

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

ANDREIA ZAGO CIUFFA

Aplicação da proteômica de *Leptospira* e ferramentas de imunoinformática para a identificação de candidatos ao desenvolvimento de uma vacina contra leptospirose

Uberlândia

2021

ANDREIA ZAGO CIUFFA

Aplicação da proteômica de *Leptospira* e ferramentas de imunoinformática para a identificação de candidatos ao desenvolvimento de uma vacina contra leptospirose

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de doutora em Ciências Veterinárias

Área de concentração: Saúde Animal

Orientador: Prof^a. Dr^a. Anna Monteiro
Correia Lima

Uberlândia

2021

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

C581 Ciuffa, Andreia Zago, 1987-
2021 Aplicação da proteômica de Leptospira e ferramentas de
imunoinformática para a identificação de candidatos ao
desenvolvimento de uma vacina contra leptospirose
[recurso eletrônico] / Andreia Zago Ciuffa. - 2021.

Orientadora: Anna Monteiro Correia Lima.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Pós-graduação em Ciências Veterinárias.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2021.319>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Veterinária. I. Lima, Anna Monteiro Correia ,1973-
(Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-
graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias

BR 050, Km 78, Campus Glória, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34) 2512-6811 - www.ppgcv.famev.ufu.br - mesvet@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	CIÊNCIAS VETERINÁRIAS				
Defesa de:	TESE DE DOUTORADO Nº PPGCVET/001/2021				
Data:	28 de julho de 2021	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	17:30
Matrícula do Discente:	11713VET008				
Nome do Discente:	ANDREIA ZAGO CIUFFA				
Título do Trabalho:	Aplicação da proteômica de <i>Leptospira</i> e ferramentas de imunoinformática para a identificação de candidatos ao desenvolvimento de uma vacina contra leptospirose				
Área de concentração:	Saúde animal				
Linha de pesquisa:	Investigação Etiológica				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Estudos de epidemiologia, de novas técnicas de diagnóstico e prevenção de doenças bacterianas em animais domésticos e selvagens				

Reuniu-se por Videoconferência (meio eletrônico), da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Professores Doutores: **Renata Santos Rodrigues - UFU; Murilo Vieira da Silva - UFU; João Helder Frederico de Faria Naves - UNIPAC; Pollyanna Mafra Soares - FAZU; Anna Monteiro Correia Lima** orientadora da candidata.

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Anna Monteiro Correia Lima, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

[A]provado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Anna Monteiro Correia Lima, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/07/2021, às 17:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renata Santos Rodrigues, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/07/2021, às 17:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Murilo Vieira da Silva, Médico(a) Veterinário(a)**, em 28/07/2021, às 17:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **João Helder Frederico de Faria Naves, Usuário Externo**, em 28/07/2021, às 18:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Pollyanna Mafra Soares, Usuário Externo**, em 28/07/2021, às 18:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2899606** e o código CRC **2676DD56**.

Dedico este trabalho à minha família, pelo incentivo, apoio e carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente à minha família: minha mãe, meu pai, minha irmã e meu marido. Este trabalho é dedicado a eles por sempre me apoiarem e me incentivarem, sem eles eu não teria conseguido.

Agradeço à minha orientadora, professora Anna Lima, pela parceria que construímos ao longo desses anos, pela ajuda, incentivo e pela confiança no meu trabalho. Também agradeço à professora Renata, pelo exemplo de educação e generosidade e por estar sempre disposta a me ajudar em tudo.

Agradeço a todos os amigos que essa caminhada me proporcionou, amigos do laboratório que se tornaram a minha segunda família. Dayane Olímpia, Laís Miguel, Pollyanna Mafra, Muriell Ganda, Lara Reis, Danilo Mundim, Bruno Cabral, Rafael Quirino, Ana Buiatte, Gabriela Bim, Melissa Alves, Gabriela Alves, Fernanda Mendes, Gabriela Ribeiro, Thais Fernanda, Lígia Cuccato, Vinícius Vieira, João Helder Frederico, são amigos que estiveram sempre comigo, me ajudando com muita alegria e amor.

Agradeço de todo coração ao meu amigo Lucas Veloso, ele foi o meu alicerce e é minha maior inspiração.

