

Escola Superior de Ensino do Instituto Butantan
Programa de Pós-graduação *Lato Sensu*
Biotecnologia para a saúde: Vacinas e Biofármacos

Mayrielle da Silva Machado

**Identificação de peptídeos potenciais candidatos para desenvolvimento
de vacina contra Leptospirose**

São Paulo
2023

Mayriele da Silva Machado

**Identificação de peptídeos potenciais candidatos para desenvolvimento de
vacina contra Leptospirose**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Biotecnologia para a saúde: Vacinas e Biofármacos do Programa de Pós-graduação *Lato Sensu* da Escola Superior do Instituto Butantan como requisito básico para a obtenção do título de Especialista em Biotecnologia.

Orientador (a): Dra. Josefa Bezerra da Silva

São Paulo

2023

**Catálogo na Publicação
Instituto Butantan
Dados inseridos pelo(a) aluno(a)**

Machado, Mayriele da Silva

Identificação de peptídeos potenciais candidatos para desenvolvimento de vacina contra Leptospirose / Mayriele da Silva Machado ; orientador(a) Josefa Bezerra da Silva - São Paulo, 2023.

38 p. : il.

Monografia (Especialização) - Escola Superior do Instituto Butantan, Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos.

1. Epitopos 2. Leptospira. 3. Peptídeos. 4. Vacina I. Silva, Josefa Bezerra da. II. Escola Superior do Instituto Butantan. III. Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos. IV. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela equipe da Biblioteca do Instituto Butantan

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Mayrielle da Silva Machado, aluno(a) do Curso de Especialização em Biotecnologia para a Saúde: Vacinas e Biofármacos, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- Imediato
- 06 meses
- 12 meses
- Outro prazo _____ Justifique:

São Paulo, 17 de janeiro de 2023.



aluno(a)

De acordo 
Orientador(a): Dra. Josefa Bezerra da Silva

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Cesar e Darci, ao meu irmão Kleber, à minha sobrinha Ingrid e à minha cunhada Danielle, pelo amor, carinho e apoio fundamentais para a minha formação.

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Josefa Bezerra da Silva.

Aos colegas do laboratório de Bacteriologia, Cassia Moreira, Daniella Courrol, Luan Gavião e Matilde Costa, muito obrigada por todo apoio, carinho e respeito que me ofereceram, vocês são pessoas maravilhosas!

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

Ao suporte financeiro da FAPESP (processo 2017/20903-6), Secretaria de Estado da Saúde, Instituto Butantan e Fundação Butantan.

RESUMO

MACHADO, Mayrielle da Silva. **Identificação de peptídeos potenciais candidatos para o desenvolvimento de vacina contra Leptospirose**. 2023. 38 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Biotecnologia) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

A leptospirose é causada por bactérias do gênero *Leptospira*. Anualmente são relatados mais de 500.000 casos graves, apresentando uma taxa de mortalidade superior a 10%. A infecção em humanos geralmente ocorre por contato direto ou indireto com a urina de animais portadores. Os humanos são hospedeiros acidentais e podem ter manifestações assintomáticas até condições graves evoluindo para óbito. Condições climáticas como chuvas intensas e condições sociais como áreas sem serviços sanitários, favorecem a incidência e disseminação da leptospirose. O gênero *Leptospira* alberga grande variedade de sorovares dificultando o desenvolvimento de uma vacina eficiente e diagnóstico precoce, e conseqüentemente o controle da doença. O presente estudo visa desenhar e identificar peptídeos de proteínas de *Leptospira* com potencial imunogênico e com capacidade de reconhecimento por anticorpos presentes em soros de pacientes diagnosticados com leptospirose. Para isso, cinco peptídeos foram desenhados e analisados *in silício* e por técnica de Dot-blot. Os resultados demonstraram a capacidade de reconhecimento dos cinco peptídeos testados frente às amostras de soro humano. Nesse estudo o uso da imunoinformática foi importante para auxiliar na escolha dos peptídeos, otimizando o tempo e diminuindo gastos financeiros. A técnica Dot-blot se mostrou eficaz para analisar o reconhecimento dos peptídeos de proteínas de *Leptospira* por anticorpos presentes nas amostras de soros analisadas. A identificação de peptídeos que sejam reconhecidos por anticorpos, é uma abordagem promissora para o desenvolvimento de vacinas e método de diagnóstico para a leptospirose.

Palavras-chave: Peptídeos. Epitopos. Vacinas. *Leptospira*. Leptospirose. Dot-blot.

ABSTRACT

MACHADO, Mayrielle da Silva. **Identification of potential candidates peptides for leptospirosis vaccine**. 2023. 38 p. Monograph (Specialist in Biotechnology) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

Leptospirosis is caused by bacteria of the genus *Leptospira*. More than 500,000 severe cases are reported annually, with a mortality rate of over 10%. Infection in humans usually occurs through direct or indirect contact with the urine of carrier animals. Reservoir animals do not present clinical signs of the acute disease, but renal colonization by *Leptospira* is frequent. Leptospirosis affects populations in both urban and rural areas, especially in tropical and subtropical climates areas. Conditions such as heavy rainfall and areas without sanitary services, favor the incidence and spread of leptospirosis. Humans are accidental hosts and may have asymptomatic manifestations or severe disease leading to death. The *Leptospira* genus harbors a wide variety of serovars, hindering the development of vaccine and early diagnosis, and consequently the control of the disease. The aim of this study was to identify *Leptospira* protein peptides conserved with immunogenic potential and capacity for recognition by antibodies present in human sera from diagnosed patients with leptospirosis. For this, five peptides were designed and selected *in silico* and analyzed by Dot-blot technique. The results demonstrated the five peptides were recognized by antibodies from human serum. The Pep 9 was recognized by two sera samples. In this study, the immunoinformatics tools were important to help in the peptides screening, and optimizing time and reducing financial expenses. The Dot-blot technique indicate to be effective for testing the recognition of epitopes that may induce an immune system response. The identification of peptides that are recognized by antibodies is a promising approach for the development of vaccines and diagnostic method for leptospirosis.

Keywords: Peptides. Epitopes. Vaccines. *Leptospira*. Leptospirosis. Dot-blot.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Leptospirose	15
1.2 Classificação e biologia da <i>Leptospira</i>	15
1.3 Aspectos epidemiológicos	16
1.4 Manifestações Clínicas.....	17
1.5 Importância da Vacinação	17
1.6 Vacinas baseadas em peptídeos.....	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 Geral.....	20
2.2 Específicos	20
3 METODOLOGIA	21
3.1 Busca de proteínas e seleção dos peptídeos	21
3.2 Afinidade dos peptídeos ao complexo MHC I e MHC II	21
3.3 Identificação de regiões conservadas em proteínas de <i>Leptospira</i> contendo as sequências dos aminoácidos dos peptídeos analisados	22
3.4 Reconhecimento dos peptídeos de proteínas de <i>Leptospira</i> por anticorpos humanos.....	22
4 RESULTADOS	24
4.1 Análise “in silico”	24
4.2 Análise dos peptídeos em interação com MHC I e MHC II	26
4.3 Identificação <i>in silico</i> de sequências de aminoácidos dos peptídeos conservadas em proteínas de diferentes espécies de <i>Leptospira</i>	27
4.4 Interação entre peptídeos e anticorpos anti-leptospira em amostras de soro humano.....	28
5 DISCUSSÃO	30

6 CONCLUSÕES.....	33
REFERÊNCIAS	34
APÊNDICE(S).....	37

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leptospirose

A leptospirose é uma doença de importância mundial que afeta humanos e animais. É causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*. Mais de um milhão de casos de leptospirose grave e cerca de 60.000 mortes são relatadas anualmente (COSTA *et al.*, 2015; PICARDEAU, 2017).

A falta de diagnóstico precoce e a indisponibilidade de vacinas capazes de induzir proteção cruzada contra vários sorovares é um grande obstáculo no controle da infecção (KUMAR; VARMA; FAISAL, 2022).

Essa doença está presente em áreas de climas subtropicais e tropicais, em zonas rurais e urbanas, apresentando grande impacto na saúde pública e também na saúde animal. A incidência e a distribuição da leptospirose são favorecidas por diferentes condições climáticas como, por exemplo, chuvas intensas e condições sociais precárias tais como: escassez de serviços sanitários e aglomerações populacionais (PICARDEAU, 2013). Os humanos geralmente são infectados de forma direta ou indiretamente por contato com a urina ou fluídos corporais de animais portadores, solos, água ou alimentos contaminados (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; ELLIS, 2015). A transmissão também pode ocorrer em atividades ocupacionais, em ambientes domésticos ou recreativos (ELLIS, 2015). O microrganismo penetra através da pele com lesões, pele íntegra quando imersa em água por longo tempo ou através de mucosas (MACHADO *et al.*, 2018).

1.2 Classificação e biologia da *Leptospira*

As bactérias do gênero *Leptospira* contêm mais de 300 sorovares patogênicos, os quais são definidos conforme a heterogeneidade estrutural no componente carboidrato do lipopolissacarídeo exposto a superfície (LPS) (MACHADO *et al.*, 2018; MARTELI *et al.*, 2020; VINCENT *et al.*, 2019).

