antibióticos eficazes. Apesar da importância desse patógeno, não existem vacinas licenciadas contra *E. cloacae*, e as alternativas terapêuticas disponíveis são cada vez mais limitadas. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver um candidato vacinal multi-epítopo capaz de induzir respostas imunes celular e humoral contra proteínas conservadas desse patógeno, utilizando um pipeline robusto de proteômica subtrativa, vacinologia reversa e imunoinformática. Foram analisados 21 genomas clínicos completos, o que permitiu a seleção de proteínas 1.352 estavam associadas a essencialidade, virulência ou resistência a antibióticos, e resultando em 39 proteínas não homólogas ao proteoma humano e não homólogas a microbiota intestinal. A seleção resultou em nove proteínas promissoras, a partir das quais foram preditos epítomos de células B e T com alta afinidade para alelos de MHC, não toxicidade, ausência de alergenicidade e elevado potencial imunogênico. Esses elementos permitiram o desenvolvimento de quatro candidatos a vacina (VEC1-VEC4), entre os quais a construção VEC1 se destacou por apresentar propriedades físico-químicas favoráveis, estrutura tridimensional estável, forte interação com receptores *Toll-like* e cobertura populacional estimada em 92,6%. As simulações imunológicas demonstraram capacidade de induzir produção robusta de anticorpos, ativação de células T auxiliares e citotóxicas e formação de células de memória após três doses simuladas. Além disso, a sequência da VEC1 foi otimizada para expressão em *Escherichia coli* e clonada *in silico* no vetor pET-28a (+), indicando viabilidade para futuras etapas experimentais. O candidato a vacina desenvolvido demonstra potencial de aplicação prática no controle de infecções por *E. cloacae*, podendo contribuir para a redução da pressão seletiva por antibióticos e para o combate da resistência antimicrobiana. Esses resultados reforçam a importância da imunoinformática como ferramenta aceleradora no desenvolvimento de vacinas e oferecem uma base sólida para validações *in vitro* e *in vivo* em estudos futuros.

**Palavras Chaves:** *Enterobacter cloacae*, Vacina Multi-epítopo, Vacinologia Reversa, Proteômica Subtrativa.

## ABSTRACT

Antimicrobial resistance associated with the *Enterobacter cloacae* complex represents an increasing challenge in hospital settings, especially given the scarcity of effective new antibiotics. Despite the clinical relevance of this pathogen, no licensed vaccines against *E. cloacae* currently exist, and the therapeutic alternatives available are becoming progressively more limited. In this context, the present study aimed to develop a multi-epitope vaccine candidate capable of inducing both cellular and humoral immune responses against conserved proteins of this pathogen, using a robust pipeline integrating subtractive proteomics, reverse vaccinology, and immunoinformatics. A total of 21 complete clinical genomes were analyzed, enabling the identification of 1,352 proteins associated with essentiality, virulence, or antibiotic resistance, which were subsequently filtered to yield 39 proteins non-homologous to the human proteome and to the gut microbiota. From these, nine promising proteins were selected, and B- and T-cell epitopes were predicted based on high binding affinity to multiple MHC alleles, non-toxicity, absence of allergenicity, and elevated immunogenic potential. These components supported the development of four multi-epitope vaccine constructs (VEC1–VEC4), among which VEC1 exhibited the most favorable characteristics, including optimal physicochemical properties, a stable three-dimensional structure, strong predicted interaction with *Toll-like* receptors, and an estimated global population coverage of 92.6%. Immune simulations demonstrated the vaccine's ability to induce robust antibody production, activation of helper and cytotoxic T cells, and formation of memory cells after three simulated doses. Additionally, the VEC1 sequence was codon-optimized for expression in *Escherichia coli* and successfully cloned in silico into the pET-28a (+) vector, indicating feasibility for future experimental validation. The vaccine candidate developed here shows practical potential for controlling *E. cloacae* infections, contributing to reduced selective pressure from antibiotics and supporting efforts to combat antimicrobial resistance. These findings highlight the value of immunoinformatics as an accelerating tool in vaccine development and provide a solid foundation for subsequent *in vitro* and *in vivo* validation studies.

**Keywords:** *Enterobacter cloacae*, Multi-epitope Vaccine, Reverse Vaccinology, Subtractive Proteomics.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1.** Mecanismos de resistência antimicrobiana. Figura adaptada de DARBY et al., 2023.

**Figura 2.** Fluxograma que ilustra a metodologia utilizada para o desenvolvimento de uma vacina de múltiplos epítomos contra *E. cloacae*.

**Figura 3.** Ilustração esquemática e arquitetura da sequência das construções de vacina de múltiplos epítomos. Componentes principais: adjuvantes, sequências imunoestimuladoras e epítomos de linfócitos T citotóxicos, linfócitos T auxiliares e linfócitos B.

**Figura 4.** Previsão de epítomos lineares de células B utilizando a escala de antigenicidade IEDB Kolaskar e Tongaonkar. O potencial antigénico foi visualizado utilizando BepiPred (limiar >0,5), com segmentos amarelos a indicar epítomos imunogénicos previstos e verdes a representar sequências não antigénicas. Estes incluem a proteína da família KdgM da porina específica do oligogalacturonato (A), a proteína de choque térmico HslJ (B), a proteína da membrana externa de resistência a múltiplas drogas MdtQ (C), a subunidade menor Curli CsgB (D), a proteína de montagem fimbrial putativa SfmF (E), a subunidade principal Curli CsgA (F), a proteína de montagem/transporte Curli CsgF (G), a chaperona de montagem Curli CsgC (H) e a adesina específica para D-manose da fimbria tipo 1 FimH (I).

**Figura 5.** Processamento de epítomos para as vacinas candidatas. (A) Epítomos MHC-I: locais de clivagem proteossómica previstos em vermelho na sequência de aminoácidos. (B) Libertação de epítomos MHC-II por catepsinas com número de locais de clivagem para cada protease.

**Figura 6.** Análise da cobertura populacional global e regional do cluster de epítomos MHC-I/II selecionado.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES (CONTINUAÇÃO)

**Figura 7.** Modelagem computacional e refinamento estrutural das vacinas candidatas contra *E. cloacae*. (A) Avaliação da qualidade de quatro construções de vacinas (VEC1-4) usando métricas derivadas do I-TASSER (C-Score, TM-Score e RMSD). (B) Validação do GalaxyRefine antes (esquerda) e após (direita) o refinamento: destacando o fator de qualidade geral, a percentagem de resíduos nas regiões mais favoráveis e as regiões não permitidas. (C) Estruturas 3D finais coloridas por elementos secundários, com  $\alpha$ -hélice em ciano,  $\beta$ -barril em magenta e *loops/coils* em rosa claro. Os modelos individuais são os seguintes: VEC1 (a), VEC2 (b), VEC3 (c) e VEC4 (d).

**Figura 8.** Validação estrutural das construções da vacina. (A-D) Gráficos de Ramachandran para modelos refinados VEC1-4 mostrando a distribuição de resíduos: regiões mais favorecidas (vermelho), regiões permitidas (amarelo) e regiões não permitidas (branco). (E-H) Pontuações Z do ProSA-web (pontos pretos) para cada construção.

**Figura 9.** Interações moleculares entre a VEC1 e o heterodímero TLR1/2 (A) Estrutura 3D geral do complexo VEC1-TLR1/2, com VEC1 representado em azul claro e TLR1/2 em verde. (B) Vista aproximada dos contactos polares na interface de ligação, com os resíduos em interação representados como modelos de bastões e rotulados. (C) Interações eletrostáticas detalhadas entre VEC1 e TLR1/2, destacando a complementaridade de carga com resíduos em clash mostrados como bastões rotulados.

**Figura 10.** Interações moleculares entre a VEC1 e o TLR4(A) Estrutura 3D geral do complexo VEC1-TLR1/2, com VEC1 representado em azul claro e TLR1/2 em verde. (B) Vista aproximada dos contactos polares na interface de ligação, com os resíduos em interação representados como modelos de bastões e rotulados. (C) Interações eletrostáticas detalhadas entre VEC1 e TLR4, destacando a complementaridade de carga com resíduos em clash mostrados como bastões rotulados.

**Figura 11.** Interações moleculares entre a VEC1 e o TLR5(A) Estrutura 3D geral do complexo VEC1-TLR1/2, com VEC1 representado em azul claro e TLR1/2 em verde. (B) Vista aproximada dos contactos polares na interface de ligação, com os resíduos em interação representados como modelos de bastões e rotulados. (C) Interações eletrostáticas detalhadas entre VEC1 e TLR5, destacando a complementaridade de carga com resíduos em clash mostrados como bastões rotulados.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES (CONTINUAÇÃO)

**Figura 12.** Análise de Modos Normais da dinâmica do complexo VEC1-TLR1/2. (A) Perfil de mobilidade do complexo via NMA. (B) Gráfico de deformabilidade destacando a flexibilidade de resíduos específicos ao longo da estrutura molecular. (C) Comparação dos fatores-B entre os dados da NMA (vermelho) e do Protein Data Bank - PDB (cinza), validando a dinâmica do modelo. (D) Espectro de *eigenvalue* mostrando o primeiro modo (menor frequência) governando os movimentos globais. (E) Distribuição da variância nos primeiros 20 modos normais, com contribuições individuais (roxo) e cumulativas (verde). (F) Matriz de covariância dos movimentos atômicos: correlacionados (vermelho), não correlacionados (branco) e anticorrelacionados (azul). (G) Modelo de rede elástica representando o acoplamento mecânico por meio de molas interatômicas.

**Figura 13.** Características estruturais e imunogênicas do VEC1. (A) Mapeamento da estrutura secundária com  $\alpha$ -hélices (laranja),  $\beta$ -barril (roxo) e *coil* (rosa). A acessibilidade da superfície dos resíduos de aminoácidos codificada (vermelho indicando resíduos expostos e azul indicando resíduos enterrados). Além disso, a linha cinzenta representa a probabilidade de desordem, onde a espessura corresponde à probabilidade de desordem nas regiões da *coil*. (B) Distribuição do epítipo mostrando células B, MHC I e MHC II com o número respectivo e a percentagem de resíduos expostos e enterrados.

**Figura 14.** Previsão estrutural de epítipos conformacionais de células B. (A) Resíduos de epítipos tabulados com numeração de posição e pontuações de confiança da previsão. (B) Mapeamento estrutural 3D de seis epítipos dominantes (a-f), com regiões antigênicas previstas destacadas a amarelo em relação à estrutura completa da proteína (branco).

**Figura 15.** Perfil da resposta imune in silico da vacinação com VEC1. (A) Produção de imunoglobulina específica do antígeno após três doses (intervalos de 30 dias), com subclasses codificadas por cores (IgM+IgG: amarelo; IgM: verde; IgG1+IgG2: azul; IgG1: roxo e IgG2: vermelho). (B) Dinâmica das populações de células B. (C) Populações de células T auxiliares. (D) Subconjuntos de células T citotóxicas (CD8+): ativas (em proliferação), em repouso e anérgicas (tolerantes). (E) Compartimentos de células T reguladoras (*Treg*) mostrando diferenciação de memória/efectora. (F) Níveis de citocinas. O gráfico principal exibe os níveis gerais de citocinas, enquanto a inserção mostra os níveis de IL-2 e o índice de Simpson (D), que mede a diversidade clonotípica das células T. Um índice de Simpson mais alto indica maior diversidade.

**Figura 16.** *Design* computacional da construção da vacina multi-epítopo para expressão bacteriana. Representação esquemática da sequência da vacina (verde claro) clonada no vetor pET28a (+) utilizando sítios de restrição. O cassete de expressão inclui: His6-Tag N-terminal e sítio de clivagem da trombina.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Principais mecanismos de resistência antimicrobiana em *Enterobacter cloacae*.

**Tabela 2.** As cepas clínicas de *Enterobacter cloacae* analisadas neste estudo.

**Tabela 3.** Análises proteômicas substrativas das proteínas da *Enterobacter cloacae*.

**Tabela 4.** Caracterização das proteínas candidatas a construção da vacina: localização subcelular, função, propriedades físico-químicas, antigenicidade, GRAVY, hélices transmembranas e peptídeo sinalizador.

**Tabela 5.** Caracterização in silico de epítomos MHC-I para a construção de vacinas: imunogenicidade, antigenicidade, toxicidade, GRAVY e alergenicidade.

**Tabela 6.** Caracterização in silico de epítomos MHC-II para o desenvolvimento de vacinas: antigenicidade, GRAVY, toxicidade, alergenicidade e indução de IFN- $\gamma$ .

**Tabela 7.** Análise de *docking* molecular das interações entre o epítomo MHC-I e o HLA: energia de ligação e compatibilidade estrutural.

**Tabela 8.** Análise de *docking* molecular das interações entre o epítomo MHC-II e o HLA: energia de ligação e compatibilidade estrutural.

**Tabela 9.** Epítomos lineares de células B com propriedades antigénicas e de toxicidade, alergénicas e hidrofóbicas.

**Tabela 10.** Construções de vacinas multi-epítomos contra *E. cloacae*: propriedade biofísicas e imunológicas.

**Tabela 11.** Análise comparativa de docking de vacinas candidatas com receptores *Toll-like*: energia de *docking* e estabilidade de interação.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1 A resistência antimicrobiana e o contexto global .....	16
1.2 Vacinas como alternativa à resistência antimicrobiana.....	18
1.2.1 Proteômica subtrativa e vacinologia reversa.....	19
1.3. Família <i>Enterobacteriaceae</i> .....	21
1.3.1 <i>Enterobacter cloacae</i> .....	21
1.3.2 Importância clínica de <i>E. cloacae</i> .....	22
1.4 Mecanismos de resistência .....	24
1.4.1 Mecanismo de ação dos principais antibióticos usados .....	26
1.5 Lacuna na literatura e justificativa .....	27
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	<b>30</b>
3.1 Coleta de dados e identificação do <i>core</i> proteômico .....	31
3.2 Triagem de genes essenciais e fatores de virulência e resistência .....	32
3.3 Triagem de homólogos da microbiota intestinal e homólogos humanos.....	32
3.4 Predição da localização subcelular.....	33
3.5 Análise de antigenicidade e propriedades físico químicas.....	33
3.6 Análise de domínios transmembrana e vias secretoras .....	33
3.7 Triagem de epítomos de células T e células B.....	34
3.8 Análise de imunogenicidade, antigenicidade, toxicidade, alergenicidade, GRAVY e potencial indutor de IFN dos epítomos selecionados .....	35
3.9 Predição da estrutura tridimensional (3D) dos epítomos selecionados e <i>docking</i> molecular .....	35
3.10 Análise de cobertura populacional .....	36
3.11 Construção da vacina.....	36
3.12 Predição da antigenicidade, alergenicidade, solubilidade e propriedades físico químicas dos candidatos à vacina.....	37

3.13 Predição da estrutura terciária, refinamento e validação dos candidatos a vacina .....	38
3.15 Simulação de dinâmica molecular .....	39
3.16 Predição da estrutura secundária e acessibilidade superficial.....	39
3.17 Epítomos descontínuos de células B .....	40
3.18 Simulação da resposta do sistema imune ao candidato a vacina mais promissor .....	40
3.19 Análise de segurança da vacina .....	40
3.20 Adaptação de códons e clonagem <i>in silico</i> .....	40
<b>4.RESULTADOS .....</b>	<b>41</b>
4.1 Análise proteômica das proteínas do <i>core</i> de <i>E. cloacae</i> .....	41
4.2 Análise de regiões transmembrana, peptídeos Sinal, propriedades físico químicas e antigenicidade .....	42
4.3 Predição de epítomos de MHC Classe I .....	44
4.4 Predição de epítomos de MHC Classe II .....	45
4.5 Modelagem de peptídeos e análise de <i>docking</i> molecular .....	46
4.6 Predição de epítomos de células B .....	50
4.7 Construção da vacina multiepítomo e análise físico química .....	51
4.8 Análise de clivagem de peptídeos e avaliação de cobertura populacional .....	53
4.9 Predição, refinamento e validação da estrutura 3D para os candidatos a vacina de <i>E. cloacae</i> .	54
4.10 Análise de <i>docking</i> molecular dos candidatos a vacina com receptores Toll-like.....	57
4.11 Simulações de dinâmica molecular .....	60
4.12 Predição da estrutura secundária e acessibilidade superficial da VEC1 .....	61
4.13 Epítomos descontínuos de células B .....	62
4.14 Simulações de respostas imunes para avaliar a eficácia da vacina.....	63
4.15 Avaliação de similaridade com proteínas humanas e risco de autoimunidade .....	65
4.16 Adaptação de códons do candidato a vacina VEC1 .....	65
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>66</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>72</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>74</b>

<b>8. ANEXO 1</b> .....	<b>103</b>
<b>9. ANEXO 2</b> .....	<b>104</b>
<b>10. ANEXO 3</b> .....	<b>105</b>

## **PRODUTIVIDADE OBTIDA**

Os resultados obtidos neste trabalho geraram um artigo científico internacional, no qual sou primeira autora, que já foi publicado na revista *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, com fator de impacto 3.6. (**Anexo 1**)

- **Gabriela Guerrero Soares**, et al. "Alternative therapeutic approaches for combating multi-drug-resistant bacteria: Reverse vaccinology against *Enterobacter cloacae*." *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 23.3 (2025): 100519.

**Adicionalmente estou contribuindo nos seguintes manuscritos que está em revisão:**

- **Repartindo a primeira autoria no artigo:** Heteroresistance to amikacin in *Klebsiella aerogenes* isolates from patients in an intensive care unit in Brazil. Submetido ao *Jornal Microbiology Spectrum* da American Society for Microbiology (ASM). (**Anexo 2**)

- **Primeira autora na revisão:** *Klebsiella oxytoca*: an opportunistic bacterial pathogen that poses challenges for treatment and vaccine development. Submetido ao *Jornal Future Microbiology*, da Taylor & Francis Group. (**Anexo 3**)

## 1. INTRODUÇÃO

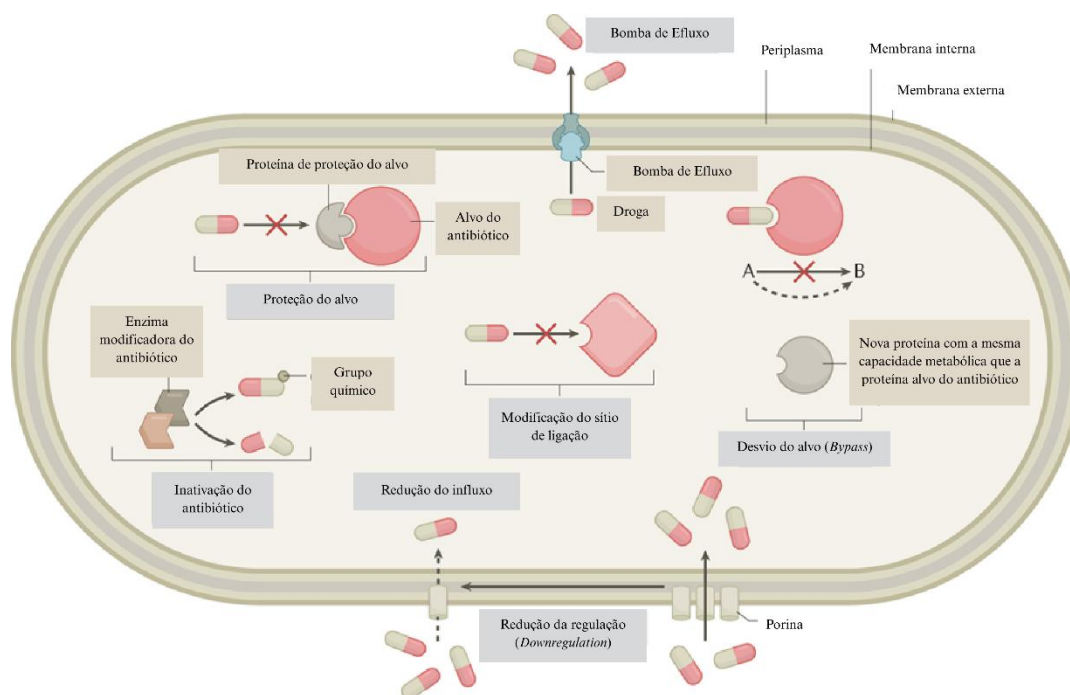
### 1.1 A RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E O CONTEXTO GLOBAL

A resistência antimicrobiana (RAM) é definida como a capacidade de microrganismos, incluindo bactérias, vírus, fungos e parasitas, de sobreviver e proliferar mesmo na presença de drogas originalmente desenvolvidas para eliminá-los ou inibir seu crescimento (TANG et al., 2023; DADGOSTAR, 2019). Esse fenômeno compromete a eficácia das terapias padrão, favorecendo a persistência de infecções e elevando o risco de disseminação de patógenos resistentes (DADGOSTAR, 2019).

Atualmente, a RAM é considerada uma das maiores ameaças à saúde pública global. Estima-se que a resistência antimicrobiana seja responsável por 700.000 mortes anualmente, podendo alcançar até 10 milhões de óbitos por ano em 2050 caso não sejam implementadas medidas eficazes de contenção (MURRAY et al., 2022; O'NEILL, 2016). Esse cenário é impulsionado por uma interação complexa de fatores, incluindo o uso excessivo e inadequado de antimicrobianos na medicina humana, agricultura e pecuária, bem como a contaminação ambiental e medidas inadequadas de controle de infecções (FERRI et al., 2017; IRFAN et al., 2022).

Do ponto de vista molecular, a RAM pode surgir tanto através de mutações espontâneas quanto pela transferência horizontal de genes e aquisição de genes de resistência (CHRISTAKI et al., 2020; BELAY et al., 2024). Os mecanismos de resistência são bem caracterizados, e a rápida evolução e disseminação dos genes de resistência ressaltam a urgência de uma ação coordenada (SULTAN et al., 2018), para combater os patógenos resistentes. Os mecanismos de resistência permitem que os microrganismos evitem os efeitos dos agentes antimicrobianos por meio da inativação dos antibióticos, modifiquem seus alvos, reduzam a absorção das drogas ou as eliminem por meio de sistemas de efluxo ativo (C REYGAERT, 2018). Alguns mecanismos de resistência são amplamente reconhecidos: alteração na permeabilidade da membrana (como redução das porinas) que impede a entrada do fármaco; a modificação do alvo antibiótico, que inclui desde mutações na proteína-alvo até estratégias mais complexas como o *bypass* do alvo (onde sua função é substituída) e a proteção do alvo por proteínas específicas; a inativação

enzimática do antibiótico, seja por degradação ou por modificação química da molécula; e, por fim, o efluxo ativo, mediado por bombas que expulsam o fármaco do interior celular (**Figura 1**) (DARBY et al., 2023).



**Figura 1.** Mecanismos de resistência antimicrobiana. Figura adaptada de DARBY et al., 2023.

As consequências da RAM são profundas, incluindo aumento da morbidade e mortalidade, prolongamento das internações hospitalares, elevação dos custos em saúde e perda significativa de produtividade, com maior impacto em países de baixa e média renda, onde sistemas de vigilância e controle ainda são limitados (DADGOSTAR, 2019; NAGHAVI et al., 2024). A resistência antimicrobiana apresenta impactos globais multifacetários, na esfera econômica e da saúde pública; e é possível que adentremos uma era pós antibiótica, na qual infecções comuns e ferimentos leves podem levar à morte (REARDON, 2014).

Um relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS), publicado em 2014 com dados de 114 países, já havia alertado para a disseminação alarmante de bactérias multirresistentes (WHO, 2014). No Brasil, o problema também se evidencia: entre 8.869 infecções bacterianas adquiridas no sistema público de saúde durante a pandemia de COVID-19, 2.641 (29,7%) foram causadas por microrganismos multirresistentes, sendo 1.257 (14,1%) identificadas em pacientes de unidades de terapia intensiva (UTIs) (POLLY et al., 2022). Os pacientes críticos representam, portanto, o epicentro da ocorrência da multirresistência em hospitais, podendo disseminar-se pelo hospital e chegar à comunidade (ANDRADE et al., 2006). Portanto, a

disseminação de bactérias resistentes a múltiplos medicamentos representa igualmente uma questão de extrema gravidade.

Reconhecendo a urgência do tema, a OMS publicou em 2017 uma lista de patógenos prioritários resistentes a antibióticos que representam uma grande ameaça para os seres humanos, sendo a maior parte da lista composta de patógenos bacterianos Gram-negativos (BREIJYEH et al., 2020; WHO, 2017). Essas bactérias são frequentemente associadas a infecções graves e à resistência a múltiplas classes de antibióticos, entre elas carbapenêmicos e cefalosporinas de terceira geração, que são muito eficazes no tratamento de bactérias MDR (WHO, 2017).

Em 2024, a OMS refinou e aprimorou sua lista de patógenos prioritários, reforçando o alerta sobre ameaças bacterianas críticas e atualizando as prioridades globais de pesquisa e desenvolvimento (R&D) para novas terapias (WHO, 2024). É nesse contexto de necessidade urgente por novas alternativas terapêuticas contra patógenos bacterianos prioritários que este trabalho se insere, visando desenvolver um candidato a vacina direcionado ao patógeno *E. cloacae*.

A procura por novos medicamentos antimicrobianos continua uma prioridade global. Contudo as perspectivas para descobertas de novos antibióticos são desanimadoras, devido a fatores como elevados custos de desenvolvimento, baixa atratividade econômica para a indústria farmacêutica e complexidade na identificação de novos alvos terapêuticos (GARGATE et al., 2025; TAGLIABUE & RAPPUOLI, 2018). Diante dessa estagnação e do avanço acelerado da resistência, torna-se evidente que intervenções alternativas são necessárias. Nesse contexto, a vacinação surge como uma estratégia particularmente promissora, capaz de reduzir a incidência de infecções, diminuir a necessidade de uso de antimicrobianos e, conseqüentemente, mitigar a disseminação da resistência.

## 1.2 VACINAS COMO ALTERNATIVA À RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Vacinas são capazes de estimular o sistema imunológico a reconhecer um agente infeccioso e responder de forma rápida e eficaz em contatos futuros, proporcionando proteção contra doenças (MESSINA et al., 2019; ARUNACHALAM, 2024). Elas podem ser compostas por microrganismos inativados ou atenuados, proteínas, polissacarídeos ou fragmentos moleculares específicos (POLLARD & BIJKER, 2021), e representam uma das estratégias mais eficazes de

saúde pública para prevenir infecções e reduzir a mortalidade (HASSO-AGOPSOWICZ et al., 2024).

O uso exclusivo de antibióticos para o controle de infecções bacterianas, embora essencial, gera intensa pressão seletiva sobre as populações microbianas, favorecendo o surgimento e a disseminação de cepas resistentes (HASSO-AGOPSOWICZ et al., 2024; TAGLIABUE & RAPPUOLI, 2018; VENTOLA, 2015). Esse processo resulta em um desequilíbrio perigoso, pois a taxa de surgimento da resistência é mais rápida do que a descoberta e aprovação de novos antimicrobianos (MURRAY et al., 2022). Nesse contexto, as vacinas ganham relevância estratégica: ao prevenirem infecções, reduzem a necessidade do uso de antibióticos e, conseqüentemente, diminuem a pressão seletiva que impulsiona a resistência (MICOLI et al., 2021; KINGWELL, 2018).

Entretanto, ao contrário do que se observa em outros patógenos bacterianos de relevância clínica, como *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*, ainda não existem vacinas licenciadas contra espécies do complexo *Enterobacter cloacae*, apesar do aumento de sua prevalência em infecções hospitalares e da sua associação com resistência a múltiplas drogas (BREIJYEH et al., 2020). O desenvolvimento de vacinas contra *Enterobacteriaceae* multirresistentes é dificultado pela variabilidade genética, redundância dos fatores de virulência e pela plasticidade da superfície celular, que permite escape da resposta imune (AL-MEGRIN et al., 2022; ANNAVAJHALA et al., 2019a; ANNAVAJHALA et al., 2019b).

Diante dessas dificuldades, abordagens computacionais têm ganhado destaque, como a proteômica subtrativa, que avalia a expressão diferencial de proteínas em contextos relevantes de infecção, e a vacinologia reversa, que aplica ferramentas computacionais para analisar genomas completos e identificar alvos promissores *in silico* (KHALID & POH et al., 2023; NAZ et al., 2019). Essas metodologias tornam o desenvolvimento vacinal mais eficiente e direcionado, ao permitir a seleção de antígenos conservados e biologicamente relevantes em patógenos complexos. Dessa forma, configuram estratégias essenciais no enfrentamento da resistência antimicrobiana, especialmente no caso de espécies como *E. cloacae*.

### **1.2.1 Proteômica subtrativa e vacinologia reversa**

O avanço contínuo das tecnologias de sequenciamento genômico levou a um aumento exponencial no número de microrganismos com genomas completamente sequenciados e disponíveis em bases de dados públicas (LAND et al., 2015; TATUSOVA et al., 2015). Esse

repositório de informações possibilitou o desenvolvimento de estratégias baseadas em genômica comparativa e proteômica subtrativa, ferramentas que permitem identificar alvos de interesse vacinal ou terapêutico a partir da análise *in silico*, sem a necessidade de cultivo do patógeno em laboratório (MUDGAL et al., 2025; VILELA RODRIGUES et al., 2019; YAP & THONG, 2017). A abordagem subtrativa consiste em excluir proteínas homólogas ao proteoma humano ou à microbiota comensal, de modo a reduzir o risco de reatividade cruzada e efeitos adversos, permitindo selecionar antígenos com maior potencial de segurança e eficácia (HABIBA et al., 2025; ALSHABRMI & ALATAWI, 2024).

Nesse contexto, destaca-se a vacinologia reversa (VR), uma estratégia inovadora baseada na exploração de sequências genômicas completas para a identificação sistemática de candidatos a vacinas (KHALID & POH et al., 2023; NAZ et al., 2019). Diferente das abordagens tradicionais, que dependem do cultivo bacteriano e da experimentação laboratorial, a VR utiliza ferramentas de bioinformática para rastrear todo o proteoma do microrganismo e prever antígenos com potencial de induzir resposta imune adaptativa (MUZZI et al., 2007a; MUZZI et al., 2007b). Esse processo pode integrar diferentes análises *in silico*, como predição de epítomos, localização subcelular, antigenicidade, toxicidade e modelagem estrutural, acelerando significativamente a seleção de alvos (GOODSWEN et al., 2023; HABIBA et al., 2025).

O uso da VR ganhou destaque em 1995 com a publicação do primeiro genoma bacteriano completo, de *Haemophilus influenzae* (FLEISCHMANN et al., 1995), o que abriu caminho para análises comparativas em larga escala. Poucos anos depois, a VR foi aplicada com sucesso no desenvolvimento da primeira vacina licenciada a partir dessa abordagem, contra *Neisseria meningitidis* do grupo B (PIZZA et al., 2000).

Desde então, a metodologia tem sido utilizada para triagem de candidatos a vacinas em diversos microrganismos de importância clínica e epidemiológica, como *Klebsiella pneumoniae* (ELFADIL et al., 2025), *Pseudomonas aeruginosa* (ZHU et al., 2025), *Mycobacterium tuberculosis* (AKURUT et al., 2025), *Serratia marcescens* (DAMAS et al., 2022) e até mesmo no contexto viral, como no SARS-CoV-2 (DA SILVA et al., 2023).