Agradeço aos professores Walter Lilenbaum e Marcos Bryan pelo auxílio na minha pesquisa e pelo exemplo profissional. Ao professor Luiz Ricardo Goulart filho pela parceria com o Laboratório de Nanobiotecnologia.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante os anos do curso, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro e à Universidade Federal de Uberlândia (UFU) pela estrutura concedida, que possibilitaram a realização desta pesquisa.

RESUMO

A leptospirose é uma zoonose causada por espiroquetas do gênero *Leptospira*, que tem um impacto significativo em saúde pública com mais de um milhão de novas infecções e 59 mil mortes por ano, além de grandes perdas econômicas na agropecuária. A falta de uma vacina totalmente eficaz contra a doença é um dos principais fatores que comprometem o seu controle, por isso é emergencial o desenvolvimento de novas vacinas que seja capaz de superar as limitações das vacinais disponíveis no mercado atualmente, e que possa ser empregada em populações humanas globalmente. Por isso, o objetivo deste estudo foi realizar uma avaliação completa do perfil proteico de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20, com caracterização *in silico* das proteínas desconhecidas e das proteínas com capacidade de gerar resposta imune para compor uma vacina multiepítopo. Para a realização da proteômica foi desenvolvido um protocolo simplificado de obtenção do extrato proteico seguido pela espectrometria de massas LTQ-Orbitrap Velos acoplado à cromatografia líquida EASY-nLC II. As proteínas encontradas passaram por uma avaliação ampla, como análise taxonômica para identificação das proteínas comuns à outras espécies e sorovares da bactéria, descrição dos grupos funcionais, design da estrutura tridimensional de proteínas importantes no estudo da *Leptospira* e caracterização *in silico* das proteínas não caracterizadas e das proteínas já identificadas como geradoras de resposta imune. A partir daí foram utilizados diversos servidores para realização das análises de imunoinformática, visando a identificação e de seleção das proteínas com maior potencial para alvo vacinal e subsequente seleção dos melhores epítomos, capazes de estimular resposta imune humoral e celular. As proteínas Loa 22, LipL32, Flagelina, Fator de alongação Tu e Fator de alongação Ts, tiveram sua estrutura tridimensional desenvolvida e validada. Dentre as proteínas selecionadas com maior potencial para alvo vacinal, a maioria correspondeu a proteínas não caracterizadas até então. Este estudo também identificou epítomos de células B, de Linfócito T Citotóxico, de Linfócito T Helper, de células TCD4 e indutores de IFN- γ , que foram reunidos através de um design racional para constituir em uma proteína quimérica multiepítopo a ser empregada como alvo vacinal com potencial para superar as limitações da bacterina utilizada atualmente. O estudo do perfil proteico de *Leptospira* associado a triagem de alvos vacinais, por meio da imunoinformática, resultou na construção de uma proteína quimérica, com características desejáveis para um imunógeno no processo de desenvolvimento da vacina.

Palavras-chave: *Leptospira* spp. Proteoma. Imunoinformática.

ABSTRACT

Leptospirosis is a zoonosis caused by spirochetes of the *Leptospira* genus, which causes a significant impact on public health, with more than one million new infections and 59,000 deaths each year, moreover major economic losses in agriculture. Lack of an fully effective vaccine against the disease is one of the main factors that compromise its control, so it is urgent to develop new vaccines that is able to overcoming the limitations of vaccines currently available, that can be used in human populations globally. Therefore, the aim of this study was to fully evaluate the protein profile of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni strain M20, with in silico characterization of uncharacterized proteins and proteins that is able to induce immune response and compose a subunit vaccine. To perform proteomics, a simplified protocol for obtaining protein extract was developed followed by mass spectrometry LTQ-Orbitrap Velos coupled to liquid chromatography EASY-nLC II. The proteins found undego a full evaluation, like a taxonomic analysis to identify common proteins to other species and serovars of the bacterium; description of functional categories; design of the three-dimensional structure of important proteins in the *Leptospira* study and in silico characterization of uncharacterized proteins and proteins already identified as induce an immune response. Then, many servers were used to perform immunoinformatics analysis, aiming to identify and select the proteins with the major potential for vaccine target and subsequent selection of the best epitopes able to stimulating humoral and cellular immunity. Proteins Loa 22, LipL32, Flagellin, Elongation factor Tu and Elongation factor Ts had their three-dimensional structure developed and validated. Among the selected proteins with the major vaccine target potential, most are uncharacterized proteins until then. This study also identified epitopes of B cell, of cytotoxic T lymphocyte, of helper T lymphocyte, of TCD4 cell and of IFN- γ inducers. This epitopes have been assembled through rational design to constitute a multi-epitope chimeric protein that can be used as a vaccine target with potential for overcome the bacterin limitations. The detailed study of *Leptospira* protein profile associated with the screening of vaccine targets by immunoinformatics resulted in the design of a chimeric protein, with desirable characteristics for an immunogen in the vaccine development process.