São conhecidas dez espécies patogênicas do gênero *Leptospira*, cinco espécies intermediárias e sete saprófitas (MARTELI *et al.*, 2020). Das espécies patogênicas, sete constituem os principais agentes da leptospirose humana e

animal, as quais são: *L. interrogans*, *L.borgpetersenii*, *L.santarosai*, *L.weilli*, *L.kirschneri*, *L.alexanderi* e *L.noguchii* (EVANGELISTA; COBURN, 2010).

As leptospirosas são espiroquetas finas e helicoidais, medem aproximadamente 6 a 20 μm (figura 1). Apresentam as extremidades em forma de gancho, o que lhes dá a forma de um ponto de interrogação (EVANGELISTA; COBURN, 2010). A motilidade delas deve-se à rotação dos flagelos axiais inseridos em seus extremos (PICARDEAU, 2013). Possuem membrana dupla, sendo que a membrana interna e a parede de peptidoglicano estão associadas e cobertas por uma membrana externa que contém lipoproteínas de superfície e lipopolissacarídeos (LPS) (HAAKE; MATSUNAGA, 2010).

Figura 1 - *Leptospira* vista em microscopia eletrônica



Fonte: adaptado de PICARDEAU, 2013.

1.3 Aspectos epidemiológicos

A leptospirose é uma zoonose conhecida desde o século XIX, quando em 1886 Adolf Weil a estudou em humanos. Em 1907 Stimson, nomeou o microrganismo de *Spirocheta interrogans* observado no fígado de um paciente que morreu com suspeita de febre amarela. No Brasil as primeiras notificações ocorreram em 1917, porém havia uma grande probabilidade de que ela já ocorria anteriormente a essa data, mas seus sintomas eram confundidos com os da febre amarela (MARTELI *et al.*, 2020).

O número de casos de leptospirose em humanos não é completamente documentado, pois há países que não possuem sistema de vigilância para essa zoonose ou não é corretamente diagnosticada. Estima-se que ocorra um caso para cada 100.000 habitantes em países com clima temperado e 10 casos por 100.000 em países com climas tropicais úmidos (OLIVEIRA *et al.*, 2022). No Brasil, a leptospirose é considerada uma doença de notificação compulsória. A faixa etária mais atingida é entre 20 e 49 anos (MARTELI *et al.*, 2020).

Em pesquisas realizadas no Brasil, no período de 2010 a 2019, foram notificados e confirmados 37.703 casos de leptospirose, com média anual aproximada de 3.770 casos (OLIVEIRA *et al.*, 2022).

A gravidade da doença é observada pelo número de internações que chega em média a 75% dos casos confirmados. Medidas de controle e diagnóstico precoce e tratamento da doença são fundamentais para reduzir o agravamento dos casos de Leptospirose (BRASIL, 2014).

1.4 Manifestações Clínicas

O período de incubação varia de 1 a 30 dias, sendo que frequentemente ocorre entre 5 e 14 dias. As manifestações clínicas são variáveis, podendo ser assintomáticas, oligossintomáticas, até quadros clínicos graves que podem resultar em óbito (BRASIL, 2014).

As leptospiras colonizam preferencialmente os rins e o fígado, tendo como sítio anatômico predileto os túbulos proximais renais, onde podem permanecer até quatro semanas após a infecção aguda em humanos e de maneira intermitente por anos em animais (JANWITTHAYANAN *et al.*, 2013; LEVETT; HAAKE, 2010).

A leptospirose humana tem apresentação bifásica, na fase aguda ocorre febre alta, cefaleia e mialgia, já na fase crônica observam-se meningites, miocardites, hepatite, nefrite e pneumonia. A síndrome de Weil e a síndrome hemorrágica pulmonar são as apresentações mais graves, comprometendo múltiplos órgãos (GOUVEIA *et al.*, 2008).

1.5 Importância da Vacinação

Apesar dos avanços na área de vacinologia, a grande maioria das vacinas é baseada em organismos vivos atenuados que produzem imunidade duradoura para alguns patógenos, mas que podem ocasionar reações adversas, como reações autoimunes ou fortes respostas alérgicas. Além disso, a atenuação ou inativação pode não ocorrer da forma desejada permitindo que o patógeno retorne ao estado virulento (SKWARCZYNSKI; TOTH, 2016).

A vacinação tem como objetivo gerar uma resposta imune protetora, de suficiente intensidade e longa duração, para prevenir ou atenuar a ação de organismos patogênicos (PETROVSKY; COOPER, 2011).

As vacinas contra a leptospirose são constituídas por culturas de leptospiras inativadas por diversos métodos (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). São vacinas formuladas com sorovar específico com resposta imune predominantemente humoral ao LPS da *Leptospira* induzindo imunidade de curta duração (DELLAGOSTIN *et al.*, 2011).

Os fatores de virulência e os mecanismos de patogenicidade das leptospiras não são completamente entendidos, o que torna um grande desafio a obtenção de uma vacina ideal contra a leptospirose (ADLER, 2014).

O desenvolvimento de novas vacinas, seguras e efetivas, não é um processo fácil (PERRIE *et al.*, 2008). Dificuldades como a baixa estabilidade da vacina e uma necessidade de “cadeia de frio” são algumas das desvantagens da vacina clássica, a qual utiliza patógenos vivos atenuados ou inativados (SKWARCZYNSKI; TOTH, 2016).

A produção de vacinas de subunidade é uma boa alternativa, principalmente quando se considera a proteção cruzada e a segurança (DELLAGOSTIN *et al.*, 2011). O desenvolvimento de vacinas utilizando epitopos antigênicos mínimos que possam desencadear a resposta imune desejada, como peptídeos sintéticos, consiste em uma estratégia inovadora e promissora. Os estudos com epitopos imunogênicos podem resultar tanto no desenvolvimento de vacinas de subunidades precisas, com fornecer informações para o desenvolvimento de terapias (SKWARCZYNSKI; TOTH, 2016).

1.6 Vacinas baseadas em peptídeos

O desenvolvimento de vacinas baseadas em peptídeos, capazes de estimular a proteção duradoura contra patógenos, é uma tendência atual (SKWARCZYNSKI; TOTH, 2016). Identificar peptídeos imunogênicos e acessíveis ao sistema imunológico é uma estratégia que está sendo bastante explorada na busca de candidatos vacinais contra doenças infecciosas. A imunoinformática surge como uma alternativa extremamente interessante neste contexto, uma vez que a predição de epitopos levaria à seleção e obtenção de peptídeos sintéticos com maior

possibilidade de reconhecimento pelo sistema imune, evitando algumas etapas de seleção *in vivo* (LARSEN; LUND; NIELSEN, 2006; NOYA *et al.*, 2005).

Algumas características são interessantes para o desenvolvimento de vacinas baseadas em peptídeos, tais como: poderem ser produzidas quase exclusivamente por processos químicos e biologia sintética, reduzindo a contaminação dos antígenos; peptídeos sintéticos podem ser liofilizados aumentando o tempo de armazenamento e reduzindo custos de refrigeração; as vacinas baseadas em peptídeos podem ser projetadas para atingir diversas cepas, diferentes estágios do ciclo de vida e até mesmo diferentes patógenos, para alcançar objetivos muito específicos. Além disso, antígenos peptídicos são menos propensos a induzir respostas alérgicas ou autoimunes (SKWARCZYNSKI; TOTH, 2016).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O presente trabalho tem como objetivo geral identificar potenciais peptídeos de proteínas de *Leptospira* para o desenvolvimento de vacinas e para o uso no diagnóstico da leptospirose.

2.2 Específicos

- a) Identificar e analisar, *in silico*, peptídeos de proteínas de *Leptospira*;
- b) Analisar *in silico* a capacidade de ligação dos peptídeos a moléculas do complexo MHC I e MHC II;
- c) Analisar *in silico* quanto à sequência dos peptídeos selecionados são conservadas entre as diferentes espécies de *Leptospira*;
- d) Detectar, através da técnica dot-blot, se os anticorpos de pacientes diagnosticados com leptospirose reconhecem os peptídeos sintetizados.

3 METODOLOGIA

3.1 Busca de proteínas e seleção dos peptídeos

Inicialmente foi efetuada uma análise *in silico*, usando o programa Blast2GO para o estudo das funções das proteínas a partir do genoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Em seguida, aquelas relacionadas à virulência, chemotaxia e proteínas de resistência a altas temperaturas foram inicialmente selecionadas. Também foram selecionados e desenhados peptídeos (Pep2 e Pe7) previamente descritos (Lata *et al* 2018) Assim, quatro proteínas e cinco peptídeos foram selecionados. Em seguida as sequências de aminoácidos das proteínas de *Leptospira* foram obtidas a partir do Banco de dados NCBI (National Library of Medicine).

Após obter a sequência dessas proteínas, os peptídeos foram desenhados usando o programa Bcepred Prediction Server (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/bcepred>). Cinco peptídeos foram selecionados e sintetizados para posterior análise *in vitro*; Pep2 e Pep7 desenhados a partir da proteína LruC (WP_000721953.1) dados em fase de publicação, e três peptídeos Pep8, Pep9 e Pep10, estudo em andamento.

3.2 Afinidade dos peptídeos ao complexo MHC I e MHC II

Os peptídeos desenhados foram analisados frente à capacidade de ligação as moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), para isso foram utilizados os programas NetMHC 4.0 ([HTTPS://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetMHC-4.0](https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetMHC-4.0)) e NetMHC 2.3 ([HTTPS://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetMHCII-2.3](https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetMHCII-2.3)). A pesquisa foi realizada usando duas estratégias: usando a sequência das proteínas e através das sequências dos peptídeos desenhados.