Esses exemplos demonstram a versatilidade da vacinologia reversa, especialmente para microrganismos multirresistentes ou de difícil cultivo, nos quais a experimentação clássica seria lenta e custosa. Ao combinar genômica comparativa, proteômica subtrativa e análises imunoinformáticas, a VR constitui uma das estratégias mais promissoras para acelerar o

desenvolvimento de novas vacinas no cenário da resistência antimicrobiana (LÓPEZ-SILES et al., 2021), particularmente quando aplicadas a patógenos oportunistas de relevância clínica.

Entre esses patógenos, destaca-se a família *Enterobacteriaceae*, que reúne diversas espécies associadas a infecções hospitalares e à crescente disseminação de mecanismos de resistência (NOËL et al., 2019; YAIKHAN et al., 2025; WUTOR et al., 2024). A compreensão dessa família bacteriana e de suas características epidemiológicas e biológicas é fundamental para contextualizar a escolha do alvo deste estudo e para fundamentar a aplicação das abordagens computacionais descritas anteriormente.

### 1.3. FAMÍLIA *ENTEROBACTERIACEAE*

*Enterobacteriaceae* é a família com maior diversidade taxonômica dentro da ordem *Enterobacterales*, abrangendo atualmente mais de 60 gêneros e mais de 250 espécies (ADEOLU et al., 2016). Esses microrganismos compartilham características fenotípicas relevantes, incluindo a capacidade de fermentar glicose, reduzir nitratos a nitritos e pelo seu metabolismo anaeróbico facultativo (FARMER et al., 2010).

As bactérias pertencentes a essa família são encontradas em diversos ambientes, incluindo solo, água, plantas e como parte da microbiota intestinal normal em humanos e animais (SINGH & BHUNIA, 2016; MOREIRA DE GOUVEIA et al., 2024). Em indivíduos saudáveis, sua participação na microbiota intestinal é geralmente inferior a 1%, embora podem proliferar em condições de doença (MOREIRA DE GOUVEIA et al., 2024). Clinicamente, as *Enterobacterales* são reconhecidas como os principais patógenos bacterianos de infecções relacionadas à ambientes de assistência à saúde e têm sido frequentemente associadas a surtos hospitalares (NOËL et al., 2019). Considerando sua ampla distribuição ambiental, capacidade de adaptação e relevância clínica, torna-se fundamental compreender com maior detalhe as características do gênero *Enterobacter* e, particularmente, da espécie *E. cloacae*. Essa contextualização permite aprofundar sua importância como patógeno oportunista, além de justificar sua seleção como alvo para abordagens modernas de descoberta de antígenos e desenvolvimento vacinal.

#### 1.3.1 *Enterobacter cloacae*

A *Enterobacter cloacae* é uma bactéria Gram-negativa, em forma de bastonete, pertencente a família *Enterobacteriaceae* (PAAUW et al., 2008). A *E. cloacae* faz parte de um grupo maior e geneticamente diversificado conhecido como complexo *Enterobacter cloacae* (ECC), que inclui várias espécies intimamente relacionadas, como *E. hormaechei*, *E. asburiae*, *E. kobei* e outras (DAVIN-REGLI ET AL., 2019). A *E. cloacae* e os membros do complexo ECC encontram-se em ambientes diversificados, no solo, na água, nas plantas e como comensais no trato gastrointestinal de seres humanos e animais (SINGH et al., 2018, DAVIN-REGLI ET AL., 2019). Entretanto, a *E. cloacae* é a espécie de *Enterobacter* mais frequentemente isolada de humanos (JI et al., 2021), sendo descrita como um organismo oportunista que causa infecções graves, especialmente em pacientes imunocomprometidos e hospitalizados (HAFIZ et al., 2023). As *Enterobacter* spp. comumente apresentam um caráter de multidrogas resistentes (MDR) devido a sua eficiente adaptação ao ambiente hospitalar e a sua facilidade de adquirir fatores de resistência e virulência por elementos genéticos moveis (SUMBANA et al., 2022).

Apesar da crescente importância das *E. cloacae* no cenário de saúde pública, poucas pesquisas reportaram os fatores de virulência dessa bactéria. Alguns mecanismos de virulência da *E. cloacae* foram identificados em pesquisas anteriores, como sistemas de secreção, formação de biofilme e secreção de diversas citotoxinas (GANBOLD et al., 2023; DAVIN-REGLI & PAGÉS, 2015; MUSTAFA et al., 2020). A presença desses fatores de virulência, somada à habilidade da espécie em explorar oportunidades clínicas e sobreviver em diversos ambientes hospitalares, reforça sua importância como patógeno oportunista. Por esse motivo, torna-se essencial compreender com maior profundidade sua relevância epidemiológica e seu impacto no contexto das infecções associadas à assistência à saúde, aspectos que serão discutidos na seção seguinte.

### **1.3.2 Importância clínica de *E. cloacae***

A *Enterobacter cloacae* é um patógeno clinicamente significativo devido à sua resistência a múltiplas drogas, diversos fatores de virulência e adaptabilidade, tornando-a uma das principais causas de infecções hospitalares difíceis de tratar em todo o mundo (YAIKHAN et al., 2025; WUTOR et al., 2024; ANNAVAJHALA et al., 2019b). Essa espécie é frequentemente caracterizada como multirresistente (MDR), com muitos isolados clínicos a apresentarem resistência a várias classes de antibióticos, incluindo  $\beta$ -lactâmicos, carbapenêmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas (GANBOLD et al., 2023; DAVIN-REGLI & PAGÉS, 2015; MILLER & ARIAS, 2024). Ademais, as *Enterobacter* spp. possuem uma resistência

intrínseca à ampicilina e cefalosporinas de amplo espectro e já houveram relatos de resistência a cefalosporinas de terceira geração e carbapenêmicos, dificultando a escolha de um tratamento adequado (INTRA et al., 2023). De forma alarmante, a resistência aos carbapenemas e à colistina é cada vez mais relatada, frequentemente mediada por genes de carbapenemase (*bla*NDM, *bla*KPC) e genes *mcr* (ANNAVAJHALA et al., 2019a, YAIKHAN et al., 2025).

Os mecanismos moleculares que sustentam esse perfil de resistência incluem a superprodução cromossômica de AmpC  $\beta$ -lactamases, a aquisição de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBLs), a presença de carbapenemases (como *bla*NDM e *bla*OXA-48) e a ação de bombas de efluxo (AL-ZAHRANI & BREK, 2025; YAIKHAN et al., 2025). Esses fatores tornam *E. cloacae* um patógeno altamente adaptável frente à pressão seletiva causada pelo uso intensivo de antibióticos.

Além da resistência, *E. cloacae* possui diversos determinantes de virulência que ampliam seu potencial patogênico, incluindo genes para adesinas, formação de biofilmes, produção de sideróforos (para aquisição de ferro), sistemas de secreção (T4SS e T6SS) e mecanismos de resistência ao soro, que permitem escapar da ação bactericida do sistema complemento (LIU et al., 2022b; GANBOLD et al., 2023; BOLOURCHI et al., 2022b). Esses fatores contribuem para sua capacidade de colonizar diferentes sítios do hospedeiro e causar infecções oportunistas (MUSTAFA et al., 2020; DAVIN-REGLI & PAGÉS, 2015).

Clinicamente, *E. cloacae* está associada a uma ampla variedade de infecções, como infecções do trato urinário, pneumonias, sepse, infecções de feridas, neonatais e do trato respiratório (HAFIZ et al., 2023; DAVIN-REGLI & PAGÉS, 2015; GIRLICH et al., 2021; WUTOR et al., 2024). A presença de cepas multirresistentes está ligada a hospitalizações prolongadas, além de taxas aumentadas de morbidade e mortalidade (DAVIN-REGLI & PAGÉS, 2015; ELBEHIRY et al., 2024).

*Enterobacter cloacae* é uma causa frequente de infecções nosocomiais, cuja disseminação ocorre tanto por transmissão clonal, quando uma mesma linhagem resistente se propaga entre pacientes e ambientes hospitalares, quanto por transferência horizontal de genes, em que plasmídeos e outros elementos móveis espalham determinantes de resistência entre diferentes cepas e espécies, favorecendo surtos persistentes e de difícil controle (OSEI SEKYERE et al., 2024). Em razão de seu perfil de resistência e importância clínica, a espécie integra o grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Enterobacter* espécies), composto por

patógenos que têm a capacidade de escapar das terapias antimicrobianas convencionais e das medidas de controle de infecção (GANBOLD et al., 2023; BOUCHER et al., 2009).

Diante de sua relevância clínica e do aumento contínuo de casos associados ao complexo *E. cloacae*, torna-se imprescindível compreender os mecanismos que sustentam sua persistência e sucesso como patógeno oportunista. Entre esses fatores, destacam-se os múltiplos mecanismos de resistência antimicrobiana, que limitam as opções terapêuticas e contribuem para a dificuldade no manejo das infecções. Assim, a seguir, serão descritos os principais mecanismos de resistência presentes em *E. cloacae* e sua relação com o fracasso terapêutico observado em ambiente hospitalar.

#### 1.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

*Enterobacter cloacae* apresenta resistência frequente a múltiplas classes de antimicrobianos, incluindo  $\beta$ -lactâmicos, quinolonas, sulfonamidas e até mesmo a colistina, que constitui uma das últimas opções terapêuticas em casos graves (WEI et al., 2025; MATSUO et al., 2025; MILLER & ARIAS, 2024). Essa ampla resistência decorre de diferentes mecanismos bacterianos que frequentemente atuam em combinação, o que potencializa a dificuldade no tratamento clínico.

O mecanismo mais relevante é a produção de  $\beta$ -lactamases, enzimas capazes de hidrolisar antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e torná-los inativos (CARCIONE et al., 2021). Entre elas, destacam-se as AmpC  $\beta$ -lactamases, de origem cromossômica característica do gênero *Enterobacter*, essas  $\beta$ -lactamases conferem resistência intrínseca a penicilinas e a cefalosporinas de primeira e segunda geração (WEI et al., 2025; ETEMADI et al., 2020). Além disso, a aquisição de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBLs), como as variantes CTX-M, SHV e TEM, amplia a resistência para cefalosporinas de terceira geração e monobactâmicos, comprometendo ainda mais as opções terapêuticas (MATSUO et al., 2025; PEIRANO & PITOUT, 2019).

Outro mecanismo central é a resistência a carbapenêmicos, considerada crítica pela Organização Mundial da Saúde. Em *E. cloacae*, ela ocorre geralmente pela combinação da superexpressão de AmpC com a presença de ESBLs, associadas a alterações na membrana externa e à hiperatividade de bombas de efluxo (CAI et al., 2024; MELETIS, 2016; LIU et al., 2021). As modificações de porinas reduzem a entrada dos antibióticos na célula, enquanto as bombas de efluxo expulsam ativamente as drogas, reduzindo sua concentração intracelular

(GAUBA & RAHMAN, 2023; LORUSSO et al., 2022). Quando esses mecanismos se somam à produção de carbapenemases, como *blaKPC*, *blaNDM* e *blaOXA-48*, o resultado é um fenótipo altamente resistente, muitas vezes sem alternativas terapêuticas eficazes (MATSUO et al., 2025; GOMEZ-SIMMONDS et al., 2018; LIU et al., 2021).

Casos de resistência à colistina, frequentemente mediados por genes *mcr*, têm sido descritos em diferentes regiões, representando uma ameaça adicional, já que esse fármaco é considerado tratamento de resgate em infecções por bactérias multirresistentes (XEDZRO et al., 2023; SI et al., 2024). Em *E. cloacae*, a emergência de cepas resistentes à colistina é particularmente preocupante (YAIKHAN et al., 2025; RODRIGUES et al., 2021), pois, em combinação a outros mecanismos de resistência, limita drasticamente as opções terapêuticas disponíveis, especialmente em unidades de terapia intensiva (UTIs), onde os pacientes são mais vulneráveis e as taxas de infecção por cepas resistentes são maiores (LOGAN & WEINSTEIN, 2017; POLLY et al., 2022).

Do ponto de vista epidemiológico, após *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, o complexo *Enterobacter cloacae* (CREC) é atualmente considerado a terceira espécie mais prevalente entre as *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenêmicos, reforçando seu papel emergente como ameaça à saúde pública global (MA et al., 2023; WHO, 2017).

A ação dos antibióticos depende de sua interação com alvos celulares específicos. No entanto, as bactérias desenvolveram múltiplos mecanismos capazes de neutralizar esses efeitos. A **Tabela 1** resume as principais classes de antibióticos, seus alvos e os mecanismos de resistência mais frequentemente associados, servindo como base para compreender a relação entre ação antimicrobiana e resistência bacteriana.

**Tabela 1.** Principais mecanismos de resistência antimicrobiana em *Enterobacter cloacae*.

Classe de antibiótico	Alvo principal na bactéria	Mecanismos de resistência mais comuns	Referências
<b><math>\beta</math>-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos)</b>	Parede celular (inibição da síntese de peptidoglicano)	Produção de $\beta$ -lactamases (AmpC, ESBLs, carbapenemases), diminuição da permeabilidade da membrana externa, bombas de efluxo	CARCIONE et al., 2021
<b>Quinolonas e fluoroquinolonas (ciprofloxacino)</b>	DNA girase e topoisomerase IV	Mutações nos genes <i>gyrA</i> e <i>parC</i> , bombas de efluxo,	FÁBREGA et al., 2008

		redução da entrada do fármaco	
<b>Sulfonamidas e trimetoprima</b>	Enzimas da via do ácido fólico	Produção de enzimas alternativas, bombas de efluxo	GRIFFITH et al., 2018
<b>Polimixinas (colistina)</b>	Membrana externa (lipopolissacarídeo)	Modificação do lipídeo A mediada por genes <i>mcr</i> , alterações de permeabilidade, bombas de efluxo	GOGRY et al., 2021 MONDAL et al., 2024

#### 1.4.1 Mecanismo de ação dos principais antibióticos usados

Os antibióticos atuam inibindo processos essenciais à sobrevivência bacteriana (UDDIN et al., 2021; NEU & GOOTZ, 1996), mas *Enterobacter cloacae* desenvolveu diferentes mecanismos capazes de neutralizar essas drogas. Os  $\beta$ -lactâmicos, que incluem penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos, agem bloqueando a síntese da parede celular ao se ligarem a proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) (LIMA et al., 2020). Em resposta, *E. cloacae* produz  $\beta$ -lactamases, como as AmpC cromossômicas e as  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBLs), que hidrolisam esses antibióticos, além de carbapenemases (*blaKPC*, *blaNDM*, *blaOXA-48*) que comprometem inclusive os carbapenêmicos, tradicionalmente usados como último recurso (AL-ZAHRANI & BREK, 2025; GOMEZ-SIMMONDS et al., 2018; LIU et al., 2021).

As quinolonas e fluoroquinolonas, como ciprofloxacino e levofloxacino, atuam inibindo as enzimas DNA girase e topoisomerase IV, essenciais para a replicação do DNA bacteriano (FÁBREGA et al., 2009; BUSH et al., 2020). A resistência envolve mutações nos genes *gyrA* e *parC* (KOTB et al., 2019; FÁBREGA et al., 2008), além da hiperexpressão de bombas de efluxo, como AcrAB-TolC, que reduzem a concentração intracelular da droga (MELETIS, 2016).

As sulfonamidas e trimetoprima interferem na síntese de folato, um cofator crucial para a produção de ácidos nucleicos (GRIFFITH et al., 2018). Nesses casos, a resistência ocorre pela aquisição de genes alternativos (*sul1*, *sul2*, *dfrA*), que codificam enzimas insensíveis aos fármacos (VENKATESAN et al., 2023; HAIDER et al., 2024).

Já a colistina, um polipeptídeo catiônico, interage com os lipopolissacarídeos da membrana externa, desestabilizando sua estrutura (GOGRY et al., 2021). A resistência em *E. cloacae* é frequentemente mediada por modificações lipídicas no lipopolissacarídeo, codificadas por

genes *mcr*, que reduzem a ligação da droga à membrana (KHUNTAYAPORN et al., 2022; GUAN et al., 2022; MONDAL et al., 2024).

Esse panorama mostra que praticamente todas as principais classes de antibióticos já apresentam mecanismos de resistência descritos em *E. cloacae*. Essa versatilidade molecular explica por que o tratamento de infecções hospitalares causadas por esse patógeno é tão desafiador e reforça a necessidade de abordagens alternativas, como o desenvolvimento de vacinas capazes de prevenir a infecção antes da instalação do quadro clínico.

Ao compreender o modo de ação dos antibióticos, torna-se evidente como os mecanismos de resistência de *E. cloacae* comprometem sua eficácia e limitam as opções terapêuticas disponíveis. Essas limitações revelam lacunas importantes na abordagem atual dessas infecções e justificam a necessidade de estratégias alternativas, discutidas na subseção seguinte.

### 1.5 LACUNA NA LITERATURA E JUSTIFICATIVA

A vacinologia reversa tem se mostrado uma abordagem promissora no desenvolvimento de imunógenos contra diferentes patógenos de relevância clínica, tendo sido aplicada com sucesso no caso da *Neisseria meningitidis* do grupo B (PIZZA et al., 2000). Além disso, essa técnica já foi explorada para o desenvolvimento de candidatos a vacinas contra *Klebsiella pneumoniae* (ELFADIL et al., 2025), *Pseudomonas aeruginosa* (ZHU et al., 2025). Entretanto ainda não há vacinas licenciadas contra espécies do complexo *Enterobacter cloacae*. Esse fato é particularmente preocupante diante do aumento de infecções hospitalares causadas por cepas multirresistentes, que comprometem a eficácia dos antibióticos de última linha, incluindo carbapenêmicos e colistina (ANNAVAJHALA et al., 2019b; SI et al., 2024).

A literatura existente sobre *E. cloacae* concentra-se majoritariamente em estudos relacionados a mecanismos de resistência antimicrobiana e na busca por novas moléculas antibióticas (INTRA et al., 2023; LOGAN & WEINSTEIN, 2017; LYYTINEN et al., 2024). Embora esses esforços sejam relevantes, observa-se uma lacuna significativa no que diz respeito ao desenvolvimento de estratégias vacinais, especialmente em um momento em que a crise da resistência antimicrobiana exige alternativas terapêuticas inovadoras (TAGLIABUE & RAPPUOLI, 2018).

Nesse contexto, o presente estudo propõe a identificação de candidatos a vacinas contra *Enterobacter cloacae* por meio da vacinologia reversa, uma abordagem inovadora que integra ferramentas de bioinformática, genômica comparativa e análises imunoinformáticas para a seleção racional de antígenos. Ao priorizar proteínas conservadas, imunogênicas e não homólogas ao hospedeiro humano, essa estratégia oferece uma alternativa concreta ao modelo tradicional baseado exclusivamente em antibióticos. Assim, o trabalho contribui para o enfrentamento da resistência antimicrobiana ao fornecer um ponto de partida robusto para o desenvolvimento de imunógenos preventivos, estabelecendo bases sólidas para validações experimentais futuras quanto à eficácia, segurança e aplicabilidade clínica dos candidatos a vacinas identificados.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver, por meio de proteômica substrática, vacinologia reversa e bioinformática, um candidato a vacina multi-epitopo contra a bactéria Gram-negativa *Enterobacter cloacae*, incluindo cepas resistentes a múltiplas classes de antimicrobianos. Esse candidato deve ser capaz de apresentar propriedades imunogênicas, estabilidade estrutural e ampla cobertura populacional em análises *in silico*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

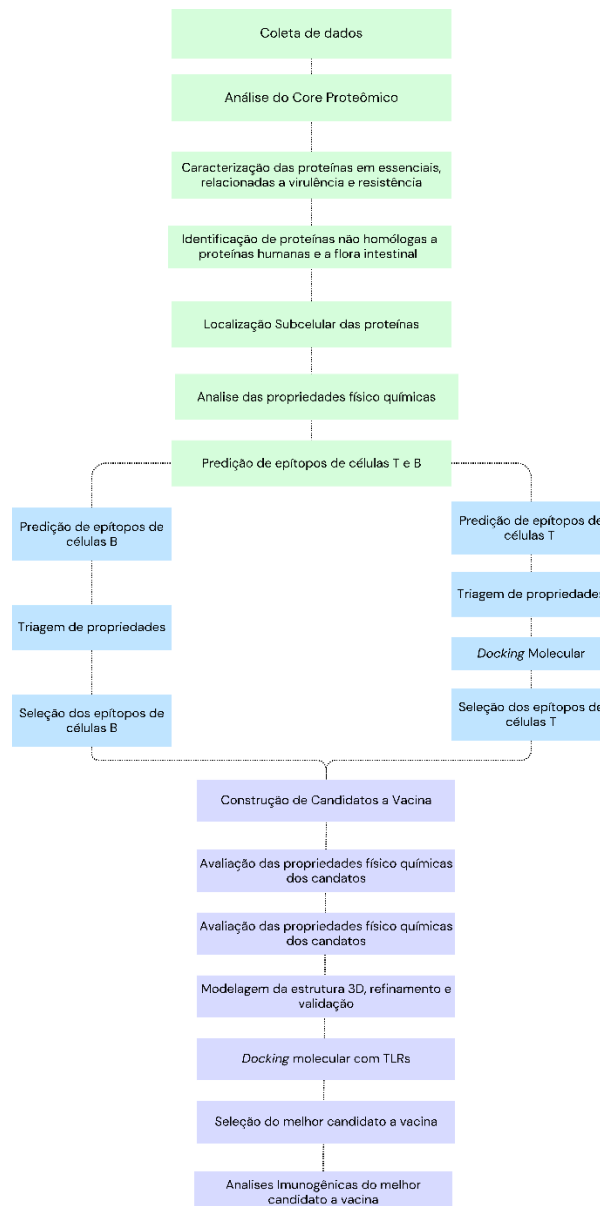
1. Realizar a análise pan-genômica de 21 genomas clínicos completos de *E. cloacae*, utilizando a ferramenta BPGA v1.3 com o intuito de identificar o proteoma central.
2. Selecionar proteínas essenciais, de virulência e de resistência a partir do *core* proteômico, por meio de comparação com bases de dados específicas (DEG, VFDB, CARD e ARG-ANNOT).
3. Excluir proteínas homólogas ao proteoma humano e ao da microbiota intestinal, a fim de evitar reatividade cruzada indesejada.
4. Predizer a localização subcelular das proteínas selecionadas, priorizando alvos que se encontram na superfície celular ou que são secretados.

5. Avaliar propriedades físico-químicas e imunológicas das proteínas candidatas, incluindo antigenicidade, toxicidade, alergenicidade, estabilidade e propriedades físico-químicas, bem como análise de domínios transmembrana e vias secretórias.
6. Selecionar epítomos de células T (MHC-I e MHC-II) e B por meio de ferramentas de bioinformática, priorizando aqueles imunogênicos, não tóxicos e não alergênicos, além de avaliar indução de IFN- $\gamma$  e propriedades de hidrofobicidade.
7. Modelar tridimensionalmente os epítomos para análises de *docking* contra moléculas HLAs, selecionando os epítomos com maior afinidade e cobertura populacional.
8. Construir diferentes candidatos de vacinas multi-epitopo (VEC1-VEC4), incorporando epítomos selecionados, adjuvantes ( $\beta$ -defensina, proteína ribossomal L7/L12, HBHA) e *linkers* apropriados (GPGPG, AAY, KK).
9. Analisar as propriedades imunológicas e físico-químicas dos candidatos a vacinas, incluindo antigenicidade, não-toxicidade, não-alergenicidade, solubilidade, estabilidade e potencial de expressão em *E. coli*.
10. Realizar modelagem tridimensional dos candidatos a vacina multiepítopo, seguida de refinamento estrutural e validação, além de análises de *docking* contra receptores do sistema imune (TLR2, TLR4, TLR9).
11. Executar simulações de dinâmica molecular com o servidor iMODS, avaliando estabilidade conformacional, B-factors, deformabilidade e *eigenvalues* das ligações entre receptores do sistema imune e o melhor candidato a vacina multiepítopo.
12. Predizer a estrutura secundária e a acessibilidade superficial do melhor candidato a vacina multiepítopo.
13. Identificar epítomos de células B descontínuos presentes no melhor candidato a vacina multiepítopo.
14. Simular *in silico* a resposta imune desencadeada pelo candidato a vacina multiepítopo mais promissor, para avaliar ativação humoral e celular.
15. Avaliar a segurança dos candidatos a vacinas, verificando ausência de similaridade com proteínas humanas.

16. Otimizar códons e realizar clonagem *in silico* do candidato mais promissor, de forma a avaliar a viabilidade de expressão heteróloga em *E. coli*.

### 3. METODOLOGIA

Este estudo empregou uma abordagem conjunta de proteômica substrativa e vacinologia reversa para identificar potenciais candidatos a vacinas contra cepas conhecidas de *Enterobacter cloacae*. Os passos para obtenção dos candidatos estão ilustrados na **Figura 2**.



**Figura 2.** Fluxograma que ilustra a metodologia utilizada para o desenvolvimento de uma vacina de múltiplos epítomos contra *E. cloacae*.

3.1 COLETA DE DADOS E IDENTIFICAÇÃO DO *CORE* PROTEÔMICO

Vinte e um proteomas completos de cepas de *E. cloacae* associadas a infecções humanas, incluindo o proteoma representativo da cepa *E. cloacae* 1382 (GCF.905331265.2), foram recuperados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Tabela 2). O Bacterial Pan Genome Analysis (BPGA) v1.3 (CHAUDHARI et al., 2016) foi utilizado para identificar famílias de proteínas conservadas. BPGA usa USEARCH como uma ferramenta padrão de agrupamento de proteínas com um corte de identidade definido como 0.6 ou 60%.

**Tabela 2.** As cepas clínicas de *Enterobacter cloacae* analisadas neste estudo.

Organismo	RefSeq Assembly	Amostra Biológica	Origem Geográfica	Ano de Isolamento
<i>Enterobacter cloacae</i> 1382*	GCF_905331265.2	SAMEA8065834	Espanha - Hospital Universitário de Bellvitge (Barcelona)	2022
<i>Enterobacter cloacae</i> FDAARGOS 1431	GCF_019047105.1	SAMN16357573	Alemanha: Braunschweig	2021
<i>Enterobacter cloacae</i> CZ862	GCF_018140965.1	SAMN18753389	República Tcheca: Praga	2021
<i>Enterobacter cloacae</i> EFN743	GCF_023920605.1	SAMN26208495	Gana	2022
<i>Enterobacter cloacae</i> PIMB10EC27	GCF_002982195.1	SAMN06448868	Vietnã	2018
<i>Enterobacter cloacae</i> isolate F	GCF_032349915.1	SAMN37529177	Canadá: Ottawa	2023
<i>Enterobacter cloacae</i> CBG15936	GCF_009707405.1	SAMN13288306	China: Guangzhou	2019
<i>Enterobacter cloacae</i> 14240244101	GCF_016864115.1	SAMN12999973	Países Baixos: Groningen	2021
<i>Enterobacter cloacae</i> 3143	GCF_024917615.1	SAMN28174020	EUA: Houston	2022
<i>Enterobacter cloacae</i> 2022CK-00409	GCF_025426135.1	SAMN29981189	EUA	2022
<i>Enterobacter cloacae</i> M12X01451	GCF_002303275.1	SAMN05831100	Desconhecida	2017
<i>Enterobacter cloacae</i> EC1_1.VN	GCF_020540925.1	SAMN22169090	África do Sul: Pretória	2021
<i>Enterobacter cloacae</i> isolate B	GCF_032352615.1	SAMN37529173	Canadá: Ottawa	2023
<i>Enterobacter cloacae</i> 99183042147	GCF_031851625.1	SAMN37298531	França: Montpellier	2023
<i>Enterobacter cloacae</i> 53EVA	GCF_033802605.1	SAMN38124868	Cingapura	2023
<i>Enterobacter cloacae</i> SD21	GCF_023238665.1	SAMN26686306	China: Shandong	2022
<i>Enterobacter cloacae</i> Ecc8276_LB-HALD	GCF_030406505.2	SAMN35795218	Senegal: DaCar	2023
<i>Enterobacter cloacae</i>	GCF_023023085.1	SAMN21379556	China	2022

12961-yvys				
<i>Enterobacter cloacae</i> Colony146	GCF_019265085.1	SAMN17833497	Tailândia	2021
<i>Enterobacter cloacae</i> Colony187	GCF_019711235.1	SAMN17833490	Tailândia: Uttaradit	2021
<i>Enterobacter cloacae</i> NH77	GCF_006228165.1	SAMN11866226	Tailândia: Chiang Mai	2019

\* Cepa referência.

### 3.2 TRIAGEM DE GENES ESSENCIAIS E FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA

As proteínas essenciais à sobrevivência da *E. cloacae* foram identificadas usando o BLASTp padrão contra o banco de dados Database of Essential Genes (DEG) (<http://tubic.tju.edu.cn/deg/>), um banco de dados frequentemente atualizado de proteínas procarióticas essenciais (LUO et al., 2014). Proteínas relacionadas à virulência celular foram identificadas por meio de um BLASTp contra o banco de dados Virulence Factor Database (VFDB) (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>), uma plataforma de análise versátil e abrangente para fatores de virulência (VFs) bacterianos (LIU et al., 2022a).

Adicionalmente, a triagem de proteínas responsáveis por fornecer resistência a antibióticos foi feita a partir do BLASTp com o banco de dados Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) (<https://card.mcmaster.ca/>) (ALCOCK et al., 2020) e Antibiotic Resistance Gene Annotation (ARG-ANNOT) (<https://www.mediterraneeinfection.com/acces-ressources/base-de-donnees/arg-annot-2/>) (GUPTA et al., 2014). Os valores de corte para todas as análises BLASTp foram: *bit-score* > 100, *e-value* ≤ 10<sup>-4</sup> e similaridade > 60%.

### 3.3 TRIAGEM DE HOMÓLOGOS DA MICROBIOTA INTESTINAL E HOMÓLOGOS HUMANOS

As proteínas essenciais, virulentas e/ou de resistência previamente identificadas foram analisadas contra um banco de dados personalizado de 79 proteomas bacterianos da microbiota intestinal usando BLASTp (NAZ et al., 2019; JADHAV et al., 2024). Essa estratégia identificou e removeu proteínas que eram homólogas àquelas na microbiota intestinal para mitigar o risco de reatividade cruzada com bactérias intestinais benéficas. Uma segunda análise BLASTp comparou as proteínas restantes contra o proteoma de referência de *Homo sapiens* (GCA.000001405.29) para excluir aquelas homólogas a proteínas humanas. Isso analisa a segurança da vacina, reduzindo a probabilidade de desencadear uma resposta autoimune.

Ambas as análises empregaram um limite de *e-value* de  $\leq 10^{-4}$  e um corte de similaridade de  $> 60\%$ .

### 3.4 PREDIÇÃO DA LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR

Dois métodos computacionais distintos foram empregados para determinar a localização subcelular das proteínas selecionadas. O primeiro, PSORTb v3.0.2 (<https://www.psorth.org/psorth/>), usa um algoritmo probabilístico para analisar a composição de aminoácidos, peptídeos sinal, hélices transmembrana e motivos associados à localização de proteínas para determinar sua localização subcelular (YU et al., 2010). O segundo programa, o servidor BUSCA (<https://busca.biocomp.unibo.it>), identifica peptídeos sinal, âncoras GPI e domínios transmembrana para identificar a localização subcelular de proteínas globulares e de membrana (SAVOJARDO et al., 2018). Os resultados foram comparados para aumentar a precisão e confiança das predições da localização subcelular dessas proteínas.