Keywords: *Leptospira* spp. Proteome. Immunoinformatics

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
2.1 Leptospirose	8
2.2 Proteômica aplicada à <i>Leptospira</i>	10
2.3 Vacinologia: a busca por candidatos à vacina contra leptospirose	16
2.4 Resposta imune à <i>Leptospira</i>	19
2.4.1 Imunidade inata	20
2.4.2 Imunidade Adquirida.....	22
2.4.3 Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC).....	24
2.5 Imunoinformática.....	26
3 METODOLOGIA.....	28
3.1 Desenvolvimento de um protocolo simplificado para extração de proteína total de <i>L. interrogans</i>	28
3.2 Espectrometria de massas	29
3.3 Modelagem e validação <i>in silico</i> de proteínas com importância reconhecida: Loa 22, LipL32, Flagelina, Fator de elongação Tu e Fator de elongação Ts	30
3.4 Caracterização físico-química <i>in silico</i> das proteínas não caracterizadas e das proteínas relatadas em outras pesquisas como geradoras de resposta imunológica	30
3.5 Avaliação da alergenicidade das proteínas	31
3.6 Predição de antigenicidade das proteínas e outras características relevantes para um alvo vacinal	31
3.7 Seleção das proteínas com maior potencial para alvo vacinal	32
3.8 Análise das proteínas selecionadas nos servidores Immune Epitope Database (IEDB) e IFN epitope e avaliação individual dos peptídeos.....	32
3.9 Construção da proteína quimérica, <i>docking</i> molecular e simulação imunológica	33
4 RESULTADOS	35
5 DISCUSSÃO	69
6 CONCLUSÃO	76
REFERÊNCIAS.....	77
APÊNDICE A – ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA REALIZADAS PARA A ELABORAÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL E VALIDAÇÃO DA MODELAGEM DAS PROTEÍNAS Loa 22, FLAGELINA, FATOR DE ELONGAÇÃO TU E FATOR DE ELONGAÇÃO TS E LipL32	91

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma das zoonoses de maior ocorrência em todo o mundo, principalmente nos países com clima subtropical ou tropical, como o Brasil, pelo fato de as altas temperaturas e a umidade favorecerem a sobrevivência da bactéria no ambiente. Além disso, as estações com maior pluviosidade estão relacionadas ao aumento de casos da doença (ADLER; MOCTEZUMA, 2010; ESCÓCIO et al., 2010; FÁVERO et al., 2017).

Trata-se de uma enfermidade infecciosa causada por espiroquetas da família *Leptospiraceae* que acomete uma grande diversidade de seres vivos como animais silvestres, domésticos e o homem, sendo caracterizada pela infecção de múltiplos órgãos. As alterações renais, hepáticas, miocardite e hemorragia pulmonar são sintomas frequentemente observados, porém, os aspectos clínicos e a severidade da doença variam de acordo com a espécie infectada e o sorovar de *Leptospira* infectante (MARINHO, 2008).

Do ponto de vista epidemiológico, o *Rattus norvegicus* é o principal reservatório da *Leptospira*, mas animais domésticos e silvestres também podem albergar a bactéria nos túbulos renais, longe da ação dos anticorpos, e eliminá-las por longos períodos na urina. Por isso, esses animais são importantes na transmissão da doença e na manutenção da bactéria no ambiente (ADLER; MOCTEZUMA, 2010; FAINE et al., 1999).

A incidência mundial da leptospirose humana supera 1 milhão de novas infecções, acarretando cerca de 59.000 mortes por ano (COSTA et al., 2015). Em relação à saúde animal, as consequências da doença estão relacionadas principalmente às perdas econômicas, uma vez que acomete cães e animais de produção, como bovinos, equinos, suínos, caprinos e ovinos causando falhas reprodutivas, queda na produção de leite e mortes (ELLIS, 1990; PIRES, 2010; PAIXÃO et al., 2016).