3.3 Identificação de regiões conservadas em proteínas de *Leptospira* contendo as sequências dos aminoácidos dos peptídeos analisados

Após a seleção dos peptídeos, foi analisado *in silico*, a presença de regiões conservadas das sequências de aminoácidos em proteínas de diferentes espécies e sorovares de *Leptospira* presentes no banco de dados NCBI, para isso foi utilizado o programa BLASTp.

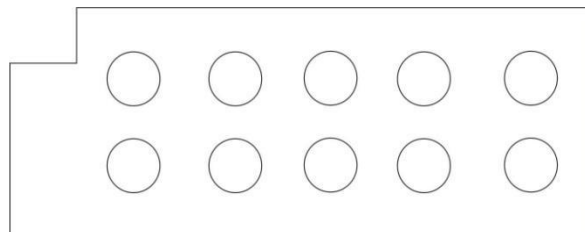
3.4 Reconhecimento dos peptídeos de proteínas de *Leptospira* por anticorpos humanos

Para a análise *in vitro*, utilizou-se a técnica Dot-blot para verificar a interação dos peptídeos com anticorpos presentes em amostras de soro de pacientes diagnosticados com leptospirose. Os soros utilizados foram obtidos no laboratório de bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz.

Para a realização do Dot-Blot foi utilizado membrana de nitrocelulose (Amersham Protan) com poro de 0,1 μm , cortada nas dimensões de 2,5 x 6 cm conforme apresentado na figura 2.

Os peptídeos foram sintetizados comercialmente, liofilizados e diluídos em PBS e um volume entre 5 a 8 μl foi aplicado em duplicata na membrana.

Figura 2 - Esquema das membranas com disposição dos peptídeos em duplicata



Fonte: própria autora, 2023.

Após a aplicação dos peptídeos nas membranas, deixou-se secando por 30 minutos em temperatura ambiente e depois 30 minutos em estufa a 37°C. Em seguida, as membranas foram retiradas da estufa e efetuado o bloqueio com 5 ml de uma solução constituída de 10% de leite em pó mólico em PBS (1x) e Tween 20 (0,05%), incubadas durante 1 h sob agitação em temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas 3 vezes com 5 ml de PBS Tween-20 (0,05%), durando

10 minutos cada lavagem, sob agitação. Após as lavagens, adicionou-se o anticorpo primário (1:2000), diluído em PBS-T-20 e leite em pó (5%). As membranas foram então incubadas por 2 horas sob agitação em temperatura ambiente. Após isso, repetiram-se as 3 lavagens e em seguida foi adicionado o anticorpo secundário (diluído 1:3000 em PBS T-20 0,05%), permanecendo por 1 hora sob agitação em temperatura ambiente. Após esse período, as membranas foram lavadas 3x com TBS Tween-20 (0,05%), sob agitação.

Em seguida, as membranas foram reveladas usando o reagente ECL Primer (Amersham RPN2232). Os reagentes A e B foram misturados na razão de 1:1, com volume final de 700 ml para cada membrana. Essa solução foi pipetada sobre as membranas por 3 minutos, evitando-se a luz direta. O excesso de reagente na membrana foi retirado e em seguida as membranas foram expostas no equipamento de quimioluminescência Uvitec Cambridge.

Após isso, as imagens foram selecionadas e analisadas no programa ImageJ, selecionando-se os pontos (spots) das amostras e os valores obtidos calculados utilizando Excel. Os resultados da densidade de pixels das membranas analisadas com o soro controle foram subtraídos das membranas com os soros de pacientes diagnosticados com leptospirose. Os resultados estão apresentados em densidade de pixels (leptospirose - controle).

4 RESULTADOS

4.1 Análise “in silico”

No presente estudo, foram realizadas análises *in silico* para a identificação de peptídeos de proteínas de *Leptospira*. Conforme apresentado (figura 3), foram selecionados e analisados dois peptídeos da proteína LruC (Pep2 e Pep7). Também foram selecionados e analisados três peptídeos denominados Pep8, Pep9 e Pep10, porém as sequências não serão apresentadas por se tratar de estudos exploratórios ainda em andamento.

Figura 3 - Identificação das sequências de aminoácidos dos peptídeos desenhados a partir da proteína LruC

```
>WP_000721953.1 LruC domain-containing protein [Leptospira interrogans] Id. Pep2 e Pep7
MKKILLILLIALSFVWFGCSHKKKGILLPFLTLLNQDAGASTAKSESSAGTATASNGGSVVVDNTGSNNNSNGVLLPN
NNSDSSSNATTNSQTSNGNNSSSAGSSNNSSSSSGSNSNSGNSNNSNSNSGSTSVGSNSDSGSSGGSNAGSSSSY
GGDTNTNSGSTNVGSNSDSGSSGSNAGSSSSGSDTSTNSGGTNVGSNSDSGSSGSNAGSSSSSSGSDTSTNS
GGTNVGSNSDSGSSGSNAGSSSSSSGSDTS TNSGGTNVGSNSDSGSSGSNAGSSSSSSGSDTNTGTGSNNGSS
NPSTPSQEITGVITVNDQIGSIPFTYNTVQTIPLNLVVTDKQSKPISGATVIVSDNEGHILFQGISNNIGKVSGTITVET
ALGQITLEITAAGESISNVINLINVVGINREIKYEVLLPVAAPDTDDKDGVPDLDYTPQDPTRSSLIRIPAEGVSTVA
YEDLYPSAGDADLNDYVLHIHNEEDLNAAGDVIRLRGTYQHVARGAGYKHTFFLKLPVAVGATFSRKVVREDGKI
VTDLTTKTVSSSDLNLGIQIHEESNKTTSNPNVNPGGVYKPGYIATIEIVFNSPVKKTALGSPYDIFIKVIN TGKEIHF
PGLYKNANGTDKYLDSNNFPWAILVPGAWKYPYEGDIRKDTQTGYKEFNLWVASNGTSYKDWYKHITNQAQVF
PVPDESELMGFLLRSMK KNAILIAILLIGAGAAVAYILKRRTLSQA
```

Fonte: própria autora, 2023.

Após a seleção das proteínas de *Leptospira*, foi realizada a predição de epítopos lineares usando o programa BcePred (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/bcepred>). Esse programa apresenta precisão aproximada de 58,7% na predição de epítopos. Apresentamos como exemplo a sequência da proteína LruC (tabela 1) demonstrando as características físico-químicas utilizadas pelo programa para a seleção dos peptídeos (hidrofilicidade, flexibilidade, acessibilidade, polaridade, superfície exposta e propensão antigênica). As regiões sublinhadas indicam as sequências de aminoácidos dos peptídeos selecionados pelo programa e que possuem as características relacionadas na coluna esquerda da tabela. Em negrito, estão destacadas as sequências de aminoácidos dos peptídeos selecionados, Pep2 e Pep7 como exemplo. Os Pep2 e Pep7, apesar de não apresentarem duas características físico-químicas determinadas no programa (tabela 1), foram escolhidos baseados nas características de seleção descritas previamente por Lata e colaboradores.

Tabela 1 - Demonstração das características dos peptídeos desenhados a partir da proteína LruC (WP_000721953.1)

