

Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo
Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP
“Dr. Antônio Guilherme de Souza”
Instituto Butantan

Iago Henrique de Miranda Mariano

Análise e identificação de peptídeos como possíveis candidatos para o desenvolvimento de vacinas e métodos diagnóstico da leptospirose

São Paulo
2022

Iago Henrique de Miranda Mariano

Análise e identificação de peptídeos como possíveis candidatos para o desenvolvimento de vacinas e métodos diagnóstico da leptospirose

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado ao Instituto Butantan, unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza”, como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Biotecnologia para saúde – Vacinas e Biofármacos.

Orientadora: Josefa B da Silva

São Paulo

2022

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

Mariano, Iago Henrique de Miranda

Análise e identificação de peptídeos como possíveis candidatos para o desenvolvimento de vacinas e métodos diagnóstico da leptospirose / Iago Henrique de Miranda Mariano ; orientador(a) Josefa Bezerra da Silva - São Paulo, 2022.

45 p. : il.

Monografia (Especialização) da Secretaria de Estado da Saúde, Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP "Doutor Guilherme de Souza" - Instituto Butantan, Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos.

1. Peptídeos 2. Leptospira. 3. Vacinas. 4. Leptospirose 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.

Esta monografia foi elaborada com base no **Guia prático para elaboração de trabalho acadêmico** desenvolvido pela Biblioteca do Instituto Butantan, de acordo com as normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Iago Henrique de Miranda Mariano, aluno(a) do curso Especialização em Biotecnologia para 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: Indeterminado por se tratar de possível patente.

O acesso ao texto completo foi liberado na data de 05 de outubro de 2023.
Repositório do Instituto Butantan

São Paulo, 13 de Janeiro de 2022

Iago Mariano
.....
aluno(a)

De acordo:
Orientador(a):

As duas mulheres mais importantes da minha vida: Minha mãe, Carla Cristina, e minha avó, Maria José. Obrigado!

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, por toda sabedoria, coragem, força e discernimento que me proporcionou durante a pandemia de Coronavírus e o ano da especialização realizada no Instituto Butantan.

Eu mesmo, pela coragem, dedicação e autoconfiança que me fazem seguir em frente sempre almejando grandes conquistas.

Aos meus familiares e amigos que me incentivam, acreditam em mim e me apoiaram em meus sonhos.

As amigas que fiz durante o curso de especialização, especialmente Ana Beatriz, Gabriela Ramos e Matheus Mesquita.

Aos professores e coordenadores dos cursos de especialização oferecidos pelo Instituto Butantan.

A minha orientadora Dra. Josefa B. da Silva, com quem tanto aprendi nesses meses trabalhando em conjunto e sua paciência e suporte.

A Dra. Angela S. Barbosa, por disponibilizar o laboratório, e seus alunos com quem compartilhei bons momentos e se tornaram amigos valiosos nessa caminhada.

A Dra. Sonia Andrade pela colaboração com a síntese e purificação dos peptídeos.

A Bruna F. Silva pela coparticipação no estudo.

Aos colaboradores do Instituto Adolfo Lutz, Dra. Eliete C. Romero e Dra. Roberta M Blanco.

Ao suporte financeiro da FAPESP, CNPq e Fundação Butantan.

" I'm not fighting because I think I can win, I'm fighting because...I must win".

Tite Kubo

RESUMO

MARIANO, Iago Henrique de Miranda. **Análise e identificação de peptídeos como possíveis candidatos para o desenvolvimento de vacinas e métodos diagnóstico da leptospirose.** 2022 45 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Biotecnologia para saúde – Vacinas e Biofármacos) – Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP; Instituto Butantan, São Paulo, 2022.

A leptospirose é causada por bactérias do gênero *Leptospira*, sendo responsável por aproximadamente 60 mil mortes anualmente ao redor do mundo. O contágio se dá pelo contato direto ou indireto com a urina de animais contaminados, pois as bactérias colonizam os túbulos renais e são excretadas na urina podendo causar insuficiência renal. As bactérias também se disseminam nos pulmões e no fígado, podendo causar febre, hemorragias pulmonares e insuficiência hepática com letalidade em torno de 15% dos casos. Atualmente, cerca de 13 espécies patogênicas de *Leptospira* são descritas na literatura com mais de 200 sorovares. Essa diversidade dificulta o desenvolvimento de vacinas e métodos de diagnósticos que consigam cobrir tamanha variedade. Dessa forma, o estudo almeja averiguar a capacidade de reconhecimento de peptídeos oriundos de proteínas de *Leptospira* por soro de hamsters, previamente imunizados com vacinas anti-leptospirose com LPS reduzido. Para isso, sete peptídeos foram desenhados e analisados *in silico*, sintetizados e avaliados por técnica de *Dot Blot*. Os peptídeos selecionados foram aplicados em membranas de nitrocelulose 0,45 µm e incubados com o soro de animais imunizados, para verificar possíveis reconhecimentos. Em seguida, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase. As membranas foram reveladas com o kit ECL e o sinal detectado por quimioluminescência utilizando o aparelho Uvitec Cambridge. Os resultados preliminares demonstraram capacidade de reconhecimento específico de três dos sete peptídeos desenhados a partir de proteínas de *Leptospira*. Os demais peptídeos não apresentaram sinal detectável ou evidenciaram possíveis interações inespecíficas. Com isso, concluímos que a técnica de *Dot Blot* pode ser uma ferramenta simples e eficaz utilizada para a análise e identificação de epítomos e peptídeos de proteínas capazes de induzir anticorpos em imunizações ou infecções naturais. Além disso, identificar peptídeos capazes de reconhecer especificamente

anticorpos anti-*Leptospira* é uma estratégia promissora para o desenvolvimento de testes de diagnóstico e identificação de possíveis candidatos para o desenvolvimento de vacinas.

Palavras-chave: Peptídeos. Anticorpos. *Leptospira*. Leptospirose. Vacinas. Dot Blot.

ABSTRACT

MARIANO, Iago Henrique de Miranda. **Analysis and identification of peptides as possible candidates for the development of vaccines and diagnostic methods for leptospirosis.** 2022 45 p. Monograph (Biotechnology for Health – Vaccines and Biopharmaceuticals) – Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP; Butantan Institute, Sao Paulo, 2022

Leptospirosis is caused by bacteria of the genus *Leptospira* and is responsible for about 60 thousand deaths annually worldwide. The infection occurs through direct or indirect contact with contaminated animals' urine because the bacteria colonize the renal tubes and are excreted in the urine, which can cause renal insufficiency. The bacteria can also spread into the lungs and liver, causing fever, lungs hemorrhage, and hepatic insufficiency with lethality in about 15% of cases. Nowadays, there are about 13 pathogenic species of *Leptospira* with more than 200 serovars described in the literature. This diversity hinders vaccine and diagnostic methods development, which could cover such variability. Thus, the study aims to check peptides' recognition capacity from *Leptospira* proteins by hamsters' serum previously immunized with an anti-Leptospirosis' vaccine with reduced LPS. To do so, seven peptides were designed and analyzed in silico, synthesized, and evaluated by the Dot Blot technique. The selected peptides were applied into a 0,45 µm nitrocellulose membrane and incubated with the serum of immunized animals to verify possible recognitions. Next, the membranes were incubated with a secondary antibody conjugated with peroxidase. The membranes were revealed using ECL kit and the chemiluminescent signal was detected by the Cambridge Uvitec. Preliminary results showed specific recognition capability of three of the seven designed peptides from *Leptospira* proteins. The remaining peptides did not show a detectable signal or showed possible non-specific interactions. Therefore, we concluded that the Dot Blot technique could be a simple and effective technique used to analyze and identification of epitopes and proteins able to induce antibodies in immunizations or natural infections. Besides that, the identification of peptides able to recognize specifically anti-*Leptospira* antibodies is a promising strategy for diagnostic test development and identification of possible candidates for vaccines development.

Keywords: Peptides. Antibodies. *Leptospira*. Leptospirosis. Vaccines. Dot Blot.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquema de membrana dupla das bactérias do gênero <i>Leptospira</i>	18
Figura 2: Esquema do preparo das vacinas e obtenção do soro de hamster contendo os anticorpos primários.	26
Figura 3: Análise e purificação por HPLC de peptídeos sintetizados quimicamente.	30
Figura 4: Reconhecimento dos peptídeos por anticorpos no soro de hamsters previamente imunizados	31
Figura 5: Reconhecimento dos peptídeos por anticorpos no soro de pacientes diagnosticados com Leptospirose.	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Demonstração da concentração dos peptídeos e controles utilizados no Dot Blot.	27
Tabela 2: Resultado da análise <i>In silico</i> dos peptídeos através de ferramentas de bioinformática	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LPS: Lipopolissacárideos

TLR: *Toll-like Receptor*

MAT: Teste de aglutinação microscópica

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

IHA: Hemaglutinação indireta

IMA: Imunoensaio de microesfera

RT-PCR: Real-Time Polymerase chain reaction

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 O Agente da Leptospirose.....	16
1.2 Morfologia de <i>Leptospira</i>.....	17
1.3 Ativação do sistema imunológico na leptospirose e reconhecimento de proteínas de membrana	19
1.4 Diagnostico	20
1.5 Medidas de prevenção da leptospirose.....	22
1.6 Uso de peptídeos como estratégias para o desenvolvimento de vacinas e métodos de diagnósticos.	22
2. OBJETIVOS.....	24
2.1 Geral	24
2.2 Específicos	24
3. METODOLOGIA	24
3.1 Desenho e análise dos peptídeos.....	24
3.2 Síntese e purificação dos peptídeos selecionados.....	25
3.3 Preparação de extratos de <i>Leptospira</i> e diluição do LPS de <i>E. coli</i> para utilização como controle positivo e negativo	25
3.4 Obtenção do anticorpo primário através da imunização de Hamsters com vacinas inativadas.....	25
3.5 Obtenção do anticorpo primário de indivíduos diagnosticados com leptospirose.....	26
3.6 Dot Blot	26
4. RESULTADOS.....	28

4.1 Análise <i>In silico</i> dos peptídeos selecionados	28
4.2 Análise da purificação dos peptídeos sintéticos	30
4.3 Ensaio de Dot Blot utilizando os peptídeos sintéticos incubado com o soro de animais previamente imunizados.....	31
4.4 Ensaio de Dot Blot utilizando os peptídeos sintéticos incubados com o soro de pacientes diagnosticados com leptospirose.....	32
5. DISCUSSÃO	34
6. CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS.....	38

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Agente da Leptospirose.