### 3.5 ANÁLISE DE ANTIGENICIDADE E PROPRIEDADES FÍSICO QUÍMICAS

Os alvos selecionados foram submetidos a uma análise de antigenicidade usando a ferramenta VaxJen v2.0 (<https://www.ddg-pharmfac.net/vaxjen/VaxJen/VaxJen.html>), uma ferramenta amplamente utilizada para prever a antigenicidade de epítomos de células T (DOYTCHINOVA & FLOWER, 2007). Para esta análise, foi implementado um *threshold* padrão de  $\geq 0,5$ . Adicionalmente, o servidor online ExPasy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) foi usado para calcular as propriedades físicoquímicas de todas as proteínas, incluindo seu peso molecular, comprimento da proteína e valor GRAVY (WILKINS et al., 2005). O valor GRAVY (Grand Average of Hydropathicity) é a soma de todos os valores de hidropatia dos aminoácidos dividida pelo comprimento da sequência proteica. Valores GRAVY negativos indicam proteínas hidrofílicas (SOLANKI et al., 2019).

### 3.6 ANÁLISE DE DOMÍNIOS TRANSMEMBRANA E VIAS SECRETORAS

A topologia de nossas proteínas transmembrana foi avaliada utilizando o servidor DeepTMHMM (<https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM>), o método mais abrangente e de maior desempenho para prever a topologia de proteínas transmembrana tanto alfa-helicoidais quanto

$\beta$ -barris (HALLGREN et al., 2022). Adicionalmente, as vias secretoras foram analisadas usando SignalP 6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>), um método de rede neural profunda baseado em servidor que prevê sequências de peptídeos de sinal (SP) e discrimina entre cinco tipos principais de SPs (TEUFEL et al., 2022).

### 3.7 TRIAGEM DE EPÍTOPOS DE CÉLULAS T E CÉLULAS B

Usamos o IEDB TepiTool (<https://tools.iedb.org/tepitool/>) (PAUL et al., 2016) e o servidor web NetCTLpan 1.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetCTLpan-1.1>) (STRANZL et al., 2010) para prever peptídeos de MHC classe I considerando um conjunto de 27 alelos distintos representando mais de 97% da população global. Essas ferramentas computacionais são amplamente empregadas na área para identificar peptídeos que reconhecem especificamente as moléculas de MHC necessárias para respostas imunes mediadas por células T (PAUL et al., 2016; STRANZL et al., 2010). O servidor NetCTLpan 1.1 emprega métodos de processamento de sequência, como clivagem pelo proteassoma, ligação a TAP e ligação a MHC-I, para identificar com precisão epítomos de linfócitos T citotóxicos (STRANZL et al., 2010). O *threshold* para o NetCTLpan 1.1 foi definido em 0,75. Consideramos apenas epítomos com nove aminoácidos, pois este é o comprimento mais comum de peptídeos de MHC classe I, variando geralmente de 8 a 11 resíduos (PAUL et al., 2016).

As previsões de epítomos MHC de classe II foram feitas pelo método recomendado pela IEDB. Foi utilizado um conjunto dos 26 alelos humanos de classe II mais frequentes dos loci DP, DQ e DR (WANG et al., 2010). As moléculas de MHC classe II normalmente se ligam a peptídeos variando de 12 a 20 aminoácidos de comprimento, com um núcleo de cerca de 9 aminoácidos sendo o mais crucial para a ligação. Tipicamente, peptídeos de 15 resíduos são usados para otimizar essas previsões (STRANZL et al., 2010).

Os epítomos lineares de células B foram previstos com os servidores IEDB e ABCpred (<https://webs.iittd.edu.in/raghava/abcpred/>) (SAHA & RAGHAVA, 2006), usando os parâmetros padrão. Os epítomos de células B exibem variabilidade estrutural, variando de 3 a 85 aminoácidos de comprimento, embora epítomos contínuos normalmente estejam dentro de uma faixa de 15 aminoácidos (SAHA & RAGHAVA, 2006; SINGH et al., 2013).

### 3.8 ANÁLISE DE IMUNOGENICIDADE, ANTIGENICIDADE, TOXICIDADE, ALERGENICIDADE, GRAVY E POTENCIAL INDUTOR DE IFN DOS EPÍTOPOS SELECIONADOS

A imunogenicidade dos epítopos de MHC-I foi avaliada usando o servidor IEDB (<https://tools.immuneepitope.org/immunogenicity/>), no qual valores mais altos e positivos indicam uma maior probabilidade de eliciar uma resposta imune (CALIS et al., 2013). A antigenicidade dos epítopos de MHC classe I, MHC classe II e de células B foi analisada usando o servidor VaxJen v2.0, aplicando um *threshold* de  $\geq 0,5$  (DOYTCHINOVA & FLOWER, 2018). As predições de toxicidade foram realizadas usando as configurações de parâmetro padrão do servidor ToxinPred (<https://www.intech.res.in/raghava/toxinpred/index.html>) (GUPTA et al., 2013). Este servidor prevê a toxicidade de diferentes peptídeos usando uma abordagem de aprendizado de máquina, especificamente máquinas de vetores de suporte (SVM), combinada com uma matriz quantitativa (GUPTA et al., 2013). Em seguida, a alergenicidade dos epítopos foi avaliada com base nas principais propriedades físicoquímicas das proteínas usando o servidor AllerTop (<https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/feedback.py>) (DIMITROV et al., 2014). Posteriormente, o servidor ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) foi utilizado para determinar os valores GRAVY dos epítopos, analisando as propriedades físicoquímicas das proteínas (WILKINS et al., 2005). Finalmente, a capacidade dos epítopos de MHC classe II de estimular a produção de IFN- $\gamma$  foi avaliada usando o servidor IFNepitope2 (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/ifnepitope2/>) (DHALL et al., 2023).

### 3.9 PREDIÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL (3D) DOS EPÍTOPOS SELECIONADOS E DOCKING MOLECULAR

Os epítopos selecionados de MHC classe I e MHC classe II foram submetidos ao servidor PEP-FOLD3 (<https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD3/>), uma ferramenta online que pode prever as estruturas tridimensionais de peptídeos variando de 5 a 50 aminoácidos de comprimento através de técnicas de montagem *de novo* (LAMIABLE et al., 2016). Experimentos de *docking* foram então conduzidos usando tanto o amplamente utilizado servidor ClusPro 2.0 (<https://cluspro.bu.edu/login.php?redir=/home.php>) (KOZAKOV et al., 2017), quanto o servidor Hawk-Dock (<https://cadd.zju.edu.cn/hawkdock/>) (WENG et al., 2019), que prevê estruturas de ligação e identifica resíduos-chave envolvidos em interações

proteína-proteína, gerando escores MM-GBSA (Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area). A função PRODIGY do servidor web HADDOCK (<https://rascal.science.uu.nl/prodigy/>) (XUE et al., 2016) refinou os complexos encaixados gerados pelo ClusPro 2.0, incluindo valores de  $\Delta G$  e Kd (M) a 37°C para produzir escores de energia de ligação. O *docking* de epítomos de MHC classe I foi realizado contra os seguintes alelos HLA: HLA-A\*01:01 (PDB: 6AT9), HLA-A\*02:01 (PDB: 3UTQ), HLA-B\*15:01 (PDB: 1XR8), HLA-B\*35:01 (PDB: 1ZSD), HLA-B\*39:01 (PDB: 4O2E), HLA-B\*53:01 (PDB: 1A1M), HLA-B\*58:01 (PDB: 5IM7), HLA-B\*44:03 (PDB: 1SYS) e HLA-A\*02:01 (PDB: 1I1Y). O *docking* de epítomos de MHC classe II foi investigado contra um painel de alelos HLA-DRB, compreendendo HLA-DRB1\*01:01 (PDB: 2FSE), HLA-DRB1\*03:01 (PDB: 1A6A), HLA-DRB1\*04:01 (PDB: 2SEB), HLA-DRB1\*15:01 (PDB: 1BX2), HLA-DRB3\*01:01 (PDB: 2Q6W), HLA-DRB3\*02:02 (PDB: 3C5J) e HLA-DRB5\*01:01 (PDB: 1H15). Esses alelos foram selecionados por sua alta prevalência global e extensa cobertura de supertipos HLA, e os epítomos foram filtrados por sua capacidade de se ligar a múltiplas moléculas HLA. Os epítomos com a maior energia de ligação média e valores MM-GBSA foram então selecionados para a construção da vacina.

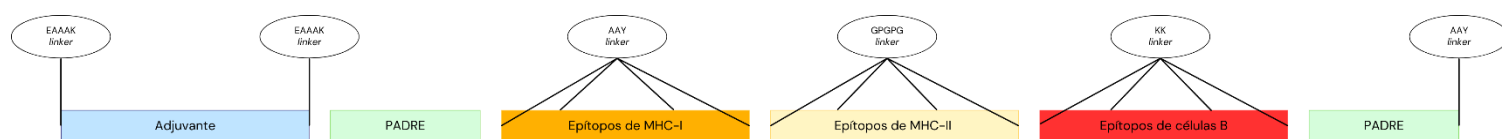
### 3.10 ANÁLISE DE COBERTURA POPULACIONAL

A ferramenta de análise de cobertura populacional do IEDB (<https://tools.iedb.org/population/>) (BUI et al., 2006) foi usada para calcular a cobertura populacional de todos os nossos epítomos de MHC-I e MHC-II com base nas frequências genótípicas de HLA obtidas do *Allele Frequency Database*. Os genótipos cobriram 16 áreas geográficas diferentes, abrangendo 115 países e 20 etnias, para garantir uma cobertura extensa pela vacina.

### 3.11 CONSTRUÇÃO DA VACINA

A construção da vacina envolveu a ligação de epítomos CTL (epítomos MHC-I), HTL (epítomos MHC-II) e BCL (epítomos de células B) usando três *linkers* especializados: AAY, GPGPG e KK. *Linkers* AAY conectaram a sequência Universal Pan HLA DR (PADRE – AKFVAAWTLKAAA) aos epítomos CTL, bem como entre os próprios epítomos CTL. Enquanto isso, *linkers* GPGPG foram usados para ligar os epítomos CTL aos epítomos HTL, além dos epítomos HTL entre si. Finalmente, *linkers* KK foram empregados para conectar os

epítomos HTL aos epítomos BCL e os epítomos BCL a outros epítomos BCL. As sequências adjuvantes, a proteína HBHA e sua sequência conservada HBHA, a proteína ribossomal 50S L7/L12 e a flagelina FliC, foram unidas usando *linkers* EAAAK nas extremidades N e C. Adicionalmente, *linkers* EAAAK foram utilizados para conectar a sequência PADRE a quatro sequências adjuvantes diferentes: a proteína HBHA e a sequência conservada HBHA (SARKAR & ULLAH, 2020), a proteína ribossomal 50S L7/L12 (LEE et al., 2014) ou a flagelina FliC (NEMPONT et al., 2008; KNUDSEN et al., 2013). Esses adjuvantes aumentam o potencial da vacina de estimular vias imunes específicas e proporcionar uma resposta imune mais robusta e direcionada. O esquema de todas as construções de vacinas é mostrado na



**Figura 3.**

**Figura 3.** Ilustração esquemática e arquitetura da sequência das construções de vacina de múltiplos epítomos. Componentes principais: adjuvantes, sequências imunoestimuladoras e epítomos de linfócitos T citotóxicos, linfócitos T auxiliares e linfócitos B.

### 3.12 PREDIÇÃO DA ANTIGENICIDADE, ALERGENICIDADE, SOLUBILIDADE E PROPRIEDADES FÍSICO QUÍMICAS DOS CANDIDATOS À VACINA

A antigenicidade dos candidatos à vacina foi avaliada usando o VaxiJen v2.0 (DOYTCHINOVA & FLOWER, 20107), enquanto o servidor AllerTOP (<https://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/>) (DIMITROV et al., 2014) foi usado para avaliar o potencial alergênico de todas as construções de vacinas. A solubilidade das construções vacinais foi estimada usando o SOLpro do Scratch Protein Predictor (<https://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>) (MAGNAN et al., 2009) empregando uma arquitetura SVM de dois estágios baseada em múltiplas representações da sequência primária. Sua precisão excede 74% quando validações cruzadas de dez vezes são usadas.

As propriedades físicoquímicas de todos os candidatos à vacina foram analisadas usando o servidor ExPASy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) (WILKINS et al., 2005). Esta

ferramenta forneceu informações sobre o número de aminoácidos, peso molecular, ponto isoelétrico teórico, índice de instabilidade, índice alifático e valores GRAVY.

### 3.13 PREDIÇÃO DA ESTRUTURA TERCIÁRIA, REFINAMENTO E VALIDAÇÃO DOS CANDIDATOS A VACINA

As estruturas 3D das construções de vacinas foram geradas usando o servidor I-TASSER (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>) (ROY et al., 2010), uma plataforma líder em predição de estrutura 3D de proteínas baseada em experimentos de Avaliação Crítica de técnicas de Predição de Estrutura (CASP)(BIBI et al., 2021). As estruturas 3D foram então refinadas usando o servidor web Galaxy Refine (<https://galaxy.seoklab.org/refine>) (HEO et al., 2013), que é projetado para melhorar tanto a qualidade global quanto local das estruturas proteicas.

A qualidade das estruturas das vacinas refinadas e não, foi avaliada usando várias ferramentas. O SAVES v6.1 (<https://saves.mbi.ucla.edu/>) avaliou a qualidade estrutural dos modelos proteicos. A ferramenta PROCHECK avaliou a qualidade estereoquímica das estruturas proteicas, com gráficos de Ramachandran criados para cada estrutura (LASKOWSKI et al., 1997). O servidor ERRAT forneceu um fator de qualidade geral para os constructos, analisando a força prevista das interações não ligadas entre diferentes tipos de átomos (COLOVOS & YEATES, 1993). Finalmente, o servidor web ProSA (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) determinou os escores-z dos modelos vacinais refinados, comparando-os com os escores-z determinados experimentalmente de proteínas nativas (WIEDERSTEIN & SIPPL, 2007).

### 3.14 DOCKING PROTEÍNA-PROTEÍNA

Os candidatos à vacina selecionados foram encaixados (*docking*) contra os complexos TLR4-MD2 (PDB:3FXI), TLR5 (PDB: 3J0A) e TLR1-TLR2 (PDB: 2Z7X) usando os servidores ClusPro 2.0 (KOZAKOV et al., 2017) e HDock (<https://hdock.phys.hust.edu.cn/>) (YAN et al., 2017). Esses receptores imunes inatos são cruciais no reconhecimento de uma variedade de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), incluindo aqueles presentes em vacinas e adjuvantes. Eles desempenham um papel vital no desencadeamento de respostas imunes eficazes e na garantia de imunidade induzida por vacina bem-sucedida.

Para identificar os resíduos de aminoácidos envolvidos em contatos polares e conflitos eletrostáticos dentro dos complexos VEC-TLRs, cruciais para a estabilidade da interação proteína-proteína, usamos o PyMol (<https://pymol.org/>) (RIGSBY & PARKER, 2016), um software amplamente utilizado para visualizar e analisar estruturas moleculares em 3D com um limite de 3,6 Å.

### 3.15 SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR

Os complexos encaixados de TLR1-TLR2, TLR4 e TLR5 com a vacina foram analisados por meio de simulações de dinâmica molecular usando o servidor online IMODS (<https://imods.chaconiah.org/>) com seus parâmetros padrão (LÓPEZ-BLANCO et al., 2014). A análise IMODS fornece *insights*-chave sobre a dinâmica estrutural do complexo, prevendo os movimentos coletivos de proteínas usando análise de modo normal (NMA) em coordenadas internas (LÓPEZ-BLANCO et al., 2014; LÓPEZ-BLANCO et al., 2011). Esta ferramenta calcula a deformabilidade, autovalores, variância, mapa de covariância, fator B e rede elástica do complexo vacina-receptor (LÓPEZ-BLANCO et al., 2011).

### 3.16 PREDIÇÃO DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA E ACESSIBILIDADE SUPERFICIAL

A estrutura secundária, bem como a acessibilidade ao solvente, do melhor candidato a vacina foram analisadas usando o servidor NetSurfP-3.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetSurfP-3.0/>) (HØIE et al., 2022). A rede neural NetChop 3.1 foi usada para analisar a clivagem de peptídeos em epítomos de MHC classe-I (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetChop-3.1/>) (KESMIR et al., 2002; NIELSEN et al., 2005). Além disso, o servidor ProsperousPlus foi utilizado para prever a atividade peptidase específica de catepsina, validando ainda mais o processamento desses epítomos para apresentação pelo MHC (<https://prosperous.erc.monash.edu/>) (SONG et al., 2018). Prever sítios de clivagem proteassomal é crucial para identificar potenciais epítomos de células T, bem como para produzir peptídeos C-terminais corretamente clivados que podem desencadear respostas imunes robustas.

### 3.17 EPÍTOPOS DESCONTÍNUOS DE CÉLULAS B

O melhor candidato de vacina selecionado foi avaliado usando o servidor ElliPro (<https://tools.iedb.org/ellipro/>) (PONOMARENKO et al., 2008) para identificar e representar regiões potenciais de ligação a anticorpos dentro da sequência ou estrutura proteica fornecida. A análise de epítomos conformacionais de células B foi conduzida com um limiar de escore mínimo de 0,70, mantendo a configuração de distância máxima padrão.

### 3.18 SIMULAÇÃO DA RESPOSTA DO SISTEMA IMUNE AO CANDIDATO A VACINA MAIS PROMISSOR

O servidor C-ImmSim foi usado para modelar a resposta do sistema imune à vacina (<https://150.146.2.1/C-IMMSIM/index.php?page=1>) (RAPIN et al., 2010). Ele emprega uma abordagem de matriz de pontuação posicional para a predição de epítomos imunes e aplica metodologias de aprendizado de máquina para modelar interações imunes em três regiões anatômicas dentro de sistemas biológicos mamíferos (SANCHES et al., 2021). Os tratamentos vacinais utilizaram os parâmetros padrão (Volume de Simulação: 10), com três injeções de vacina administradas em intervalos de 30 dias. Os passos de tempo para essas três injeções foram definidos em 1, 90 e 180 dias, com o total de passos de simulação definido em 600 (QAMAR et al., 2020).

### 3.19 ANÁLISE DE SEGURANÇA DA VACINA

A similaridade de sequência entre o candidato a vacina e as proteínas do hospedeiro pode potencialmente resultar em reatividade cruzada e autoimunidade (MAHAPATRA et al., 2021). Portanto, para garantir a segurança imunológica da vacina, a sequência foi submetida à análise de BLASTP contra o proteoma de *Homo sapiens* (GCA\_000001405.29).

### 3.20 ADAPATAÇÃO DE CÓDONS E CLONAGEM *IN SILICO*

O servidor web Benchling (<https://www.benchling.com/>) foi empregado para realizar a tradução reversa da sequência. O viés de uso de códons e o conteúdo de GC de *E. coli* (K12) foram considerados para otimizar a sequência, garantindo que o conteúdo de GC caísse dentro

da faixa ideal de 30–70% (ALI et al., 2017). Além disso, o índice de adaptação de códons (CAI) foi calculado usando o servidor web CAI calculator (<https://ppuigbo.me/programs/CAIcal/>) (PUIGBÒ et al., 2008) e teve como objetivo ser maior que 0,8, que é considerado ideal para alcançar altos níveis de expressão proteica (MORLA et al., 2016).

O candidato a vacina otimizado foi então projetado usando o vetor pET-28a (+), incorporando sítios de restrição XhoI e NdeI nas extremidades C e N, respectivamente. A construção foi clonada *in-frame* com a His-tag do plasmídeo e os sítios de clivagem de trombina. Além disso, a clonagem *in silico* foi conduzida utilizando o servidor web Benchling (<https://www.benchling.com/>).

## 4.RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISE PROTEÔMICA DAS PROTEÍNAS DO CORE DE *E. CLOACAE*

A análise de pan-genoma realizada com o BPGA versão 1.3 identificou 2.593 sequências proteicas não parálogas a partir dos proteomas completos de 21 amostras de *Enterobacter cloacae* associadas a infecções humanas, incluindo o proteoma de referência da cepa *E. cloacae* (**Tabela 2 e Tabela 3**).

A Database of Essential Genes (DEG) revelou que 1.287 dessas 2.593 proteínas do núcleo não parálogas foram classificadas como essenciais. Adicionalmente, 172 proteínas foram identificadas como possíveis fatores de virulência utilizando a Virulence Factor Database (VFDB), e 61 mostraram associação com resistência antibiótica de acordo com as Comprehensive Antibiotic Resistance Database e Antibiotic Resistance Gene-ANNOTation Database.

No total, foram identificadas 1.352 proteínas não redundantes relacionadas à essencialidade, resistência e/ou virulência. Essas proteínas foram subsequentemente triadas contra um banco de 79 proteomas da microbiota intestinal, resultando na identificação de 40 proteínas sem similaridade significativa com a microbiota intestinal. Uma triagem adicional contra o proteoma de referência de *Homo sapiens* mostrou que 39 dessas proteínas também não possuíam homólogos humanos. Desse conjunto final, apenas 12 das 39 proteínas foram localizadas no espaço extracelular ou na membrana externa e selecionadas para análises subsequentes (**Tabela 3**).

**Tabela 3.** Análises proteômicas substrativas das proteínas da *Enterobacter cloacae*.

N°	Proteínas	<i>Enterobacter cloacae</i> (N° de Proteínas)
1	Proteoma total da cepa referência <i>E. cloacae</i>	4.664
2	Proteínas não paralógicas e integrantes do proteoma <i>core</i>	2.593
3	Proteínas essenciais determinadas através da análise BLASTp em relação à base de dados DEG ( <i>evaluate</i> $\leq 10^{-4}$ , <i>bitscore</i> >100, ppos >60%)	1.287
4	Fatores de resistência determinados através da análise BLASTp em relação à base de dados CARD e ARG-ANNOT ( <i>evaluate</i> $\leq 10^{-4}$ , <i>bitscore</i> >100, ppos >60%)	61
5	Fatores de virulência determinados através da análise BLASTp em relação à base de dados VFDB ( <i>evaluate</i> $\leq 10^{-4}$ , <i>bitscore</i> >100, ppos >60%)	172
6	Proteínas não redundantes associadas à essencialidade, resistência ou virulência	1.352
7	Proteínas não homólogas a flora intestinal (BLASTp, <i>evaluate</i> $\leq 10^{-4}$ , ppos >60%)	40
8	Proteínas não homólogas a humanos e não homólogas a flora intestinal (BLASTp, <i>evaluate</i> $\leq 10^{-4}$ , ppos >60%)	39
9	Proteínas citoplasmáticas ou da membrana plasmática identificadas usando os servidores PSORTb e BUSCA	27
10	Proteínas extracelulares ou da membrana externa identificadas usando os servidores PSORTb e BUSCA	12
11	Proteínas expostas à superfície que exibem propriedades antigênicas, conforme determinado pelo VaxiJen v2.0	9
	<b>Proteínas selecionadas para triagem de epítomos</b>	<b>9</b>

#### 4.2 ANÁLISE DE REGIÕES TRANSMEMBRANA, PEPTÍDEOS SINAL, PROPRIEDADES FÍSICO QUÍMICAS E ANTIGENICIDADE

A análise das 12 proteínas de superfície expostas pelo SignalP 6.0 revelou que 9 proteínas continham peptídeos sinal secretórios, transportados pelo translocon Sec e clivados pela Signal Peptidase I. As 3 proteínas restantes continham peptídeos sinal de lipoproteína, também transportados pelo translocon Sec, mas clivados pela Signal Peptidase II (Sec/SPII). É importante destacar que nenhuma das proteínas analisadas apresentou hélices transmembrana. Além disso, todas as 12 proteínas exibiram um valor negativo de Grand Average of Hydropathicity (GRAVY), indicando solubilidade e adequação para o desenvolvimento vacinal, conforme determinado pela ferramenta VaxiJen v2.0.

A avaliação de antigenicidade e localização identificou que 2 das 12 proteínas eram proteínas de membrana externa: a proteína de membrana externa de resistência a múltiplas drogas MdtQ e a porina específica para oligogalacturonato KdgM. Outras 7 proteínas foram classificadas como proteínas extracelulares com perfis antigênicos notáveis, incluindo a subunidade principal de Curli CsgA, a proteína putativa de montagem fimbrial SfmF, a proteína de montagem/transporte de Curli CsgF, a adesina FimH específica para D-manose da fímbria tipo 1, a subunidade menor de Curli CsgB, a proteína de choque térmico HslJ e a chaperona de

montagem de Curli CsgC. Essas nove proteínas foram subsequentemente avaliadas quanto à presença de epítomos úteis para a construção da vacina. As propriedades físico-químicas e antigênicas detalhadas dessas proteínas são apresentadas na **Tabela 4**.

**Tabela 4.** Caracterização das proteínas candidatas a construção da vacina: localização subcelular, função, propriedades físico-químicas, antigenicidade, GRAVY, hélices transmembranas e peptídeo sinalizador.

RefSeq ID <sup>(1)</sup>	Nome da proteína <sup>(2)</sup>	Função <sup>(3)</sup>	Localização <sup>(4)</sup>	Score de antigenicidade <sup>(5)</sup>	Hidrofobicidade (GRAVY) <sup>(6)</sup>	Comprimento (aa) <sup>(7)</sup>	Peso molecular kDa <sup>(8)</sup>	Hélices TM <sup>(9)</sup>	Sinal P <sup>(10)</sup>
WP_023620194.1	*Subunidade principal Curli CsgA [ <i>Enterobacter</i> ]	Curlin forma fímbrias Curli, estruturas superficiais enroladas que se montam melhor abaixo de 37 °C e se ligam à fibronectina.	Extracelular	1,0214	-0,318	153	15,37	TMHs: 0	Peptídeo sinalizador (Sec/SPI)
WP_013095935.1	* Proteína de montagem fimbrial putativa SfmF [ <i>Enterobacter</i> ]	Pode contribuir para a adesão a várias superfícies em nichos ambientais específicos.	Extracelular	0,7398	-0,152	174	18,28	TMHs: 0	Peptídeo sinalizador (Sec/SPI)
WP_013097173.1	*Proteína de montagem/transporte da produção de curli CsgF [ <i>Enterobacter</i> ]	Pode estar envolvida na biogênese das organelas curli.	Extracelular	0,5523	-0,315	137	14,98	TMHs: 0	Peptídeo sinalizador (Sec/SPI)
WP_013095931.1	Subunidade da proteína fimbrial tipo 1 FimI [ <i>Enterobacter</i> ]	As fímbrias (pili) são filamentos bacterianos de 0,5-1,5 µm (100-300/célula) que medeiam a colonização dos órgãos do hospedeiro.	Extracelular	0,4642	0,125	181	19,64	TMHs: 0	Peptídeo sinalizador (Sec/SPI)
WP_028027948.1	Proteína de montagem/transporte da produção de curli CsgG [ <i>Enterobacter</i> ]	Pode estar envolvida na biogênese das organelas curli.	Extracelular	0,3337	-0,018	277	30,37	TMHs: 0	Peptídeo sinalizador de lipoproteína (Sec/SPII)
WP_182059907.1	*Adesina específica para D-manose da fimbria tipo 1 FimH [ <i>Enterobacter sp.</i> RHBSTW-00175]	Uma subunidade fimbrial menor necessária para a ligação específica S, permitindo que a <i>E. coli</i> patogénica se ligue às glicoproteínas $\alpha$ -sialil(2-3) $\beta$ -Gal durante infecções do trato urinário e meningite.	Extracelular	0,6488	-0,161	355	36,35	TMHs: 0	Peptídeo sinalizador (Sec/SPI)
WP_182060423.1	*Subunidade menor curli CsgB [ <i>Enterobacter sp.</i> RHBSTW-00175]	A curlina forma fímbrias curli que se agrupam abaixo de 37 °C, ligam-se à fibronectina e, quando coexpressas com celulose, criam uma matriz hidrofóbica que confere coesão e propriedades semelhantes às dos tecidos às colónias bacterianas (PubMed:24097954).	Extracelular	0,6595	-0,223	151	16,05	TMHs: 0	Peptídeo sinalizador (Sec/SPI)
WP_315685900.1	*Proteína de choque térmico HslJ [ <i>Enterobacter cloacae</i> ]	Funciona principalmente como uma proteína-chave de resposta ao stress.	Extracelular	0,675	-0,175	146	15,80	TMHs: 0	Peptídeo sinalizador de lipoproteína (Sec/SPII)

WP_166716973.1	*Chaperona de montagem Curli CsgC [ <i>Enterobacter</i> não classificada]	Mediadora da montagem de CsgA em fibras Tafi extracelularmente (via via ENP) e potencialmente intracelularmente, com possível envolvimento de CsgF.	Extracelular	0,7714	-0,052	110	11,79	TMHs: 0	Peptídeo sinalizador (Sec/SPI)
WP_013097172.1	Proteína de montagem/transporte da produção de curli CsgE [ <i>Enterobacter cloacae</i> ]	Pode estar envolvida na biogênese das organelas curli.	Extracelular	0,3228	-0,064	129	14,40	TMHs: 0	Peptídeo sinalizador (Sec/SPI)
WP_226834852.1	*Proteína da membrana externa multirresistente MdtQ [ <i>Enterobacter cloacae</i> ]	Pode estar envolvida na resistência à puromicina, acriflavina e cloreto de tetrafenilarsênio. Porina específica para oligogalacturônidos.	Membrana externa	0,5923	-0,158	472	50,99	TMHs: 0	Peptídeo sinalizador de lipoproteína (Sec/SPII)
WP_020687115.1	*Proteína da família KdgM porina específica para oligogalacturonato [ <i>Enterobacter</i> ]	Também necessária para a virulência total. Membrana externa	Membrana externa	0,8742	-0,685	227	25,90	TMHs: 0	Peptídeo sinalizador (Sec/SPI)

Todos os dados foram analisados utilizando vários servidores: 1, 2 = NCBI; 3 = UNIPROT; 4 = BUSCA e PsortB; 5, 6, 7, 8 = ProtParam; 9 = Servidor TMMHMM; 10 = SignalP 6.0. \* Proteínas selecionadas para análise de epítomos.

### 4.3 PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS DE MHC CLASSE I

A análise das proteínas selecionadas usando Tepitool e NetCTLpan 1.1 identificou 144 epítomos potenciais de 9 resíduos para células T (MHC classe I), dos quais 70 foram sugeridos como imunogênicos pelo IEDB. Uma análise mais aprofundada revelou que 42 dos 70 epítomos eram antigênicos, conforme determinado pelo servidor VaxiJen v2.0 usando um limiar de  $\geq 0,5$ . Importaneamente, nenhum desses epítomos antigênicos foi considerado tóxico pela avaliação do servidor ToxinPred, garantindo sua segurança para inclusão em constructos. Adicionalmente, seus valores GRAVY foram calculados usando o servidor ProtParam para avaliar a natureza hidrofílica dos epítomos. Entre os 42 epítomos antigênicos, 20 exibiram valores GRAVY negativos, indicando hidrofílicidade e potencial solubilidade em condições fisiológicas.

Refinamos ainda mais esses 20 epítomos hidrofílicos analisando sua alergenicidade com o servidor AllerTop. Isso identificou 12 epítomos não alergênicos, que foram considerados ideais por atenderem a todos os critérios de imunogenicidade, antigenicidade, não toxicidade, não alergenicidade e valores GRAVY negativos (**Tabela 5**). Consequentemente, esses 12 epítomos prosseguiram para a análise de *docking* molecular para explorar suas interações com moléculas de MHC.