Sequência	<p>¹MKKILILLIALSFVVFGCSHKKKGILLPFLTLLNQDAGASTAKSESSAGTATASNG GSVVVDNTGSGNNSNGVLLPNNNSDSSSNATTNSQTSGNNSSSAGSSNNSSS SGSNSNSGSNNSNSNSGSGTSVGSNSDSGSSGGSNAGSSSSSYGGDTNTNSGST NVGSNSDSGSSGSNAGSGSSSGSDTSTNSGGTNVGSNSDSGSSGSNAGSSSS SGSDTSTNSGGTNVGSNSDSGSSGSNAGSSSSSGSDTSTNSGGTNVGSNSDS GSSGSNAGSSSSSGSDTNTGTGSNNGSSNPSTPSQEITGVITVNDQIGSIPFTYN TVQTIPLNLVVTDKQSKPISGATVIVSDNEGHILFQGISNIGKVSGTITVETALGQI TLEITAAGESISNVINLINVVGINREIKYEVLLPVAAAPTDTDKDGVPTLDTYPQDP TRSSLIRIPAEGVSTVAYEDLYPSAGDADLNDYVLHIHNEEDLNAAGDVIRLRGTY QHVARGAGYKHTFFLKLPAVAVGATFSRKVVREDGKIVTDLTTKTVSSSDLNLGIQI HEESNKTTSNPNVNPGGVYKPGYIATIEIVFNSPVKKTALGSYPYDIFIKVINTGKEI HFPGLYKNANGTDKYLDSNFPWAILVPGAWKYPYEGLDIRKDTQTGYKEFNL WVASNGTSYKDWYKHITNQAKVFPVPEDESELMGFLLRSMKKNAILIAILLIGAGA AVAYILKRRTLSQA⁷²⁹</p>
Hidrofilicidade	<p>¹MKKILILLIALSFVVFGCSHKKKGILLPFLTLLNQDAGASTAKSESSAGTATASNG GSVVVDNTGSGNNSNGVLLPNNNSDSSSNATTNSQTSGNNSSSAGSSNNSSS SGSNSNSGSNNSNSNSGSGTSVGSNSDSGSSGGSNAGSSSSSYGGDTNTNSGST NVGSNSDSGSSGSNAGSGSSSGSDTSTNSGGTNVGSNSDSGSSGSNAGSSSS SGSDTSTNSGGTNVGSNSDSGSSGSNAGSSSSSGSDTSTNSGGTNVGSNSDS GSSGSNAGSSSSSGSDTNTGTGSNNGSSNPSTPSQEITGVITVNDQIGSIPFTYN TVQTIPLNLVVTDKQSKPISGATVIVSDNEGHILFQGISNIGKVSGTITVETALGQI TLEITAAGESISNVINLINVVGINREIKYEVLLPVAAAPTDTDKDGVPTLDTYPQDP TRSSLIRIPAEGVSTVAYEDLYPSAGDADLNDYVLHIHNEEDLNAAGDVIRLRGTY QHVARGAGYKHTFFLKLPAVAVGATFSRKVVREDGKIVTDLTTKTVSSSDLNLGIQI HEESNKTTSNPNVNPGGVYKPGYIATIEIVFNSPVKKTALGSYPYDIFIKVINTGKEI HFPGLYKNANGTDKYLDSNFPWAILVPGAWKYPYEGLDIRKDTQTGYKEFNL WVASNGTSYKDWYKHITNQAKVFPVPEDESELMGFLLRSMKKNAILIAILLIGAGA AVAYILKRRTLSQA⁷²⁹</p>
Flexibilidade	<p>¹MKKILILLIALSFVVFGCSHKKKGILLPFLTLLNQDAGASTAKSESSAGTATASNG GSVVVDNTGSGNNSNGVLLPNNNSDSSSNATTNSQTSGNNSSSAGSSNNSSS SGSNSNSGSNNSNSNSGSGTSVGSNSDSGSSGGSNAGSSSSSYGGDTNTNSGST NVGSNSDSGSSGSNAGSGSSSGSDTSTNSGGTNVGSNSDSGSSGSNAGSSSS SGSDTSTNSGGTNVGSNSDSGSSGSNAGSSSSSGSDTSTNSGGTNVGSNSDS GSSGSNAGSSSSSGSDTNTGTGSNNGSSNPSTPSQEITGVITVNDQIGSIPFTYN TVQTIPLNLVVTDKQSKPISGATVIVSDNEGHILFQGISNIGKVSGTITVETALGQI TLEITAAGESISNVINLINVVGINREIKYEVLLPVAAAPTDTDKDGVPTLDTYPQDP TRSSLIRIPAEGVSTVAYEDLYPSAGDADLNDYVLHIHNEEDLNAAGDVIRLRGTY QHVARGAGYKHTFFLKLPAVAVGATFSRKVVREDGKIVTDLTTKTVSSSDLNLGIQI HEESNKTTSNPNVNPGGVYKPGYIATIEIVFNSPVKKTALGSYPYDIFIKVINTGKEI HFPGLYKNANGTDKYLDSNFPWAILVPGAWKYPYEGLDIRKDTQTGYKEFNL WVASNGTSYKDWYKHITNQAKVFPVPEDESELMGFLLRSMKKNAILIAILLIGAGA AVAYILKRRTLSQA⁷²⁹</p>
Acessibilidade	<p>¹MKKILILLIALSFVVFGCSHKKKGILLPFLTLLNQDAGASTAKSESSAGTATASNG GSVVVDNTGSGNNSNGVLLPNNNSDSSSNATTNSQTSGNNSSSAGSSNNSSS SGSNSNSGSNNSNSNSGSGTSVGSNSDSGSSGGSNAGSSSSSYGGDTNTNSGST NVGSNSDSGSSGSNAGSGSSSGSDTSTNSGGTNVGSNSDSGSSGSNAGSSSS SGSDTSTNSGGTNVGSNSDSGSSGSNAGSSSSSGSDTSTNSGGTNVGSNSDS GSSGSNAGSSSSSGSDTNTGTGSNNGSSNPSTPSQEITGVITVNDQIGSIPFTYN TVQTIPLNLVVTDKQSKPISGATVIVSDNEGHILFQGISNIGKVSGTITVETALGQI TLEITAAGESISNVINLINVVGINREIKYEVLLPVAAAPTDTDKDGVPTLDTYPQDP TRSSLIRIPAEGVSTVAYEDLYPSAGDADLNDYVLHIHNEEDLNAAGDVIRLRGTY QHVARGAGYKHTFFLKLPAVAVGATFSRKVVREDGKIVTDLTTKTVSSSDLNLGIQI HEESNKTTSNPNVNPGGVYKPGYIATIEIVFNSPVKKTALGSYPYDIFIKVINTGKEI HFPGLYKNANGTDKYLDSNFPWAILVPGAWKYPYEGLDIRKDTQTGYKEFNL</p>

	WVASNGTSYKDWYKHITNQAKVFPVPEDESELMGFLLRSMKKNAILIAILLIGAGA AVAYILKRRTLSQA ⁷²⁹
Polaridade	¹ MKKILILLIALSFVVFVGCSSHKKKGILLPFLTLLNQDAGASTAKSESSAGTATASNG GSVVVDNTGSGNNSNGVLLPNNNSDSSSNATTNSQTSGNNSSSAGSSNNSSS SGSNSNSGSNNSNSNSGSTSVGSNSDSGSSGGSNAGSSSSYGGDTNTNSGST NVGSNSDSGSSGSNAGSGSSSGSDTSTNSGGTNVGSNSDSGSSGSNAGSSSS SGSDTSTNSGGTNVGSNSDSGSSGSNAGSSSSSGSDTSTNSGGTNVGSNSDS GSSGSNAGSSSSSGSDTNTGTGSNNGSSNPSTPSQEITGVITVNDQIGSIPFTYN TVQTIPLNLVVTDKQSKPISGATVIVSDNEGHILFQGISNIGKVSGTITVETALGQI TLEITAAGESISNVINLVGINREIKYEVLLPVAAAPTDTDKDGVPTLDTYPQDP TRSSLIRIPAEGVSTVAYEDLYPSAGDADLNDYVLHIHNEEDLNAAGDVIRLRGT QHVARGAGYKHTFFLKLPAVAVGATFSRKVVREDGKIVTDLTTKTVSSSDLNLGIQI HEESNKTTSNPNVNPGGVYKPGYIATIEIVFNSPVKKTALGSYPYDIFIKVINTGKEI HFPGLYKNANGTDKYLDSNNFPWAILVPGAWKYPYEGLDIRKDTQTGYKEFNL WVASNGTSYKDWYKHITNQAKVFPVPEDESELMGFLLRSMKKNAILIAILLIGAGA AVAYILKRRTLSQA ⁷²⁹
Superfície exposta	1
Propensão antigênica	

Fonte: própria autora, 2023.

4.2 Análise dos peptídeos em interação com MHC I e MHC II

Nas análises *in silico*, para verificar a interação dos peptídeos com o MHC I, foi utilizado o programa NetMHC 4.0. Conforme demonstrado na tabela 2, o Pep2 não apresentou forte ou fraca ligação a alelos do MHC I. Já o peptídeo Pep7, foi selecionado dentro dos intervalos estabelecidos pelo programa, strong binders (forte ligação) % Rank < 0,5 como de forte ligação com um alelo do MHC I. O Pep8 também apresentou forte ligação a alelos HLA, sendo que o Pep9 e Pep10 apresentaram ligações a alelos do MHC I (dados não apresentados, pois se trata de estudo em andamento, ainda não publicados).

Na sequência de aminoácidos do peptídeo Pep2, o aminoácido Q (glutamina) está destacado, pois foi realizada a troca pelo aminoácido G (glicina) para facilitar sua síntese (tabela 2 e apêndice I). Porém, considerou-se a pesquisa com a sequência original. Na sequência do peptídeo Pep7, pode-se verificar um aminoácido a mais, isso se deve ao fato do programa aceitar como número mínimo para pesquisa, uma sequência a partir de 9 aminoácidos.

Tabela 2 - Interação *in silico* dos peptídeos com o MHC I

Tabela MHC I						
Pep.	Sequência Peps.	HLA	Peptídeo	1-log50k(aff)	Afinidade(nM)	%Rank
Pep2	VQTIPLNLVVTD			-		
Pep7	WAILVPGA	HLA-B5801	WAILVPGAW	0.758	13.70	0.08

Fonte: própria autora, 2023.

Legenda: Não foram encontradas ligações com HLA para o Pep2 no intervalo de SB (Strong binding) ou WB (weak binding).

Nas análises para verificar a interação dos peptídeos com o MHC II utilizando o programa NetMHC 2.3, observou-se que os peptídeos Pep2 e Pep7 apresentaram fraca ligação ($2 < \% \text{ Rank} < 10$) com alguns alelos de HLA DRB, conforme demonstrado na tabela 3 e apêndice I. Os peptídeos Pep8, Pep9 e Pep10 não apresentaram forte ou fraca ligação a alelos do complexo MHC II, porém apresentaram ligações com alelos em intervalos diferentes (dados não apresentados, pois se trata de estudo em andamento ainda não publicado).