A leptospirose, ou Síndrome de Weil, é o nome dada a infecção causada pelas bactérias do gênero *Leptospira* que pode acometer quase todas as espécies de mamíferos. Dentre as espécies patogênicas de *Leptospira*, a *L. interrogans* é a mais diversa e representa mais de 80 sorovares (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010). Os sorovares são classificados em função das características apresentadas pelos seus epítomos na membrana celular em um mosaico de antígenos lipopolissacárideos (LPS), podendo variar em composição e orientação. Outra técnica utilizada na classificação é a hibridização DNA-DNA e análise filogenética do rRNA 16S, dividindo esse gênero em 3 grandes grupos (saprófitas, patogênicas e intermediárias) com 22 espécies descritas. Contudo, novas técnicas de sequenciamento podem auxiliar a decifrar as bases genéticas da diversidade antigênica de LPS, permitindo o desenvolvimento de novos métodos moleculares na identificação de sorovares (PICARDEAU, 2017).

A doença é considerada um problema de saúde principalmente em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, mas pode acometer países industrializados, principalmente em épocas chuvosas (SOCOLOVSKI et al., 2011). Estima-se mais de 1 milhão de casos anualmente no mundo com uma taxa de mortalidade entre 5-15%, resultando em aproximadamente 60000 mortes (PICARDEAU, 2017). Dentre os países acometidos, estão aqueles em desenvolvimento, tais como Índia, Sri Lanka, países da América Central e o Brasil (AGAMPODI; PEACOCK; THEVANESAM, 2009; BHARADWAJ et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2017; PETERS et al., 2017; SANTOS et al., 2017). Além disso, estudos conduzidos na Tailândia indicam que apesar da maior incidência em áreas úmidas e rurais, a bactéria não se restringe a essas locais e pode chegar a regiões urbanas (COSSON et al., 2014).

A *Leptospira* pode ser transmitida por diversos mamíferos, desde animais domésticos, gado e principalmente roedores. Enquanto a maioria dos mamíferos desenvolvem a doença quando entram em contato com o patógeno, ratos e camundongos conseguem permanecer assintomáticos mesmo quando a bactéria coloniza seus túbulos renais (LEVETT, 2001; MWACHUI et al., 2015). A *Leptospira* passa então a ser secretada na urina desses roedores e, caso haja água e umidade,

podem sobreviver durante meses no ambiente utilizando de um mecanismo de agregação bacteriana (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; TRUEBA et al., 2004).

A contaminação de outros animais ocorre pelo contato direto ou indireto com a urina desses animais contaminados, a bactéria penetra através da pele lesionada ou membranas mucosas e alcança a corrente sanguínea atingindo principalmente fígado, rins e pulmões. Logo, a primeira linha de defesa contra esse patógenos são a pele, saliva e mucosas (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; ASOH et al., 2014; LEVETT, 2001). Pacientes com sintomas leves podem apresentar apenas febre, dores de cabeça e musculares enquanto pacientes com quadros severos apresentam sangramentos nos pulmões e meningite, sendo que os principais sintomas relacionados a óbitos de pessoas e animais são hemorragias pulmonares ou insuficiência renal ou hepática (BHARTI et al., 2003a; LEVETT, 2001). Nos estágios iniciais, a doença deve ser tratada com o uso de antibióticos de forma a evitar a evolução do quadro, enquanto casos mais graves exigem internações hospitalares e a administração dos antibióticos por via intravenosa (CHACKO et al., 2021).

1.2 Morfologia de *Leptospira*

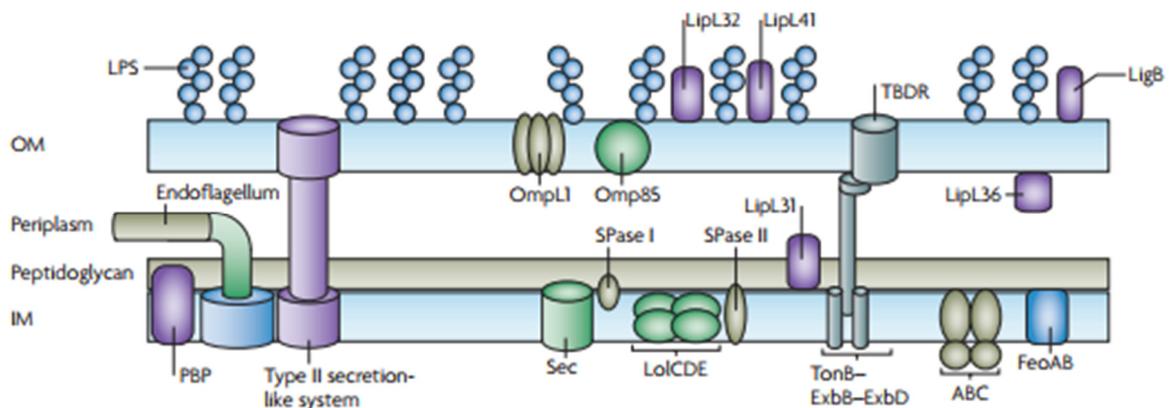
O gênero *Leptospira* possui dupla membrana composta de uma camada externa, constituída de lipoproteínas e lipopolissacarídeos (LPS), que envolve a membrana citoplasmática interna que está associada a uma fina parede celular composta de peptidoglicanos (CULLEN; HAAKE; ADLER, 2004; HAAKE; MATSUNAGA, 2010). Na membrana externa, encontramos proteínas com funções estruturais e funcionais, por exemplo as lipoproteínas: LipL32, LipL21 e LipL41 (CULLEN et al., 2005). Além de apresentarem proteínas com potencial imunogênico com diferentes funções, como a OmpL1 que é uma porina (SHANG et al., 1995) e a GspD que possui um papel de secreção (REYES et al., 2005).

Ademais, são classificadas como espiroquetas e possuem extremidades em forma de gancho, com dois flagelos periplasmáticos que auxiliam nos mecanismos de escape e motilidade, o que possibilita com que elas possam se estabelecer nos túbulos renais (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; BHARTI et al., 2003b; GOUVEIA et al., 2008; MCBRIDE et al., 2005). Outro fator de virulência que contribui para a colonização da bactéria são as proteínas de adesão expressas na membrana

de espécies patogênicas de forma a interagir com receptores e outras macromoléculas. A literatura descreve cepas patogênicas de *Leptospira* capazes de se aderirem a fibroblastos, macrófagos (TOMA et al., 2011), células endoteliais e epiteliais de rins, além de conseguirem induzir apoptose em macrófagos e infectar melanócitos (GASQUE; JAFFAR-BANDJEE, 2015; MERIEN; BARANTON; PEROLAT, 1997). Essa aderência é realizada através de um conjunto de proteínas capazes de interagirem e se ligarem a diferentes tecidos. Dentre as proteínas expressas pela *Leptospira*, *LigA* e *LigB* foram descritas como duas proteínas de adesão expressas apenas em espécies patogênicas de *Leptospira* (MATSUNAGA et al., 2003) capazes de se ligarem a fibrinogênio e proteínas de matriz extracelular (CHOY et al., 2007). Do mesmo modo, LipL53 e Lsa21 possuem a capacidade de interagir com proteínas de matriz (ATZINGEN et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2010), enquanto Lsa32 e Lsa24 conseguem aderir a laminina, e fibronectina além de se ligar a plasminogênio (DOMINGOS et al., 2015; STEVENSON et al., 2007).

A junção da motilidade, ação de proteases e mecanismos de adesão são essenciais para a bactéria conseguir transpassar as barreiras dos tecidos (KASSEGNE et al., 2014; WUNDER et al., 2016b), degradando a matriz extracelular (SILVA et al., 2018) e permitindo com que a bactéria se dissemine e alcance diversos órgãos principalmente fígado, rins e pulmões, podendo ser encontradas até mesmo no cérebro e coração (PICARDEAU, 2017; WUNDER et al., 2016a).

Figura 1: Esquema de membrana dupla das bactérias do gênero *Leptospira*.



Fonte: KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009

1.3 Ativação do sistema imunológico na leptospirose e reconhecimento de proteínas de membrana

O primeiro passo para uma futura resposta adaptativa seria o reconhecimento de antígenos da bactéria. O LPS é um dos principais e mais estudados antígenos de bactérias Gram-negativas e é reconhecido por receptores do tipo *Toll-like Receptor* (TLR). Estudos indicam que em camundongos acometidos pela leptospirose, o TLR4 reconhece porções lipídicas do lipídeo A, componente do LPS, sendo responsável pela produção precoce de anticorpos IgM e conseqüentemente a remoção da bactéria da corrente sanguínea, enquanto o TLR2 reconhece uma fração de polissacarídeo do LPS e atua em conjunto a essa resposta, promovendo secreção de citocinas, anticorpos e de óxido nítrico pelas células do sistema imunológico (CHASSIN et al., 2009; PICARDEAU, 2017). Camundongos C3H/HeJ, que apresentam TLR4 não funcional, desenvolvem a forma grave da doença, indicando que esse receptor é essencial no combate ao patógeno (DOMINGOS et al., 2017; SILVA et al., 2009; VIRIYAKOSOL et al., 2006).

Em contrapartida, o LPS de *Leptospira* é reconhecido principalmente pelo TLR2 em humanos ao invés do TLR4, sugerindo uma possível causa para o fato de humanos não montarem uma resposta inata efetiva (CHASSIN et al., 2009; WERTS et al., 2001). Estudos corroboram esses resultados mostrando que o Lipídeo A do LPS da *Leptospira* apresenta características distintas de outras bactérias Gram negativas (NAHORI et al., 2005; WERTS et al., 2001). Apesar dessa alta imunogenicidade, o LPS não consegue oferecer uma imunidade duradoura pois induzem uma resposta T independente. Além disso, os anticorpos gerados não são capazes de reconhecer outros sorovares, ficando restritos a sorovares homólogos (ADLER, 2015; HAAKE; ZUCKERT, 2015).