**Tabela 5.** Caracterização *in silico* de epítomos MHC-I para a construção de vacinas: imunogenicidade, antigenicidade, toxicidade, GRAVY e alergenicidade.

Proteína-alvo	Comprimento (aa) <sup>(1)</sup>	Sequência do epítopo <sup>(2)</sup>	Cobertura de alelo HLA <sup>(3)</sup>	Escore de imunogenicidade <sup>(4)</sup>	Escore de antigenicidade de <sup>(5)</sup>	Toxicidade <sup>(6)</sup>	Hidrofobicidade e (GRAVY) <sup>(7)</sup>	Potencial alergénico <sup>(8)</sup>
Subunidade menor Curli CsgB	9	GSDLANTEY	HLA-A*01:01 HLA-A*30:02	0,12	0,58	Não tóxico	-0,9	Não alergénico
Proteína SfmF, supostamente responsável pela montagem das fímbrias	9	NPRPGRADA	HLA-B*07:02	0,13	1,91	Não tóxico	-1,78	Não alergénico
Proteína de choque térmico HsIJ	9	KLAEGELKV	HLA-A*02:03 HLA-A*02:01 HLA-A*02:06 HLA-A*32:01	0,11	1,28	Não tóxico	-0,18	Não alergénico
	9	QLQNHFIL	HLA-B*08:01	0,21	0,52	Não tóxico	-0,37	Não alergénico
	9	ELLARRPDL	HLA-B*08:01	0,14	1,22	Não tóxico	-0,49	Não alergénico
Proteína MdtQ da membrana externa resistente a múltiplas drogas	9	SMSEVDAAR	HLA-A*33:01 HLA-A*68:01 HLA-A*31:01	0,16	0,6	Não tóxico	-0,38	Não alergénico
	9	SVARLYWDW	HLA-B*57:01 HLA-A*32:01 HLA-B*58:01 HLA-B*53:01	0,25	1,56	Não tóxico	-0,23	Não alergénico
	9	ESNDSRTIY	HLA-A*26:01 HLA-A*01:01 HLA-B*35:01 HLA-A*30:02 HLA-B*15:01 HLA-B*53:01	0,02	1,34	Não tóxico	-1,57	Não alergénico
Proteína da família KdgM, porina específica para oligogalacturonato	9	HEDQISWRW	HLA-B*44:02 HLA-B*44:03 HLA-B*53:01 HLA-B*58:01 HLA-B*40:01 HLA-B*57:01	0,08	2,24	Não tóxico	-1,81	Não alergénico
	9	VAARYRYEY	HLA-A*30:02 HLA-B*35:01 HLA-B*58:01 HLA-B*57:01 HLA-A*01:01 HLA-A*32:01 HLA-B*15:01 HLA-B*53:01	0,17	1,19	Não tóxico	-0,96	Não alergénico
	9	DSKLVFRLR	HLA-A*33:01 HLA-A*68:01 HLA-A*31:01	0,11	1,17	Não tóxico	-0,29	Não alergénico
Fímbria tipo 1, adesina específica para D-manose FimH	9	ITTEIDSYK	HLA-A*11:01 HLA-A*68:01 HLA-A*03:01	0,12	0,84	Não tóxico	-0,6	Não alergénico

Todos os dados foram analisados utilizando vários servidores: 1 = ProtParam; 2, 3 = Tepitool e NetCTLpan1.1; 4 = IEDB server; 5 = VaxiJen v2.0; 6 = ToxinPred; 7 = ProtParam; 8 = AllerTop.

#### 4.4 PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS DE MHC CLASSE II

A análise de epítomos de MHC classe II a partir das 9 proteínas (**Tabela 4**) identificou 319 epítomos de 15 resíduos com alta afinidade usando o servidor Tepitool. Desses epítomos identificados, 170 foram determinados como antigénicos usando o servidor VaxiJen v2.0 com um limiar de  $\geq 0,5$ . Destes, 135 apresentaram valores GRAVY negativos com o servidor ProtParam, sendo, portanto, adequados para nossos propósitos. A subsequente avaliação de

toxicidade usando o servidor ToxinPred revelou que 131 desses epítomos hidrofílicos eram não tóxicos, confirmando sua segurança para análise posterior.

A alergenicidade dos 131 epítomos não tóxicos foi novamente avaliada usando o servidor AllerTop, com 47 epítomos identificados como não alergênicos, satisfazendo assim critérios cruciais de segurança e compatibilidade. Esses 47 epítomos foram então analisados quanto à sua capacidade de induzir interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), uma citocina chave para a modulação de respostas imunes. Usando o servidor IFNepitope2, 9 epítomos apresentaram um perfil indutor de IFN- $\gamma$  (**Tabela 6**). Esses 9 epítomos foram selecionados para análises avançadas de *docking* molecular para avaliar suas interações potenciais com moléculas de MHC classe II.

**Tabela 6.** Caracterização *in silico* de epítomos MHC-II para o desenvolvimento de vacinas: antigenicidade, GRAVY, toxicidade, alergenicidade e indução de IFN- $\gamma$ .

Proteína-alvo	Comprimento (aa) <sup>(1)</sup>	Sequência do epítopo <sup>(2)</sup>	Cobertura de alelo HLA <sup>(3)</sup>	Escore de antigenicidade <sup>(4)</sup>	Hidrofobicidade (GRAVY) <sup>(5)</sup>	Toxicidade <sup>(6)</sup>	Potencial alergênico <sup>(7)</sup>	Potencial de indução de IFN- $\gamma$ <sup>(8)</sup>
Chaperona de montagem Curli CsgC	15	LSSQITFKTSQQGNM	HLA-DQA1*04:01/DQB1*04:02	0,83	-0,61	Não tóxico	Não alergênico	Positivo
	15	SSQITFKTSQQGNMT	HLA-DRB1*08:02	0,95	-0,91	Não tóxico	Não alergênico	Positivo
Subunidade menor Curli CsgB	15	SQGGYGNTAKIIQQG	HLA-DRB1*11:01	0,84	-0,77	Não tóxico	Não alergênico	Positivo
Proteína de montagem/transporte da produção Curli CsgF	15	AFMLNEAQAQNSYKD	HLA-DQA1*01:02/DQB1*06:02	0,61	-0,87	Não tóxico	Não alergênico	Positivo
	15	NEAQAQNSYKDPSFK	HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01	1,06	-1,79	Não tóxico	Não alergênico	Positivo
Proteína de choque térmico HslJ	15	QLQLNVTDRKTGKTS	HLA-DRB1*11:01	1,84	-1,19	Não tóxico	Não alergênico	Positivo
	15	AQSDISLTKNMTVSG	HLA-DRB1*07:01	0,83	-0,16	Não tóxico	Não alergênico	Positivo
Porina específica para oligogalacturonato Proteína da família KdgM	15	KLAYKWDKNWAPYV E	HLA-DRB3*02:02	0,53	-1,11	Não tóxico	Não alergênico	Positivo
Fimbria tipo 1 Adesina específica para D-manose FimH	15	QVGIRAWPVSITGNK	HLA-DQA1*01:01/DQB1*05:01	1,15	-0,07	Não tóxico	Não alergênico	Positivo
			HLA-DRB1*15:01					

Todos os dados foram analisados utilizando vários servidores: 1 = ProtParam; 2, 3 = Tepitool; 4 = VaxiJen v2.0; 5 = ProtParam; 6 = ToxinPred; 7 = AllerTop; 8 = IFNepitope2.

#### 4.5 MODELAGEM DE PEPTÍDEOS E ANÁLISE DE *DOCKING* MOLECULAR

A análise de *docking* molecular foi utilizada para identificar epítomos com alta promiscuidade de ligação a múltiplos alelos HLA, garantindo ampla cobertura populacional. As estruturas previstas foram submetidas a *docking* com 9 alelos de MHC classe I e 7 alelos de MHC classe II usando os servidores ClusPro 2.0 e Hawkdock para avaliar as interações de ligação. Os epítomos com os menores valores de MM/GBSA (-44,81 para MHC-I e -46,37 para MHC-II) e

de energia de ligação (-11,89 para MHC-I e -13,65 para MHC-II), indicando as interações de ligação mais fortes, foram selecionados para a formulação dos candidatos a vacinas (**Tabela 7** e **Tabela 8**).

**Tabela 7.** Análise de *docking* molecular das interações entre o epítipo MHC-I e o HLA: energia de ligação e compatibilidade estrutural.

Epítipos/Alelos	HLA-A0101 (PDB: 6AT9)		HLA-A0201 (PDB: 3UTQ)		HLA-B1501 (PDB: 1XR8)		HLA-B3501 (PDB: 1ZSD)		HLA-B3901 (PDB: 4O2E)		HLA-B5301 (PDB: 1A1M)		HLA-B5801 (PDB: 5IM7)		HLA-B4403 (PDB: 1SYS)		HLA-A2.1 (PDB: 1HY)		Média	
	MM/GBSA	Energia de ligação kcal/mol	MM/GBSA	Energia de ligação kcal/mol	MM/GBSA	Energia de ligação kcal/mol	MM/GBSA	Energia de ligação kcal/mol	MM/GBSA	Energia de ligação kcal/mol	MM/GBSA	Energia de ligação kcal/mol	MM/GBSA	Energia de ligação kcal/mol	MM/GBSA	Energia de ligação kcal/mol	MM/GBSA	Energia de ligação kcal/mol	MM/GBSA	Energia de ligação kcal/mol
*DSKLVFRLR	-45,81	-11,00	-39,91	-11,80	-49,78	-9,60	-41,32	-10,70	-46,70	-11,80	-31,34	-10,60	-51,54	-11,40	-53,49	-12,90	-43,36	-11,20	-44,81	-11,22
ELLARRPDL	-26,29	-10,70	-25,85	-11,10	-37,04	-8,60	-30,36	-9,60	-22,95	-12,00	-25,31	-10,30	-31,75	-10,80	-26,45	-11,60	-41,85	-10,40	-29,76	-10,57
*ESNDRRTIY	-40,00	-11,70	-36,87	-11,80	-30,15	-10,90	-25,08	-10,80	-33,62	-11,80	-38,09	-10,50	-31,02	-11,70	-40,97	-12,40	-34,16	-11,20	-34,44	-11,42
*GSDLANTY	-31,64	-8,10	-42,45	-9,90	-28,09	-7,60	-50,15	-7,70	-24,41	-10,40	-48,11	-7,70	-34,57	-9,70	-23,50	-11,50	-20,90	-9,80	-33,76	-9,16
*HEDQISWRW	-37,50	-11,70	-44,20	-11,90	-36,17	-9,40	-31,07	-10,30	-28,18	-13,30	-26,85	-12,10	-31,48	-10,70	-39,98	-11,40	-30,96	-9,00	-34,04	-11,09
ITTEIDSYK	-22,70	-9,90	-15,16	-9,00	-25,66	-10,90	-28,73	-9,90	-26,45	-12,30	-22,85	-10,30	-25,69	-9,60	-32,18	-10,50	-24,22	-9,00	-24,85	-10,16
KLAEGELKV	-23,38	-9,60	-34,16	-9,10	-20,18	-10,90	-45,33	-9,10	-23,21	-10,10	-39,06	-10,70	-32,15	-9,80	-22,96	-10,70	-27,58	-9,40	-29,78	-9,93
*NPRPGRADA	-33,84	-10,40	-30,81	-12,00	-33,75	-9,90	-34,83	-10,30	-35,69	-10,40	-41,44	-10,50	-39,14	-11,20	-43,20	-11,80	-36,00	-9,50	-36,52	-10,67
*QLQNHFIL	-33,08	-10,50	-23,87	-12,80	-27,49	-13,10	-28,72	-9,40	-32,42	-12,20	-41,10	-11,20	-38,17	-11,10	-33,48	-12,40	-34,70	-14,30	-32,56	-11,89
SMSEVDAAR	-31,91	-8,90	-31,47	-7,90	-26,68	-12,00	-26,23	-11,20	-36,22	-8,90	-32,41	-12,10	-40,78	-12,20	-22,13	-10,50	-23,85	-12,30	-30,19	-10,67
SVARLYWDW	-26,20	-10,60	-34,49	-9,90	-24,10	-8,30	-27,49	-8,20	-32,90	-11,20	-32,77	-9,20	-33,92	-11,20	-30,53	-9,50	-33,59	-8,20	-30,67	-9,59
*VAARYRYEY	-37,02	-11,00	-42,49	-11,80	-39,46	-9,60	-43,33	-10,70	-45,37	-11,80	-39,15	-11,10	-32,78	-11,40	-31,89	-10,20	-29,38	-11,60	-37,87	-7,84

\* Epítipos selecionados para a construção da vacina. O servidor PEP-FOLD3 foi utilizado para gerar estruturas 3D. O servidor Hawkdock foi utilizado para *docking* e forneceu pontuações MM/GBSA, enquanto a energia de ligação foi obtida a partir do Prodigy.

**Tabela 8.** Análise de *docking* molecular das interações entre o epítipo MHC-II e o HLA: energia de ligação e compatibilidade estrutural.

Epítopos / Alelos	HLA-DRB10101 (PDB: 2FSE)		HLA-DRB10301 (PDB: 1A6A)		HLA-DRB10401 (PDB: 2SEB)		HLA-DRB11501 (PDB: 1BX2)		HLA-DRB30101 (PDB: 2Q6W)		HLA-DRB30202 (PDB: 3C5J)		HLA-DRB5*0101 (PDB: 1H15)		Média	
	MM/GBSA	Energia de ligação kcal/mol	MM/GBSA	Energia de ligação kcal/mol	MM/GBSA	Energia de ligação kcal/mol	MM/GBSA	Energia de ligação kcal/mol	MM/GBSA	Energia de ligação kcal/mol	MM/GBSA	Energia de ligação kcal/mol	MM/GBSA	Energia de ligação kcal/mol	MM/GBSA	Energia de ligação kcal/mol
AFMLNEAQAQNSYKD	-37,36	-13,10	-22,41	-9,40	-15,45	-11,60	-40,82	-12,20	-39,90	-13,20	-30,17	-11,20	-30,16	-13,20	-30,90	-11,80
*AQSDISLTKNMTVSG	-25,99	-13,10	-35,83	-12,60	-33,82	-12,40	-34,22	-10,60	-26,79	-13,20	-48,11	-12,30	-39,78	-14,30	-34,93	-12,57
*KLAYKWDKNWAPYVE	-40,38	-10,10	-30,81	-10,00	-42,40	-9,60	-39,66	-12,10	-38,94	-13,80	-36,48	-11,80	-45,60	-11,90	-39,18	-11,53
*LSSQITFKTSQQGNM	-36,07	-12,10	-32,65	-13,30	-51,95	-13,30	-44,14	-12,40	-38,69	-13,60	-48,70	-12,70	-44,21	-16,60	-42,34	-13,65
NEAQAQNSYKDPSFK	-27,00	-11,80	-25,94	-9,40	-35,41	-9,00	-26,76	-10,10	-30,63	-11,30	-30,21	-9,20	-35,02	-14,10	-30,14	-10,52
*QLQLNVTDRKTGKTS	-46,39	-13,50	-38,54	-11,50	-38,12	-12,50	-46,82	-11,60	-48,35	-13,10	-45,49	-12,60	-47,58	-14,20	-44,47	-12,58
*QVGIRAWPVSITGNK	-44,93	-14,10	-40,89	-10,30	-43,56	-13,60	-46,45	-12,40	-38,14	-14,70	-47,37	-12,90	-63,27	-15,60	-46,37	-13,25
*SQGGYGNTAKIIQQG	-40,31	-12,80	-34,73	-10,20	-38,51	-10,40	-34,52	-11,80	-37,60	-12,40	-39,54	-10,70	-34,89	-13,10	-37,16	-11,43
*SSQITFKTSQQGNMT	-31,70	-12,50	-33,67	-12,90	-39,93	-13,20	-38,07	-11,60	-34,38	-13,10	-49,37	-11,80	-55,00	-14,80	-40,30	-12,90

\* Epítopos selecionados para a construção da vacina. As estruturas 3D foram geradas utilizando o servidor PEP-FOLD3. O *docking* molecular foi realizada utilizando o servidor Hawkdock. Os resultados MM/GBSA e as energias de ligação foram obtidos a partir do Hawkdock e do Prodigy, respetivamente.

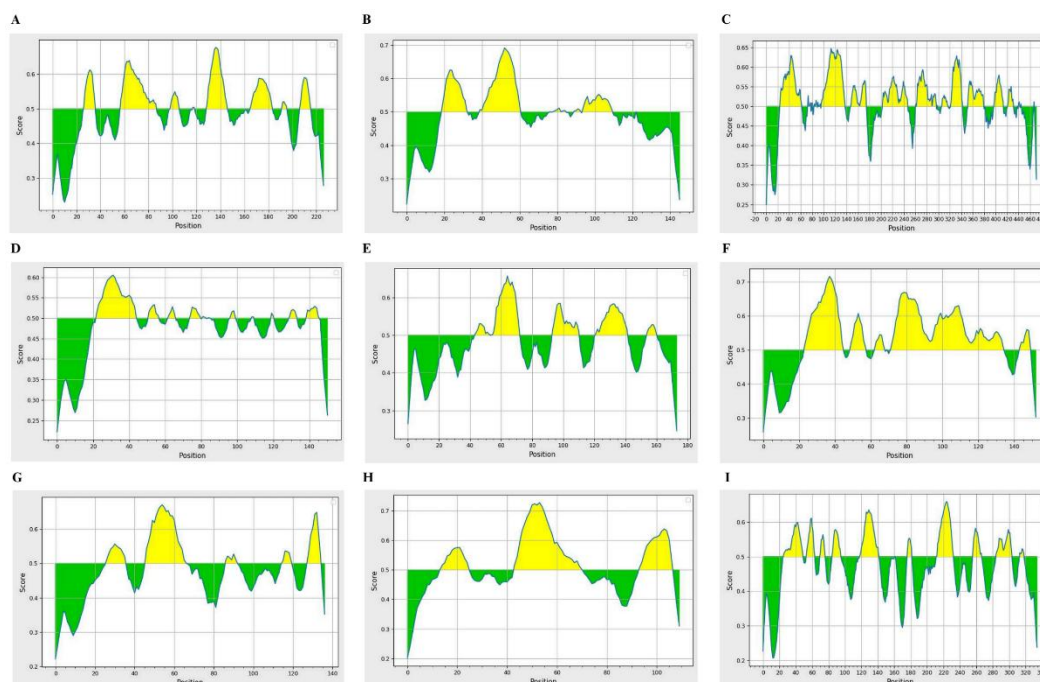
## 4.6 PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS DE CÉLULAS B

No total, 26 epítomos lineares de células B, variando de 11 a 18 aminoácidos de comprimento, foram identificados nas 9 proteínas (**Tabela 4**). Desses, 15 epítomos foram considerados antigênicos e não tóxicos. Análises posteriores mostraram que 10 desses epítomos também eram não alergênicos e possuíam um escore GRAVY negativo. Esses 10 epítomos, derivados de 7 proteínas diferentes, foram selecionados para estudos adicionais (**Tabela 9**).

**Tabela 9.** Epítomos lineares de células B com propriedades antigênicas e de toxicidade, alergênicas e hidrofóbicas.

Proteína alvo	Sequência do epítopo <sup>(1)</sup>	Comprimento (aa) <sup>(2)</sup>	Escore de antigenicidade <sup>(3)</sup>	Toxicidade <sup>(4)</sup>	Alergicidade <sup>(5)</sup>	Hidrofobicidade (GRAVY) <sup>(6)</sup>
Proteína de choque térmico HsJ	PGKASVQADQLQNH	14	0,8880	Não tóxico	Não alergénico	-1,13
Proteína da membrana externa multirresistente MdtQ	EVDAARAAFYP	11	0,7752	Não tóxico	Não alergénico	-0,02
	LTAKNQHQQVEKDAAR	17	1,1507	Não tóxico	Não alergénico	-1,61
Proteína putativa de montagem fimbrial SfmF	KTDGSDSGLLALNDASTA	18	0,8524	Não tóxico	Não alergénico	-0,32
Subunidade principal do curli CsgA	HGHGQGGNGPNSTLNI	16	2,7205	Não tóxico	Não alergénico	-1,08
Proteína de montagem/transporte da produção do curli CsgF	TGKPGRMVTNDFIVDI	16	0,7441	Não tóxico	Não alergénico	-0,04
	ATESGTPPLTPNNLTSK	16	0,6860	Não tóxico	Não alergénico	-0,81
Fímbria tipo 1 Adesina específica para D-manose FimH	QVGIRAWPVSITGNKP	16	1,1205	Não tóxico	Não alergénico	-0,16
	PKGTSKSTMRYSVTD	16	1,2373	Não tóxico	Não alergénico	-1,12
Subunidade menor do curli CsgB	SVVSQDGVGNRARVDQ	16	1,6157	Não tóxico	Não alergénico	-0,64

Todos os dados foram analisados utilizando vários servidores: 1 = servidores IEDB e ABCpred; 2 = ProtParam; 3 = VaxiJen v2.0; 4 = ToxinPred; 5 = AllerTop; 6 = ProtParam.



**Figura 4.** Previsão de epítomos lineares de células B utilizando a escala de antigenicidade IEDB Kolaskar e Tongaonkar. O potencial antigênico foi visualizado utilizando BepiPred (limiar

>0,5), com segmentos amarelos a indicar epítomos imunogénicos previstos e verdes a representar sequências não antigénicas. Estes incluem a proteína da família KdgM da porina específica do oligogalacturonato (A), a proteína de choque térmico HslJ (B), a proteína da membrana externa de resistência a múltiplas drogas MdtQ (C), a subunidade menor Curli CsgB (D), a proteína de montagem fimbrial putativa SfmF (E), a subunidade principal Curli CsgA (F), a proteína de montagem/transporte Curli CsgF (G), a chaperona de montagem Curli CsgC (H) e a adesina específica para D-manose da fimbria tipo 1 FimH (I).

#### 4.7 CONSTRUÇÃO DA VACINA MULTIEPÍTOPO E ANÁLISE FÍSICO QUÍMICA

Os epítomos triados mencionados acima foram combinados para criar quatro candidatos a vacinas (VEC1-4). Esses epítomos foram montados utilizando a sequência PADRE com vários *linkers* e adjuvantes. As construções das vacinas apresentaram tamanho e peso consistentes (60,34 a 98,51 kDa) com pontos isoelétricos teóricos entre 9,42 e 9,69, indicando que carregam uma carga negativa em níveis de pH acima de seu ponto isoelétrico e uma carga positiva abaixo dele. Além disso, os valores do índice de instabilidade das construções variaram de 20,10 a 28,88, indicando que as construções eram estáveis em uma ampla gama de condições. A estabilidade foi, também, demonstrada em temperaturas variáveis, com os valores do índice alifático obtidos variando de 67,09 a 71,88. Adicionalmente, todos as quatro construções mostraram-se não alergénicas, antigénicas e com valores GRAVY negativos, indicando solubilidade e capacidade de interagir eficientemente com o sistema imunológico. A solubilidade foi confirmada com o servidor SOLpro, que mostrou o menor escore de solubilidade em 0,718520 e o maior em 0,927365, sugerindo uma alta probabilidade de serem solúveis quando expressos em *E. coli* (**Tabela 10**).



#### 4.8 ANÁLISE DE CLIVAGEM DE PEPTÍDEOS E AVALIAÇÃO DE COBERTURA POPULACIONAL

A eficácia potencial de nossos candidatos a vacinas foi avaliada através da análise da atividade peptidase proteassomal e específica de catepsina, com análise de clivagem de peptídeos usando NetChop3.1 e ProsperousPlus. Esta análise revelou 16 sítios de clivagem proteassomal dentro dos *clusters* de epítomos de MHC classe I, com muitos desses sítios posicionados próximos ao *linker* "AAY" utilizado. Adicionalmente, identificamos diversos sítios de clivagem para várias catepsinas, incluindo dez para catepsina G, sete para catepsina K, três para catepsina E, quatro para catepsina D, 12 para catepsina S e 12 para catepsina B. Todos esses sítios de clivagem tiveram um escore maior que 0,8 e estavam situados dentro dos *clusters* de epítomos de MHC classe II. Esses achados sugerem que a construção de vacina de multi-epítomos está bem posicionado para o processamento e apresentação eficazes via moléculas de MHC classe I e MHC classe II, garantindo uma ampla resposta imune.

As moléculas de MHC são altamente polimórficas, com mais de 7000 alelos HLA humanos distintos identificados, cada um exibindo frequências variáveis em diversos grupos étnicos e regiões geográficas. Portanto, utilizamos a ferramenta de cobertura populacional do IEDB para garantir que nossos candidatos a vacinas tenham a capacidade de serem reconhecidos por indivíduos de diferentes populações. A análise revelou que os *clusters* de epítomos de MHC I e MHC II, incluídos em nossas construções de vacinas, podem cobrir aproximadamente 92,60% da população global. Especificamente, a cobertura foi maior nas Índias Ocidentais (96,53%) e Europa (96,21%), enquanto foi mais baixa na África do Sul (68,38%) e América Central (65,45%).

##### A

Previsões do NetChop 3.0 usando a versão C-terminal. Limite: 0.900000

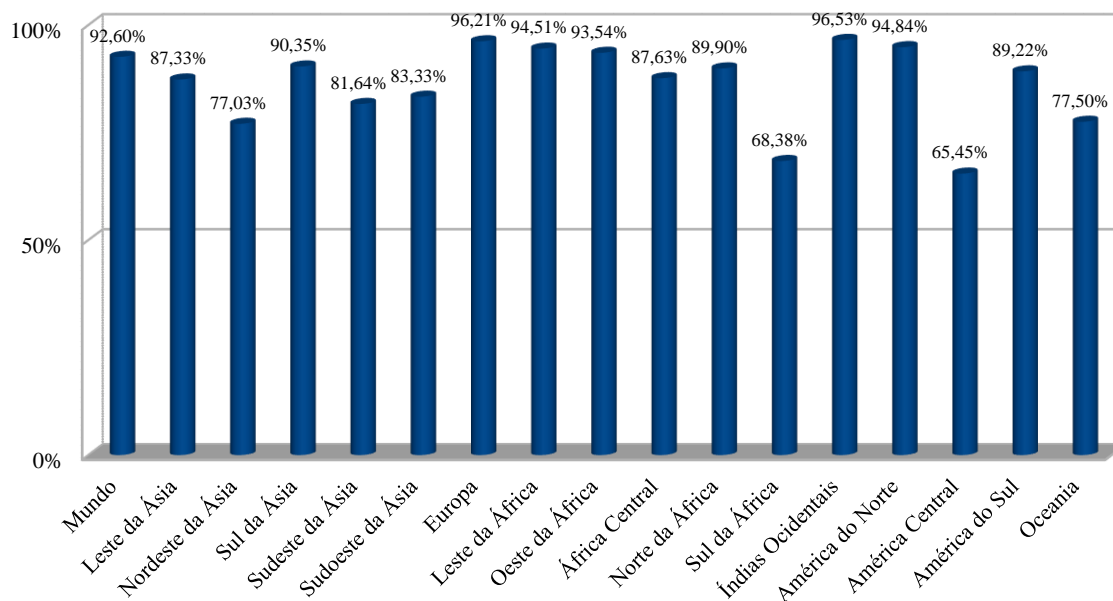
E A A A K A K F V A A W T **L** K A A A A Y D S K L V **F**  
 R **L** R A A **Y** E S N D S R T **I** **Y** A A **Y** G S D L A N T E **Y** A  
 A **Y** H E D Q I S **W** R **W** A A **Y** N P R P G R A D A A A Y Q  
**L** Q N H R F I L A A Y **V** A A R Y R **Y** E **Y**

Número de sítios de clivagem em vermelho: 16. Número de aminoácidos: 102.

##### B

Proteases	Nº de sítios de clivagem
Catepsina G (S01.133)	10
Catepsina K (C01.036)	7
Catepsina E (A01.010)	3
Catepsina D (A01.009)	4
Catepsina S (C01.034)	12
Catepsina B (C01.060)	12

**Figura 5.** Processamento de epítomos para as vacinas candidatas. (A) Epítomos MHC-I: locais de clivagem proteossômica previstos em vermelho na sequência de aminoácidos. (B) Libertação de epítomos MHC-II por catepsinas com número de locais de clivagem para cada protease.



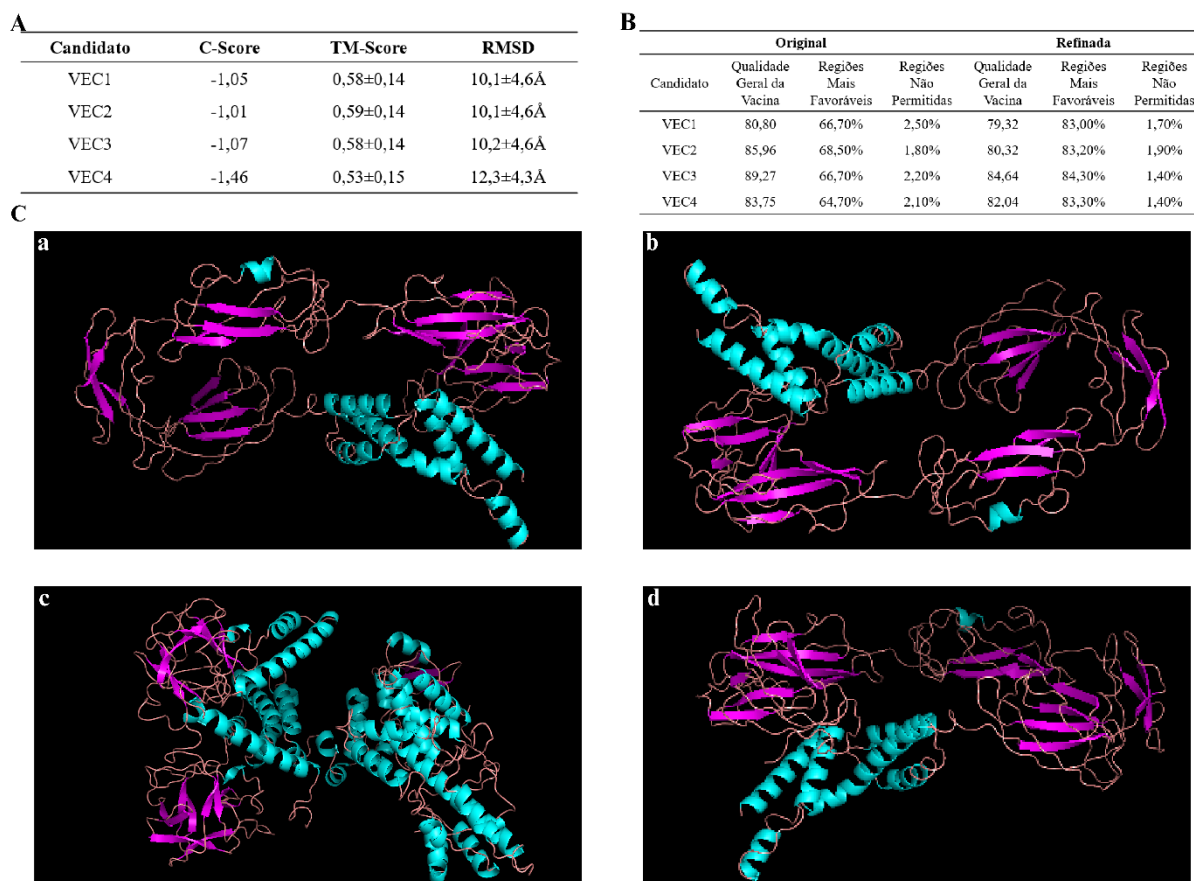
**Figura 6.** Análise da cobertura populacional global e regional do *cluster* de epítomos MHC-I/II selecionado.