Tabela 3 – Análises *in silico* da interação dos peptídeos com o MHC II

Tabela MHC II						
Pep.	Sequência Peps	DRB	Peptídeo	1-log50k(aff)	Afinidade (nM)	%Rank
Pep2	VQTIPLNLVVTD	DRB1_0103	VQTIPLNLVVTD	0.2042	5488.5	7.00
		DRB3_0301	VQTIPLNLVVTD	0.6387	49.8	5.00
Pep7	WAILVPGA	DRB1_0402	WAILVPGAW	0.1191	13775.2	2.50
		DRB1_0801	WAILVPGAW	0.2977	1996.5	5.00
		DRB1_0802	PWAILVPGA	0.1014	16688.8	6.00
		DRB1_0901	WAILVPGAW	0.2955	2042.9	3.50
		DRB1_1001	PWAILVPGA	0.2122	5031.6	8.00
		DRB5_0101	WAILVPGAW	0.1518	9675.0	5.00

Fonte: própria autora, 2023.

4.3 Identificação *in silico* de sequências de aminoácidos dos peptídeos conservadas em proteínas de diferentes espécies de *Leptospira*

Na análise para verificar as sequências de aminoácidos dos peptídeos, conservadas em proteínas de *Leptospira*, foram consideradas as que apresentaram um percentual de 100% de identidade. Assim, podemos observar que todas as sequências dos peptídeos escolhidos, apresentados neste trabalho, Pep2 e Pep7, são conservadas entre diferentes espécies de *Leptospira*, conforme apresentado (tabela 4 e apêndice II). As sequências e identidade das proteínas dos peptídeos

Pep8, Pep9 e Pep10 não serão apresentados neste trabalho, pois estão em fase de estudo e ainda não foram publicados.

Tabela 4 – Sequências conservadas em espécie de *Leptospira* com 100% de identidade com a sequência de aminoácidos dos peptídeos estudados

Id. Peptídeo	Número de proteínas com 100% d identidade
Pep2	112
Pep7	250

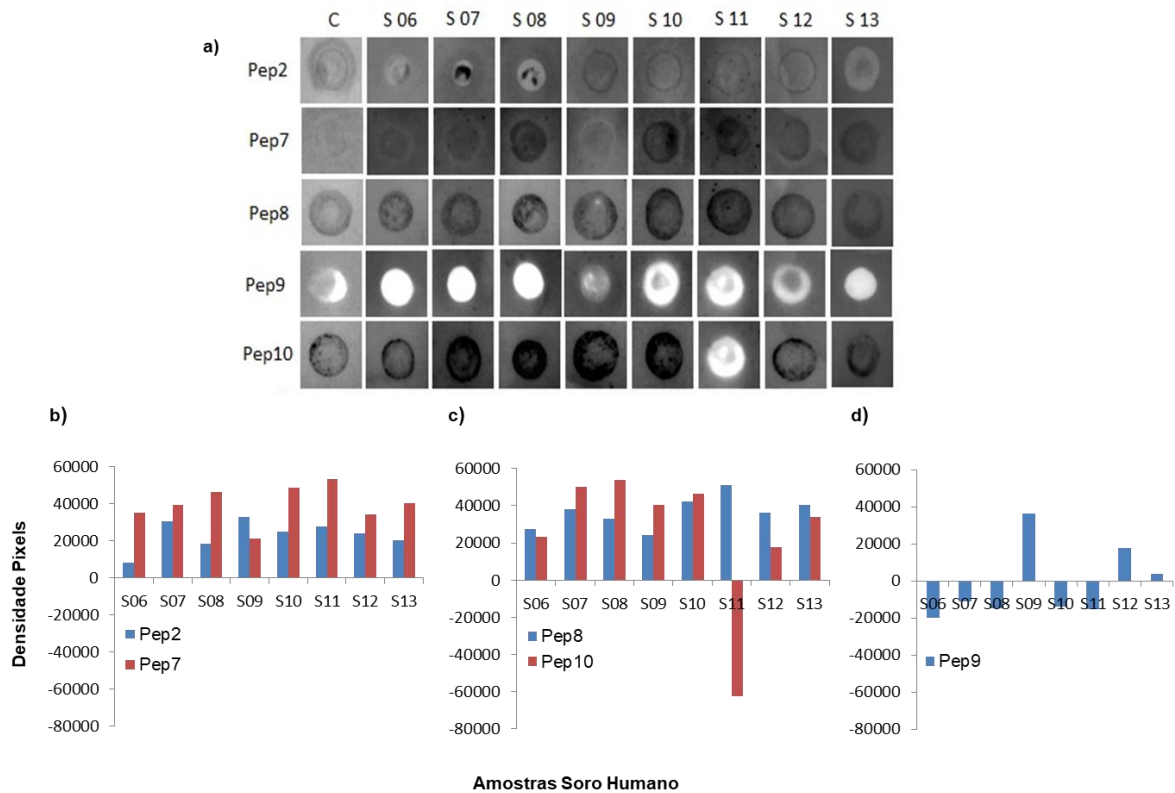
Fonte: própria autora, 2023.

4.4 Interação entre peptídeos e anticorpos anti-leptospira em amostras de soro humano

Através dos resultados obtidos, podemos verificar que os peptídeos Pep2, Pep7 e Pep8 foram reconhecidos por todos os soros analisados (figura 4b), já o Pep9, foi reconhecido em duas amostras de soros (S09 e S12) (figura 4d) e o Pep10 foi reconhecido por todos os soros exceto o soro S11 (figura 4c). Podemos observar também reconhecimento do Pep10 por anticorpos presentes no soro controle, indicando inespecificidade deste peptídeo com o soro humano (figura 4a). Verificando a imagem dos spots (figura 4a) e gráfico referentes ao Pep9, que foi reconhecido somente em 3 (três) amostras, não foi possível definir o que ocorreu para esse resultado, sendo provavelmente algum problema na síntese do peptídeo.

O reconhecimento mais acentuado ocorreu com Pep2, Pep7 e Pep8, em todas as amostras de soro analisadas (figura 4a, b e c).

Figura 4 - Interação dos peptídeos com soros humanos diagnosticados com leptospirose



Fonte: própria autora, 2023.

Legenda: Interação entre os peptídeos selecionados e amostras de soro humano diagnosticados com leptospirose (S06 a S13) e controle negativo (C). Gráficos (b-d) apresentando os valores obtidos dos spots através de densidade de pixels (leptospirose+ menos o controle-).

5 DISCUSSÃO

A vacinação é considerada a melhor estratégia para o controle da leptospirose. Com o objetivo de eliminar efeitos adversos, causados por vacinas inativadas ou atenuadas, e fornecer proteção cruzada contra os diversos sorovares de *Leptospira*, as pesquisas atuais têm se voltado para o desenvolvimento de vacinas de subunidades ou recombinantes (LATA *et al.*, 2018).

As pesquisas para o desenvolvimento dessas vacinas têm como principal foco proteínas da membrana externa (OMPs), lipoproteínas, lipopolissacarídeos (LPSs) e fatores de virulência. Isso se deve ao fato dessas proteínas desempenharem um importante papel na interação de patógenos com células hospedeiras, estando possivelmente associadas à patogênese (LATA *et al.*, 2018; WANG; JIN; WEGRZYN, 2007). Assim, no presente estudo, a escolha das proteínas para a busca de peptídeos levou em consideração seu papel na virulência, dentre outros fatores já mencionados anteriormente.

Em pesquisas realizadas, diversas proteínas de membrana externa de *Leptospira* usadas em imunizações induziram proteção no animal modelo (hamster), incluindo a LipL32. Porém, esses candidatos à vacina mostraram conferir uma proteção limitada e não induziram proteção cruzada. Sendo assim, um alvo que seja altamente conservado, que estimule uma resposta humoral e mediada por células contra a leptospirose seria de grande importância para o desenvolvimento de uma vacina eficaz (CONRAD *et al.*, 2017). Atualmente, diversos estudos demonstram que vacinas a base de epitopos podem estimular eficazmente uma imunidade contra a maioria dos sorovares (LATA *et al.*, 2018).

Uma etapa importante num projeto de vacina baseada em peptídeos é a escolha de um epitopo com capacidade de induzir reações humorais fortes e duradouras e também imunidade celular contra o patógeno desejado (PEARSON *et al.*, 2010). A escolha do epitopo deve levar em consideração possíveis respostas de hipersensibilidade induzida por alguns dos antígenos (DIEMERT *et al.*, 2012). E finalmente, o epitopo precisa ser altamente conservado para que seja capaz de cobrir a variedade de subtipos de patógenos (SKWARCZYNSKI; TOTH, 2016).

Nossos estudos demonstraram que dentre os peptídeos selecionados, os Pep2 e Pep7 foram reconhecidos por anticorpos anti-leptospira, apresentando sequências de aminoácidos conservados em uma grande quantidade de proteínas

dentre as espécies e sorovares de *Leptospira* nos estudos *in silico*. Esses resultados obtidos possivelmente os tornam candidatos interessantes para futuras pesquisas no desenvolvimento de vacina para *Leptospira*, pois aumenta as chances de mais amplo espectro vacinal, ou seja, abrangendo uma maior diversidade de espécies e sorovares por possível proteção cruzada.