Outras proteínas de membrana são largamente estudadas igual ao LPS. A LipL32 é abundante em sorovares patogênicos de *Leptospira*, ocupando aproximadamente 20% da superfície interna da membrana externa (HAAKE et al., 2000; MALMSTRÖM et al., 2009). Estudos relacionam a LipL32 com a virulência da bactéria devido a sua capacidade de induzir inflamações no fígado em zebrafish e por ter sido encontrada em lesões nos tecidos cardíacos de pacientes que foram a óbito (CHANG et al., 2016; IGLEZIAS et al., 2020). A LipL32 é considerada um potencial indicador para o diagnóstico da infecção, uma vez que anticorpos anti-

LipL32 foram detectados no soro de pacientes infectados (LESSA-AQUINO et al., 2013; WERTS et al., 2001; YANG et al., 2006).

Ademais, novas proteínas vêm sendo estudadas no intuito de serem aplicadas no desenvolvimento de novos métodos diagnósticos ou vacinas. A LruC é uma lipoproteína conservada presente na membrana externa, sendo que anticorpos anti-LruC foram encontrados no soro de cavalos e o gene responsável foi identificado principalmente em espécies patogênicas de *Leptospira* (LATA et al., 2018; VERMA et al., 2012). Outras proteínas como: Omp11, LipL42 e LigA também são abundantes em *Leptospira* e foram estudadas para o desenvolvimento de vacinas e métodos diagnósticos, sendo aplicadas em diferentes estratégias (FENG et al., 2009; LUCAS et al., 2011; TOMA et al., 2014).

Após o reconhecimento dos antígenos, o hospedeiro desenvolve a resposta adaptativa predominantemente humoral no intuito de combater o patógeno. Estudos demonstram que a transferência de anticorpos convalescentes ou administração de anticorpos monoclonais auxiliam a resposta de neutrófilos e macrófagos, principais células que irão atuar na defesa do hospedeiro (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; CHEN et al., 2017; JOST et al., 1986).

1.4 Diagnóstico

A variedade nos sorovares e seus mecanismos de virulência dificultam o desenvolvimento de vacinas e métodos diagnósticos que consigam cobrir todo o gênero *Leptospira*. Além disso, o diagnóstico clínico é extremamente complicado com sintomas comuns à outras doenças, podendo levar a diagnóstico tardio e complicação do quadro (HAAKE; ZUCKERT, 2015).

Atualmente, o principal método empregado e aceito como referência pela OMS é o teste de aglutinação microscópica (MAT), amplamente utilizado por sua sensibilidade, especificidade e capacidade de distinguir os sorovares presentes. O método consiste em incubar o soro do paciente com culturas da bactéria para verificar uma possível aglutinação (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; MUSSO; LA SCOLA, 2013; SAMROT et al., 2021). Entretanto, a técnica MAT também possui relevantes pontos negativos pois é um teste que depende da presença de anticorpos, o que impossibilita o diagnóstico prematuro da doença. Além disso, necessita de manutenção de diferentes sorovares e espécies no laboratório referência o que torna economicamente inviável para muitos laboratórios

(ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; MUSSO; LA SCOLA, 2013; SAMROT et al., 2021).

O segundo método mais utilizado é o ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) com intuito de detectar os anticorpos IgM e IgG no soro de pacientes infectados. Essa metodologia já foi utilizada com uma grande variedade de antígenos proteicos, como LipL32, LigL41 ou OmpL1, visando aumentar a especificidade e sensibilidade (MUSSO; LA SCOLA, 2013; NATARAJASEENIVASAN et al., 2008; VEDHAGIRI et al., 2013). O ELISA é uma metodologia que pode ser automatizada e não depende do cultivo de bactérias em laboratório. Porém, possui limitação devido a reprodutibilidade frente a diversidade de sorovares de *Leptospira* exigindo testes complementares para confirmar o diagnóstico (DESAKORN et al., 2012; ZIN et al., 2019).

Ao longo de anos, novos métodos diagnósticos foram desenvolvidos com intuito de identificar anticorpos de pacientes infectados, buscando maior especificidade, sensibilidade e menor custo, tais como o método de hemaglutinação indireta (IHA), que aglutina hemácias na presença de anticorpos anti-*Leptospira* IgM ou IgG (SAMROT et al., 2021; SULZER et al., 1975), o método LEPTO dipstick que adsorve antígenos em uma membrana que vão interagir com anticorpos anti-*Leptospira* do indivíduo (GUSSENHOVEN et al., 1997; SEHGAL et al., 1999) ou o imunoensaio de microesfera (IMA) com antígenos de *Leptospira* aderidos a *beads* que, quando em contato com a amostra dos pacientes, interagem com os anticorpos IgM ou IgG presentes proporcionando detecção de sinal fluorescente (WYNWOOD et al., 2015, 2016).

Além dos métodos indiretos que buscam identificar os anticorpos anti-*Leptospira*, existem métodos diretos que buscam identificar a bactéria ou seu material genético nas amostras de indivíduos diagnosticados com leptospirose. Para isso, pode-se utilizar de microscopia de campo escuro para visualizar a bactéria (SAMROT et al., 2021) ou a técnica de RT-PCR que amplifica o material genético da *Leptospira* em amostras de urina e sangue logo nos primeiros estágios da doença (AHMED et al., 2012; BAL et al., 1994; NAKAJIMA et al., 1995; VILLUMSEN et al., 2010). Devido aos seus resultados precisos e rápidos, diversos locais incorporaram o PCR como metodologia complementar aos métodos indiretos como ELISA ou MAT (GASEM et al., 2020).

1.5 Medidas de prevenção da leptospirose

A vacinação seria a melhor estratégia para evitar complicações pela incidência de leptospirose, mas ainda não foram desenvolvidas vacinas que possam ser usadas mundialmente. Grande parte das vacinas já desenvolvidas são de uso animal e induzem respostas imunológicas T-independente contra o LPS e produção de IFN- γ , oferecendo proteção durante um curto tempo e sem proteção cruzada contra outros sorovares (ADLER; FAINE, 1977; JOST; ADLER; FAINE, 1989; NAIMAN et al., 2001; TEIXEIRA et al., 2019). As que são oferecidas a gados e suínos não conseguem impedir a colonização dos túbulos renais, permitindo que esses animais ainda transmitam a doença. O foco dessa vacinação seria reduzir os sintomas e perdas econômicas devido a abortos e natimortos (BROWN et al., 2003).

Novas estratégias de desenvolvimento de candidatos vacinais buscam remover o LPS na membrana da bactéria, seja através de reagentes químicos (LAURETTI-FERREIRA et al., 2020), ou através de mutações dos genes relacionados a via de biossíntese do LPS (SRIKRAM et al., 2011). Outras abordagens focam no uso de antígenos recombinantes, buscando proteínas imunogênicas e conservadas que consigam gerar resposta imune duradoura (ADLER, 2015; BRANGER et al., 2001, 2005; CAO et al., 2011; DELLAGOSTIN et al., 2011; HAAKE et al., 1999).

Entretanto, poucos estudos têm apresentado resultados consistentes no que se refere a proteção e eliminação da bactéria dos tecidos do hospedeiro infectado. Encontrar um antígeno de *Leptospira* que reúna todas as características desejadas é uma tarefa complicada. A proteína deve ser imunogênica, se ligar fortemente a complexos de histocompatibilidade, ter epitopos disponíveis para a geração de anticorpos além de gerar imunidade cruzada com outras espécies de *Leptospira* e diferentes sorovares.

1.6 Uso de peptídeos como estratégias para o desenvolvimento de vacinas e métodos de diagnósticos.

Atualmente, diversas abordagens tem sido utilizadas para o desenvolvimento de vacinas ou métodos diagnósticos universais capazes de induzir uma forte e duradoura resposta imune ou identificar com precisão diferentes sorovares. Identificar peptídeos imunogênicos e acessíveis ao sistema imunológico são

estratégias que estão sendo bastante exploradas e que nos permitem desenvolver métodos para o diagnóstico prematuro através da detecção de anticorpos contra antígenos específicos. Além disso a aplicação do uso de peptídeos é uma estratégia promissora na busca de candidatos vacinais contra doenças infecciosas. A imunoinformática surge como uma alternativa extremamente interessante neste contexto, uma vez que a predição de epítomos levaria à seleção e produção 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).

Relatos da literatura tem demonstrado eficiência e sensibilidade em testes para diagnóstico de diferentes patógenos utilizando o estudo de peptídeos como ferramenta. Casey e colaboradores relataram alta sensibilidade em testes desenvolvidos com quatro peptídeos a partir de proteínas de *Mycobacterium avium* (CASEY et al., 2011; GORI et al., 2013). Do mesmo modo, um peptídeo com 20 aminoácidos foi utilizado no desenvolvimento de diagnóstico de Zika vírus através de ELISA com aproximadamente 96% de sensibilidade e especificidade (MISHRA et al., 2018).

Outra forma de utilização de peptídeos é através da identificação de biomarcadores presentes durante a infecção para diferenciação de patógenos em infecções com sintomatologia similar. O estudo de Karlsson e colaboradores buscou identificar peptídeos como biomarcadores que pudessem diferenciar bactérias envolvidas com infecções no trato respiratório, tais como, *Staphylococcus aureus*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae* por apresentarem sintomas iniciais semelhantes (KARLSSON et al., 2020). Da mesma forma, pesquisadores buscam identificar antígenos na proteína M de estreptococos do grupo A no intuito de utilizar destes peptídeos no desenvolvimento de vacinas (AZUAR et al., 2019).

No caso de vírus, vacinas de peptídeos vem sendo pesquisadas para Influenza com intuito de serem aplicadas em humanos e na pecuária (LOHIA; BARANWAL, 2015; LÓPEZ-SERRANO et al., 2021), assim como o vírus da Hepatite-C em que se busca peptídeos capazes de conferir proteção contra os 6 genótipos conhecidos atualmente (MOLERO-ABRAHAM et al., 2013).