#### 4.9 PREDIÇÃO, REFINAMENTO E VALIDAÇÃO DA ESTRUTURA 3D PARA OS CANDIDATOS A VACINA DE *E. CLOACAE*

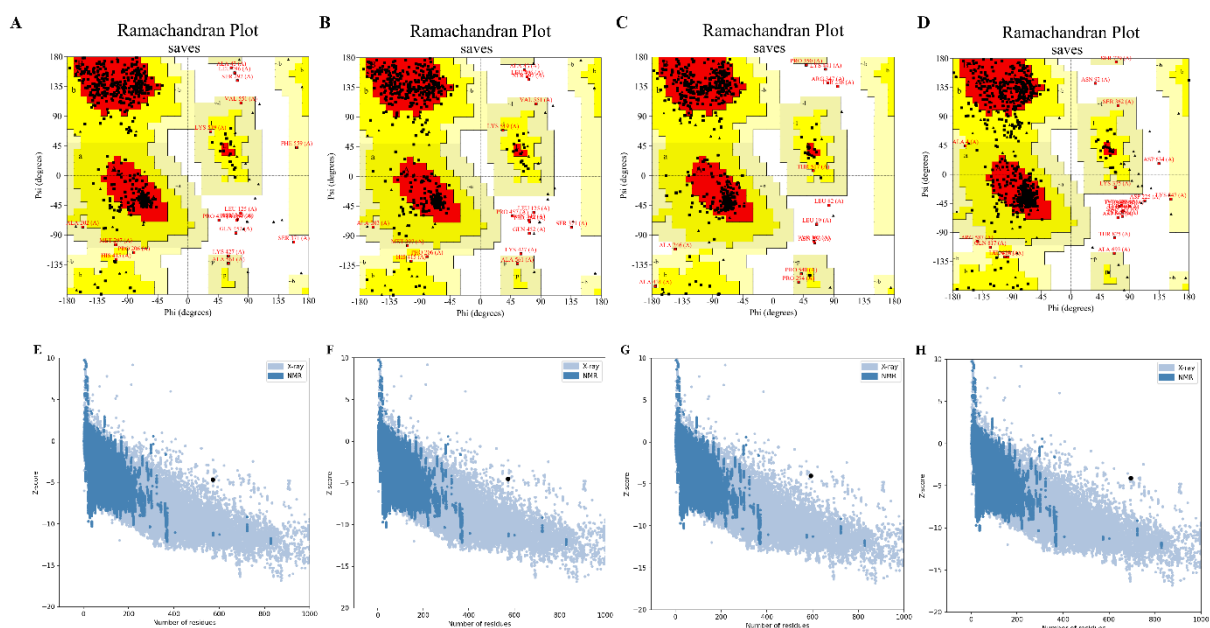
A estrutura 3D de cada candidato vacinal foi determinada através de análise de *threading* usando o servidor web I-TASSER. Cada sequência gerou cinco modelos 3D previstos, sendo o primeiro modelo selecionado para investigação posterior com base nos valores C-score de -1,05, -1,01, -1,07 e -1,46 para VEC1 a 4, respectivamente. A similaridade estrutural entre nossos modelos proteicos foi analisada usando I-TASSER, que calculou o desvio padrão quadrático médio (RMSD) das posições atômicas e forneceu um escore de modelagem por template (TM-score). Os TM-scores para os modelos vacinais variaram de  $0,53 \pm 0,15$  a  $0,61 \pm 0,46$ , enquanto os valores de RMSD variaram entre  $0,59 \pm 0,14$  e  $12,3 \pm 4,3$ .

Os modelos 3D derivados de cada construção foram posteriormente otimizados utilizando o servidor GalaxyRefine. O processo de refinamento produziu cinco modelos para cada

constructo vacinal, sendo o primeiro modelo refinado de cada construção, identificado como o mais adequado e selecionado para análise. Esses modelos refinados foram avaliados quanto à integridade estrutural por meio de várias ferramentas de validação, incluindo ERRAT, gráfico de Ramachandran do PROCHECK e servidores web ProSA. O ERRAT apresenta especificamente um escore de qualidade estrutural geral. Antes do refinamento, os escores variaram entre 89,27 (VEC3) e 80,80 (VEC1), com VEC2 e VEC4 tendo escores de 85,96 e 83,75, respectivamente. No entanto, após o refinamento, os escores de qualidade para VEC1-4 foram 79,32, 80,32, 84,64 e 82,03, respectivamente. A análise do gráfico de Ramachandran mostrou melhorias significativas na distribuição de resíduos dentro das regiões permitidas. Nos modelos refinados, 83,00%, 83,20%, 84,30% e 83,30% dos resíduos em VEC1, VEC2, VEC3 e VEC4 estavam nas regiões permitidas, todos mostrando melhora em relação aos originais. O refinamento também reduziu pela metade a porcentagem de resíduos situados em regiões proibidas para todos os constructos. Os escores-Z previstos pelo ProSa-Web para os quatro modelos vacinais refinados VEC1, VEC2, VEC3 e VEC4 foram -4,66, -4,52, -4,04 e -4,09, respectivamente. Embora o escore-Z tenha se desviado ligeiramente da faixa típica observada para proteínas naturais de tamanho comparável, a análise ERRAT produziu um escore (79 a 84) acima de 50, indicando que os modelos são de alta qualidade (WIEDERSTEIN & SIPPL, 2007). Adicionalmente, a análise do gráfico de Ramachandran demonstrou que mais de 80% dos resíduos foram classificados na região favorecida, validando a precisão da estrutura terciária das vacinas. Os modelos 3D de todas as vacinas são mostrados na **Figura 7**.



**Figura 7.** Modelagem computacional e refinamento estrutural das vacinas candidatas contra *E. cloacae*. (A) Avaliação da qualidade de quatro construções de vacinas (VEC1-4) usando métricas derivadas do I-TASSER (C-Score, TM-Score e RMSD). (B) Validação do GalaxyRefine antes (esquerda) e após (direita) o refinamento: destacando o fator de qualidade geral, a percentagem de resíduos nas regiões mais favoráveis e as regiões não permitidas. (C) Estruturas 3D finais coloridas por elementos secundários, com  $\alpha$ -hélice em ciano,  $\beta$ -barril em magenta e *loops/coil* em rosa claro. Os modelos individuais são os seguintes: VEC1 (a), VEC2 (b), VEC3 (c) e VEC4 (d).



**Figura 8.** Validação estrutural das construções da vacina. (A-D) Gráficos de Ramachandran para modelos refinados VEC1-4 mostrando a distribuição de resíduos: regiões mais favorecidas (vermelho), regiões permitidas (amarelo) e regiões não permitidas (branco). (E-H) Pontuações Z do ProSA-web (pontos pretos) para cada construção.

#### 4.10 ANÁLISE DE *DOCKING* MOLECULAR DOS CANDIDATOS A VACINA COM RECEPTORES TOLL-LIKE

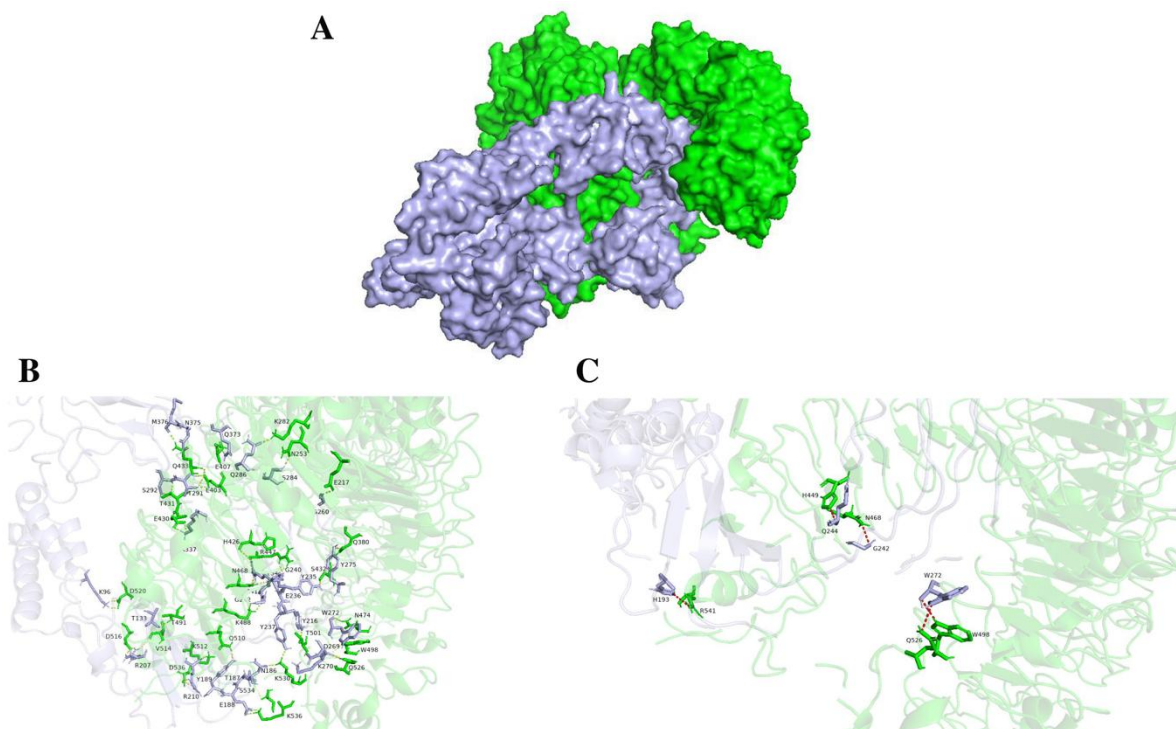
A análise de *docking* proteína-proteína foi realizada para avaliar o potencial de interação de VEC1, VEC2, VEC3 e VEC4 contra o complexo TLR4-MD2 humano (PDB:3FXI), o heterodímero TLR1-TLR2 (PDB:2Z7X) e contra o TLR5 (PDB:3J0A). A VEC1 demonstrou a maior energia de ligação média (-24,07 kcal/mol) e valor de *docking* (-322,21) com a constante de dissociação (Kd) mais favorável a 37°C, tornando-a o candidato vacinal mais promissor contra *E. cloacae* (**Tabela 11**).

As representações superficiais dos complexos VEC1-TLR1/2, VEC1-TLR4 e VEC1-TLR5 são mostradas nas **Figuras 9A, 10A e 11A**, respectivamente. Para cada complexo, as interações residuais entre VEC1 e os TLRs foram analisadas examinando-se os contatos polares (**Figuras 9B, 10B e 11B**) e os *clashes* eletrostáticos (**Figuras 9C, 10C e 11C**) usando o PyMol. Os TLRs são mostrados em verde, enquanto a VEC1 é representada em azul claro. Em todos os complexos VEC1-TLR, múltiplos resíduos estão envolvidos em interações polares e *clashes* eletrostáticos. No entanto, não foram observadas diferenças significativas no número de *clashes*

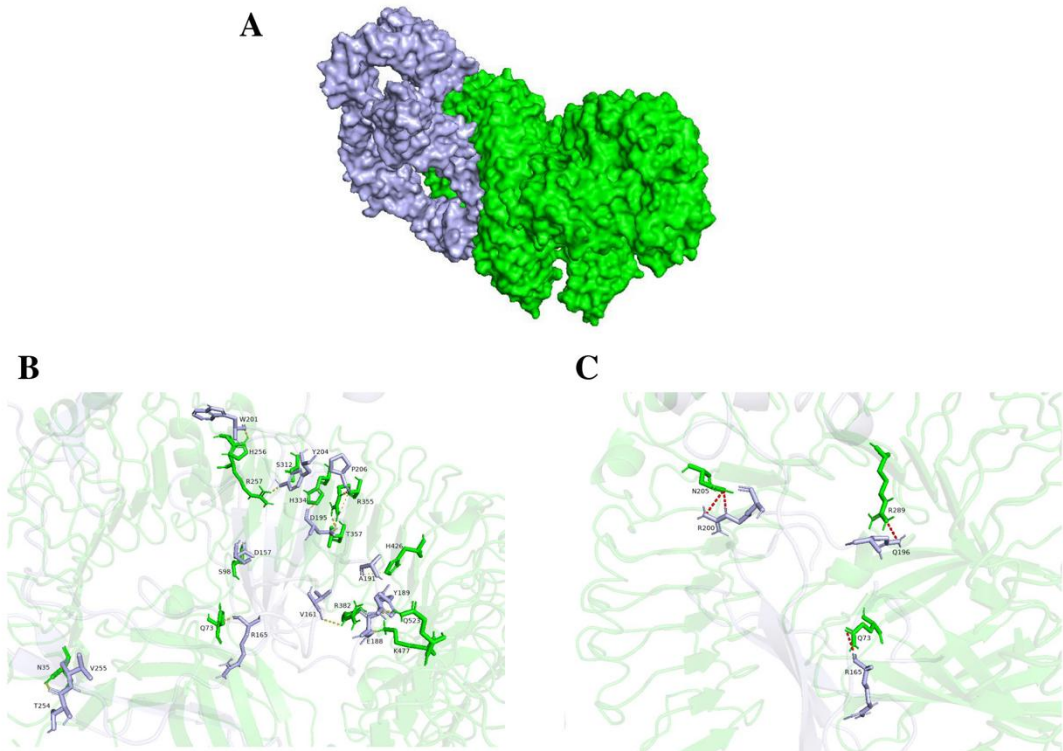
eletrostáticos entre os complexos. Um total de 15 resíduos da cadeia A do TLR1/2 e 11 resíduos da cadeia B do TLR1/2 se envolvem em interações polares com 26 resíduos da VEC1 (**Figura 9B**). Notavelmente, o complexo VEC1-TLR1/2 exibiu um número maior de interações polares em comparação com os outros complexos (**Figuras 9B, 10B e 11B**), indicando que a ligação de hidrogênio é um fator chave na determinação da afinidade e estabilidade do complexo.

**Tabela 11.** Análise comparativa de *docking* de vacinas candidatas com receptores Toll-like: energia de *docking* e estabilidade de interação.

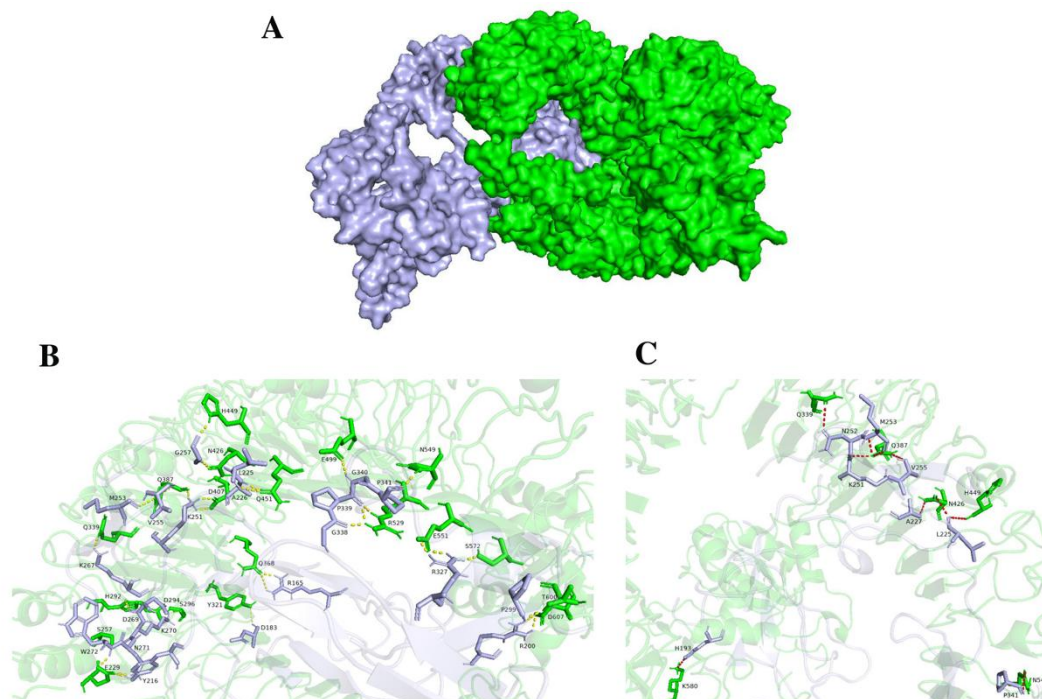
Receptor Toll-like	TLR1/2				TLR4				TLR5				Média		
Candidato a vacina	Valor de <i>Docking</i>	Pontuação de confiança	Energia de ligação (kcal/mol)	Kd (M) a 37°C	Valor de <i>Docking</i>	Pontuação de confiança	Energia de ligação (kcal/mol)	Kd (M) a 37°C	Valor de <i>Docking</i>	Pontuação de confiança	Energia de ligação (kcal/mol)	Kd (M) a 37°C	Valor de <i>Docking</i>	Pontuação de confiança	Energia de ligação (kcal/mol)
VEC1	-311,51	0,96	-25,00	2,5e <sup>-18</sup>	-301,26	0,95	-22,60	1,2e <sup>-16</sup>	-353,87	0,98	-24,60	4,3e <sup>-18</sup>	-322,21	-24,07	4,23e <sup>-17</sup>
VEC2	-320,83	0,97	-24,80	3,5e <sup>-18</sup>	-282,41	0,93	-21,60	6,0e <sup>-16</sup>	-344,44	0,98	-24,50	5,2e <sup>-18</sup>	-315,89	-23,63	2,03e <sup>-16</sup>
VEC3	-283,19	0,93	-23,70	1,8e <sup>-17</sup>	-328,35	0,97	-19,60	1,6e <sup>-14</sup>	-299,81	0,95	-20,60	3,0e <sup>-15</sup>	-303,14	-21,30	6,34e <sup>-15</sup>
VEC4	-276,66	0,93	-17,90	2,3e <sup>-13</sup>	-280,86	0,93	-20,20	5,6e <sup>-15</sup>	-309,49	0,96	-17,70	3,4e <sup>-13</sup>	-289,00	-18,60	1,92e <sup>-13</sup>



**Figura 9.** Interações moleculares entre a VEC1 e o heterodímero TLR1/2 (A) Estrutura 3D geral do complexo VEC1-TLR1/2, com VEC1 representado em azul claro e TLR1/2 em verde. (B) Vista aproximada dos contactos polares na interface de ligação, com os resíduos em interação representados como modelos de bastões e rotulados. (C) Interações eletrostáticas detalhadas entre VEC1 e TLR1/2, destacando a complementaridade de carga com resíduos em clash mostrados como bastões rotulados.



**Figura 10.** Interações moleculares entre a VEC1 e o TLR4(A) Estrutura 3D geral do complexo VEC1-TLR1/2, com VEC1 representado em azul claro e TLR1/2 em verde. (B) Vista aproximada dos contactos polares na interface de ligação, com os resíduos em interação representados como modelos de bastões e rotulados. (C) Interações eletrostáticas detalhadas entre VEC1 e TLR4, destacando a complementaridade de carga com resíduos em clash mostrados como bastões rotulados.



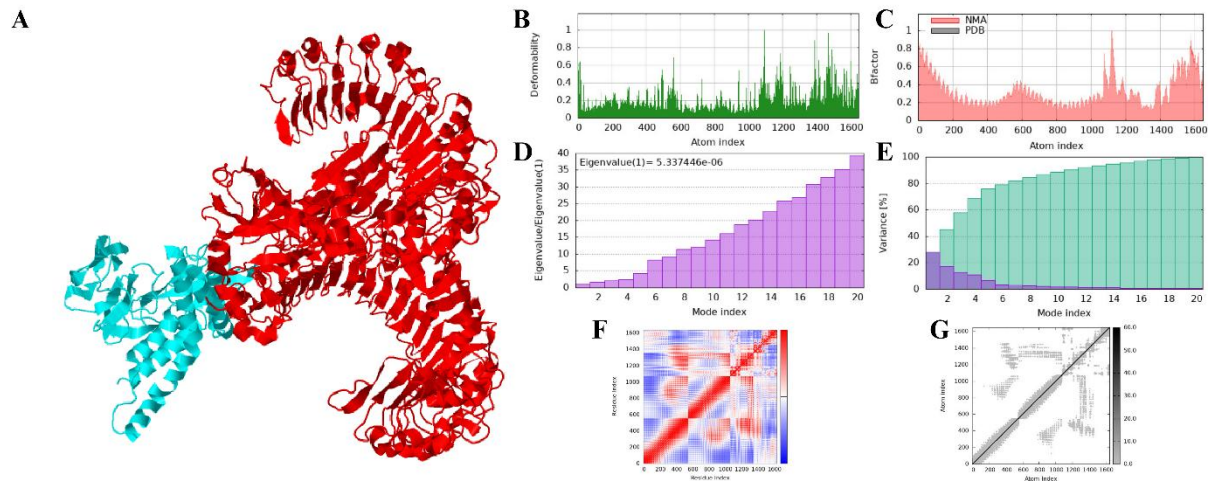
**Figura 11.** Interações moleculares entre a VEC1 e o TLR5(A) Estrutura 3D geral do complexo VEC1-TLR1/2, com VEC1 representado em azul claro e TLR1/2 em verde. (B) Vista aproximada dos contactos polares na interface de ligação, com os resíduos em interação representados como modelos de bastões e rotulados. (C) Interações eletrostáticas detalhadas entre VEC1 e TLR5, destacando a complementaridade de carga com resíduos em clash mostrados como bastões rotulados.

#### 4.11 SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR

Simulações de dinâmica molecular, acopladas à análise de modo normal (NMA), foram realizadas no complexo VEC1 e TLR1/2 dimerizado, que demonstrou ligação efetiva com o complexo TLR (**Figura 9A**). Os valores do *fator B* (B-factor) da simulação indicaram as flutuações do desvio padrão quadrático médio (RMS) das posições atômicas e, portanto, as regiões de alta e baixa flexibilidade dentro do complexo VEC1-TLR1/2 (**Fig. 12B e C**). O alto nível de flexibilidade dentro do candidato a vacina provavelmente contribuiu para a ligação eficiente do constructo ao complexo TLR.

O gráfico de *eigenvalue* (**Fig. 12D**) reflete a rigidez relativa dos modos no complexo, onde o *eigenvalue* de  $5,3374447e^{06}$  indica a estabilidade estrutural do complexo encaixado. Além disso, a distribuição de variância destaca a estabilidade geral e a flexibilidade do complexo

(**Figura 12D**, roxo - individual, verde - cumulativa). Nossa matriz de covariância dos movimentos atômicos e o modelo de rede elástica (**Figuras 12F e 12G**, respectivamente) também mostram áreas de rigidez e flexibilidade, o que apoia ainda mais a estabilidade estrutural e a flexibilidade da VEC1. No geral, a VEC1 exibe uma interação adequada com o complexo TLR1-TLR2, com propriedades dinâmicas favoráveis, aumentando assim sua adequação como candidato vacinal direcionado a TLR.

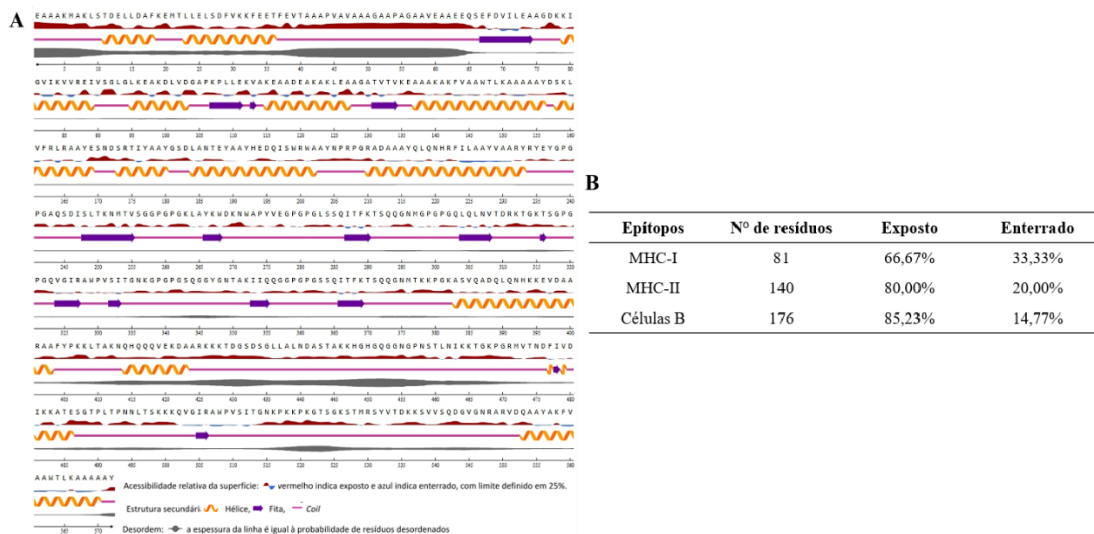


**Figura 12.** Análise de Modos Normais da dinâmica do complexo VEC1-TLR1/2. (A) Perfil de mobilidade do complexo via NMA. (B) Gráfico de deformabilidade destacando a flexibilidade de resíduos específicos ao longo da estrutura molecular. (C) Comparação dos fatores-B entre os dados da NMA (vermelho) e do Protein Data Bank - PDB (cinza), validando a dinâmica do modelo. (D) Espectro de *eigenvalue* mostrando o primeiro modo (menor frequência) governando os movimentos globais. (E) Distribuição da variância nos primeiros 20 modos normais, com contribuições individuais (roxo) e cumulativas (verde). (F) Matriz de covariância dos movimentos atômicos: correlacionados (vermelho), não correlacionados (branco) e anticorrelacionados (azul). (G) Modelo de rede elástica representando o acoplamento mecânico por meio de molas interatômicas.

#### 4.12 PREDIÇÃO DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA E ACESSIBILIDADE SUPERFICIAL DA VEC1

A análise da estrutura secundária de nossa vacina VEC1 revelou que uma parte significativa de sua estrutura consistia em regiões *coil* (desordenadas), representando 56,29% do total (**Figura 13A**). Adicionalmente, 34,09% e 9,62% da VEC1 eram compostos por domínios  $\alpha$ -hélice e  $\beta$ -

barril, respectivamente (**Fig. 13A**). A análise de acessibilidade ao solvente mostrou que um número substancial de resíduos (66,67%) no *cluster* de epítomos MHC-I estava exposto ao solvente, enquanto 33,33% permaneciam enterrados dentro da estrutura. Da mesma forma, o *cluster* de epítomos MHC-II tinha 80% dos resíduos expostos, com os 20% restantes enterrados. Além disso, para os epítomos de células B, 85,22% dos resíduos estavam expostos, restando 14,77% enterrados (**Figura 13B**). Esses achados fornecem *insights* valiosos sobre as propriedades estruturais e a imunogenicidade potencial da vacina VEC1, indicando que sua acessibilidade superficial está otimizada para induzir uma resposta imune efetiva.



**Figura 13.** Características estruturais e imunogénicas do VEC1. (A) Mapeamento da estrutura secundária com  $\alpha$ -hélices (laranja),  $\beta$ -barril (roxo) e *coil* (rosa). A acessibilidade da superfície dos resíduos de aminoácidos codificada (vermelho indicando resíduos expostos e azul indicando resíduos enterrados). Além disso, a linha cinzenta representa a probabilidade de desordem, onde a espessura corresponde à probabilidade de desordem nas regiões da *coil*. (B) Distribuição do epítopo mostrando células B, MHC I e MHC II com o número respectivo e a percentagem de resíduos expostos e enterrados.

#### 4.13 EPÍTOPOS DESCONTÍNUOS DE CÉLULAS B

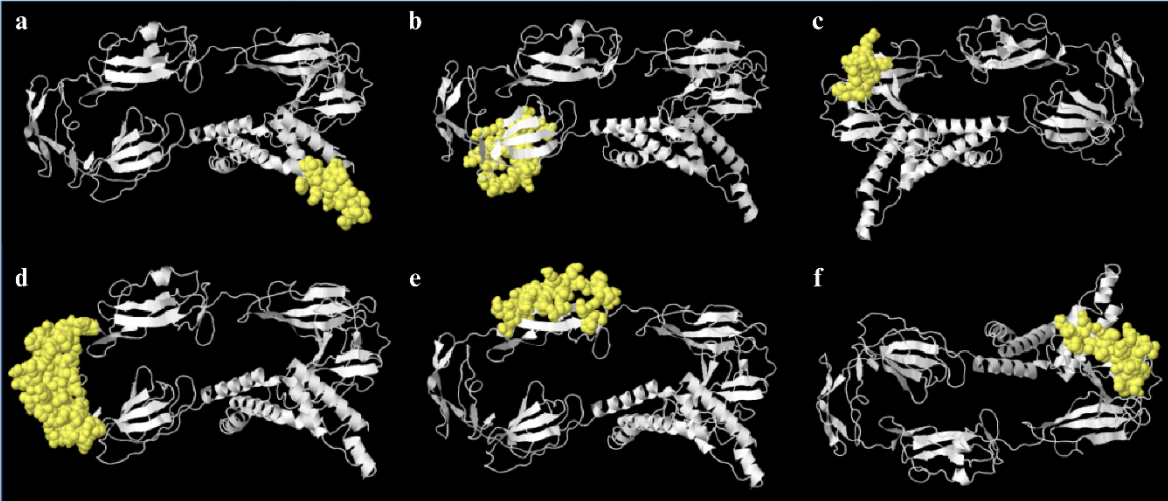
A ferramenta online ElliPro no servidor IEDB identificou seis epítomos descontínuos de células B, com escores variando de 0,729 a 0,894. Os resíduos de aminoácidos que formam esses epítomos descontínuos, incluindo o número de resíduos e seus escores respectivos, foram detalhados na **Figura 14A**. O epítopo descontínuo de célula B previsto mais curto continha 11

resíduos, enquanto o mais longo continha 60 resíduos. As representações estruturais 3D desses epítomos são destacadas em amarelo na **Figura 14B**.