Após serem reconhecidos, os antígenos são degradados nos endossomos e lisossomos para gerar peptídeos menores (NEEFJES *et al.*, 2011). As moléculas clássicas de histocompatibilidade (MHC I) são expressas em quase todas as células nucleadas e apresentam peptídeos antigênicos aos Linfócitos T CD8+, que irão atuar estimulando as respostas celulares. O MHC II, o qual é expresso em células APCs (linfócitos, células dendríticas e macrófagos), apresenta os peptídeos antigênicos aos Linfócitos auxiliares (T CD4+) (GIRARD; MOUSSION; FÖRSTER, 2012).

A vacina deve ser reconhecida pelo sistema imunológico, assim como ocorre com um patógeno. O sistema imunológico inato serve como primeira linha de defesa contra antígenos e estimula a imunidade adaptativa, desencadeando respostas celulares e anticorpos (SKWARCZYNSKI; TOTH, 2016). Para o desenvolvimento de vacinas a base de peptídeos, é importante que se identifique epitopos de células B e células T, baseando-se na previsão de ligação dos peptídeos com a molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Os peptídeos que selecionamos apresentaram resultados consideráveis de ligação ao MHC I e II, destacando-se o Pep7. A identificação de peptídeos que se liguem a diferentes alelos do complexo HLA é interessante para o desenvolvimento de vacinas, pois aumentam as possibilidades de maior abrangência e efetividade em diferentes populações.

Para a identificação dos epitopos de células B e células T, tem-se a imunoinformática apresentando uma grande contribuição, pois oferece redução de tempo para seleção de potenciais candidatos, redução dos custos e maior confiabilidade nos estudos de desenvolvimento de vacinas e métodos de diagnóstico (DELLAGOSTIN *et al.*, 2017; WIWANITKIT, 2007). Comprovadamente, em nossas análises, a utilização da imunoinformática contribuiu para a identificação e seleção dos peptídeos, contribuindo também na otimização do tempo da pesquisa *in silico*.

Entre as diversas características que os epitopos de células B apresentam, estão a hidrofiliabilidade, flexibilidade, acessibilidade, superfície exposta, polaridade e propensão antigênica, características as quais são de grande importância para a

previsão de epitopos de células B. Apesar dos peptídeos, Pep2 e Pep7, não terem apresentado resultados para superfície exposta e propriedades antigênicas nas análises utilizando o programa BcPred, os mesmos foram escolhidos baseado nas características de seleção descritas previamente por Lata e colaboradores (LATA *et al.*, 2018).

O fato desses peptídeos serem reconhecidos por anticorpos nas amostras de soros de pacientes diagnosticados com leptospirose é indicativo de serem potenciais candidatos para o desenvolvimento de vacinas contra a leptospirose, ou de serem utilizados em testes de diagnóstico.

6 CONCLUSÕES

Conforme os resultados obtidos, pode-se concluir que os cinco peptídeos testados foram reconhecidos por anticorpos anti-leptospiras. Os Pep2, Pep7 e Pep8 apresentaram maior especificidade, portanto são os mais promissores para continuar os estudos para o desenvolvimento de vacinas e uso em diagnóstico da leptospirose. Além disso, apresentam sequências conservadas entre diversas proteínas nas espécies de *Leptospira*, favorecendo maior espectro vacinal.

Podemos ainda concluir que as ferramentas de imunoinformática são de grande importância na busca de peptídeos com capacidade de indução de anticorpos em imunizações, reduzindo etapas de testes *in vitro* e *in vivo*. E por fim, a técnica de Dot-blot, utilizada na análise *in vitro*, se mostrou uma técnica simples e eficaz para selecionar epitopos capazes de serem reconhecidos por anticorpos.

REFERÊNCIAS¹

- ADLER, B. Pathogenesis of leptospirosis: Cellular and molecular aspects. **Veterinary Microbiology**, v. 172, n. 3–4, p. 353–358, 2014.
- ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. Leptospira and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3–4, p. 287–296, 2010.
- BHARTI, A. R. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. v. 3, n. December, p. 757–71, 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Leptospirose: diagnóstico e manejo clínico.**[s.l: s.n.].
- CONRAD, N. L. *et al.* LigB subunit vaccine confers sterile immunity against challenge in the hamster model of leptospirosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 3, p. 1–20, 2017.
- COSTA, F. *et al.* Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. 0–1, 2015.
- DELLAGOSTIN, O. A. *et al.* Recombinant vaccines against leptospirosis. **Human Vaccines**, v. 7, n. 11, p. 1215–1224, 2011.
- DELLAGOSTIN, O. A. *et al.* Reverse vaccinology: An approach for identifying leptospiral vaccine candidates. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1, 2017.
- DIEMERT, D. J. *et al.* Generalized urticaria induced by the Na-ASP-2 hookworm vaccine: Implications for the development of vaccines against helminths. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 130, n. 1, p. 169–176.e6, 2012.
- ELLIS, W. A. **Animal Leptospirosis.** [s.l: s.n.]. v. 387.
- EVANGELISTA, K. V.; COBURN, J. Leptospira as an emerging pathogen: A review of its biology, pathogenesis and host immune responses. **Future Microbiology**, v. 5, n. 9, p. 1413–1425, 2010.
- GIRARD, J. P.; MOUSSION, C.; FÖRSTER, R. HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 11, p. 762–773, 2012.
- GOUVEIA, E. L. *et al.* Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 3, p. 505–508, 2008.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** Informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. *Leptospira*: A spirochaete with a hybrid outer membrane. **Molecular Microbiology**, v. 77, n. 4, p. 805–814, 2010.

JANWITTHAYANAN, W. *et al.* In vivo gene expression and immunoreactivity of *Leptospira* collagenase. **Microbiological Research**, v. 168, n. 5, p. 268–272, 2013.

KUMAR, A.; VARMA, V. P.; FAISAL, S. M. Screening of Surface-Exposed Lipoproteins of *Leptospira* Involved in Modulation of Host Innate Immune Response. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, n. March, 2022.

LARSEN, J. E. P.; LUND, O.; NIELSEN, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. **Immunome Research**, v. 2, n. 1, p. 2, 2006.

LATA, K. S. *et al.* Exploring *Leptospiral* proteomes to identify potential candidates for vaccine design against *Leptospirosis* using an immunoinformatics approach. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–15, 2018.

LEVETT, P. N.; HAAKE, D. A. *Leptospira* Species (*Leptospirosis*). **Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases**, p. 3059–3065, 2010.

MACHADO, G. B. *et al.* *Leptospirose Humana: Uma Revisão Sobre a Doença E Os Fatores De Risco Associados À Zona Rural.* **Science And Animal Health**, v. 5, n. 3, p. 238, 2018.

MARTELI, A. N. *et al.* Análise espacial da leptospirose no Brasil. **Saúde em Debate**, v. 44, n. 126, p. 805–817, 2020.

NEEFJES, J. *et al.* Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 12, p. 823–836, 2011.

NOYA, O. *et al.* Immunodiagnosis of Parasitic Diseases with Synthetic Peptides. **Current Protein & Peptide Science**, v. 4, n. 4, p. 299–308, 2005.

OLIVEIRA, E. H. DE *et al.* *Leptospirose no Brasil: uma abordagem em saúde coletiva.* **Research, Society and Development**, v. 11, n. 6, p. e19411627111, 2022.

PEARSON, M. S. *et al.* Neutralizing antibodies to the hookworm hemoglobinase Na-APR-1: Implications for a multivalent vaccine against hookworm infection and schistosomiasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n. 10, p. 1561–1569, 2010.

PERRIE, Y. *et al.* Recent Developments in Particulate-Based Vaccines. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 1, n. 2, p. 117–129, 2008.

PETROVSKY, N.; COOPER, P. D. Carbohydrate-based immune adjuvants. **Expert Review of Vaccines**, v. 10, n. 4, p. 523–537, 2011.

PICARDEAU, M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Medecine et**

Maladies Infectieuses, v. 43, n. 1, p. 1–9, 2013.

PICARDEAU, M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: Still terra incognita? **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 297–307, 2017.

SKWARCZYNSKI, M.; TOTH, I. Peptide-based synthetic vaccines. **Chemical Science**, v. 7, n. 2, p. 842–854, 2016.

VINCENT, A. T. *et al.* Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 5, 2019.

WANG, Z.; JIN, L.; WEGRZYN, A. Leptospirosis vaccines. **Microbial Cell Factories**, v. 6, p. 1–10, 2007.

WIWANITKIT, V. Predicted epitopes of Lig A of *Leptospira interrogans* by bioinformatics method: A clue for further vaccine development. **Vaccine**, v. 25, n. 15, p. 2768–2770, 2007.