Com isso, almeja-se encontrar antígenos que sejam acessíveis, imunogênicos e conservados capazes de conferir proteção contra uma diversidade de patógenos

sem que resultem em reatividade cruzada com moléculas do hospedeiro. Vacinas baseadas em peptídeos de *Leptospira* podem oferecer imunidade cruzada contra diferentes espécies e sorovares da bactéria e possibilitam avanços em direção a uma vacina universal (GRASSMANN; SOUZA; MCBRIDE, 2017).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo do estudo foi certificar se anticorpos presentes no soro de hamsters previamente imunizados com vacinas com LPS reduzido ou de indivíduos diagnosticados com leptospirose eram capazes de reconhecer peptídeos sintéticos oriundos de proteínas de *Leptospira*

2.2 Específicos

1. Analisar a capacidade de reconhecimento de anticorpos advindos do soro de hamsters previamente imunizados frente a diferentes peptídeos desenhados a partir de proteínas de *Leptospira*.
2. Realizar através de ferramentas de bioinformática a análise da similaridade dos peptídeos com outras proteínas presentes no banco de dados do NCBI e averiguar a homologia com a proteína original;
3. Selecionar os peptídeos que apresentassem maior reconhecimento pelos soros de hamster e analisar frente aos soros de pacientes diagnosticados com leptospirose

3. METODOLOGIA

3.1 Desenho e análise dos peptídeos

As sequências de aminoácidos dos peptídeos desenhados foram analisadas através de ferramentas de bioinformática (Protein BLAST) para confirmação da proteína originária e análises de homologia com outras proteínas de *Leptospira* no banco de dados do NCBI.

3.2 Síntese e purificação dos peptídeos selecionados

Os peptídeos foram selecionados a partir da publicação de LATA et al., (2018) que utilizou da ferramenta de Bioinformática Immune Epitope Database (IEDB) para identificar peptídeos de proteínas da membrana externa de *L. interrogans* serovar Copenhageni com características imunogênicas e conservadas. Em seguida, os resultados foram filtrados através da seleção de epítopos capazes de se ligarem fortemente ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e serem reconhecidos por linfócitos T e B. Os peptídeos promissores foram então sintetizados quimicamente pela colaboradora Dra. Sonia A. Andrade, purificados através da técnica de HPLC e identificados como Pep1-7. Os peptídeos foram mantidos em temperatura de 2-8 °C para uso posterior.

3.3 Preparação de extratos de *Leptospira* e diluição do LPS de *E. coli* para utilização como controle positivo e negativo

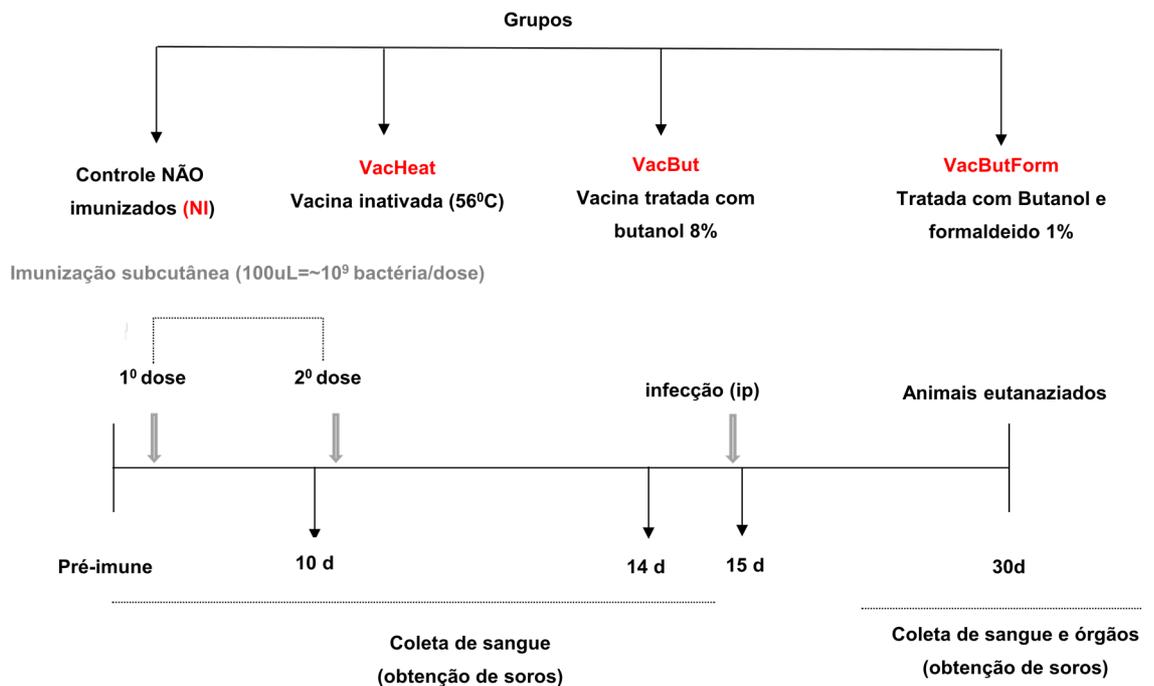
Extratos da cepa patogênica *L. interrogans* serovar Copenhageni e saprófita *L. biflexa* serovar Patoc foram preparados para utilização como controle positivo e negativo respectivamente. Ambas foram cultivadas em meio de cultura EMJH, centrifugadas após 6 dias de crescimento e lavadas com PBS. Em seguida, as culturas foram ressuspensas em PBS e coquetel inibidor de protease (Sigma). As bactérias foram lisadas na presença de Beads de vidro e submetidas à pulsos de 2500 rpm durante 2 minutos em mine-Bead beater (Biospect Products). Os tubos foram imediatamente imersos em gelo e o processo foi repetido 10x. Ao fim do procedimento, as proteínas totais foram quantificadas através do equipamento Nanodrop 1000 e aliqüotadas em microtubos e armazenadas a -80 °C para posterior uso. Além disso, foi utilizado LPS de *E. coli* (Sigma) como controle negativo.

3.4 Obtenção do anticorpo primário através da imunização de Hamsters com vacinas inativadas

As vacinas foram previamente produzidas pelo nosso grupo, através de projeto financiado pelo CNPq (Processo: 473035/2013-8), conforme Laurette e colaboradores (2020).

As suspensões foram formuladas e injetadas em hamsters segundo esquema indicado na Figura 2. Os animais sobreviventes foram eutanasiados 30 dias após o desafio conforme descrito no protocolo (CEAUIB 1314/14).

Figura 2: Esquema do preparo das vacinas e obtenção do soro de hamster contendo os anticorpos primários.



Fonte: Próprio autor, 2022.

3.5 Obtenção do anticorpo primário de indivíduos diagnosticados com leptospirose

As amostras do soro de indivíduos diagnosticados com leptospirose foram provenientes do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo/SP. A obtenção e utilização das amostras de soros de pacientes para esse estudo foi aprovado previamente pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Processo: CAAE-31938820.3.1001.0059).

3.6 Dot Blot

Foram utilizadas membranas de Nitrocelulose com poros de 0,2 μm ou 0,45 μm cortadas com dimensões 2x6 cm (Amersham Protran Premium, Alemanha). Os peptídeos foram pesados e diluídos em água ultrapura de acordo com a Tabela 1. Em seguida, foram aplicados 5 μL por amostra na membrana na concentração de 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, seguido por 30 minutos de incubação a temperatura ambiente e 30 minutos

em estufa a 37 °C. As membranas foram bloqueadas com PBS-Tween 20 (0,05%) contendo 10% de leite em pó molico durante 1 hora sob agitação. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas três vezes com PBS-T20 (0,05%), sob agitação durante 10 min.

Em seguida o anticorpo primário foi adicionado as membranas de acordo com as diluições desejadas. As amostras de soro de hamsters imunizados e não imunizados (controle) foram diluídos em PBS T20 (0,05%) contendo 5% de leite em pó mólco em razão 1:2000. As membranas foram incubadas sob agitação durante 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida foram lavadas 3x com PBS T20 (0,05%), e adicionado o anticorpo secundário anti-IgG de hamster conjugado com peroxidases (Invitrogen, USA), na diluição 1:3000 em PBS T20 (0,05%) e incubadas por 1 h a temperatura ambiente sob agitação. As últimas lavagens foram realizadas usando TBS T-20 (0,05%) durante 10 minutos com 3 repetições. As membranas foram reveladas utilizando os reagentes ECL (Amersham ECL Prime, Alemanha) na proporção 1:1 e o sinal foi detectado por quimioluminescência no aparelho Cambridge Uvitec. A densidade de cada *spot* foi analisada utilizando o software ImageJ. Uma área da membrana foi selecionada para obtenção da densidade basal do sinal e a densidade de cada *spot* experimental foi medida utilizando da mesma área subtraída da densidade do *spot* basal da membrana. Os resultados da densidade final obtida dos *spots* na membrana experimental foram comparados com os *spots* da membrana controle.

Tabela 1: Demonstração da concentração dos peptídeos e controles utilizados no Dot Blot.

Peptídeos	Concentração aplicada na membrana
Pep 1-7	250 µg/5 µL
Extrato de Copenhageni	0,922 fg/5 µL
Extrato de Patoc	10,3 µg/5 µL
LPS de E. coli	1,5 µg/5 µL

Fonte: Próprio autor, 2022.

4. RESULTADOS

4.1 Análise *In silico* dos peptídeos selecionados

Através da análise *in silico*, observamos que os peptídeos selecionados eram advindos principalmente da proteína de membrana LruC e tinham alta similaridade entre diferentes espécies de *Leptospira* com exceção ao peptídeo 4, que apresentou homologia com diferentes proteínas de *Leptospira* e variação na cobertura (Query Cover) (tabela 2). Os demais peptídeos apresentaram cobertura acima de 80%, mostrando que a maior parte dos peptídeos apresentaram homologia com as sequências disponíveis no GenBank. Destacam-se os peptídeos 1, 3, 5 e 7 que apresentaram uma cobertura de 100% com diferentes espécies patogênicas de *Leptospira*, principalmente os peptídeos 1, 3 e 7 que apresentaram similaridade com proteínas de mais de 5 espécies de *Leptospira* patogênica. Além disso, todos os peptídeos apresentaram identidade acima de 90%, exceto o Pep4.

Além disso, foi analisado o *e-value* como critério de confiabilidade na análise dos peptídeos. Dos 7 peptídeos testados, 4 apresentaram valor menor que 0,01 (peptídeos 1-3 e 6) o que representa baixa chance de encontrar aleatoriamente regiões homólogas. Apesar de obter um valor de E-value maior que 0,01, o peptídeo 7 também apresentou score baixo (0,11) para uma sequência curta de aminoácidos. De forma contrária, o peptídeo 4 e 5 obtiveram E-value maiores que 10 e 1 respectivamente, sendo os maiores valores encontrados na análise *in silico* dos peptídeos.