A falta de vacinas e tratamentos eficientes contra a leptospirose, bem como a existência de hospedeiros assintomáticos que disseminam a bactéria no ambiente e a falta de saneamento básico está aumentando a carga dessa doença no mundo. As vacinas utilizadas não mudaram muito nos últimos anos e são compostas pela bactéria inteira inativada, sendo a principal forma de prevenção nos animais e em alguns países, em populações humanas (DELLAGOSTIN et al., 2017; LATA et al., 2018).

As limitações das vacinas disponíveis como reações adversas, falta de imunidade cruzada entre os sorovares e o curto prazo de proteção, tornam seu uso insatisfatório no mercado veterinário e impedem que ela seja empregada globalmente em humanos, mesmo acreditando-

se que a vacinação de populações humanas seja a estratégia mais viável para o controle da doença nesta espécie (ELLIS, 2015; ADLER, 2015; LATA et al., 2018).

Por isso, existem diversas pesquisas que buscam o desenvolvimento de uma nova vacina a partir de uma subunidade proteica ou pela construção de proteínas com epítomos imunogênicos conhecidos (DELLAGOSTIN et al., 2017; FERNANDES et al., 2017; FOOKOLAE et al., 2020; FORTES et al., 2020; LATA et al., 2018; LATA et al., 2020).

As proteínas realizam a maioria das funções fisiológicas das células. Em relação às células bacterianas, especificamente *Leptospira*, o estudo aprofundado de suas proteínas é fundamental para a compreensão dos mecanismos de virulência, patogenicidade e antigenicidade, bem como para o emprego dessas moléculas como alvos vacinais (EMIDIO et al., 2015; FORTES et al., 2020).

As pesquisas em vacinologia utilizam amplamente o sorovar Copenhageni, de *L. interrogans*, pelo fato de ter sido um dos primeiros a ter seu genoma sequenciado (NASCIMENTO et al., 2004), o que abriu caminho para diversos estudos sobre leptospirose utilizando este sorovar. Além disso, é um dos sorovares mais patogênicos para humanos e animais domésticos (WHO, 2003; ADLER, 2015).

Estudos do proteoma de *Leptospira* vêm sendo realizados, utilizando tecnologias mais modernas como a espectrometria de massas (MS) e uma diversidade de amostras para desvendar aspectos clínicos da doença (ESHGHI et al., 2015; NASCIMENTO FILHO et al., 2018).

Paralelamente a estes avanços, a imunoinformática tem sido empregada extensivamente no desenvolvimento de vacinas, apresentando alto nível de confiança na predição de imunógenos eficazes a partir de bancos de dados de genomas e proteomas (DELLAGOSTIN et al., 2017; FOOKOLAE et al., 2020; LATA et al., 2018; LATA et al., 2020).

Considerando a crescente demanda por novas vacinas contra leptospirose, o objetivo deste estudo foi avaliar o perfil proteico de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20, com *design* das estruturas tridimensionais de proteínas importantes, caracterização *in silico* das proteínas desconhecidas e das proteínas com capacidade de gerar resposta imune, além de empregar ferramentas de imunoinformática para identificação e seleção de peptídeos antigênicos e imunogênicos a fim de desenvolver o protótipo de uma nova vacina multiepítopo para populações humanas que supere as limitações da bacterina.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Leptospirose

A Leptospirose é uma zoonose cosmopolita, que tem como agente etiológico os membros patogênicos do gênero *Leptospira*. Este gênero é composto por 22 espécies, divididas em 3 grupos de acordo com o seu potencial patogênico, sendo o grupo 1 as espécies patogênicas que causam doença grave como *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. kirschneri*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. Alexanderi*, *L. kmetyi*, *L. weilii*, *L. mayott* e *L. alstoni*. O segundo grupo é composto por *Leptospiras* com importância patogênica intermediária como *L. wolffii*, *L. licerasiae*, *L. fainei*, *L. broomii* e *L. inadai*. Ao terceiro grupo pertencem as *Leptospiras* não patogênicas, ou seja, que não são capazes de causar a doença, sendo elas: *L. biflexa*, *L. idonii*, *L. terpstrae*, *L. meyeri*, *L. vanthielii*, *L. wolbachisaprophytes* e *L. yanagawae* (PUCHE et al., 2018).

As *Leptospiras* são bactérias pertencentes à família *Leptospiraceae* da ordem *Spirochaetales*, possuem formato helicoidal, são móveis, medem 6-25µm de comprimento por 0,2µm de diâmetro, e apresentam temperatura ideal de crescimento entre 28 e 30°C (ADLER, 2015).