APÊNDICE(S)

A. - Resultados das análises in silico: Interação dos peptídeos com o MHC I e MHC II

MHC I						
Id. Pep	Sequência aa. Peps.	HLA	Peptídeo	1- log50k(aff)	Afinidade (nM)	%Rank
Pep 2	VQTIPLNLVVTD	HLA-A0101	VQTIPLNLVVTD	0.043	31279.19	42.00
		HLA-A0201	VQTIPLNLVVTD	0.089	19112.85	26.00
		HLA-A0301	VQTIPLNLVVTD	0.046	30308.39	39.00
		HLA-A2402	VQTIPLNLVVTD	0.037	33646.56	29.00
		HLA-A2601	VQTIPLNLVVTD	0.035	34343.93	55.00
		HLA-B0702	VQTIPLNLVVTD	0.035	34404.54	49.00
		HLA-B0801	VQTIPLNLVVTD	0.028	37065.38	80.00
		HLA-B2705	VQTIPLNLVVTD	0.048	29861.15	39.00
		HLA-B3901	VQTIPLNLVVTD	0.043	31548.39	28.00
		HLA-B4001	VQTIPLNLVVTD	0.038	33240.57	50.00
		HLA-B5801	VQTIPLNLVVTD	0.044	31058.30	60.00
		HLA-B1501	VQTIPLNLVVTD	0.062	25662.95	37.00
MHC II						
Id. Pep	Sequência aa. Peps.	DRB	Peptídeo	1- log50k(aff)	Afinidade (nM)	%Rank
Pep 2	VQTIPLNLVVTD	DRB1_0101	VQTIPLNLVVTD	0.5120	196.4	21.00
		DRB1_0103	VQTIPLNLVVTD	0.2042	5488.5	7.00WB
		DRB1_0301	VQTIPLNLVVTD	0.1948	6073.9	42.00
		DRB1_0401	VQTIPLNLVVTD	0.1559	9253.2	70.00
		DRB1_0402	VQTIPLNLVVTD	0.0934	18195.3	80.00
		DRB1_0403	VQTIPLNLVVTD	0.2607	2976.8	23.00
		DRB1_0404	VQTIPLNLVVTD	0.2972	2005.6	44.00
		DRB1_0405	VQTIPLNLVVTD	0.2518	3279.3	40.00
		DRB1_0701	VQTIPLNLVVTD	0.2886	2203.2	47.00
		DRB1_0801	VQTIPLNLVVTD	0.2719	2637.0	47.00
		DRB1_0802	VQTIPLNLVVTD	0.1889	6476.3	38.00
		DRB1_0901	VQTIPLNLVVTD	0.1824	6945.4	70.00
		DRB1_1001	VQTIPLNLVVTD	0.2772	2492.1	60.00
		DRB1_1101	VQTIPLNLVVTD	0.1356	11523.2	75.00
		DRB1_1201	VQTIPLNLVVTD	0.3238	1505.4	22.00
		DRB1_1301	VQTIPLNLVVTD	0.5051	211.5	55.00
		DRB1_1302	VQTIPLNLVVTD	0.2999	1949.3	31.00
		DRB1_1501	VQTIPLNLVVTD	0.2336	3991.7	43.00
		DRB1_1602	VQTIPLNLVVTD	0.1225	13288.1	90.00
		DRB3_0101	VQTIPLNLVVTD	0.1631	8557.4	60.00
		DRB3_0202	VQTIPLNLVVTD	0.2380	3806.4	22.00
		DRB3_0301	VQTIPLNLVVTD	0.6387	49.8	5.00WB
		DRB4_0101	VQTIPLNLVVTD	0.3289	1423.3	21.00
		DRB4_0103	VQTIPLNLVVTD	0.4441	409.6	37.00
		DRB5_0101	VQTIPLNLVVTD	0.0780	21498.5	85.00

MHC I						
Id. Pep	Sequência aa. Peps.	HLA	Peptídeo	1- log50k(aff)	Afinidade (nM)	%Rank
Pep7	WAILVPGA	HLA-A0101	WAILVPGA	0.082	20493.68	10.00
		HLA-A0101	PWAILVPGA	0.061	25933.16	22.00
		HLA-A0201	WAILVPGA	0.089	18992.46	26.00
		HLA-A0201	PWAILVPGA	0.049	29551.94	46.00
		HLA-A0301	WAILVPGA	0.045	30564.25	40.00
		HLA-A0301	PWAILVPGA	0.022	39319.31	75.00
		HLA-A2402	WAILVPGA	0.065	24688.98	17.00
		HLA-A2402	PWAILVPGA	0.059	26373.16	19.00

		HLA-A2601	WAILVPGAW	0.119	13812.78	5.00
		HLA-A2601	PWAILVPGA	0.037	33516.86	50.00
		HLA-B0702	WAILVPGAW	0.136	11515.49	8.00
		HLA-B0702	PWAILVPGA	0.036	33991.99	47.00
		HLA-B0801	WAILVPGAW	0.099	17164.90	19.00
		HLA-B0801	PWAILVPGA	0.023	38786.92	90.00
		HLA-B2705	WAILVPGAW	0.063	25317.94	28.00
		HLA-B2705	PWAILVPGA	0.047	30183.05	40.00
		HLA-B3901	WAILVPGAW	0.149	10005.26	4.50
		HLA-B3901	PWAILVPGA	0.021	39938.88	70.00
		HLA-B4001	WAILVPGAW	0.082	20486.58	13.00
		HLA-B4001	PWAILVPGA	0.035	34401.57	60.00
		HLA-B5801	WAILVPGAW	0.758	13.70	0.08 <=SB
		HLA-B5801	PWAILVPGA	0.039	32922.73	70.00
		HLA-B1501	WAILVPGAW	0.183	6907.73	11.00
		HLA-B1501	PWAILVPGA	0.039	32806.09	60.00
MHC II						
Id. Pep	Sequência aa. Peps.	DRB	Peptídeo	1-log50k(aff)	Afinidade (nM)	%Rank
Pep7	WAILVPGA	DRB1_0101	WAILVPGAW	0.1538	9464.5	12.00
		DRB1_0101	PWAILVPGA	0.0780	21496.9	33.00
		DRB1_0103	PWAILVPGA	0.0491	29398.2	75.00
		DRB1_0103	WAILVPGAW	0.0463	30286.1	80.00
		DRB1_0301	WAILVPGAW	0.0108	44468.9	70.00
		DRB1_0301	PWAILVPGA	0.0034	48185.2	95.00
		DRB1_0401	WAILVPGAW	0.0813	20756.3	12.00
		DRB1_0401	PWAILVPGA	0.0367	33599.3	35.00
		DRB1_0402	WAILVPGAW	0.1191	13775.2	2.50 WB
		DRB1_0402	PWAILVPGA	0.0427	31486.7	42.00
		DRB1_0403	WAILVPGAW	0.1153	14354.3	35.00
		DRB1_0403	PWAILVPGA	0.0642	24960.8	85.00
		DRB1_0404	WAILVPGAW	0.0953	17838.4	22.00
		DRB1_0404	PWAILVPGA	0.0941	18069.6	22.00
		DRB1_0405	WAILVPGAW	0.0531	28150.3	27.00
		DRB1_0405	PWAILVPGA	0.0515	28629.2	28.00
		DRB1_0701	WAILVPGAW	0.1812	7039.6	17.00
		DRB1_0701	PWAILVPGA	0.0405	32260.8	60.00
		DRB1_0801	WAILVPGAW	0.2977	1996.5	5.00 WB
		DRB1_0801	PWAILVPGA	0.1356	11525.6	30.00
		DRB1_0802	PWAILVPGA	0.1014	16688.8	6.00 WB
		DRB1_0802	WAILVPGAW	0.0735	22568.9	13.00
		DRB1_0901	WAILVPGAW	0.2955	2042.9	3.50 WB
		DRB1_0901	PWAILVPGA	0.0637	25086.4	41.00
		DRB1_1001	PWAILVPGA	0.2122	5031.6	8.00 WB
		DRB1_1001	WAILVPGAW	0.1943	6111.7	10.00
		DRB1_1101	WAILVPGAW	0.0957	17744.1	15.00
		DRB1_1101	PWAILVPGA	0.0910	18673.2	16.00
		DRB1_1201	WAILVPGAW	0.1484	10040.0	13.00
		DRB1_1201	PWAILVPGA	0.0562	27206.1	47.00
		DRB1_1301	WAILVPGAW	0.4381	437.1	11.00
		DRB1_1301	PWAILVPGA	0.0805	20932.2	85.00
		DRB1_1302	WAILVPGAW	0.0437	31150.9	36.00
		DRB1_1302	PWAILVPGA	0.0237	38692.2	60.00
		DRB1_1501	WAILVPGAW	0.0527	28257.1	27.00
		DRB1_1501	PWAILVPGA	0.0446	30846.6	32.00
		DRB1_1602	WAILVPGAW	0.1122	14858.0	15.00
		DRB1_1602	PWAILVPGA	0.0985	17214.7	21.00
		DRB3_0101	WAILVPGAW	0.0392	32722.1	37.00
		DRB3_0101	PWAILVPGA	0.0219	39445.9	65.00
		DRB3_0202	PWAILVPGA	0.0309	35782.3	30.00
		DRB3_0202	WAILVPGAW	0.0245	38369.5	38.00
		DRB3_0301	WAILVPGAW	0.1520	9654.1	21.00
		DRB3_0301	PWAILVPGA	0.0855	19823.1	42.00
DRB4_0101	PWAILVPGA	0.0861	19690.1	21.00		

		DRB4_0101	WAILVPGAW	0.0844	20070.2	22.00
		DRB4_0103	WAILVPGAW	0.3010	1925.7	13.00
		DRB4_0103	PWAILVPGA	0.0932	18244.2	65.00
		DRB5_0101	WAILVPGAW	0.1518	9675.0	5.00 WB
		DRB5_0101	PWAILVPGA	0.0208	39922.0	48.00