Tabela 2: Análise *In silico* dos peptídeos através da ferramenta Protein BLAST.

Id.	Nome da Proteína	Identidade da proteína	Ident.	Query Cover	E - value
Pep 1	LruC domain-containing protein	WP_004443213.1	92.31%	100%	3,00E-04
		WP_000721953.1	92.31%	100%	3,00E-04
		WP_061205385.1	92.31%	100%	3,00E-04
		WP_061216776.1	92.31%	100%	3,00E-04
		WP_004756261.1	92.31%	100%	3,00E-04
		WP_020984624.1	92.31%	100%	3,00E-04
		WP_117340911.1	92.31%	100%	3,00E-04
		WP_061209339.1	92.31%	100%	3,00E-04
Pep 2		WP_000721953.1	100%	83%	0.003
		WP_100737469.1	100%	83%	0.003
		WP_100762626.1	100%	83%	0.003

Pep 3		WP_002998667.1	100%	83%	0.003	
		WP_004443213.1	90%	83%	0.015	
		WP_061205385.1	90%	83%	0.015	
		WP_004443213.1	100%	100%	3,00E-09	
		WP_000721953.1	100%	100%	3,00E-09	
		WP_061205385.1	100%	100%	3,00E-09	
		WP_061216776.1	100%	100%	3,00E-09	
		WP_020984624.1	100%	100%	3,00E-09	
		WP_117340911.1	100%	100%	3,00E-09	
		WP_135670626.1	100%	100%	3,00E-09	
Pep 4	APC family permease	WP_109018937.1	100	58%	12	
	SH3 domain-containing protein	WP_135762858.1	88,89	66%	12	
	class I SAM-dependent methyltransferase	WP_061222742.1	72,73	91%	23	
	6-phosphogluconolactonase	WP_001167587.1	80	83%	23	
Pep 5	LruC domain-containing protein	WP_004443213.1	100%	100%	1.2	
		WP_000721953.1	100%	100%	1.2	
		WP_004756261.1	100%	100%	1.2	
Pep 6		WP_004443213.1	100%	92%	3,00E-06	
		WP_000721953.1	100%	92%	3,00E-06	
		WP_020772482.1	100%	92%	3,00E-06	
		WP_002998667.1	100%	92%	3,00E-06	
		WP_069609704.1	100%	92%	3,00E-06	
		Pep 7	WP_004443213.1	100%	100%	0,11
			WP_000721953.1	100%	100%	0,11
WP_061205385.1	100%		100%	0,11		
WP_061216776.1	100%		100%	0,11		
WP_004767826.1	100%		100%	0,11		
WP_135651040.1	100%		100%	0,11		
WP_020984624.1	100%		100%	0,11		
WP_117340911.1	100%		100%	0,11		
WP_061209339.1	100%		100%	0,11		
	WP_100762626.1	100%	100%	0,11		

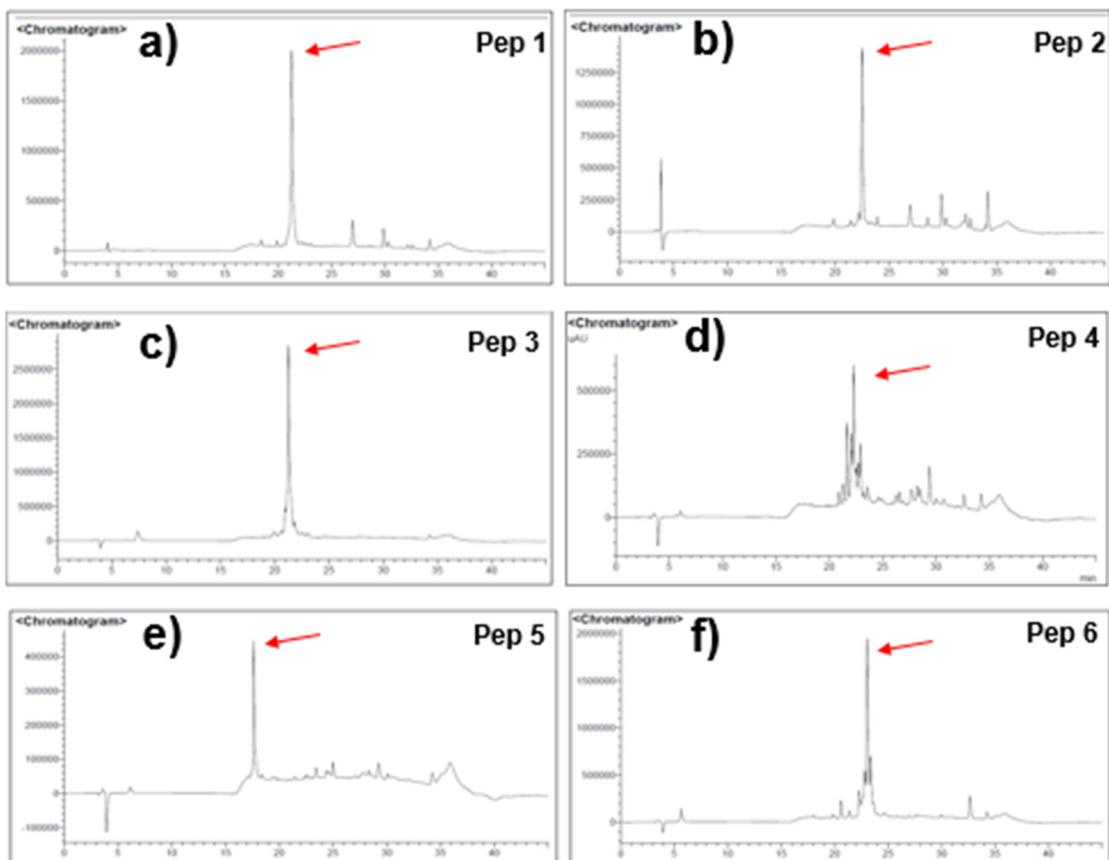
Fonte: Próprio autor, 2022

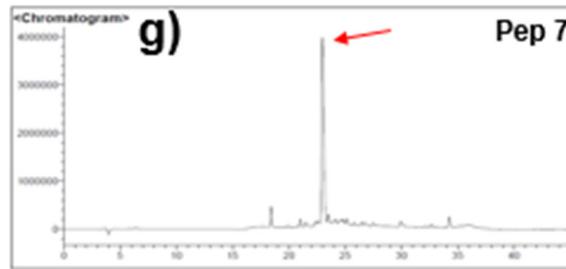
4.2 Análise da purificação dos peptídeos sintéticos

Os sete peptídeos selecionados na literatura foram sintetizados quimicamente e purificados através de HPLC. Os peptídeos foram analisados frente a capacidade de interação com anticorpos de hamsters previamente imunizados com vacinas com baixo teor de LPS.

Conforme representado na Figura 1, todos os peptídeos, exceto o Pep 4, apresentaram uma purificação eficiente, com picos bem definidos. Os peptídeos 1, 3 e 7 apresentaram ruídos baixos e distantes do pico de interesse. Além disso, os três peptídeos obtiveram picos de absorvância acima de 2 milhões μ AU (2mi, 2,5mi e 4mi respectivamente), indicando um alto rendimento na purificação. Já os peptídeos 2, 5 e 6 apresentaram picos adjacentes ao pico de interesse, porém não comprometendo a eficiência dos mesmos durante as análises. Por fim, com relação ao peptídeo 4, não foi possível obter uma pureza e rendimento eficiente com absorvância de aproximadamente 500mil μ AU.

Figura 3: Análise e purificação por HPLC de peptídeos sintetizados quimicamente.





Fonte: Próprio autor, 2022.

Cromatograma representando os picos dos peptídeos de interesse após a purificação por HPLC.

4.3 Ensaio de Dot Blot utilizando os peptídeos sintéticos incubado com o soro de animais previamente imunizados.

Dentre os sete peptídeos selecionados e testados frente ao soro de hamster, destacam-se os Pep1, 2, 4 e 7, os mesmos apresentaram maior sinal quimioluminescente, indicando maior reconhecimento pelos anticorpos presentes no soro de hamsters previamente imunizados (Fig 3a). Entretanto, o peptídeo 4 também foi reconhecido no soro de hamsters não imunizados (controle). Já os peptídeos 1, 2 e 7 apresentaram maior especificidade com detecção do sinal apenas pelo soro de hamsters do grupo imunizado. Entre estes, o Pep7 apresentou maior sinal quimioluminescente com uma densidade de 51178 (Fig 3b).

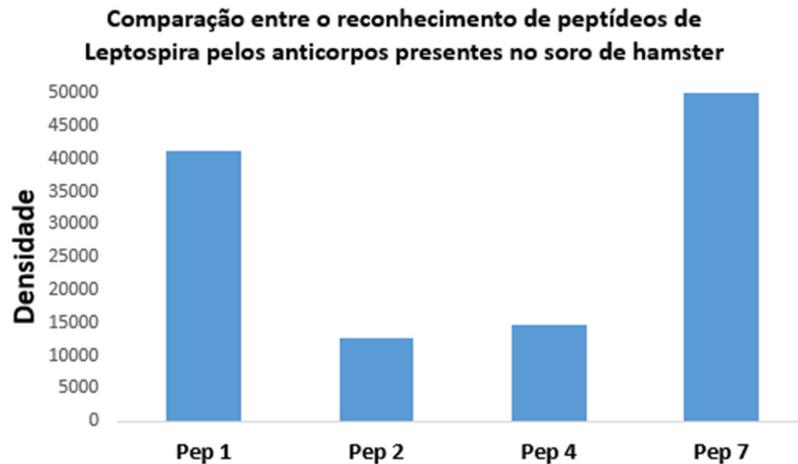
Já os peptídeos 3, 5 e 6 apresentam sinal quimioluminescente próximo aos valores detectados no controle, indicando que este peptídeo não apresenta a especificidade desejada.

Figura 4: Reconhecimento dos peptídeos por anticorpos no soro de hamsters previamente imunizados

a)

	PEP-1	PEP-2	PEP-3	PEP-4	PEP-5	PEP-6	PEP-7
NI							
I							

b)



Fonte: Próprio autor, 2022.