**A**

Número	Resíduos	Nº de resíduos	Escore
1	AFEVTAAPVAVAAAGAAPAGAAV	24	0,894
2	AKADSKLVFLRYGSDLANTEYAAYHQR	27	0,834
3	TSKKKQVGIRS	11	0,829
4	AAAYQLQNHFILAAVYVEYGGPISTKNMTVSGGPGPGKLAYKWDKNAPYVEGPGPGLSSQ	60	0,803
5	NGSQGGYGNTAKIQGGGPGSGQTKTSQQPG	31	0,781
6	NLAWPVSITGNKPKVVSQDGVGNR	24	0,729

**B**



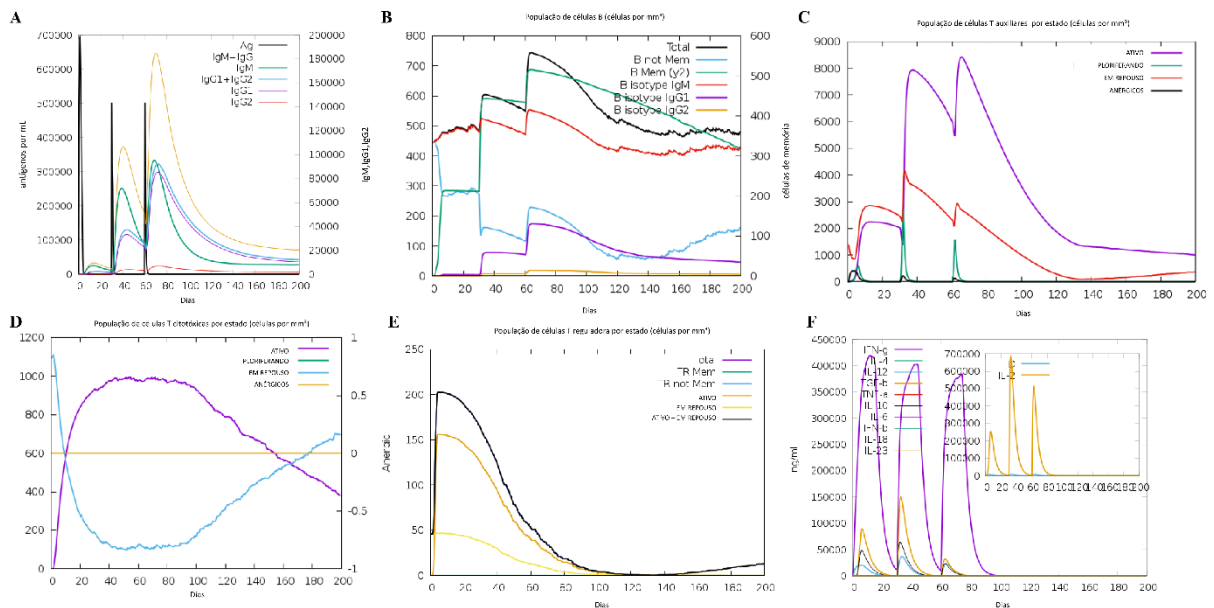
**Figura 14.** Previsão estrutural de epítomos conformacionais de células B. (A) Resíduos de epítomos tabulados com numeração de posição e pontuações de confiança da previsão. (B) Mapeamento estrutural 3D de seis epítomos dominantes (a-f), com regiões antigénicas previstas destacadas a amarelo em relação à estrutura completa da proteína (branco).

#### 4.14 SIMULAÇÕES DE RESPOSTAS IMUNES PARA AVALIAR A EFICÁCIA DA VACINA

Por meio de simulações imunológicas, prevemos a exposição sistêmica de antígenos dentro do tecido linfoide ao longo do esquema de vacinação de três doses da VEC1. A vacina foi injetada inicialmente no tempo zero, seguida por duas doses de reforço aos 30 e 60 dias após a injeção inicial. A resposta imune primária foi caracterizada por níveis elevados de IgM, indicando ativação imune inicial. As respostas secundária e terciária demonstraram uma reação mais forte, evidenciada por níveis significativamente aumentados de IgM + IgG, IgG1 + IgG2 e anticorpos IgG1, juntamente com um declínio mais rápido na concentração de antígeno (**Figura 15A**).

Observou-se uma elevada ativação de células B, particularmente com o aumento dos níveis de células B ( $\gamma_2$ ) e IgM, acompanhada por um proeminente desenvolvimento de células de

memória (**Figura 15B**). As populações expandidas de células T auxiliares (*helper*) e células T citotóxicas apoiaram o estabelecimento de memória imunológica, sugerindo o potencial da vacina para induzir imunidade de longa duração (**Figura 15C, D**). Níveis significativos de células T reguladoras (células *Treg*) foram observados após a exposição à VEC1, mas esses níveis subsequentemente diminuíram após alguns dias de exposição ao antígeno (**Figura 15E**). Além disso, a vacina VEC1 mostrou induzir a produção de citocinas-chave, incluindo IFN- $\gamma$  e IL-2 (**Figura 15F**).



**Figura 15.** Perfil da resposta imune *in silico* da vacinação com VEC1. (A) Produção de imunoglobulina específica do antígeno após três doses (intervalos de 30 dias), com subclasses codificadas por cores (IgM+IgG: amarelo; IgM: verde; IgG1+IgG2: azul; IgG1: roxo e IgG2: vermelho). (B) Dinâmica das populações de células B. (C) Populações de células T auxiliares. (D) Subconjuntos de células T citotóxicas (CD8+): ativas (em proliferação), em repouso e anérgicas (tolerantes). (E) Compartimentos de células T reguladoras (*Treg*) mostrando diferenciação de memória/efectora. (F) Níveis de citocinas. O gráfico principal exibe os níveis gerais de citocinas, enquanto a inserção mostra os níveis de IL-2 e o índice de Simpson (D), que mede a diversidade clonotípica das células T. Um índice de Simpson mais alto indica maior diversidade.



pET28a (+) utilizando sítios de restrição. O cassete de expressão inclui: His6-Tag N-terminal e sítio de clivagem da trombina.

## 5. DISCUSSÃO

A resistência antimicrobiana é reconhecida como um dos desafios de saúde pública mais críticos do mundo (MOODLEY et al., 2022; MICOLI et al., 2021; YOUSAFI et al., 2021). As vacinas representam uma abordagem preventiva promissora, pois possuem potencial significativo para reduzir a disseminação de bactérias altamente patogênicas e minimizar a dependência de antibióticos, que são a causa primária da resistência antimicrobiana (CHATTERJEE et al., 2021; DALSSASS et al., 2019; FRUTOS-GRILO et al., 2023). Neste contexto, construímos uma vacina multi-epítomos direcionada a cepas de *Enterobacter cloacae*, um patógeno oportunista que comumente causa infecções nosocomiais (FRUTOS-GRILO et al., 2023).

O desenvolvimento de um candidato a vacina requer a análise das sequências de proteínas do *core* que são conservadas em todos os proteomas, uma vez que estas representam alvos promissores para a criação de candidatos antigênicos de amplo espectro (ISLAM et al., 2022; ZHANG et al., 2022). Realizamos uma análise subtrativa de vinte e um proteomas de *E. cloacae* e, a partir do proteoma *core* conservado resultante, identificamos nove proteínas que exibiam perfis indicativos de essencialidade, virulência e resistência. Essas proteínas foram determinadas como não homólogas a proteínas de humanos e da microbiota intestinal, antigênicas, e possuíam domínios extracelulares ou localização na membrana externa. As proteínas essenciais desempenham um papel crítico no suporte ao crescimento, sobrevivência e reprodução do patógeno dentro de seu hospedeiro, além de realizar capacidades funcionais essenciais, o que significa que esses genes não podem ser facilmente descartados (DEY et al., 2022; ZHANG et al., 2022). Além das proteínas essenciais, os fatores de virulência de superfície ou secretados são de interesse particular para a construção de vacinas, dada sua capacidade de interagir com o sistema imunológico do hospedeiro e induzir uma resposta imune (DEY et al., 2022; SANCHES et al., 2021). As propriedades antigênicas da proteína permitem que ela seja reconhecida pelo sistema imunológico, induzindo uma resposta imune protetora no hospedeiro (ARYA & BHATT et al., 2021). Além disso, a triagem de proteínas que não homólogas à microbiota intestinal humana e ao próprio hospedeiro pode conferir especificidade

ao patógeno. Isso reduz a chance de induzir uma resposta autoimune no hospedeiro, protegendo simultaneamente o ambiente simbiótico da flora intestinal (AGUTTU et al., 2021).

Dentre as nove proteínas selecionadas, quatro eram proteínas Curli: a subunidade principal de Curli CsgA, a subunidade menor de Curli CsgB, a chaperona de montagem de Curli CsgC e a proteína de montagem/transporte de Curli CsgF. As Curli são nanofibras amiloides constituídos por proteínas, que representam o principal componente da matriz extracelular de biofilmes em bactérias Gram-negativas, desempenhando papel fundamental na adesão às superfícies e na invasão de tecidos (SLEUTEL et al., 2023, DYER et al., 2007). Cinco outras proteínas foram identificadas e atenderam aos nossos critérios. SfmF é uma proteína fimbrial putativa encontrada na *E. coli* K-12 e pode permitir a adesão a várias superfícies em nichos ambientais específicos (KOREA et al., 2010). FimH é uma adesina fimbrial que atua como um fator de virulência em infecções do trato urinário causadas por *E. coli*, promovendo a ligação a glicoproteínas manosiladas no revestimento epitelial da bexiga (KRAMMER et al., 2023). Notavelmente, a FimH é um candidato a vacina particularmente promissor, pois já progrediu para ensaios clínicos de fase II para a prevenção de infecções urinárias recorrentes, utilizando um agonista de TLR4 como adjuvante (ELDRIDGE et al., 2021). A proteína de choque térmico (HslJ), uma proteína putativa de membrana externa, foi encontrada conferindo resistência à novobiocina em *E. coli* e está envolvida diversas vias regulatórias essenciais para funções celulares em temperaturas padrão de crescimento (HARCUM & HADDADIN, 2006, LILIC et al., 2003). A proteína MdtQ, já encontrada nas vesículas de membrana externa de *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenêmicos, desempenha um papel na resistência de múltiplas drogas (FAN et al., 2023). Finalmente, KdgM, uma proteína pertencente à família de porinas específicas para oligogalacturonato, foi identificada tendo um papel na captação celular de oligossacarídeos ácidos (HUTTER et al., 2014).

Apesar de sua significância médica, existem poucos estudos que aplicam a vacinologia reversa e a genômica subtrativa na busca por alvos de vacinas contra *E. cloacae*. No entanto, alguns estudos fizeram contribuições importantes nesta área. AL-MEGRIN et al. (2022) identificaram duas proteínas, a proteína fosfoporina PhoE e uma proteína putativa de porina de membrana externa, que foram utilizadas para projetar uma vacina de peptídeo multi-epítipo contra *E. cloacae*. Além disso, ISMAIL et al. (2020) priorizaram quatro proteínas alvo, incluindo a proteína usher de membrana externa LptC, a proteína putativa de membrana externa A OmpA, a proteína putativa de membrana externa FimD e um transportador de arginina, como candidatas potenciais a vacina contra *E. cloacae*. Furthermore, BOLOURCHI et al. (2022a) identificaram

duas proteínas distintas, o receptor de sideróforo dependente de TonB e a proteína contendo o domínio YjbH, como novos alvos putativos imunogênicos contra isolados clínicos do complexo *E. cloacae*. Mais recentemente, ALHASSAN (2024) identificou quatro proteínas, a proteína associada ao gancho flagelar FigL, o receptor de sideróforo dependente de TonB, a porina OmpA e a proteína da haste do corpo basal flagelar FigB, para construir uma vacina de multi-epítomos contra o complexo *E. cloacae*. Notavelmente, a vacina desenvolvida em nosso estudo incorpora proteínas diferentes das identificadas em estudos anteriores, diminuindo assim a lacuna de conhecimento existente nesta área.

Uma estratégia para a nossa construção de vacina é utilizar múltiplos antígenos, pois estes podem induzir uma resposta imune mais abrangente e robusta em comparação com vacinas de componente único (DA COSTA et al., 2024). Além disso, a incorporação de múltiplos antígenos altamente imunogênicos na construção de vacinas podem ajudar a mitigar o impacto da variação antigênica, que pode ocorrer ao confiar em um único antígeno (DA COSTA et al., 2024). Desta forma, identificamos epítomos de células B, células T auxiliares e células T citotóxicos derivados de nossas proteínas conservadas selecionadas. Para manter a eficácia contra cepas variantes emergentes, a estratégia adotada é o uso de epítomos de proteínas conservadas do *core*. Isso se deve ao fato de que mutações nessas regiões são improváveis, pois trariam um impacto prejudicial e um prejuízo adaptativo considerável para as bactérias (AKBAY et al., 2021). Os epítomos selecionados induziram uma resposta antigênica sem desencadear reações alérgicas e exibiram propriedades favoráveis, como hidrofobicidade e não toxicidade (PRIYAMVADA et al., 2024).

Para garantir uma ampla cobertura de HLA, os epítomos selecionados de MHC-I e MHC-II foram submetidos a *docking* molecular contra diversas variantes HLA relevantes. Os epítomos com os melhores escores médios de *docking*, assim como os epítomos de células B, foram utilizados na construção da vacina. A construção da vacina incorporou uma combinação dos epítomos selecionados de células B, células T auxiliares e células T citotóxicos, que foram conectados por *linkers* AAY, GPGPG e KK. Os *linkers* formadores de  $\alpha$ -hélice contendo a sequência EAAAK foram adicionados aos terminais C e N dos adjuvantes (SWETHA et al., 2022). Essas sequências *linker* não apenas servem para separar fisicamente os diferentes componentes peptídicos, mas também podem desempenhar um papel na melhoria da eficácia, estabilidade e propriedades imunogênicas das construções de vacinas (ROY et al., 2024; BISWAS et al., 2024). A função dos linkers AAY é serem clivados por proteassomos mamíferos, o que resulta na liberação de epítomos individuais em sua configuração natural e na

prevenção da criação de epítomos funcionais indesejados nas junções (ARAM et al., 2024). Em contraste, o *linker* GPGPG estimula respostas robustas de linfócitos T auxiliares e preserva a estrutura do epítomo, enquanto o *linker* KK serve como um sítio de clivagem para a protease lisossomal, que é crucial para a apresentação de antígenos mediada por MHC classe II (KOTTARATHIL et al., 2025). Adicionalmente, o linker EAAAK, que é rígido e possui propriedades formadoras de hélice, foi selecionado para melhorar as propriedades imunogênicas da construção da vacina (PRIYAMVADA & RAMAIAH, 2023; ALIZADEH et al., 2022). Para potencializar a resposta de linfócitos T citotóxicos, a sequência PADRE foi incorporada ao constructo vacinal, aumentando a estabilidade da estrutura e otimizando a eficácia e potência das subunidades (HASHEMPOUR et al., 2024). Adicionalmente, as construções de vacina incorporaram adjuvantes derivados dos próprios patógenos, incluindo a flagelina FliC, a proteína HBHA, a sequência conservada HBHA ou a proteína ribossomal 50S L7/L12. A FliC estimula o sistema imunológico através do receptor Toll-like 5 (MURTAZA et al., 2022), enquanto a proteína ribossomal 50S L7/L12 e a sequência HBHA têm a capacidade de interagir com o receptor Toll-like 4 (KHAN et al., 2023). Esses adjuvantes podem, portanto, induzir respostas imunes mais direcionadas e eficazes (BISWAS et al., 2024).

Nossas análises resultaram no desenvolvimento de quatro candidatos a vacinas: VEC1, VEC2, VEC3 e VEC4. Todas as vacinas se mostraram com propriedades desejáveis, incluindo pesos moleculares adequados, pontos isoelétricos altos, natureza não alergênica, estabilidade física, caráter hidrofílico e solubilidade. Mais importante, esses candidatos exibiram alta antigenicidade e a capacidade de induzir uma resposta imune robusta. O estudo também investigou a suscetibilidade dos epítomos vacinais (separados por *linkers*) à clivagem pelas peptidases do proteassomo e por catepsinas específicas. Nossos achados indicaram que os *linkers* selecionados e seu arranjo foram apropriados, permitindo que os epítomos produzidos fossem efetivamente apresentados e processados pelo sistema imunológico do hospedeiro, induzindo respostas imunes tanto humorais quanto celulares (DAMAS et al., 2022).

As vacinas desempenham um papel profilático crucial e requerem cobertura extensa para enfrentar os desafios futuros impostos por infecções enfrentadas pela comunidade de saúde. Consequentemente, uma vacina de multi-epítomos precisa ser adequada à variação global nos alelos HLA para atender às necessidades de diferentes grupos étnicos (JIANG et al., 2025). Nossas vacinas são previstas para cobrir 92,6% da população global, onde uma cobertura de 90% mostrou-se previamente suficientemente eficaz para ser usada em todo o mundo (JIANG et al., 2025; SHAH et al., 2024; DEY et al., 2023; YOUSAF et al., 2023). Todos os quatro

candidatos a vacinas passaram por modelagem estrutural 3D e refinamento para oferecer *insights* valiosos sobre suas interações proteína-ligante (NAKATA et al., 2023). Todos os modelos foram validados para comparar com precisão as estruturas não refinadas e refinadas (SALAHLOU et al., 2024). Através de nossa modelagem, confirmamos que a maioria dos resíduos de interesse em nossas estruturas estavam em regiões favoráveis, indicando que as estruturas finais eram de qualidade aceitável.

Os receptores Toll-like (TLR) desempenham um papel essencial na ponte entre as respostas imunes inata e adaptativa, modulando a ativação de células apresentadoras de antígeno e regulando a produção de citocinas críticas (DUAN et al., 2022). O complexo TLR1/2 desempenha um papel central nas respostas imunes, pois é crucial para infecções microbianas, maturação de células dendríticas, diferenciação de células T auxiliares e regulação de vias de sinalização (ZHU et al., 2025). O TLR2 também é particularmente conhecido por seu envolvimento no reconhecimento de uma ampla gama de componentes microbianos, em parte devido às suas interações sinérgicas com outros TLRs, como TLR1, TLR6 e, em alguns casos, TLR4 (DI LORENZO et al., 2020). Além disso, agonistas de TLR1/2 estão entre os adjuvantes mais potentes que melhoram as respostas a vacinas na população idosa (VAN DUIN et al., 2007). Os padrões de ligação e a estabilidade dos quatro candidatos a vacinas com os receptores Toll-like foram avaliados por meio de *docking* molecular e simulações de dinâmica molecular. A VEC1 exibiu a energia de ligação mais forte com TLR1/2, TLR4 e TLR5 quando comparada às VEC2-4. A ligação de um ligante aos domínios extracelulares de TLR1 e TLR2 induz sua heterodimerização, desencadeando um rearranjo estrutural que inicia a sinalização intracelular (JIN et al., 2007). Aqui, o complexo VEC1-TLR1/2 teve um maior número de resíduos interagentes usando contatos polares e menos *clashes* eletrostáticos, particularmente nos domínios C-terminal. Essas interações são cruciais na determinação das constantes de ligação proteica, mesmo em distâncias relativamente longas, uma vez que interações polares entre resíduos carregados conferem especificidade nas interações proteína-proteína (ZHOU & PANG, 2018). Isso sugere que as interações entre a VEC1 e os aminoácidos do TLR1/2 formam complexos altamente estáveis que ativariam células e sinais intracelulares. Esta interação estável foi confirmada, também, com simulações de dinâmica molecular, pois o complexo VEC1-TLR1/2 apresentou o menor *eigenvalue* e regiões mais rígidas em comparação com os complexos TLR4 e TLR5, indicando um movimento molecular mais estável e flexível (ORESANYA et al., 2024). Nossos achados estão alinhados com os de ZHU et al. (2025), que demonstraram a forte afinidade de ligação de vacinas de multi-epítomos direcionadas a *Pseudomonas aeruginosa* com os receptores Toll-like 1 e 2.

Em seguida, foram previstas a estrutura secundária e a acessibilidade superficial da VEC1, parâmetros essenciais para o desenvolvimento de uma vacina eficaz (MOODLEY et al., 2022). A vacina VEC1 foi encontrada com uma alta proporção de resíduos *coil* (56,29%), seguida por domínios  $\alpha$ -hélice (34,09%) e  $\beta$ -barril (9,62%). Os motivos de  $\alpha$ -hélice enrolada (*coiled-coil*) são antígenos candidatos promissores para o desenvolvimento de vacinas, pois são altamente imunogênicos e demonstraram efeitos protetores em numerosos ensaios funcionais *in vitro* (BISWAS et al., 2024; AYADI et al., 2020). Nossos dados indicaram que a maioria dos epítomos de MHC-I, MHC-II e de células B estavam expostos, sugerindo regiões potenciais para reconhecimento de epítomos e estabilidade da vacina (SAVOJARDO et al., 2021). O arranjo espacial de epítomos descontínuos ou conformacionais de células B é fundamental para o projeto de vacinas e é influenciado pelo dobramento proteico (MOODLEY et al., 2022). A identificação de epítomos descontínuos de células B e seu arranjo dentro da nossa construção VEC1 indicam que eles podem ter o potencial de interagir com anticorpos e exibir flexibilidade estrutural, tornando a VEC1 uma candidata favorável.

A simulação imunológica mostrou que a vacina VEC1 gerou níveis elevados de células T citotóxicas e auxiliares, bem como IFN- $\gamma$ . Nossos dados estão alinhados com relatos que sugerem que esses parâmetros são críticos para uma resposta imune humoral e adaptativa robusta (ROY et al., 2024; PRIYAMVADA & RAMAIAH, 2023; SARVMEILI et al., 2024; SARFRAZ et al., 2024). Curiosamente, estudos anteriores descobriram que vacinas avaliadas por meio de simulações imunológicas *in silico* não apenas demonstram a capacidade de induzir uma resposta imunogênica robusta, mas também a capacidade de produzir anticorpos *in vivo* (KAUSHIK et al., 2022). Além disso, a sequência nucleotídica da VEC1 foi otimizada para maior eficiência transcricional e translacional dentro da *E. coli* K12, considerando seu conteúdo de GC e índice de adaptação de códons (CAI) (SALAHLU et al., 2024). A construção final foi projetada com sítios de restrição NdeI e XhoI, permitindo sua clonagem no vetor de expressão pET28a+, que mostra sua adequação para testes *in vitro*. Em conclusão, este estudo empregou várias técnicas computacionais para desenvolver um candidato potencial a vacina, VEC1, contra o patógeno *E. cloacae*. Os dados demonstraram que a vacina VEC1 possui propriedades estruturais e fisicoquímicas favoráveis e tem o potencial de induzir respostas imunes tanto humorais quanto baseadas em células. Além disso, foi previsto que a VEC1 pode ser prontamente expressa em cepas de *E. coli*. Embora a aplicação de abordagens de imunoinformática tenha se mostrado valiosas para orientar os estudos experimentais para a vacina, nosso estudo teve algumas limitações. Por exemplo, as ferramentas computacionais disponíveis não foram capazes de identificar antígenos baseados em carboidratos, que podem

ser antígenos protetores comuns (COCORULLO et al., 2023). Esses tipos de análises frequentemente priorizam antígenos altamente expressos ou aqueles com peptídeos sinal distintos, enquanto negligenciam antígenos menos abundantes, mas possivelmente igualmente eficazes (JIANG et al., 2025). Consequentemente, outros epítomos que ainda contribuem para a resposta imune podem ter sido sub explorados. A resposta imune prevista por simulações *in silico* pode não levar em conta fatores como condições médicas pré-existentes e idade, que podem influenciar a resposta imune de um indivíduo após receber a vacina em cenários do mundo real (ROY et al., 2024). A validação experimental em modelos animais é crítica para confirmar imunogenicidade, segurança e eficácia protetora, ligando a promessa computacional à aplicação real (MURSALEEN et al., 2024; SHAH et al., 2023). Como resultado, o nosso candidato a vacina de multi-epítomos proposto passará por avaliação e validação extensas na próxima fase de estudos. Isso envolverá uma análise detalhada de sua capacidade de induzir uma resposta imune robusta e protetora, bem como uma avaliação completa de seu perfil de segurança geral em modelos animais relevantes. Espera-se que os achados desses estudos contribuam para o desenvolvimento e aplicação clínica bem-sucedidos da vacina VEC1 contra cepas de *E. cloacae*.

## 6. CONCLUSÃO

O presente estudo empregou uma abordagem integrada de proteômica subtrativa, vacinologia reversa e imunoinformática para a identificação e caracterização de candidatos a vacinas contra *Enterobacter cloacae*. A partir dos achados deste estudo, apresento a seguir as conclusões mais relevantes, organizadas conforme os objetivos propostos.

- A triagem de 21 genomas clínicos permitiu selecionar proteínas associadas à essencialidade, virulência e resistência antimicrobiana, resultando em 39 alvos não homólogos ao proteoma humano e à microbiota intestinal, consolidando um conjunto seguro e biologicamente relevante para aplicação em vacinas.
- Por meio de ferramentas imunoinformáticas, foram identificados epítomos com alta afinidade para alelos de MHC, não tóxicos, não alergênicos e fortemente antigênicos, garantindo determinantes capazes de estimular respostas imunes celular e humoral de forma abrangente.
- Com base nos epítomos selecionados, foram desenvolvidas quatro construções de vacinas (VEC1–VEC4), cada uma composta por adjuvantes e linkers específicos. Todas

apresentaram propriedades físico-químicas favoráveis, elevada antigenicidade, ausência de alergenicidade e boa solubilidade. Entre elas, a VEC1 foi priorizada para análises aprofundadas após demonstrar as melhores interações nos estudos de *docking*.

- Todas as construções multi-epítipo apresentaram modelos tridimensionais estruturalmente adequados após as etapas de modelagem, refinamento e validação. Entre elas, a VEC1 foi selecionada para análises aprofundadas devido ao seu desempenho superior nas interações de *docking* com receptores Toll-like, demonstrando maior potencial para ativação da resposta imunológica.
- As simulações imunológicas demonstraram que a VEC1 tem potencial para estimular produção robusta de anticorpos, ativação de células T auxiliares e citotóxicas, além da geração de células de memória, indicando a capacidade da formulação de promover uma resposta imunológica eficaz e duradoura.
- A otimização de códons e a clonagem *in silico* da sequência da VEC1 no vetor pET-28<sup>a</sup> (+) evidenciaram que o candidato é viável para expressão heteróloga em *Escherichia coli*, representando um passo fundamental para a transição do modelo computacional para testes laboratoriais.

## 7. REFERÊNCIAS

ADEOLU, M.; ALNAJAR, S.; NAUSHAD, S.; S. GUPTA, R. Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacteriales’: proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 66, n. 12, p. 5575–5599, 2016. Microbiology Society. Disponível em: <http://doi.org/10.1099/ijsem.0.001485>.

AGUTTU, C.; OKECH, B. A.; MUKISA, A.; LUBEGA, G. W. Screening and characterization of hypothetical proteins of *Plasmodium falciparum* as novel vaccine candidates in the fight against malaria using reverse vaccinology. *Journal, genetic engineering & biotechnology*, v. 19, n. 1, p. 103, 2021. Elsevier BV. Disponível em: <http://doi.org/10.1186/s43141-021-00199-y>.

AKBAY, B.; ABIDI, S. H.; IBRAHIM, M. A. A.; MUKHATAYEV, Z.; ALI, S. Multi-subunit SARS-CoV-2 vaccine design using evolutionarily conserved T- and B- cell epitopes. *Vaccines*, v. 9, n. 7, p. 702, 2021. MDPI AG. Disponível em: <http://doi.org/10.3390/vaccines9070702>.

AKURUT, E.; GAVAMUKULYA, Y.; MULINDWA, J.; et al. Design of a multi-epitope vaccine against drug-resistant mycobacterium tuberculosis and mycobacterium bovis using reverse vaccinology. *Scientific reports*, v. 15, n. 1, p. 27298, 2025. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://doi.org/10.1038/s41598-025-11768-3>.

ALCOCK, B. P.; RAPHENYA, A. R.; LAU, T. T. Y. et al. CARD 2020: antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Research*, v. 48, n. D1, p. D517–D525, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz935>.

ALHASSAN, H. H. Advanced vaccinomic, immunoinformatic, and molecular modeling strategies for designing Multi- epitope vaccines against the *Enterobacter cloacae* complex. *Frontiers in immunology*, v. 15, p. 1454394, 2024. Frontiers Media SA. Disponível em: <http://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1454394>.

ALI, M.; PANDEY, R.K.; KHATOON, N.; NARULA, A.; MISHRA, A.; PRAJAPATI, V.K. Exploring dengue genome to construct a multi-epitope based subunit vaccine by utilizing immunoinformatics approach to battle against dengue infection. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, 9232, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09199-w>.

ALIZADEH, M.; AMINI-KHOEI, H.; TAHMASEBIAN, S. et al. Designing a novel multi-epitope vaccine against Ebola virus using reverse vaccinology approach. *Scientific Reports*, v. 12, 7757, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11851-z>.

AL-MEGRIN, W. A. I.; KARKASHAN, A.; ALNUQAYDAN, A. M.; et al. Design of a multi-epitopes based chimeric vaccine against *Enterobacter cloacae* using pan-genome and reverse vaccinology approaches. *Vaccines*, v. 10, n. 6, p. 886, 2022. MDPI AG. Disponível em: <http://doi.org/10.3390/vaccines10060886>.

ALSHABRMI, F. M.; ALATAWI, E. A. Subtractive proteomics-guided vaccine targets identification and designing of multi-epitopes vaccine for immune response instigation against *Burkholderia pseudomallei*. *International journal of biological macromolecules*, v. 270, n. Pt 1, p. 132105, 2024. Elsevier BV. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.132105>.

AL-ZAHRANI, I. A.; BREK, T. M. Emergence of a bla<sub>NDM-5</sub>-carrying extensively drug-resistant *Enterobacter cloacae* ST1718 in Saudi Arabia: Insights from comprehensive genome analysis. *Journal of Infection and Public Health*, v. 18, n. 2, 102645, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2024.102645>.

ANDRADE, D. DE; LEOPOLDO, V. C.; HAAS, V. J. Ocorrência de bactérias multiresistentes em um centro de Terapia Intensiva de Hospital brasileiro de emergências. *Revista brasileira de terapia intensiva*, v. 18, n. 1, 2006. Associação de Medicina Intensiva Brasileira. Disponível em: <http://doi.org/10.1590/s0103-507x2006000100006>.

ANNAVAJHALA, A. J. et al. Mechanisms of carbapenem resistance in *Enterobacter cloacae* complex. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 74, n. 12, p. 3199-3207, 2019a. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jac/dkz348>.

ANNAVAJHALA, M. K.; GOMEZ-SIMMONDS, A.; UHLEMANN, A.-C. Multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* complex emerging as a global, diversifying threat. *Frontiers in microbiology*, v. 10, p. 44, 2019b. Frontiers Media SA. Disponível em: <http://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00044>.

ARAM, C.; ALIJANIZADEH, P.; SALEKI, K.; KARAMI, L. Development of an ancestral DC and TLR4-inducing multi-epitope peptide vaccine against the spike protein of SARS-CoV and SARS-CoV-2 using the advanced immunoinformatics approaches. *Biochemistry and Biophysics Reports*, v. 39, 101745, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2024.101745>.

ARUNACHALAM, A. B. Vaccines induce homeostatic immunity, generating several secondary benefits. *Vaccines*, v. 12, n. 4, 2024. Disponível em: <http://doi.org/10.3390/vaccines12040396>.

ARYA, H.; BHATT, T. K. Role Bioinformatics Subunit Vaccine Design. *Molecular Docking Computer-Aided Drug Design*. Academic Press, 2021.

AYADI, I.; BALAM, S.; AUDRAN, R. et al. P. falciparum and P. vivax orthologous coiled-coil candidates for a potential cross-protective vaccine. *Frontiers in Immunology*, v. 11, 574330, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.574330>.

BELAY, W. Y.; GETACHEW, M.; TEGEGNE, B. A.; et al. Mechanism of antibacterial resistance, strategies and next-generation antimicrobials to contain antimicrobial resistance: a review. *Frontiers in pharmacology*, v. 15, n. 1444781, 2024. Frontiers Media SA. Disponível em: <http://doi.org/10.3389/fphar.2024.1444781>.