B. - Proteínas contendo sequências conservadas dos peptídeos estudados

Proteínas contendo sequência do peptídeo 2			
Descrição	Identificação	E value	Per. Ident.
LruC domain-containing protein [Leptospira interrogans]	WP_000721953.1	0.004	100.00%
lipoprotein [Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz L1-130]	AAS72200.1	0.004	100.00%
putative lipoprotein [Leptospira interrogans serovar Lora str. TE 1992]	EMF43772.1	0.004	100.00%
LruC domain-containing protein [Leptospira interrogans]	WP_000721945.1	0.004	100.00%
putative lipoprotein [Leptospira interrogans str. 2006001854]	EMM82353.1	0.004	100.00%
putative lipoprotein [Leptospira interrogans serovar Zanoni str. LT2156]	EMM94227.1	0.004	100.00%
LruC domain-containing protein [Leptospira kmetyi]	WP_100737469.1	0.004	100.00%
Lipoprotein [Leptospira interrogans serovar Copenhageni/Icterohaemorrhagiae]	OCA00467.1	0.004	100.00%
lipoprotein [Leptospira interrogans serovar Hardjo str. Norma]	ALE41857.1	0.004	100.00%
LruC domain-containing protein [Leptospira barantonii]	WP_100762626.1	0.004	100.00%
LruC domain-containing protein [Leptospira weilii]	WP_002998667.1	0.004	100.00%
LruC [Leptospira interrogans serovar Pomona]	AAW65727.2	0.004	100.00%
Lipoprotein [Leptospira interrogans serovar Canicola]	OCC29480.1	0.004	100.00%
Proteínas contendo sequência do peptídeo 7			
Descrição	Identificação	E value	Per. Ident.
LruC domain-containing protein [Leptospira noguchii]	WP_243817938.1	0.17	100%
LruC domain-containing protein [Leptospira interrogans]	WP_000721953.1	0.17	100%
LruC domain-containing protein [Leptospira santarosai]	WP_061205385.1	0.17	100%
lipoprotein [Leptospira interrogans serovar Copenhageni str. Fiocruz L1-130]	AAS72200.1	0.17	100%
LruC domain-containing protein [Leptospira]	WP_032810123.1	0.17	100%
LruC domain-containing protein [Leptospira weilii]	WP_061216776.1	0.17	100%
LruC domain-containing protein [Leptospira kirschneri]	WP_004762740.1	0.17	100%
putative lipoprotein [Leptospira interrogans serovar Lora str. TE 1992]	EMF43772.1	0.17	100%
putative lipoprotein [Leptospira interrogans str. 2006001854]	EMM82353.1	0.17	100%
LruC domain-containing protein [Leptospira sp. mild_001]	WP_229303284.1	0.17	100%
putative lipoprotein [Leptospira interrogans serovar Zanoni str. LT2156]	EMM94227.1	0.17	100%
hypothetical protein LEP1GSC066_0775 [Leptospira sp. serovar Kenya str. Sh9]	EMK13774.1	0.17	100%
hypothetical protein LEP1GSC130_0348 [Leptospira santarosai str. 200403458]	EMO72561.1	0.17	100%
LruC domain-containing protein [Leptospira alexanderi]	WP_020984624.1	0.17	100%
Lipoprotein [Leptospira interrogans serovar Copenhageni/Icterohaemorrhagiae]	OCA00467.1	0.17	100%
lipoprotein [Leptospira interrogans serovar Hardjo str. Norma]	ALE41857.1	0.17	100%
hypothetical protein LEP1GSC056_3756 [Leptospira borgpetersenii str. Brem 328]	EMN15868.1	0.17	100%
LruC domain-containing protein [Leptospira mayottensis]	WP_117340911.1	0.17	100%
hypothetical protein LEP1GSC133_3501 [Leptospira borgpetersenii serovar Pomona str. 200901868]	EMO63143.1	0.17	100%
LruC domain-containing protein [Leptospira borgpetersenii]	WP_061209339.1	0.17	100%

LruC domain-containing protein [<i>Leptospira weilii</i>]	WP_004501564.1	0.17	100%
LruC domain-containing protein [<i>Leptospira andrefontaineae</i>]	WP_135773565.1	0.17	100%
LruC domain-containing protein [<i>Leptospira johnsonii</i>]	WP_108930161.1	0.17	100%
hypothetical protein LEP1GSC128_1263 [<i>Leptospira borgpetersenii</i> str. 200801926]	EKP11569.1	0.17	100%
Uncharacterized protein LB4E_3311 [<i>Leptospira borgpetersenii</i> str. 4E]	ANH02417.2	0.17	100%
LruC domain-containing protein [<i>Leptospira borgpetersenii</i>]	GIM19594.1	0.17	100%
hypothetical protein LBBP_04214 [<i>Leptospira borgpetersenii</i> serovar Ballum]	ALO28336.1	0.17	100%
LruC domain-containing protein [<i>Leptospira santarosai</i>]	WP_032917195.1	0.17	100%
LruC domain-containing protein [<i>Leptospira alstonii</i>]	WP_020772482.1	0.17	100%
hypothetical protein LEP1GSC047_0419 [<i>Leptospira inadai</i> serovar Lyme str. 10]	EQA35960.1	0.17	100%
LruC domain-containing protein [<i>Leptospira dzoumogneensis</i>]	WP_135756562.1	0.17	100%
LruC domain-containing protein [<i>Leptospira fainei</i>]	WP_016551109.1	0.17	100%
LruC domain-containing protein [<i>Leptospira inadai</i>]	WP_039935178.1	0.17	100%
LruC domain-containing protein [<i>Leptospira kirschneri</i>]	WP_004766576.1	0.17	100%
LruC domain-containing protein [<i>Leptospira venezuelensis</i>]	WP_086445836.1	0.17	100%
LruC domain-containing protein [<i>Leptospira santarosai</i>]	WP_032919299.1	0.17	100%
LruC domain-containing protein [<i>Leptospira hartskeerlii</i>]	WP_100707510.1	0.17	100%
hypothetical protein BES34_001090 [<i>Leptospira inadai</i> serovar Lyme]	PNV77066.1	0.17	100%
LruC domain-containing protein [<i>Leptospira mayottensis</i>]	WP_135603239.1	0.17	100%
putative lipoprotein [<i>Leptospira interrogans</i> str. L1207]	EMN49703.1	0.17	100%
hypothetical protein LEP1GSC165_1734 [<i>Leptospira santarosai</i> str. CBC523]	EMO13532.1	0.17	100%
hypothetical protein LEP1GSC161_4189 [<i>Leptospira santarosai</i> str. CBC1416]	EMO59867.1	0.17	100%
LruC domain-containing protein [<i>Leptospira ainazelensis</i>]	WP_205274914.1	0.17	100%
Lipoprotein [<i>Leptospira interrogans</i> serovar Canicola]	OCC29480.1	0.17	100%
hypothetical protein LEP1GSC068_0262 [<i>Leptospira</i> sp. Fiocruz LV3954]	EKO76250.1	0.17	100%
hypothetical protein LEP1GSC048_0160 [<i>Leptospira santarosai</i> serovar Shermani str. 1342KT]	EPG83641.1	0.17	100%
hypothetical protein LEP1GSC039_1042 [<i>Leptospira santarosai</i> str. 2000027870]	EMM87254.1	0.17	100%
hypothetical protein LEP1GSC187_2119 [<i>Leptospira santarosai</i> str. ZUN179]	EMO46755.1	0.17	100%
hypothetical protein LEP1GSC169_3275 [<i>Leptospira santarosai</i> str. HAI1349]	EMJ46500.1	0.17	100%
hypothetical protein LEP1GSC162_3219 [<i>Leptospira santarosai</i> str. CBC1531]	EMP82172.1	0.17	100%
hypothetical protein LEP1GSC040_0552 [<i>Leptospira santarosai</i> str. 2000030832]	EMM75164.1	0.17	100%
hypothetical protein LEP1GSC175_0068 [<i>Leptospira santarosai</i> str. HAI821]	EMO31258.1	0.17	100%
hypothetical protein LEP1GSC163_1485 [<i>Leptospira santarosai</i> str. CBC379]	EKR93608.1	0.17	100%
hypothetical protein LEP1GSC168_0336 [<i>Leptospira santarosai</i> str. HAI134]	EMO21115.1	0.17	100%
hypothetical protein B9T54_18310 [<i>Leptospira borgpetersenii</i> serovar Hardjo-bovis]	AWV71895.1	0.17	100%
hypothetical protein LEP1GSC121_1447 [<i>Leptospira borgpetersenii</i> serovar Castellonis str. 200801910]	EKR01113.1	0.17	100%

hypothetical protein LEP1GSC043_4627 [Leptospira weilii str. Ecochallenge]	EMY13697.1	0.17	100%
hypothetical protein LEP1GSC051_2671 [Leptospira sp. P2653]	EMJ63440.1	0.17	100%
hypothetical protein LEP1GSC188_3245 [Leptospira weilii serovar Topaz str. LT2116]	EMF84381.1	0.17	100%
hypothetical protein LPTSP1_35750 [Leptospira johnsonii]	GBF40557.1	0.17	100%
hypothetical protein LEP1GSC064_0507 [Leptospira kirschneri serovar Grippytyphosa str. Moskva]	EKQ85611.1	0.17	100%