Reconhecimento dos peptídeos sintéticos desenhados a partir de proteínas de *Leptospira* por anticorpos presentes no soro de hamsters previamente imunizados com vacinas inativadas com baixo teor de LPS. **a)** Sinal detectado na membrana de nitrocelulose demonstrando a interação dos peptídeos com anticorpos de hamsters imunizados (I) e não imunizados (NI). **b)** Comparação do sinal quimioluminescente entre os peptídeos com maior reconhecimento pelos anticorpos presentes no soro.

4.4 Ensaio de Dot Blot utilizando os peptídeos sintéticos incubados com o soro de pacientes diagnosticados com leptospirose.

Dentre os peptídeos testados, Pep 2 e 7 foram selecionados para testes posteriores com o soro de indivíduos diagnosticados com leptospirose. As membranas, contendo os peptídeos aderidos, foram incubadas com o soro de pacientes afim de avaliar a capacidade de reconhecimento e especificidade dos peptídeos.

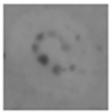
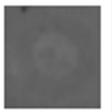
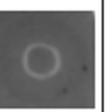
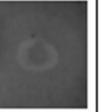
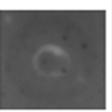
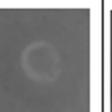
Conforme apresentado (Fig. 4a), o peptídeo 2 não apresentou resultados satisfatórios, uma vez que foi detectado um leve sinal na membrana controle o que não aconteceu nas membranas tratadas com o soro de pacientes contendo os anticorpos primários anti-*leptospira*. Além disso, notou-se maior densidade do *spot* comparativamente ao da membrana testada com o soro de pacientes diagnosticados com leptospirose (Fig 4b).

Por outro lado, o peptídeo 7 não apresentou sinal quimioluminescente na membrana controle, enquanto as membranas experimentais incubadas com o soro de pacientes diagnosticados apresentaram sinal quimioluminescente em diferentes proporções. O menor sinal observado foi registrado na membrana tratada com o

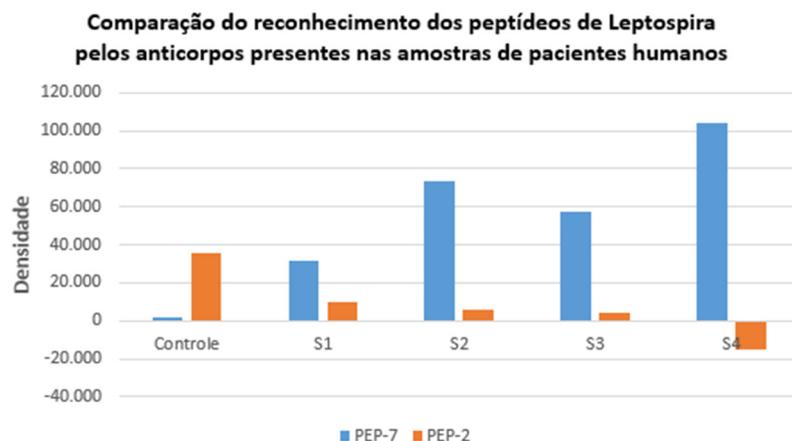
soro do paciente 1 (S1), (Fig 4a) já o maior reconhecimento foi constatado com o soro do paciente 4 (S4) um sinal de aproximadamente 17x e 100x maior do que na membrana controle respectivamente (Fig 4b).

Figura 5: Reconhecimento dos peptídeos por anticorpos no soro de pacientes diagnosticados com Leptospirose.

a)

	NI	S1	S2	S3	S4
PEP-2					
PEP-7					

b)



Fonte: Próprio autor, 2022.

Reconhecimento dos peptídeos de proteínas de *Leptospira* pelos anticorpos presentes no soro de pacientes diagnosticados com leptospirose. **a)** Sinal quimioluminescente detectado nas membranas de nitrocelulose demonstrando a interação dos peptídeos com anticorpos presentes nos soros de 4 pacientes (S1-4) diagnosticados com leptospirose, e não infectados (NI) **b)** Diferença no sinal quimioluminescente entre os peptídeos 2 e 7 incubados com os diferentes soros de pessoas diagnosticadas com *Leptospira* (S1-4) e não infectados (Controle).

5. DISCUSSÃO

A aplicação de peptídeos no desenvolvimento de drogas e vacinas vem sendo amplamente estudada. Muitos peptídeos já são utilizados como fármacos, e muitos outros estão em fase de testes pré-clínicos e clínicos, sendo utilizados na indústria médica e farmacêutica, principalmente no tratamento do câncer e de distúrbios metabólicos, além de outras condições como alergia, distúrbios imunológicos e doenças cardiovasculares.

Neste trabalho foi avaliada a capacidade de ligação de anticorpos, produzidos através de imunizações com vacinas com baixo teor de LPS, a peptídeos desenhados a partir de sequências de proteínas de *Leptospira*. A identificação da interação de ligação entre os epítopos de proteínas às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) é considerada como o primeiro passo para o desenho de uma vacina promissora. Considerando essa premissa, peptídeos foram desenhados a partir de sequências da proteína LruC de *Leptospira*, presente na parte interna da membrana extracelular.

A LruC é uma proteína conservada na maioria das espécies patogênicas de *Leptospira*. Essa proteína, assim como LruA e LruB, foi identificada em casos de uveíte em cavalos acometidos por *Leptospira* (LATA et al., 2018; VERMA et al., 2005, 2012). Por ser uma proteína de membrana externa imunogênica e altamente conservada, LruC é considerada uma interessante candidata no desenvolvimento de vacinas. Os resultados obtidos neste estudo corroboram com a literatura, uma vez que as sequências dos peptídeos desenhados a partir da proteína LruC foram identificadas em mais de uma espécie de *Leptospira* e com alta identidade no estudo *in silico*, sugerindo que a proteína é conservada entre as espécies patogênicas de *Leptospira*, conforme relatado previamente (VERMA et al., 2005, 2012).

Além disso, os baixos valores de *E-value* apontam uma alta confiabilidade dos resultados obtidos nos alinhamentos. Dentre os 7 peptídeos utilizados no trabalho, 6 deles foram relacionados a proteína LruC com *Query Cover* acima de 83%, com exceção ao peptídeo 4 que foi relacionado a diferentes proteínas. Essa alta homologia indica que esses peptídeos poderiam ser utilizados para estratégias de desenvolvimento de vacinas e métodos diagnósticos por ser uma proteína conservada em diferentes espécies patogênicas de *Leptospira*, possibilitando uma cobertura maior e proteção contra os sorovares de *Leptospira* incidentes na

população (LATA et al., 2018). Dentre os peptídeos selecionados na literatura, aqueles nomeados como 3, 5 e 6 não apresentaram diferença no sinal quimioluminescente das membranas experimentais e controle, sugerindo que não houve reconhecimento dos anticorpos presentes no soro de hamsters previamente imunizados. A ausência de reconhecimento pode ser devido a diferentes fatores como baixa imunogenicidade ou acessibilidade desse epítomos frente ao sistema imunológico.

De maneira contrária, o Pep 4 foi reconhecido por soros dos animais não imunizados e nos soros dos grupos experimentais, apontando inespecificidade deste peptídeo. Outro fator que pode explicar o sinal quimioluminescente na membrana controle foi o processo de purificação, já que o cromatograma do Pep 4 apresentou diversos picos menores adjacentes ao pico principal.

Por fim, os peptídeos 1, 2 e 7 apresentaram resultados satisfatórios, uma vez que houve sinal quimioluminescente apenas na membrana experimental, evidenciando um reconhecimento específico dos anticorpos presentes no soro de hamsters previamente imunizados. Esse reconhecimento era esperado por serem peptídeos descritos como bons indutores da resposta humoral e adaptativa (LATA et al., 2018). A presença de sinal quimioluminescente sugere que ao administrar a vacina de bacterina com baixo teor de LPS, os epítomos desses peptídeos foram capazes de estimular a resposta imune adaptativa, resultando na produção de anticorpos nos animais imunizados, indicando ser um forte candidato vacinal com possível capacidade de neutralizar o patógeno e auxiliar a resposta do hospedeiro através da exposição de epítomos (MALONIS; LAI; VERGNOLLE, 2019).

Nas análises complementares, os peptídeos 2 e 7 foram incubados com o soro de pacientes acometidos por leptospirose. Não houve reconhecimento do Pep2 pelos anticorpos presente no soro dos pacientes analisados, o sinal quimioluminescente foi detectado apenas na membrana controle, indicando inespecificidade deste peptídeo para soros humanos, apesar das análises *in silico* não ter apresentado homologia com proteínas de humanos.

Neste trabalho conseguimos identificar um peptídeo promissor. O Pep7 que foi reconhecido por soros de hamsters imunizados e por soros de humanos diagnosticados com leptospirose, apresentando maior especificidade frente aos demais peptídeos analisados. Tal resultado reforça a análise *in silico* realizada, sugerindo que essa sequência de aminoácidos é conservada e imunogênica mesmo

entre diferentes espécies de *Leptospira*. Reforçando assim os relatos da literatura, indicando que um peptídeo com tais características é potencialmente interessante para o desenvolvimento de vacinas, e possivelmente com cobertura para uma maior diversidade de espécies patogênicas ou para o uso em métodos diagnósticos com maior especificidade (KANAGAVEL; SHANMUGHAPRIYA; ANBARASU, 2014; LI et al., 2014).

Corroborando os nossos resultados Tatum e colaboradores (2012) identificaram um peptídeo FHAB2, um fator de virulência de *Pasteurella multocida*, altamente conservado e imunogênico e seu uso em vacina demonstrou imunidade cruzada contra outros sorotipos (TATUM et al., 2012). Similarmente, estudos realizados buscando identificar epítomos de proteínas virais, Lee e colaboradores (2013), selecionaram um polipeptídeo de H5N1 e desenvolveram uma vacina capaz de proteger camundongos contra outros subtipos virais tais como H1N1 e H5N2, além do H5N1 (LEE et al., 2013).