BIBI, S.; ULLAH, I.; ZHU, B. et al. In silico analysis of epitope-based vaccine candidate against tuberculosis using reverse vaccinology. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, 1249, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80899-6>.

BISWAS, R.; SWETHA, R.G.; BASU, S.; ROY, A.; RAMAIAH, S.; ANBARASU, A. Designing multi-epitope vaccine against human cytomegalovirus integrating pan-genome and reverse vaccinology pipelines. *Biologicals*, v. 87, 101782, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2024.101782>.

BOLOURCHI, N.; FERESHTEH, S.; NOORI GOODARZI, N.; BADMASTI, F. Subtractive genomic analysis for computational identification of putative immunogenic targets against clinical *Enterobacter cloacae* complex. *PLoS One*, v. 17, n. 10, e0275749, 2022a. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0275749>.

BOLOURCHI, N.; GISKE, C. G.; NEMATZADEH, S.; et al. Comparative resistome and virulome analysis of clinical NDM-1-producing carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* complex. *Journal of global antimicrobial resistance*, v. 28, p. 254–263, 2022b. Elsevier BV. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.jgar.2022.01.021>.

BOUCHER, H. W.; TALBOT, G. H.; BRADLEY, J. S.; et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 48, n. 1, p. 1–12, 2009. Oxford University Press (OUP). Disponível em: <http://doi.org/10.1086/595011>.

BREIJYEH, Z.; JUBEH, B.; KARAMAN, R. Resistance of Gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. *Molecules*, v. 25, n. 6, p. 1340, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules25061340>.

BUI, H.-H.; SIDNEY, J.; DINH, K.; SOUTHWOOD, S.; NEWMAN, M.J.; SETTE, A. Predicting population coverage of T-cell epitope-based diagnostics and vaccines. *BMC Bioinformatics*, v. 7, n. 1, 153, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-153>.

BUSH, N. G.; DIEZ-SANTOS, I.; ABBOTT, L. R.; MAXWELL, A. Quinolones: Mechanism, lethality and their contributions to antibiotic resistance. *Molecules (Basel, Switzerland)*, v. 25, n. 23, p. 5662, 2020. MDPI AG. Disponível em: <http://doi.org/10.3390/molecules25235662>.

C REYGAERT, W.; DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES, OAKLAND UNIVERSITY WILLIAM BEAUMONT SCHOOL OF MEDICINE, ROCHESTER, MI, USA. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS microbiology*, v. 4, n. 3, p. 482–501, 2018. American Institute of Mathematical Sciences (AIMS). Disponível em: <http://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>.

CAI, S.; QUAN, J.; WANG, Z.; et al. High prevalence of carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* complex in a tertiary hospital over a decade. *Microbiology spectrum*, p. e0078024, 2024. Disponível em: <http://doi.org/10.1128/spectrum.00780-24>.

CALIS, J. J. A.; MAYBENO, M.; GREENBAUM, J. A. et al. Properties of MHC class I presented peptides that enhance immunogenicity. *PLoS Computational Biology*, v. 9, n. 10, e1003266, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003266>.

CARCIONE, D.; SIRACUSA, C.; SULEJMANI, A.; LEONI, V.; INTRA, J. Old and new beta-lactamase inhibitors: Molecular structure, mechanism of action, and clinical use. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), v. 10, n. 8, p. 995, 2021. MDPI AG. Disponível em: <http://doi.org/10.3390/antibiotics10080995>.

CHATTERJEE, R.; SAHOO, P.; MAHAPATRA, S. R. et al. Development of a conserved chimeric vaccine for induction of strong immune response against *Staphylococcus aureus* using immunoinformatics approaches. *Vaccines*, v. 9, n. 9, 1038, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/vaccines9091038>.

CHAUDHARI, N. M.; GUPTA, V. K.; DUTTA, C. BPGA—An ultra-fast pan-genome analysis pipeline. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, 24373, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep24373>.

CHRISTAKI, E.; MARCOU, M.; TOFARIDES, A. Antimicrobial resistance in bacteria: Mechanisms, evolution, and persistence. *Journal of molecular evolution*, v. 88, n. 1, p. 26–40, 2020. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://doi.org/10.1007/s00239-019-09914-3>.

COCORULLO, M.; CHIARELLI, L.R.; STELITANO, G. Improving protection to prevent bacterial infections: Preliminary applications of reverse vaccinology against the main cystic fibrosis pathogens. *Vaccines*, v. 11, n. 7, 1221, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/vaccines11071221>.

COLOVOS, C.; YEATES, T.O. Verification of protein structures: Patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Science*, v. 2, n. 9, p. 1511–1519, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pro.5560020916>.

DA COSTA, R.M.; ROOKE, J.L.; WELLS, T.J.; CUNNINGHAM, A.F.; HENDERSON, I.R. Type 5 secretion system antigens as vaccines against Gram-negative bacterial infections. *npj Vaccines*, v. 9, n. 1, 53, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41541-024-00953-6>.

DA SILVA, M. K.; CAMPOS, D. M. DE O.; AKASH, S.; et al. Advances of reverse vaccinology for mRNA vaccine design against SARS-CoV-2: A review of methods and tools. *Viruses*, v. 15, n. 10, p. 2130, 2023. MDPI AG. Disponível em: <http://doi.org/10.3390/v15102130>.

DADGOSTAR, P. Antimicrobial resistance: Implications and costs. *Infection and drug resistance*, v. 12, p. 3903–3910, 2019. Informa UK Limited. Disponível em: <http://doi.org/10.2147/idr.s234610>.

DALSASS, M.; BROZZI, A.; MEDINI, D.; RAPPUOLI, R. Comparison of open-source reverse vaccinology programs for bacterial vaccine antigen discovery. *Frontiers in Immunology*, v. 10, p. 113, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00113>.

DAMAS, M. S. F.; MAZUR, F. G.; DE FREIRE, C. C. M.; DA CUNHA, A. F.; DA PRANCHEVICIUS, M.-C. A systematic immuno-informatic approach to design a multiepitope-based vaccine against emerging multiple drug resistant *Serratia marcescens*. *Frontiers in Immunology*, v. 13, 768569, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.768569>.

DARBY, E. M.; TRAMPARI, E.; SIASAT, P.; et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nature reviews. Microbiology*, v. 21, n. 5, p. 280–295, 2023. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://doi.org/10.1038/s41579-022-00820-y>.

DAVIN-REGLI, A.; LAVIGNE, J.-P.; PAGÈS, J.-M. *Enterobacter* spp.: Update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. *Clinical microbiology reviews*, v. 32, n. 4, 2019. American Society for Microbiology. Disponível em: <http://doi.org/10.1128/CMR.00002-19>.

DAVIN-REGLI, A.; PAGÈS, J.-M. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*: Versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, p. 392, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00392>.

DEY, J.; MAHAPATRA, S. R.; PATNAIK, S. et al. Molecular characterization and designing of a novel multiepitope vaccine construct against *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, v. 28, n. 2, 49, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10989-021-10356-z>.

DEY, J.; MAHAPATRA, S. R.; SINGH, P. K.; et al. Designing of multi-epitope peptide vaccine against *Acinetobacter baumannii* through combined immunoinformatics and protein interaction-based approaches. *Immunologic research*, v. 71, n. 4, p. 639–662, 2023. Springer

Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://doi.org/10.1007/s12026-023-09374-4>

DHALL, A.; PATIYAL, S.; RAGHAVA, G. P. S. A hybrid method for discovering interferon-gamma inducing peptides in human and mouse. *bioRxiv*, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2023.02.02.526919>.

DI LORENZO, A.; BOLLI, E.; TARONE, L.; CAVALLO, F.; CONTI, L. Toll-like receptor 2 at the crossroad between cancer cells, the immune system, and the microbiota. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 24, 9418, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21249418>.

DIMITROV, I.; BANGOV, I.; FLOWER, D. R.; DOYTCHINOVA, I. AllerTOP vol 2—a server for in silico prediction of allergens. *Journal of Molecular Modeling*, v. 20, n. 6, 2278, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00894-014-2278-5>.

DOYTCHINOVA, I. A.; FLOWER, D. R. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinformatics*, v. 8, n. 1, p. 4, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-4>.

DUAN, T.; DU, Y.; XING, C.; WANG, H.Y.; WANG, R.-F. Toll-like receptor signaling and its role in cell-mediated immunity. *Frontiers in Immunology*, v. 13, 812774, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.812774>.

DYER, J.G.; SRIRANGANATHAN, N.; NICKERSON, S.C.; ELVINGER, F. Curli production and genetic relationships among *Escherichia coli* from cases of bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*, v. 90, n. 1, p. 193–201, 2007. Disponível em: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)72620-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)72620-6).

ELBEHIRY, A.; AL SHOAIBI, M.; ALZHRANI, H.; et al. *Enterobacter cloacae* from urinary tract infections: frequency, protein analysis, and antimicrobial resistance. *AMB express*, v. 14, n. 1, p. 17, 2024. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://doi.org/10.1186/s13568-024-01675-7>.

ELDRIDGE, G.R.; HUGHEY, H.; ROSENBERGER, L. et al. Safety and immunogenicity of an adjuvanted *Escherichia coli* adhesin vaccine in healthy women with and without histories of recurrent urinary tract infections: Results from a first-in-human phase 1

study. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, v. 17, n. 5, p. 1262–1270, 2021. Disponible em: <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1834807>.

ELFADIL, M. M.; SAMHOON, S. O. A.; SAADALDIN, M. M.; et al. Reverse vaccinology and immunoinformatics approaches for multi-epitope vaccine design against *Klebsiella pneumoniae* reveal a novel vaccine target protein. *Journal, genetic engineering & biotechnology*, v. 23, n. 3, p. 100510, 2025. Elsevier BV. Disponible em: <http://doi.org/10.1016/j.jgeb.2025.100510>.

ETEMADI, S.; EBRAHIMZADEH LEYLABADLO, H.; GHOTASLOU, R. AmpC  $\beta$ -lactamase among Enterobacteriaceae: A new insight. *Gene reports*, v. 19, n. 100673, p. 100673, 2020. Elsevier BV. Disponible em: <http://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100673>.

FÀBREGA, A.; MADURGA, S.; GIRALT, E.; VILA, J. Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microbial biotechnology*, v. 2, n. 1, p. 40–61, 2009. Wiley. Disponible em: <http://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2008.00063.x>.

FAN, F.; WANG, J.; CHEN, H.; WEI, L.; ZHANG, Z. Isolation and protein MdtQ analysis of outer membrane vesicles released by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Microbial Pathogenesis*, v. 183, p. 106325, 2023. Disponible em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106325>.

FARMER, J. J., III; FARMER, M. K.; HOLMES, B. The Enterobacteriaceae: General Characteristics. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 15. mar. 2010. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. Disponible em: <http://doi.org/10.1002/9780470688618.taw0051>.

FERRI, M.; RANUCCI, E.; ROMAGNOLI, P.; GIACCONE, V. Antimicrobial resistance: A global emerging threat to public health systems. *Critical reviews in food science and nutrition*, v. 57, n. 13, p. 2857–2876, 2017. Informa UK Limited. Disponible em: <http://doi.org/10.1080/10408398.2015.1077192>.

FLEISCHMANN, R. D.; ADAMS, M. D.; WHITE, O.; et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science (New York, N.Y.)*, v. 269, n. 5223, p. 496–512, 1995. American Association for the Advancement of Science (AAAS). Disponible em: <http://doi.org/10.1126/science.7542800>.

FRUTOS-GRILO, E.; KRELING, V.; HENSEL, A.; CAMPOY, S. Host-pathogen interaction: *Enterobacter cloacae* exerts different adhesion and invasion capacities against different host cell types. *PLoS One*, v. 18, n. 10, e0289334, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0289334>.

GANBOLD, M.; SEO, J.; WI, Y. M.; KWON, K. T.; KO, K. S. Species identification, antibiotic resistance, and virulence in *Enterobacter cloacae* complex clinical isolates from South Korea. *Frontiers in microbiology*, v. 14, p. 1122691, 2023. Frontiers Media SA. Disponível em: <http://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1122691>.

GARGATE, N.; LAWS, M.; RAHMAN, K. M. Current economic and regulatory challenges in developing antibiotics for Gram-negative bacteria. *npj antimicrobials and resistance*, v. 3, n. 1, p. 50, 2025. Disponível em: <http://doi.org/10.1038/s44259-025-00123-1>.

GAUBA, A.; RAHMAN, K. M. Evaluation of antibiotic resistance mechanisms in Gram-negative bacteria. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, v. 12, n. 11, p. 1590, 2023. MDPI AG. Disponível em: <http://doi.org/10.3390/antibiotics12111590>.

GIRLICH, D.; OUZANI, S.; EMERAUD, C.; et al. Uncovering the novel *Enterobacter cloacae* complex species responsible for septic shock deaths in newborns: a cohort study. *The Lancet. Microbe*, v. 2, n. 10, p. e536–e544, 2021. Elsevier BV. Disponível em: [http://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00098-7](http://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00098-7).

GOGRY, F. A.; SIDDIQUI, M. T.; SULTAN, I.; HAQ, Q. M. R. Current update on intrinsic and acquired colistin resistance mechanisms in bacteria. *Frontiers in medicine*, v. 8, n. 677720, 2021. Frontiers Media SA. Disponível em: <http://doi.org/10.3389/fmed.2021.677720>.

GOMEZ-SIMMONDS, A.; ANNAVAJHALA, M. K.; WANG, Z.; et al. Genomic and geographic context for the evolution of high-risk carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* complex clones ST171 and ST78. *mBio*, v. 9, n. 3, 2018. Disponível em: <http://doi.org/10.1128/mBio.00542-18>.

GOODSWEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. A guide to current methodology and usage of reverse vaccinology towards in silico vaccine discovery. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 47, n. 2, fuad004, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/femsre/fuad004>.

GRIFFITH, E. C.; WALLACE, M. J.; WU, Y.; et al. The structural and functional basis for recurring sulfa drug resistance mutations in staphylococcus aureus dihydropteroate synthase. *Frontiers in microbiology*, v. 9, n. 1369, 2018. Frontiers Media SA. Disponível em: <http://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01369>.

GUAN, J.; LI, L.; ZHENG, L.; et al. First report of the colistin resistance gene mcr-10.1 carried by IncpA1763-KPC Plasmid pSL12517-mcr10.1 in *Enterobacter cloacae* in Sierra Leone. *Microbiology spectrum*, v. 10, n. 4, p. e0112722, 2022. American Society for Microbiology. Disponível em: <http://doi.org/10.1128/spectrum.01127-22>.

GUPTA, S. K.; PADMANABHAN, B. R.; DIENE, S. M. et al. ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 58, n. 1, p. 212–220, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.01310-13>.

GUPTA, S.; KAPOOR, P.; CHAUDHARY, K.; GAUTAM, A.; KUMAR, R.; RAGHAVA, G. P. S. In silico approach for predicting toxicity of peptides and proteins. *PLoS One*, v. 8, n. 9, e73957, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073957>.

HABIBA, T. U.; HUSSAIN, Z.; ASGHAR, F.; NAWAZ, W. Reverse vaccinology-based identification and in silico characterization of immunogenic membrane proteins of *Salmonella Typhimurium* as novel vaccine targets against multidrug-resistant infections. *BMC microbiology*, v. 25, n. 1, p. 542, 2025. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://doi.org/10.1186/s12866-025-04124-y>.

HAFIZ, T. A.; ALBLOSHI, A.; ALHUMAIDAN, O. S.; et al. The epidemiological pattern, resistance characteristics and clinical outcome of *Enterobacter cloacae*: Recent updates and impact of COVID-19 pandemic. *Healthcare (Basel, Switzerland)*, v. 11, n. 3, p. 312, 2023. MDPI AG. Disponível em: <http://doi.org/10.3390/healthcare11030312>.

HAIDER SALIH ABBAS, D.; SALIM SAAID TUWAIJ, N. Genetic detection of Resistance Genes among *Enterobacter cloacae* and *Citrobacter* spp. isolates. *BIO web of conferences*, v. 139, p. 06029, 2024. EDP Sciences. Disponível em: <http://doi.org/10.1051/bioconf/202413906029>.

HALLGREN, J.; TSIRIGOS, K. D.; PEDERSEN, M. D.; ALMAGRO ARMENTEROS, J. J.; MARCATILI, P.; NIELSEN, H.; KROGH, A.; WINTHER, O.

DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks. *bioRxiv*, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2022.04.08.487609>.

HARCUM, S.W.; HADDADIN, F.T. Global transcriptome response of recombinant *Escherichia coli* to heat-shock and dual heat-shock recombinant protein induction. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 33, n. 10, p. 801–814, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10295-006-0122-3>.

HASHEMPOUR, A.; KHODADAD, N.; AKBARINIA, S. et al. Reverse vaccinology approaches to design a potent multiepitope vaccine against the HIV whole genome: Immunoinformatic, bioinformatics, and molecular dynamics approaches. *BMC Infectious Diseases*, v. 24, 873, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12879-024-09775-2>.

HASSO-AGOPSOWICZ, M.; SPARROW, E.; CAMERON, A. M.; et al. The role of vaccines in reducing antimicrobial resistance: A review of potential impact of vaccines on AMR and insights across 16 vaccines and pathogens. *Vaccine*, v. 42, n. 19S1, p. S1–S8, 2024. Elsevier BV. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2024.06.017>.

HEO, L.; PARK, H.; SEOK, C. GalaxyRefine: Protein structure refinement driven by side-chain repacking. *Nucleic Acids Research*, v. 41, n. W1, p. W384–W388, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt458>.

HØIE, M.H.; KIEHL, E.N.; PETERSEN, B. et al. NetSurfP-3.0: Accurate and fast prediction of protein structural features by protein language models and deep learning. *Nucleic Acids Research*, v. 50, n. W1, p. W510–W515, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkac439>.

HUTTER, C.A.J.; LEHNER, R.; WIRTH, C.; CONDEMINE, G.; PENEFF, C.; SCHIRMER, T. Structure of the oligogalacturonate-specific KdgM porin. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, v. 70, n. 6, p. 1770–1778, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1107/S1399004714007147>.

INTRA, J.; CARCIONE, D.; SALA, R. M.; et al. Antimicrobial resistance patterns of *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella aerogenes* strains isolated from clinical specimens: A twenty-year surveillance study. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, v. 12, n. 4, 2023. Disponível em: <http://doi.org/10.3390/antibiotics12040775>.

IRFAN, M.; ALMOTIRI, A.; ALZEYADI, Z. A. Antimicrobial resistance and its drivers—A review. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), v. 11, n. 10, p. 1362, 2022. MDPI AG. Disponível em: <http://doi.org/10.3390/antibiotics11101362>.

ISLAM, S.I.; SANJIDA, S.; AHMED, S.S. et al. Core proteomics and immunoinformatic approaches to design a multiepitope reverse vaccine candidate against Chagas disease. *Vaccines*, v. 10, n. 10, 1669, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/vaccines10101669>.

ISMAIL, S.; AHMAD, S.; AZAM, S.S. Vaccinomics to design a novel single chimeric subunit vaccine for broad-spectrum immunological applications targeting nosocomial Enterobacteriaceae pathogens. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 146, 105258, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105258>.

JADHAV, A.; SHANMUGHAM, B.; RAJENDIRAN, A.; PAN, A. Unraveling novel broad-spectrum antibacterial targets in food and waterborne pathogens using comparative genomics and protein interaction network analysis. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 27, p. 300–308, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.08.007>.

JI, Y.; WANG, P.; XU, T.; et al. Development of a One-Step Multiplex PCR Assay for Differential Detection of Four species (*Enterobacter cloacae*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter roggkampii*, and *Enterobacter kobei*) Belonging to *Enterobacter cloacae* Complex With Clinical Significance. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 11, p. 677089, 2021. Frontiers Media SA. Disponível em: <http://doi.org/10.3389/fcimb.2021.677089>.

JIANG, J.; XU, L.; WANG, X. et al. A comprehensive strategy for the development of a multi-epitope vaccine targeting *Treponema pallidum*, utilizing heat shock proteins, encompassing the entire process from vaccine design to in vitro evaluation of immunogenicity. *Frontiers in Microbiology*, v. 16, 1551437, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1551437>.

JIN, M.S.; KIM, S.E.; HEO, J.Y. et al. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell*, v. 130, n. 6, p. 1071–1082, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.09.008>.

KAUSHIK, V.; JAIN, P.; AKHTAR, N. et al. Immunoinformatics-aided design and in vivo validation of a peptide-based multiepitope vaccine targeting canine circovirus. *ACS*

Pharmacology & Translational Science, v. 5, n. 8, p. 679–691, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsptsci.2c00130>.

KEŞMİR, C.; NUSSBAUM, A. K.; SCHILD, H.; DETOURS, V.; BRUNAK, S. Prediction of proteasome cleavage motifs by neural networks. *Protein engineering*, v. 15, n. 4, p. 287–296, 2002. Disponível em: <http://doi.org/10.1093/protein/15.4.287>.

KHALID, K.; POH, C. L. The promising potential of reverse vaccinology-based next-generation vaccine development over conventional vaccines against antibiotic-resistant bacteria. *Vaccines*, v. 11, n. 7, 2023. Disponível em: <http://doi.org/10.3390/vaccines11071264>.

KHAN, M.T.; MAHMUD, A.; ISLAM, M.M. et al. Multi-epitope vaccine against drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*: A proteome-wide subtraction and immunoinformatics approach. *Genomics & Informatics*, v. 21, n. 3, e42, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.5808/gi.23021>.

KHUNTAYAPORN, P.; THIRAPANMETHEE, K.; CHOMNAWANG, M. T. An update of mobile colistin resistance in non-fermentative Gram-negative bacilli. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 12, p. 882236, 2022. Frontiers Media SA. Disponível em: <http://doi.org/10.3389/fcimb.2022.882236>.

KINGWELL, K. Vaccines take a shot at antimicrobial resistance. *Nature reviews. Drug discovery*, v. 17, n. 4, p. 229–231, 2018. Disponível em: <http://doi.org/10.1038/nrd.2018.8>.

KNUDSEN, M.L.; JOHANSSON, D.X.; KOSTIC, L. et al. The adjuvant activity of alphavirus replicons is enhanced by incorporating the microbial molecule flagellin into the replicon. *PLoS One*, v. 8, n. 6, e65964, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065964>.

KOREA, C.-G.; BADOURALY, R.; PREVOST, M.-C.; GHIGO, J.-M.; BELOIN, C. *Escherichia coli* K-12 possesses multiple cryptic but functional chaperone-usher fimbriae with distinct surface specificities. *Environmental Microbiology*, v. 12, n. 7, p. 1957–1977, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02202.x>.

KOTB, D. N.; MAHDY, W. K.; MAHMOUD, M. S.; KHAIRY, R. M. M. Impact of co-existence of PMQR genes and QRDR mutations on fluoroquinolones resistance in Enterobacteriaceae strains isolated from community and hospital acquired UTIs. *BMC*

infectious diseases, v. 19, n. 1, 2019. Springer Science and Business Media LLC. Disponible em: <http://doi.org/10.1186/s12879-019-4606-y>.

KOTTARATHIL, A.; MURUGAN, G.; RAJKUMAR, D.S.; CHANDRAN, A.K.; ELUMALAI, V.; PADMANABAN, R. Designing multi-epitope-based vaccine targeting immunogenic proteins of *Streptococcus mutans* using immunoinformatics to prevent caries. *The Microbe*, v. 7, 100320, 2025. Disponible em: <https://doi.org/10.1016/j.microb.2025.100320>.

KOZAKOV, D.; HALL, D. R.; XIA, B. et al. The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nature Protocols*, v. 12, n. 2, p. 255–278, 2017. Disponible em: <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.169>.

KRAMMER, E.-M.; BRIDOT, C.; SERNA, S. et al. Structural insights into a cooperative switch between one and two FimH bacterial adhesins binding pauci- and high-mannose type N-glycan receptors. *Journal of Biological Chemistry*, v. 299, n. 5, 104627, 2023. Disponible em: <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.104627>.

LAMIABLE, A.; THÉVENET, P.; REY, J.; VAVRUSA, M.; DERREUMAUX, P.; TUFFÉRY, P. PEP-FOLD3: Faster de novo structure prediction for linear peptides in solution and in complex. *Nucleic Acids Research*, v. 44, n. W1, p. W449–W454, 2016. Disponible em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw329>.

LAND, M. et al. Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. *Functional & Integrative Genomics*, v. 15, n. 2, p. 141–161, 2015. Disponible em: <https://doi.org/10.1007/s10142-015-0433-4>.

LASKOWSKI, R.A.; HUTCHINSON, E.G.; MICHIE, A.D.; WALLACE, A.C.; JONES, M.L.; THORNTON, J.M. PDBsum: A Web-based database of summaries and analyses of all PDB structures. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 22, n. 12, p. 488–490, 1997. Disponible em: [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(97\)01140-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(97)01140-7).

LEE, S.J.; SHIN, S.J.; LEE, M.H. et al. A potential protein adjuvant derived from *Mycobacterium tuberculosis* Rv0652 enhances dendritic cells-based tumor immunotherapy. *PLoS One*, v. 9, n. 8, e104351, 2014. Disponible em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104351>.

LILIC, M.; JOVANOVIĆ, M.; JOVANOVIĆ, G.; SAVIĆ, D.J. Identification of the CysB-regulated gene, hslJ, related to the Escherichia coli novobiocin resistance phenotype. *FEMS Microbiology Letters*, v. 224, n. 2, p. 239–246, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00441-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00441-5).

LIMA, L. M.; SILVA, B. N. M. DA; BARBOSA, G.; BARREIRO, E. J.  $\beta$ -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *European journal of medicinal chemistry*, v. 208, n. 112829, p. 112829, 2020. Elsevier BV. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112829>.

LIU, B.; ZHENG, D.; ZHOU, S.; CHEN, L.; YANG, J. VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Research*, v. 50, n. D1, p. D912–D917, 2022a. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1107>.

LIU, S.; CHEN, L.; WANG, L.; et al. Cluster differences in antibiotic resistance, biofilm formation, mobility, and virulence of clinical Enterobacter cloacae complex. *Frontiers in microbiology*, v. 13, p. 814831, 2022b. Frontiers Media SA. Disponível em: <http://doi.org/10.3389/fmicb.2022.814831>.

LIU, S.; HUANG, N.; ZHOU, C.; et al. Molecular mechanisms and epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacter cloacae complex isolated from Chinese patients during 2004-2018. *Infection and drug resistance*, v. 14, p. 3647–3658, 2021. Informa UK Limited. Disponível em: <http://doi.org/10.2147/IDR.S327595>.

LOGAN, L. K.; WEINSTEIN, R. A. The epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: The impact and evolution of a global menace. *The journal of infectious diseases*, v. 215, n. suppl\_1, p. S28–S36, 2017. Disponível em: <http://doi.org/10.1093/infdis/jiw282>.

LÓPEZ-BLANCO, J. R.; ALIAGA, J. I.; QUINTANA-ORTÍ, E. S.; CHACÓN, P. iMODS: Internal coordinates normal mode analysis server. *Nucleic Acids Research*, v. 42, n. Web Server issue, p. W271–W276, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gku339>.

LÓPEZ-BLANCO, J.R.; GARZÓN, J.I.; CHACÓN, P. iMod: Multipurpose normal mode analysis in internal coordinates. *Bioinformatics*, v. 27, n. 20, p. 2843–2850, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr497>.

LÓPEZ-SILES, M.; CORRAL-LUGO, A.; MCCONNELL, M. J. Vaccines for multidrug resistant Gram negative bacteria: lessons from the past for guiding future success. *FEMS microbiology reviews*, v. 45, n. 3, 2021. Oxford University Press (OUP). Disponível em: <http://doi.org/10.1093/femsre/fuaa054>.

LORUSSO, A. B.; CARRARA, J. A.; BARROSO, C. D. N.; TUON, F. F.; FAORO, H. Role of Efflux Pumps on Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of molecular sciences*, v. 23, n. 24, p. 15779, 2022. MDPI AG. Disponível em: <http://doi.org/10.3390/ijms232415779>.

LUO, H.; LIN, Y.; GAO, F.; ZHANG, C.-T.; ZHANG, R. DEG 10, an update of the database of essential genes that includes both protein-coding genes and noncoding genomic elements. *Nucleic Acids Research*, v. 42, n. D1, p. D574–D580, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1131>.

LYYTINEN, O. L.; DAPULIGA, C.; WALLINGER, D.; et al. Three novel *Enterobacter cloacae* bacteriophages for therapeutic use from Ghanaian natural waters. *Archives of virology*, v. 169, n. 8, p. 156, 2024. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://doi.org/10.1007/s00705-024-06081-9>.

MA, J.; SONG, X.; LI, M.; et al. Global spread of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: Epidemiological features, resistance mechanisms, detection and therapy. *Microbiological research*, v. 266, n. 127249, p. 127249, 2023. Elsevier BV. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127249>.

MAGNAN, C.N.; RANDALL, A.; BALDI, P. SOLpro: Accurate sequence-based prediction of protein solubility. *Bioinformatics*, v. 25, n. 17, p. 2200–2207, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp386>.

MAHAPATRA, S. R.; DEY, J.; KAUR, T.; et al. Immunoinformatics and molecular docking studies reveal a novel Multi-Epitope peptide vaccine against pneumonia infection. *Vaccine*, v. 39, n. 42, p. 6221–6237, 2021. Elsevier BV. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.09.025>.

MATSUO, A.; MATSUMURA, Y.; MORI, K.; NOGUCHI, T.; YAMAMOTO, M.; NAGAO, M. Molecular epidemiology and  $\beta$ -lactam resistance mechanisms of *Enterobacter cloacae* complex isolates obtained from bloodstream infections, Kyoto, Japan. *Microbiology*

Spectrum, v. 13, n. 4, e02485-24, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/spectrum.02485-24>.

MELETIS, G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Therapeutic advances in infectious disease*, v. 3, n. 1, p. 15–21, 2016. SAGE Publications. Disponível em: <http://doi.org/10.1177/2049936115621709>.

MESSINA, N. L.; ZIMMERMANN, P.; CURTIS, N. The impact of vaccines on heterologous adaptive immunity. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 25, n. 12, p. 1484–1493, 2019. Elsevier BV. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.02.016>.

MICOLI, F.; BAGNOLI, F.; RAPPUOLI, R.; SERRUTO, D. The role of vaccines in combatting antimicrobial resistance. *Nature reviews. Microbiology*, v. 19, n. 5, p. 287–302, 2021. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://doi.org/10.1038/s41579-020-00506-3>.

MILLER, W. R.; ARIAS, C. A. ESKAPE pathogens: antimicrobial resistance, epidemiology, clinical impact and therapeutics. *Nature reviews. Microbiology*, v. 22, n. 10, p. 598–616, 2024. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://doi.org/10.1038/s41579-024-01054-w>.

MONDAL, A. H.; KHARE, K.; SAXENA, P.; et al. A review on colistin resistance: An antibiotic of last resort. *Microorganisms*, v. 12, n. 4, 2024. Disponível em: <http://doi.org/10.3390/microorganisms12040772>.

MOODLEY, A.; FATOBA, A.; OKPEKU, M.; CHILIZA, T. E.; SIMELANE, M. B. C.; POOE, O. J. Reverse vaccinology approach to design a multi-epitope vaccine construct based on the *Mycobacterium tuberculosis* biomarker PE\_PGRS17. *Immunologic Research*, v. 70, n. 4, p. 501–517, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12026-022-09284-x>.