Estudos também descrevem diferentes estratégias utilizando peptídeos e epítomos de proteínas como candidatos no desenvolvimento de uma vacina universal contra as diferentes espécies de *Leptospira*. Dentre eles, destacam-se os peptídeos desenhados a partir de proteínas OmpL1 e LipL41 com epítomos capazes de induzir diferenciação de linfócitos e produção de anticorpos, bem como, epítomos das proteínas LmpL1, LipL32 E LipL21 que foram selecionados e fusionados no desenvolvimento de vacinas contra leptospirose, baseada em peptídeo (LIN et al., 2011, 2016).

Nesta mesma linha de estudos, pesquisadores selecionaram regiões conservadas de LigA para desenvolvimento de método de diagnóstico de leptospirose com resultados promissores devido a maior sensibilidade na fase aguda da doença (KANAGAVEL; SHANMUGHAPRIYA; ANBARASU, 2014).

Pesquisas com o intuito de identificar epítomos imunogênicos, conservados e acessíveis ao sistema imune do hospedeiro com capacidade de interagir com os linfócitos T e B, induzindo fortes respostas humoral e celular são áreas bastante promissoras para o desenvolvimento de vacinas e métodos de diagnóstico na leptospirose uma vez que oferecem a possibilidade de cobrir uma maior diversidade de sorovares e especificidade nos testes de diagnóstico.

6. CONCLUSÃO

Neste estudo conseguimos identificar um peptídeo com maior especificidade frente aos soros testados, que foi capaz de ser reconhecido pelo soro tanto de animais previamente imunizados quanto de pacientes diagnosticados com leptospirose.

Com isso novos testes serão efetuados a fim de utilizar este peptídeo no melhoramento de testes para diagnóstico rápido e seguro da leptospirose, oferecendo maior precisão e sensibilidade. Além disso, esse peptídeo pode auxiliar no desenvolvimento futuro de uma vacina recombinante mais eficiente, que ofereça maior capacidade imunogênica e protetora, sendo capaz de cobrir uma maior diversidade de sorovares da bactéria.

A nossa estratégia de uso de peptídeos desenvolvida neste estudo, tem o potencial de gerar dados importantes para a criação de uma nova vacina contra leptospirose para uso em humanos. Além disso, nos fornece informações relevantes sobre o tipo de resposta imune gerada contra os peptídeos analisados, direcionando pesquisas para a produção de uma vacina recombinante como alternativa promissora e extremamente importante para o controle da doença e como medida preventiva em animais domésticos.

REFERÊNCIAS¹

- ADLER, B. Vaccines against leptospirosis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 387, p. 251–272, 2015.
- ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3–4, p. 287–296, 2010.
- AGAMPODI, S.; PEACOCK, S. J.; THEVANESAM, V. The potential emergence of leptospirosis in Sri Lanka. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 9, p. 524–526, 2009.
- AHMED, S. A. et al. Rapid Diagnosis of Leptospirosis by Multiplex PCR. **Malaysian Journal of Medical Sciences**, v. 19, n. 3, p. 9–16, 2012.
- ASOH, T. et al. Natural defense by saliva and mucosa against oral infection by *leptospira*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 60, n. 6, p. 383–389, 2014.
- ATZINGEN, M. V et al. Lsa21 , a novel *leptospiral* protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 70, p. 1–16, 2008.
- AZUAR, A. et al. Recent advances in the development of peptide vaccines and their delivery systems against group a streptococcus. **Vaccines**, v. 7, n. 3, p. 1–26, 2019.
- BAL, A. E. et al. Detection of leptospires in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 8, p. 1894–1898, 1994.
- BHARADWAJ, R. et al. An urban outbreak of leptospirosis in Mumbai, India. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 55, n. 6, p. 194–196, 2002.
- BHARTI, A. R. et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 12, p. 757–771, 2003a.
- BRANGER, C. et al. Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 11, p. 6831–6838, 2001.
- BRANGER, C. et al. Protection against *Leptospira interrogans* sensu lato challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 7, p. 4062–4069, 2005.
- BROWN, R. A. et al. Comparison of three different leptospiral vaccines for induction of a type 1 immune response to *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. **Vaccine**, v. 21, n. 27–30, p. 4448–4458, 2003.
- CAO, Y. et al. Evaluation of novel fusion proteins derived from extracellular matrix binding domains of LigB as vaccine candidates against leptospirosis in a hamster model. **Vaccine**, v. 29, n. 43, p. 7379–7386, 2011.
- CASEY, J. L. et al. Peptides specific for *Mycobacterium avium* subspecies

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

paratuberculosis infection: Diagnostic potential. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 24, n. 8, p. 589–596, 2011.

CHACKO, C. S. et al. A short review on leptospirosis: Clinical manifestations, diagnosis and treatment. **Clinical Epidemiology and Global Health**, v. 11, n. 4, p. 100741, 2021.

CHANG, M. Y. et al. Leptospiral outer membrane protein LipL32 induces inflammation and kidney injury in zebrafish larvae. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1–12, 2016.

CHASSIN, C. et al. TLR4- and TLR2-Mediated B Cell Responses Control the Clearance of the Bacterial Pathogen, *Leptospira interrogans*. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 4, p. 2669–2677, 2009.

CHEN, X. et al. Mononuclear-macrophages but not neutrophils act as major infiltrating anti-leptospiral phagocytes during leptospirosis. **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, p. 1–25, 2017.

CHOY, H. A. et al. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 5, p. 2441–2450, 2007.

COSSON, J. F. et al. Epidemiology of *Leptospira* Transmitted by Rodents in Southeast Asia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 6, 2014.

CULLEN, P. A. et al. Surfaceome of *Leptospira* spp. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 8, p. 4853–4863, 2005.

CULLEN, P. A.; HAAKE, D. A.; ADLER, B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. **FEMS microbiol**, v. 28, n. 3, p. 291–318, 2004.

DELLAGOSTIN, O. A. et al. Recombinant vaccines against Leptospirosis. **Human Vaccines**, v. 7, n. 11, p. 1215–1224, 2011.

DESAKORN, V. et al. Accuracy of a commercial IgM ELISA for the diagnosis of human leptospirosis in Thailand. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 3, p. 524–527, 2012.

DOMINGOS, R. F. et al. Novel *Leptospira interrogans* protein Lsa32 is expressed during infection and binds laminin and plasminogen. **Microbiology**, v. 161, p. 851–864, 2015.

DOMINGOS, R. H. et al. Resistance of mice to *Leptospira* infection and correlation with chemokine response. **Immunobiology**, v. 222, n. 11, p. 1004–1013, 2017.

EFFLER, P. V et al. Evaluation of Eight Rapid Screening Tests for Acute Leptospirosis in Hawaii. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1464–1469, 2002.

FENG, C. Y. et al. Immune strategies using single-component LipL32 and multi-component recombinant LipL32-41-OmpL1 vaccines against *leptospira* Immune

strategies using single-component LipL32 and multi-component recombinant LipL32-41-OmpL1 vaccines against *leptospira*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 42, n. 9, p. 796–803, 2009.

FRAGA, T. R. et al. Immune Evasion by Pathogenic *Leptospira* Strains : The Secretion of Proteases that Directly Cleave Complement Proteins. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 6, p. 876–886, 2014.

GASEM, M. H. et al. Leptospirosis in Indonesia: Diagnostic challenges associated with atypical clinical manifestations and limited laboratory capacity. **BMC Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 1–11, 2020.

GASQUE, P.; JAFFAR-BANDJEE, M. C. The immunology and inflammatory responses of human melanocytes in infectious diseases. **Journal of Infection**, v. 71, n. 4, p. 413–421, 2015.

GORI, A. et al. Peptides for immunological purposes: Design, strategies and applications. **Amino Acids**, v. 45, n. 2, p. 257–268, 2013.

GOUVEIA, E. L. et al. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 3, p. 505–508, 2008.

GRASSMANN, A. A.; SOUZA, J. D.; MCBRIDE, A. J. A. A universal vaccine against leptospirosis: Are we going in the right direction? **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 3, p. 1–8, 2017.

GUSSENHOVEN, G. C. et al. LEPTO Dipstick , a Dipstick Assay for Detection of *Leptospira* - Specific Immunoglobulin M Antibodies in Human Sera. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 92–97, 1997.

HAAKE, D. A. et al. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 12, p. 6572–6582, 1999.

HAAKE, D. A. et al. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 4, p. 2276–2285, 2000.

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

HAAKE, D. A.; ZUCKERT, W. R. The leptospiral outer membrane. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 387, p. 187–221, 2015.

HATTA, M. et al. Introduction of a Rapid Dipstick assay for the detection of *Leptospira*-specific Immunoglobulin M antibodies in the laboratory diagnosis of Leptospirosis in a hospital in Makassar, Indonesia. **Southeast asian journal of tropical medicine and public health**, v. 31, n. 3, p. 515–520, 2000.

IGLEZIAS, S. D. et al. Immunohistochemical detection of Lp25 and LipL32 proteins in skeletal and cardiac muscles of fatal human leptospirosis. **Rev. Inst. Med. Trop São**

Paulo, v. 62, n. 85, p. 1–10, 2020.

JOST, B. H. et al. A monoclonal antibody reacting with a determinant on leptospiral lipopolysaccharide protects guinea pigs against leptospirosis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 22, n. 3, p. 269–275, 1986.

KANAGAVEL, M.; SHANMUGHAPRIYA, S.; ANBARASU, K. B-Cell-Specific Peptides of *Leptospira interrogans* LigA for Diagnosis of Patients with Acute Leptospirosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 21, n. 3, p. 354–359, 2014.

KARLSSON, R. et al. Discovery of species-unique peptide biomarkers of bacterial pathogens by tandem mass spectrometry-based proteotyping. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 19, n. 3, p. 518–528, 2020.

KASSENE, K. et al. Identification of collagenase as a critical virulence factor for invasiveness and transmission of pathogenic *leptospira* species. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 7, p. 1105–1115, 2014.

KHAKI, P. Clinical Laboratory Diagnosis of Human Leptospirosis. **Int J Enteric Pathog**, v. 4, n. 1, p. 1–7, 2016.

KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. *Leptospira*: The dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 10, p. 736–747, 2009.

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.

LAURETTI-FERREIRA, F. et al. New strategies for *Leptospira* vaccine development based on LPS removal. **PLoS ONE**, v. 15, n. 3, p. 1–16, 2020.

LEE, J. et al. The highly conserved HA2 protein of the influenza A virus induces a cross protective immune response. **Journal of Virological Methods**, v. 194, n. 1–2, p. 280–288, 2013.

LESSA-AQUINO, C. et al. Identification of Seroreactive Proteins of *Leptospira interrogans* Serovar Copenhageni Using a High-Density Protein Microarray Approach. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 10, 2013.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Journal of the American Medical Association**, v. 150, n. 14, p. 1406–1407, 2001.

LI, W. et al. Peptide vaccine: Progress and challenges. **Vaccines**, v. 2, n. 3, p. 515–536, 2014.

LIN, X. et al. Characterization of Conserved Combined T and B Cell Epitopes in *Leptospira interrogans* Major Outer Membrane Proteins OmpL1 and LipL41. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 21, p. 1–9, 2011.

- LIN, X. et al. Chimeric epitope vaccine against *Leptospira interrogans* infection and induced specific immunity in guinea pigs. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 241, p. 1–9, 2016.
- LOHIA, N.; BARANWAL, M. Identification of conserved peptides comprising multiple T Cell epitopes of matrix 1 protein in H1N1 influenza virus. **Viral Immunology**, v. 28, n. 10, p. 570–579, 2015.
- LÓPEZ-SERRANO, S. et al. Immune responses to pandemic h1n1 influenza virus infection in pigs vaccinated with a conserved hemagglutinin HA1 peptide adjuvanted with CAF®01 or CDA/αGalCerMPEG. **Vaccines**, v. 9, n. 7, 2021.
- LUCAS, D. S. D. et al. Recombinant LipL32 and LigA from *Leptospira* are unable to stimulate protective immunity against leptospirosis in the hamster model. **Vaccine**, v. 29, n. 18, p. 3413–3418, 2011.
- MALMSTRÖM, J. et al. Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen *Leptospira interrogans*. **Nature**, v. 460, n. 7256, p. 762–765, 2009.
- MALONIS, R. J.; LAI, J. R.; VERGNOLLE, O. Peptide-Based Vaccines : Current Progress and Future Challenges. **Chemical Reviews**, v. 120, p. 3210–3229, 2019.
- MATSUNAGA, J. et al. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Mol Microbiol**, v. 49, n. 4, p. 929–945, 2003.
- MCBRIDE, A. J. A. et al. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 18, n. 5, p. 376–386, 2005.
- MERIEN, F.; BARANTON, G.; PEROLAT, P. Invasion of vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 2, p. 729–738, 1997.
- MISHRA, N. et al. Diagnosis of Zika virus infection by peptide array and ELISA. **mBio**, v. 9, n. 2, p. 1–16, 2018.
- MOLERO-ABRAHAM, M. et al. Selection of conserved epitopes from hepatitis c virus for pan-population stimulation of T-cell responses. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2013, 2013.
- MUSSO, D.; LA SCOLA, B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: A challenge. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 46, n. 4, p. 245–252, 2013.
- MWACHUI, M. A. et al. Environmental and Behavioural Determinants of Leptospirosis Transmission: A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. 1–15, 2015.
- NAHORI, M.-A. et al. Differential TLR Recognition of Leptospiral Lipid A and Lipopolysaccharide in Murine and Human Cells. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 9, p. 6022–6031, 2005.

NAIMAN, B. M. et al. Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and $\gamma\delta$ T lymphocytes. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 12, p. 7550–7558, 2001.

NAKAJIMA, H. et al. Evaluation of the polymerase chain reaction for diagnosis of tuberculous meningitis. **Rinsho byori. The Japanese journal of clinical pathology**, v. 43, n. 8, p. 843–846, 1995.

NATARAJASEENIVASAN, K. et al. Serodiagnosis of severe leptospirosis: Evaluation of ELISA based on the recombinant OmpL1 or LipL41 antigens of *Leptospira interrogans* serovar autumnalis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 102, n. 8, p. 699–708, 2008.

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

OLIVEIRA, M. A. A. et al. Human leptospirosis: occurrence of serovars of *Leptospira spp.* in the state of Minas Gerais, Brazil, from 2008 to 2012. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 483–488, 2017.

OLIVEIRA, T. R. et al. LipL53 , a temperature regulated protein from *Leptospira interrogans* that binds to extracellular matrix molecules. **Microbes and Infection**, v. 12, p. 207–217, 2010.

PETERS, A. et al. Leptospirosis in the Caribbean: a literature review. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 41, p. 1–9, 2017.

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

REYES, E. A. R. et al. Expresión en *Escherichia coli* del gen *gspd I* del sistema de secreción tipo II de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad hardjo *. **Revista Cubana de Med Trop**, v. 57, n. 1, p. 45–46, 2005.

SAMROT, A. V. et al. Leptospiral infection, pathogenesis and its diagnosis—a review. **Pathogens**, v. 10, n. 2, p. 1–30, 2021.

SANTOS, I. DE O. C. et al. Human leptospirosis in the Federal District, Brazil, 2011–2015: Eco-epidemiological characterization. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 6, p. 777–782, 2017.

SAVIO, M. L. et al. Detection and identification of *Leptospira interrogans* serovars by PCR coupled with restriction endonuclease analysis of amplified DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 935–941, 1994.

SEHGAL, S. C. et al. LEPTO Dipstick: A rapid and simple method for serodiagnosis of acute leptospirosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 2, p. 161–164, 1999.

SHAFIGHI, T. et al. Molecular detection of *Leptospira spp.* in the urine of cattle in northern Iran. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 15, n. 4, p. 402–405, 2014.

- SHANG, E. S. et al. The rare outer membrane protein, OmpL1, of pathogenic *Leptospira* species is a heat-modifiable porin. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 8, p. 3174–3181, 1995.
- SILVA, J. B. D. et al. Chemokines expression during *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni infection in resistant BALB/c and susceptible C3H/HeJ mice. **Microbial Pathogenesis**, v. 47, n. 2, p. 87–93, 2009.
- SILVA, L. B. et al. *Leptospira interrogans* Secreted Proteases Degrade Extracellular Matrix and Plasma Proteins From the Host. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. 92, p. 1–11, 2018.
- SOCOLOVSKI, C. et al. Strikes, flooding, rats, and leptospirosis in Marseille, France. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 10, p. 710–715, 2011.
- SRIKRAM, A. et al. Cross-protective immunity against leptospirosis elicited by a live, attenuated lipopolysaccharide mutant. **Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 6, p. 870–879, 2011.
- STEVENSON, B. et al. *Leptospira interrogans* Endostatin-Like Outer Membrane Proteins Bind Host Fibronectin, Laminin and Regulators of Complement. **PLoS ONE**, v. 2, n. 11, p. e1188, 2007.
- SULZER, C. R. et al. Evaluation of an indirect hemagglutination test for the diagnosis of human leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 218–221, 1975.
- TATUM, F. M. et al. Cross-Protection Against Fowl Cholera Disease with the Use of Recombinant *Pasteurella multocida* FHAB2 Peptides Vaccine Research Note — Cross-Protection Against Fowl Cholera Disease with the Use of Recombinant *Pasteurella multocida* FHAB2 Peptides Vaccine. **Avian Diseases**, v. 56, n. 3, p. 589–591, 2012.
- TEIXEIRA, A. F. et al. Adjuvanted leptospiral vaccines: Challenges and future development of new leptospirosis vaccines. **Vaccine**, v. 37, n. 30, p. 3961–3973, 2019.
- TOMA, C. et al. Characteristic features of intracellular pathogenic *Leptospira* in infected murine macrophages. **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 11, p. 1783–1792, 2011.
- TOMA, C. et al. Leptospiral outer membrane protein LMB216 is involved in enhancement of phagocytic uptake by macrophages. **Cellular Microbiology**, v. 16, n. 9, p. 1366–1377, 2014.
- TRUEBA, G. et al. Cell aggregation: A mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. **International Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 35–40, 2004.
- VEDHAGIRI, K. et al. Detection of LipL32-specific IgM by ELISA in sera of patients with a clinical diagnosis of leptospirosis. **Pathogens and Global Health**, v. 107, n. 3, p. 130–135, 2013.

- VERMA, A. et al. LruA and LruB, novel lipoproteins of pathogenic *Leptospira interrogans* associated with equine recurrent uveitis. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 11, p. 7259–7266, 2005.
- VERMA, A. et al. Antibodies to a novel leptospiral protein, LruC, in the eye fluids and sera of horses with *Leptospira*-associated uveitis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 3, p. 452–456, 2012.
- VILLUMSEN, S. et al. Expanding the diagnostic use of PCR in leptospirosis: Improved method for DNA extraction from blood cultures. **PLoS ONE**, v. 5, n. 8, 2010.
- VIRIYAKOSOL, S. et al. Toll-like receptor 4 protects against lethal *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae infection and contributes to in vivo control of leptospiral burden. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 2, p. 887–895, 2006.
- WERTS, C. et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. **Nature Immunology**, v. 2, n. 4, p. 346–352, 2001.
- WUNDER, E. A. et al. Real-time PCR reveals rapid dissemination of *Leptospira interrogans* after intraperitoneal and conjunctival inoculation of hamsters. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 7, p. 2105–2115, 2016a.
- WUNDER, J. E. A. et al. A novel flagellar sheath protein, FcpA, determines filament coiling, translational motility and virulence for the *Leptospira* spirochete. **Molecular Microbiology**, v. 101, n. 3, p. 457–470, 2016b.
- WYNWOOD, S. J. et al. Validation of a Microsphere Immunoassay for Serological Leptospirosis Diagnosis in Human Serum by Comparison to the Current Gold Standard. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, p. 1–13, 2015.
- WYNWOOD, S. J. et al. Serological diagnosis of Leptospirosis in bovine serum samples using a microsphere immunoassay. **Veterinary Record Open**, v. 3, n. 1, p. 1–7, 2016.
- YANG, C. W. et al. Toll-like receptor 2 mediates early inflammation by leptospiral outer membrane proteins in proximal tubule cells. **Kidney International**, v. 69, n. 5, p. 815–822, 2006.
- ZIN, N. M. et al. Evaluation of igm LAT and igm ELISA as compared to microscopic agglutination test (MAT) for early diagnosis of *leptospira* sp. **Tropical Biomedicine**, v. 36, n. 4, p. 1071–1080, 2019.