MOREIRA DE GOUVEIA, M. I.; BERNALIER-DONADILLE, A.; JUBELIN, G. Enterobacteriaceae in the human gut: Dynamics and ecological roles in health and disease. *Biology*, v. 13, n. 3, p. 142, 2024. MDPI AG. Disponível em: <http://doi.org/10.3390/biology13030142>.

MORLA, S.; MAKHIJA, A.; KUMAR, S. Synonymous codon usage pattern in glycoprotein gene of rabies virus. *Gene*, v. 584, n. 1, p. 1–6, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.02.047>.

MUDGAL, B.; VERMA, D.; VENOGOPAL, D.; et al. Subtractive genomics approach: A guide to unveiling therapeutic targets across pathogens. *Journal of microbiological methods*, v. 232–234, n. 107127, p. 107127, 2025. Elsevier BV. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2025.107127>.

MURRAY, C. J. L.; IKUTA, K. S.; SHARARA, F.; et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*, v. 399, n. 10325, p. 629–655, 2022. Elsevier BV. Disponível em: [http://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)02724-0](http://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)02724-0).

MURSHALEEN, S.; SARFRAZ, A.; SHEHROZ, M. et al. Genome-level therapeutic targets identification and chimeric Vaccine designing against the *Blastomyces dermatitidis*. *Heliyon*, v. 10, n. 16, e36153, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e36153>.

MURTAZA, A.; AFZAL, H.; DOAN, T.D.; KE, G.M.; CHENG, L.T. Flagellin improves the immune response of an infectious bursal disease virus (IBDV) subunit vaccine. *Vaccines*, v. 10, n. 11, 1780, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/vaccines10111780>.

MUSTAFA, A.; IBRAHIM, M.; RASHEED, M. A.; et al. Genome-wide Analysis of Four *Enterobacter cloacae* complex type strains: Insights into Virulence and Niche Adaptation. *Scientific reports*, v. 10, n. 1, p. 8150, 2020. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65001-4>.

MUZZI, A. et al. Comparative genomics and reverse vaccinology. *Functional & Integrative Genomics*, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2007a. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10142-006-0028-1>.

MUZZI, A.; MASIGNANI, V.; RAPPUOLI, R. The pan-genome: towards a knowledge-based discovery of novel targets for vaccines and antibacterials. *Drug discovery today*, v. 12, n. 11–12, p. 429–439, 2007b. Elsevier BV. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.04.008>.

NAGHAVI, M.; VOLLSET, S. E.; IKUTA, K. S.; et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: a systematic analysis with forecasts to 2050. *Lancet*, v. 404, n. 10459, p. 1199–1226, 2024. Elsevier BV. Disponível em: [http://doi.org/10.1016/s0140-6736\(24\)01867-1](http://doi.org/10.1016/s0140-6736(24)01867-1).

NAKATA, S.; MORI, Y.; TANAKA, S. End-to-end protein-ligand complex structure generation with diffusion-based generative models. *BMC Bioinformatics*, v. 24, n. 1, 233, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12859-023-05354-5>.

NAZ, K.; NAZ, A.; ASHRAF, S. T.; et al. PanRV: Pangenome-reverse vaccinology approach for identifications of potential vaccine candidates in microbial pangenome. *BMC bioinformatics*, v. 20, n. 1, p. 123, 2019. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://doi.org/10.1186/s12859-019-2713-9>.

NEMPONT, C.; CAYET, D.; RUMBO, M.; BOMPARD, C.; VILLERET, V.; SIRARD, J.-C. Deletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity. *The Journal of Immunology*, v. 181, n. 3, p. 2036–2043, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.3.2036>.

NEU, H. C.; GOOTZ, T. D. Antimicrobial chemotherapy. *Medical Microbiology*, 1996. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7986/> Acesso em: 30/9/2025.

NIELSEN, M.; LUNDEGAARD, C.; LUND, O.; KEŞMIR, C. The role of the proteasome in generating cytotoxic T-cell epitopes: insights obtained from improved predictions of proteasomal cleavage. *Immunogenetics*, v. 57, n. 1–2, p. 33–41, 2005. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://doi.org/10.1007/s00251-005-0781-7>.

NOËL, A.; VASTRADE, C.; DUPONT, S.; et al. Nosocomial outbreak of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacter cloacae* among cardiothoracic surgical patients: causes and consequences. *The journal of hospital infection*, v. 102, n. 1, p. 54–60, 2019. Elsevier BV. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.jhin.2019.01.001>.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. , 2016. Disponível em: <http://doi.org/10.5555/20173071720>.

ORESANYA, Z.; ODESANYA, O.; OLANIYI, I.; AGBOJO, C.; ELEANYA, G.W.; KANMODI, R. A computational assessment of alkaloids targeting the plant homeodomain in *pygopus2*: Inhibitory potential and drug-like properties. *Advances in Medical, Pharmaceutical and Dental Research*, v. 4, n. 2, p. 97, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.21622/ampdr.2024.04.2.923>.

OSEI SEKYERE, J.; MMATLI, M.; BOSCH, A.; et al. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, and *Escherichia coli* outbreak among neonates in Tembisa hospital, South Africa. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 14, p. 1328123, 2024. Frontiers Media SA. Disponível em: <http://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1328123>.

OUASSIF, M.; BELAIDI, S.; CHTITA, S.; LANEZ, T.; ABUL QAIS, F.; MD AMIRUDDIN, H. Combined molecular docking and dynamics simulations studies of natural compounds as potent inhibitors against SARS-CoV-2 main protease. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, v. 40, n. 21, p. 11264–11273, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1957712>.

PAAUW, A.; CASPERS, M. P. M.; SCHUREN, F. H. J.; et al. Genomic diversity within the *Enterobacter cloacae* complex. *PloS one*, v. 3, n. 8, p. e3018, 2008. Public Library of Science (PLoS). Disponível em: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0003018>.

PAUL, S.; SIDNEY, J.; SETTE, A.; PETERS, B. TepiTool: A pipeline for computational prediction of T cell epitope candidates. *Current Protocols in Immunology*, v. 114, n. 1, p. 18.19.1-18.19.24, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cpim.12>.

PEIRANO, G.; PITOUT, J. D. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: update on molecular epidemiology and treatment options. *Drugs*, v. 79, n. 14, p. 1529-1541, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01180-3>.

PIZZA, M.; SCARLATO, V.; MASIGNANI, V.; et al. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science (New York, N.Y.)*, v. 287, n. 5459, p. 1816–1820, 2000. American Association for the Advancement of Science (AAAS). Disponível em: <http://doi.org/10.1126/science.287.5459.1816>.

POLLARD, A. J.; BIJKER, E. M. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nature reviews. Immunology*, v. 21, n. 2, p. 83–100, 2021. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://doi.org/10.1038/s41577-020-00479-7>.

POLLY, M.; DE ALMEIDA, B. L.; LENNON, R. P.; et al. Impact of the COVID-19 pandemic on the incidence of multidrug-resistant bacterial infections in an acute care hospital in Brazil. *American journal of infection control*, v. 50, n. 2, p. 238–239, 2022. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.ajic.2021.10.014>.

PONOMARENKO, J.; BUI, H.-H.; LI, W. et al. ElliPro: A new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. *BMC Bioinformatics*, v. 9, n. 1, 514, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-514>.

PRIYAMVADA, P.; RAMAIAH, S. Pan-genome and reverse vaccinology approaches to design multi-epitope vaccine against Epstein-Barr virus associated with colorectal cancer. *Immunologic Research*, v. 71, n. 6, p. 887–908, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12026-023-09403-2>.

PRIYAMVADA, P.; SWETHA, R.G.; DASGUPTA, R.; ANBARASU, A.; RAMAIAH, S. Immunoinformatics strategy for designing a multi-epitope chimeric vaccine to combat *Neisseria gonorrhoeae*. *Vacunas*, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vacun.2024.04.003>.

PUIGBÒ, P.; BRAVO, I. G.; GARCIA-VALLVÉ, S. CAIcal: A combined set of tools to assess codon usage adaptation. *Biology Direct*, v. 3, n. 1, 38, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1745-6150-3-38>.

QAMAR, T.U.M.; SHOKAT, Z.; MUNEER, I.; ASHFAQ, U.A.; JAVED, H.; ANWAR, F.; BARI, A.; ZAHID, B.; SAARI, N. Multiepitope-based subunit vaccine design and evaluation against respiratory syncytial virus using reverse vaccinology approach. *Vaccines*, v. 8, n. 2, 288, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/vaccines8020288>.

RAPIN, N.; LUND, O.; BERNASCHI, M.; CASTIGLIONE, F. Computational immunology meets bioinformatics: The use of prediction tools for molecular binding in the simulation of the immune system. *PLoS One*, v. 5, n. 4, e9862, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009862>.

REARDON, S. WHO warns against “post-antibiotic” era. *Nature*, 2014. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://doi.org/10.1038/nature.2014.15135>.

RIGSBY, R. E.; PARKER, A. B. Using the PyMOL application to reinforce visual understanding of protein structure. *Biochemistry and molecular biology education: a bimonthly publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, v. 44, n. 5, p. 433–437, 2016. Wiley. Disponível em: <http://doi.org/10.1002/bmb.20966>.

RODRIGUES, C. et al. Emergence of colistin resistance in *Enterobacter cloacae* complex: epidemiology and clinical significance. *Microorganisms*, v. 10, n. 1, p. 55, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010055>.

ROY, A.; KUCUKURAL, A.; ZHANG, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature protocols*, v. 5, n. 4, p. 725–738, 2010. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://doi.org/10.1038/nprot.2010.5>.

ROY, A.; SWETHA, R.G.; BASU, S.; BISWAS, R.; RAMAIAH, S.; ANBARASU, A. Integrating pan-genome and reverse vaccinology to design multi-epitope vaccine against Herpes simplex virus type-1. *3 Biotech*, v. 14, n. 7, 176, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13205-024-04022-6>.

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

SALAHLOU, R.; FARAJNIA, S.; BARGHI, N. et al. Development of a novel multi-epitope vaccine against the pathogenic human polyomavirus V6/7 using reverse vaccinology. *BMC Infectious Diseases*, v. 24, n. 1, 177, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12879-024-09046-0>.

SLEUTEL, M.; PRADHAN, B.; VOLKOV, A. N.; REMAUT, H. Structural analysis and architectural principles of the bacterial amyloid curli. *Nature communications*, v. 14, n. 1, p. 2822, 2023. Disponível em: <http://doi.org/10.1038/s41467-023-38204-2>.

SANCHES, R.C.O.; TIWARI, S.; FERREIRA, L.C.G. et al. Immunoinformatics design of multi-epitope peptide-based vaccine against *Schistosoma mansoni* using transmembrane

proteins as a target. *Frontiers in Immunology*, v. 12, 621706, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.621706>.

SARFRAZ, A.; QURAT-UL-AIN FATIMA, S.; SHEHROZ, M. et al. Decrypting the multi-genome data for chimeric vaccine designing against the antibiotic resistant *Yersinia pestis*. *International Immunopharmacology*, v. 132, 111952, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2024.111952>.

SARKAR, B.; ULLAH, M. A. Designing novel subunit vaccines against herpes simplex virus-1 using reverse vaccinology approach. *bioRxiv*, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2020.01.10.901678>.

SARVMEILI, J.; BAGHBAN KOHNEHROUZ, B.; GHOLIZADEH, A.; SHANEHANDI, D.; OFOGHI, H. Author Correction: Immunoinformatics design of a structural proteins driven multi-epitope candidate vaccine against different SARS-CoV-2 variants based on fynomer. *Scientific Reports*, v. 14, n. 1, 30524, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-82829-2>.

SAVOJARDO, C.; MANFREDI, M.; MARTELLI, P.L.; CASADIO, R. Solvent accessibility of residues undergoing pathogenic variations in humans: From protein structures to protein sequences. *Frontiers in Molecular Biosciences*, v. 7, 626363, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.626363>.

SAVOJARDO, C.; MARTELLI, P.L.; FARISELLI, P.; PROFITI, G.; CASADIO, R. BUSCA: an integrative web server to predict subcellular localization of proteins. *Nucleic Acids Research*, v. 46, n. W1, p. W459–W466, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gky320>.

SHAH, M.; ANWAR, A.; QASIM, A. et al. Proteome level analysis of drug-resistant *Prevotella melaninogenica* for the identification of novel therapeutic candidates. *Frontiers in Microbiology*, v. 14, 1271798, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1271798>.

SHAH, M.; SITARA, F.; SARFRAZ, A. et al. Development of a subunit vaccine against the cholangiocarcinoma causing *Opisthorchis viverrini*: a computational approach. *Frontiers in Immunology*, v. 15, 1281544, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1281544>.

SI, Z.; ZHAO, S.; HAO, Y.; et al. Colistin resistance mechanisms and molecular epidemiology of *Enterobacter cloacae* complex isolated from a tertiary hospital in Shandong, China. *Infection and drug resistance*, v. 17, p. 3723–3735, 2024. Informa UK Limited. Disponível em: <http://doi.org/10.2147/IDR.S473580>.

SINGH, A. K.; BHUNIA, A. K. Optical scatter patterns facilitate rapid differentiation of *Enterobacteriaceae* on CHROMagar™ Orientation medium. *Microbial biotechnology*, v. 9, n. 1, p. 127–135, 2016. Wiley. Disponível em: <http://doi.org/10.1111/1751-7915.12323>.

SINGH, H.; ANSARI, H. R.; RAGHAVA, G. P. S. Improved method for linear B-cell epitope prediction using antigen's primary sequence. *PLoS One*, v. 8, n. 5, e62216, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062216>.

SINGH, N. K.; BEZDAN, D.; CHECINSKA SIELAFF, A.; et al. Multi-drug resistant *Enterobacter bugandensis* species isolated from the International Space Station and comparative genomic analyses with human pathogenic strains. *BMC microbiology*, v. 18, n. 1, p. 175, 2018. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://doi.org/10.1186/s12866-018-1325-2>.

SOLANKI, V.; TIWARI, M.; TIWARI, V. Prioritization of potential vaccine targets using comparative proteomics and designing of the chimeric multi-epitope vaccine against *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, 5240, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41496-4>.

SONG, J.; LI, F.; LEIER, A. et al. PROSPERous: High-throughput prediction of substrate cleavage sites for 90 proteases with improved accuracy. *Bioinformatics*, v. 34, n. 4, p. 684–687, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx670>.

STRANZL, T.; LARSEN, M. V.; LUNDEGAARD, C.; NIELSEN, M. NetCTLpan: Pan-specific MHC class I pathway epitope predictions. *Immunogenetics*, v. 62, n. 6, p. 357–368, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00251-010-0441-4>.

SULTAN, I.; RAHMAN, S.; JAN, A. T.; et al. Antibiotics, resistome and resistance mechanisms: A bacterial perspective. *Frontiers in microbiology*, v. 9, n. 2066, 2018. Frontiers Media SA. Disponível em: <http://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02066>.

SUMBANA, J.; SANTONA, A.; FIAMMA, M.; et al. Polyclonal emergence of MDR *Enterobacter cloacae* complex isolates producing multiple extended spectrum beta-lactamases at Maputo Central Hospital, Mozambique. *Rendiconti lincei. Scienze fisiche e naturali*, v. 33, n. 1, p. 39–45, 2022. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://doi.org/10.1007/s12210-021-01039-4>.

SWETHA, R.G.; BASU, S.; RAMAIAH, S.; ANBARASU, A. Multi-epitope vaccine for monkeypox using pan-genome and reverse vaccinology approaches. *Viruses*, v. 14, n. 11, 2504, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v14112504>.

TAGLIABUE, A.; RAPPUOLI, R. Changing priorities in vaccinology: Antibiotic resistance moving to the top. *Frontiers in immunology*, v. 9, p. 1068, 2018. Disponível em: <http://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01068>.

TANG, K. W. K.; MILLAR, B. C.; MOORE, J. E. Antimicrobial resistance (AMR). *British journal of biomedical science*, v. 80, p. 11387, 2023. Disponível em: <http://doi.org/10.3389/bjbs.2023.11387>.

TATUSOVA, T. et al. Update on RefSeq microbial genomes resources. *Nucleic Acids Research*, v. 43, n. Database issue, p. D599–D605, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gku1062>.

TEUFEL, F.; ALMAGRO ARMENTEROS, J. J.; JOHANSEN, A. R. et al. SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. *Nature Biotechnology*, v. 40, n. 7, p. 1023–1025, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01156-3>.

UDDIN, T. M.; CHAKRABORTY, A. J.; KHUSRO, A.; et al. Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *Journal of infection and public health*, v. 14, n. 12, p. 1750–1766, 2021. Elsevier BV. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.020>.

VAN DUIN, D.; MOHANTY, S.; THOMAS, V. et al. Age-associated defect in human TLR-1/2 function. *The Journal of Immunology*, v. 178, n. 2, p. 970–975, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.2.970>.

VENKATESAN, M.; FRUCI, M.; VERELLEN, L. A.; et al. Molecular mechanism of plasmid-borne resistance to sulfonamide antibiotics. *Nature communications*, v. 14, n. 1, p. 4031, 2023. Disponível em: <http://doi.org/10.1038/s41467-023-39778-7>.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T: a peer-reviewed journal for formulary management*, v. 40, n. 4, p. 277–283, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25859123>.

VILELA RODRIGUES, T. C. et al. Subtractive genomics for vaccine target identification. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 68, p. 203–211, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.07.006>.

WANG, P.; SIDNEY, J.; KIM, Y.; et al. Peptide binding predictions for HLA DR, DP and DQ molecules. *BMC bioinformatics*, v. 11, n. 1, p. 568, 2010. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://doi.org/10.1186/1471-2105-11-568>.

WEI, C.; WU, J.; ZHANG, J.; et al. Clinical characteristics, molecular epidemiology and mechanisms of colistin heteroresistance in *Enterobacter cloacae* complex. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 15, p. 1536058, 2025. Frontiers Media SA. Disponível em: <http://doi.org/10.3389/fcimb.2025.1536058>.

WENG, G.; WANG, E.; WANG, Z. et al. HawkDock: A web server to predict and analyze the protein-protein complex based on computational docking and MM/GBSA. *Nucleic Acids Research*, v. 47, n. W1, p. W322–W330, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz397>.

WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M.J. ProSA-web: Interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research*, v. 35, p. W407–W410, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkm290>.

WILKINS, M. R.; GASTEIGER, E.; BAIROCH, A.; SANCHEZ, J.-C.; WILLIAMS, K. L.; APPEL, R. D.; HOCHSTRASSER, D. F. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. In: LINK, A. J. (Ed.). *2-D Proteome Analysis Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, 2005. p. 531–552. (Methods in Molecular Biology, v. 112). Disponível em: <https://doi.org/10.1385/1-59259-584-7:531>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antimicrobial resistance global report on surveillance : 2014 summary. WHO, 2014 .Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-HSE-PED-AIP-2014.2>Acesso em: 27/9/2025b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. Geneva: WHO, 2024. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Geneva: WHO, 2017. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.

WUTOR, B. M.; ADEFILA, W. O.; LAMIN, K. M.; et al. Community-acquired multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* sepsis in a 25-month-old child in rural Gambia: A case report. *IDCases*, v. 37, n. e02018, p. e02018, 2024. Elsevier BV. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.idcr.2024.e02018>.

XEDZRO, C.; SHIMAMOTO, TOSHI; YU, L.; et al. Emergence of colistin-resistant *Enterobacter cloacae* and *Raoultella ornithinolytica* carrying the phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-9*, derived from vegetables in Japan. *Microbiology spectrum*, v. 11, n. 6, p. e0106323, 2023. American Society for Microbiology. Disponível em: <http://doi.org/10.1128/spectrum.01063-23>.

XUE, L. C.; RODRIGUES, J. P.; KASTRITIS, P. L.; BONVIN, A. M.; VANGONE, A. PRODIGY: a web server for predicting the binding affinity of protein-protein complexes. *Bioinformatics*, v. 32, n. 23, p. 3676–3678, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw514>.

YAIKHAN, T.; SINGKHAMANAN, K.; LUENGLUSONTIGIT, P.; et al. Genomic analysis of *Enterobacter cloacae* complex from Southern Thailand reveals insights into multidrug resistance genotypes and genetic diversity. *Scientific reports*, v. 15, n. 1, p. 4670, 2025. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://doi.org/10.1038/s41598-024-81595-5>.

YAN, Y.; ZHANG, D.; ZHOU, P.; LI, B.; HUANG, S.-Y. HDock: A web server for protein-protein and protein-DNA/RNA docking based on a hybrid strategy. *Nucleic Acids Research*, v. 45, n. W1, p. W365–W373, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkx407>.

YAP, K. P.; THONG, K. L. Genome-based vaccine design for bacterial pathogens. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, v. 15, p. 243–248, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2017.01.004>.

YOUSAF, H.; NAZ, A.; ZAMAN, N. et al. Immunoinformatic and reverse vaccinology-based designing of potent multi-epitope vaccine against Marburgvirus targeting the glycoprotein. *Heliyon*, v. 9, n. 8, e18059, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18059>.

YOUSAFI, Q.; AMIN, H.; BIBI, S. et al. Subtractive proteomics and immunoinformatics approaches for multi-peptide vaccine prediction against *Klebsiella oxytoca* and validation through in silico expression. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, v. 27, n. 4, p. 2685–2701, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10989-021-10283-z>.

YU, N. Y.; WAGNER, J. R.; LAIRD, M. R.; MELLI, G.; REY, S.; LO, R.; DAO, P.; SAHINALP, S. C.; ESTER, M.; FOSTER, L. J.; BRINKMAN, F. S. L. PSORTb 3.0: Improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics*, v. 26, n. 13, p. 1608–1615, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq249>.

ZHANG, X.; WU, F.; YANG, N. et al. In silico methods for identification of potential therapeutic targets. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*, v. 14, n. 2, p. 285–310, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12539-021-00491-y>.

ZHOU, H.-X.; PANG, X. Electrostatic interactions in protein structure, folding, binding, and condensation. *Chemical Reviews*, v. 118, n. 4, p. 1691–1741, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00305>.

ZHU, F.; QIN, R.; MA, S.; et al. Designing a multi-epitope vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* via integrating reverse vaccinology with immunoinformatics

approaches. *Scientific reports*, v. 15, n. 1, p. 10425, 2025. Disponível em:  
<http://doi.org/10.1038/s41598-025-90226-6>.

## 8. ANEXO 1

Journal of Genetic Engineering and Biotechnology 23 (2025) 100519



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Genetic Engineering and Biotechnology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jgeb](http://www.elsevier.com/locate/jgeb)

## Alternative therapeutic approaches for combating multi-drug-resistant bacteria: Reverse vaccinology against *Enterobacter cloacae*<sup>☆</sup>

Gabriela Guerrero Soares<sup>a,1</sup>, Marcelo Silva Folhas Damas<sup>a,1</sup>, Pedro Mendes Laprega<sup>a,b</sup>,  
 Rebecca Elizabeth Shilling<sup>a,b</sup>, Eduarda Oliva Ribeiro Rangel<sup>a</sup>, Louise Teixeira Cerdeira<sup>b</sup>,  
 Murillo Rodrigo Petrucelli Homem<sup>c</sup>, André Pitondo-Silva<sup>d</sup>, Andrea Soares da Costa-Fuentes<sup>a</sup>,  
 Maria-Cristina da Silva Pranchevicius<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brazil

<sup>b</sup> Department of Vector Biology, Liverpool School of Tropical Medicine, Liverpool, United Kingdom

<sup>c</sup> Departamento de Computação, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brazil

<sup>d</sup> Programa de Pós-graduação em Odontologia e Tecnologia Ambiental, Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, Brazil

### ARTICLE INFO









#### Keywords:

*Enterobacter cloacae*  
 Multi-epitope vaccine  
 Reverse vaccinology  
 Subtractive proteomics

### ABSTRACT

*Enterobacter cloacae* is a clinically significant opportunistic and multidrug-resistant bacterium that causes a range of hospital-acquired infections, particularly in intensive care units. However, studies on vaccine development have been limited, and no vaccine currently protects against *E. cloacae*. Here, we employed subtractive proteomics, reverse vaccinology, and immunoinformatic approaches to design a multi-epitope-based vaccine targeting *E. cloacae*. Analysis of 21 complete *E. cloacae* genomes associated with human infections revealed 1,352 proteins linked to essentiality, resistance, and/or virulence, 39 of which were non-human and non-gut homologs. From this refined selection, 9 were found to be antigenic, extracellular, or exported to the outer membrane and used to construct 4 multi-epitope vaccines (VEC1-4) containing antigenic (threshold of  $\geq 0.5$ ), non-allergenic, conserved, hydrophilic (GRAVY  $< 0$ ), exposed, and non-toxic epitopes. They were all processed and presented through the MHC class pathway, while also showing high population coverage. VEC1 showed the most consistent performance, with the highest average binding affinity ( $-24.07$  kcal/mol), docking score ( $-322.21$ ), and the most favorable dissociation constant at  $37^\circ\text{C}$ . VEC1 was shown to be conformationally stable, with a secondary structure predominantly made up of alpha-helices and coils. The *in silico* analysis suggested that VEC1 can be efficiently expressed in an *E. coli* system, and it is currently awaiting *in vivo* testing to confirm its precise efficacy, safety, and immunogenicity. These findings provide valuable insights for developing novel approaches to prevent and control the spread of multidrug-resistant bacteria.

## 9. ANEXO 2

<b>Manuscript #</b>	Spectrum02833-25
<b>Current Revision #</b>	0
<b>Submission Date</b>	2025-09-08 15:21:34
<b>Current Stage</b>	Under Peer Review
<b>Title</b>	Heteroresistance to amikacin in <i>Klebsiella aerogenes</i> isolates from patients in an intensive care unit in Brazil
<b>Manuscript Type</b>	Research Article
<b>Special Section</b>	N/A
<b>Corresponding Author</b>	Maria Cristina da Silva Pranchevicius (Universidade Federal de São Carlos)
<b>Contributing Authors</b>	Natália Ribeiro Crispim , Gustavo Dantas Nunes , Gabriela Guerra Soares , Rebecca Elizabeth Shilling , Roumayne Lopes Ferreira , Leslie Camelo Campos , Olinda Soares Athaide Alcobaça , João Pedro Maia de Oliveira Silva , Saulo Henrique Rodrigues , Dr. Andre Pitondo-Silva , Andrea Soares da Costa Fuentes , Anderson Ferreira da Cunha , Robert J. Mitchell , Maria Cristina da Silva Pranchevicius (corr-auth)
<b>Abstract</b>	Heteroresistance is defined by the presence of subpopulations within a bacterial isolate that exhibit greater antibiotic resistance than the dominant population. In this study, we investigated amikacin heteroresistance in the opportunistic, nosocomial pathogen <i>Klebsiella aerogenes</i> (AHR-KA). Eight carbapenemase-resistant, but amikacin-susceptible, isolates from intensive care units of a Brazilian hospital were analyzed. Population analysis profiling identified five amikacin heteroresistant isolates (AHR-KA-1 to 5), with subpopulation frequencies ranging from $1.83 \times 10^{-7}$ to $6.01 \times 10^{-6}$ . Among these, only AHR-KA-1 exhibited stable heteroresistance following serial passaging in antibiotic-free media. AHR-KA-1 demonstrated only slightly reduced growth rates when compared with those of the unstable AHR-KAs, parental and control strains, suggesting no significant fitness cost associated with drug resistance. Time-kill assays for AHR-KA-1 showed an initial decline in cell viabilities followed by regrowth at both 4X and 8X MIC. The draft genome of the stable isolate had a total length and G+C content similar to most of the sequenced genomes from <i>K. aerogenes</i> . Notably, AHR-KA-1's <i>aac(6')-Ib-cr</i> variant contained D179Y and R102W mutations, conferring amikacin resistance. Moreover, quantitative reverse transcription PCR revealed significantly elevated expression of the <i>aac(6')-Ib-cr</i> gene in AHR-KA-1 before amikacin-free passage, compared to both the parental strain and the AHR-KA-1 strain after drug-free passage. These findings provide valuable insights into stable amikacin heteroresistance in <i>K. aerogenes</i> along with the need for vigilant detection, surveillance and strategies to manage the spread of heteroresistant pathogens and to prevent therapeutic failure. <i>Klebsiella aerogenes</i> , an opportunistic human pathogen, is frequently implicated in severe and invasive infections, particularly in immunocompromised individuals. The growing prevalence of antibiotic resistance among these strains poses a significant therapeutic challenge. The phenomenon of heteroresistance further complicates management, potentially leading to diagnostic difficulties due to the lack of standardized detection methods and subsequent treatment failures. Our studies identified and characterized <i>Klebsiella aerogenes</i> strains heteroresistant to amikacin, isolated from patients in an intensive care unit. Such data can serve as a foundational reference for understanding the clinical relevance, genomic variability, and pathogenic potential of <i>Klebsiella aerogenes</i> heteroresistance to antibiotics used in clinical settings.
<b>Importance</b>	
<b>Editor</b>	<a href="#">Dr. Sandeep Tamber</a>
<b>Suggested Reviewers to Include</b>	Zackery Bulman (University of Illinois at Chicago), Yingshun Zhou (Southwest Medical University), Lili Chen (University of South China), Ewa Laskowska (Uniwersytet Gdanski)
<b>Suggested Reviewers to Exclude</b>	N/A
<b>Keywords</b>	Amikacin, Whole-Genome Sequencing, Heteroresistance, <i>Klebsiella aerogenes</i>
<b>Research Areas</b>	Antimicrobial Chemotherapy, Clinical Microbiology, Bacteriology
<b>Editor Subject Areas</b>	Antimicrobial Resistance
<b>PubMed Similar Manuscripts</b>	<a href="#">(expand)</a>
<b>Conflict of Interest</b>	No conflict of interest.
<b>Preprint Server</b>	No
<b>Biorxiv Preprint</b>	No
<b>Funding Sources</b>	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)  : FAPESP fellowship 2021/08423-4 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)  : FAPESP fellowship 2022/12429-0 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)  : FAPESP fellowship 2023/08917-2 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)  : FAPESP fellowship 2023/14763-8 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)  : FAPESP grant 2020/11964-4 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)  : FAPESP grant 2022/16872-6 Korea National Institute of Health  : Grant No. 2023ER210800 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)  : CAPES fellowship Finance code 001

10. ANEXO 3



Future Microbiology

**Klebsiella oxytoca: an opportunistic bacterial pathogen that poses challenges for treatment and vaccine development.**

<b>Submission ID</b>	256555697
<b>Article Type</b>	Review
<b>Keywords</b>	Klebsiella oxytoca, Vaccine, Antimicrobial Resistance, opportunistic bacterial pathogen, Therapeutic Options
<b>Authors</b>	Gabriela Guimaraes Soares, Maria Carolina Franco de Sá, Marlene Silva Farias Damas, Natália Ribeiro Crispim, Andrea Soares da Costa Fuentes, Maria Cristina da Silva Franchevicius



Hi, Maria Cris...

[SUBMIT NEW MANUSCRIPT](#)

### My Articles

SUBMISSION	TITLE	JOURNAL	STATUS	CHARGES
256555697	Klebsiella oxytoca: an opportunistic bacteri...	Future Microbiology	Out for Review	

**1 SUBMISSION** ▾

---

**2 PEER REVIEW** ▲

11 August 2025
With Editor

29 August 2025
Out for Review

[VIEW PDF](#)
[CONTACT](#)

|