A patogenicidade da *Leptospira* está associada à presença das imunoglobulinas leptospirais (Lig), que são moléculas expostas à superfície apenas das espécies patogênicas e associadas à capacidade de evasão do sistema imune do hospedeiro. As *Leptospiras* patogênicas apresentam diversas características que lhe conferem capacidade de invasão, disseminação e permanência no hospedeiro, como a capacidade de adesão a algumas células (fibroblastos, células endoteliais, monócitos e macrófagos) e componentes da matriz extracelular (colágeno tipo I e IV, laminina, fibronectina, elastina). Além disso, a bactéria consegue evadir os mecanismos de defesa inata do hospedeiro, inativando o sistema complemento, que caracteriza a primeira linha de resposta imune do organismo invadido pelas bactérias (MIRAGAIA, 2016).

As *Leptospiras* patogênicas possuem ainda uma proteína, a hemolisina, que é capaz de romper a membrana de hemácias, liberando quantidades de ferro fundamentais para sobrevivência de algumas cepas da bactéria (WANDERSMAN et al., 2000).

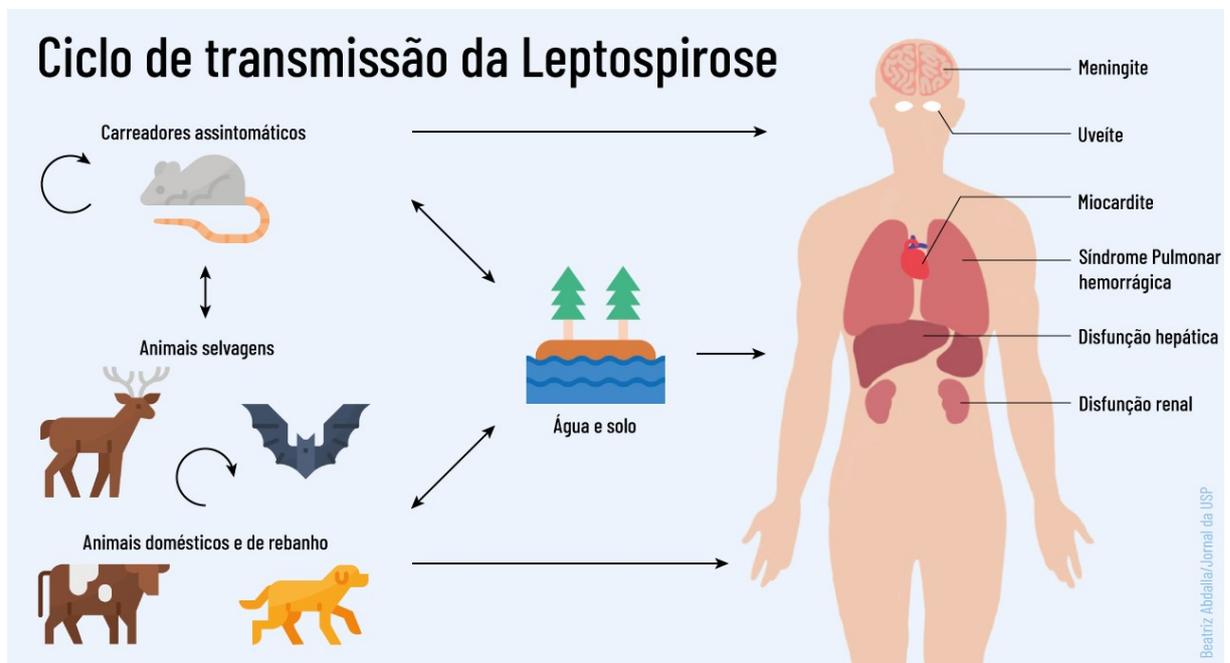
Após a penetração do agente no hospedeiro, inicia-se a leptospiremia, fase aguda da doença onde ocorre disseminação da bactéria pela corrente sanguínea. Posteriormente as *Leptospiras* direcionam-se para o fígado e os rins. Quando ocorre a colonização renal, as

bactérias são eliminadas na urina e contaminam o ambiente, constituindo uma fonte de novas infecções; como ocorre com os hospedeiros de manutenção, que são cronicamente infectados e eliminam bactérias viáveis (LEVETT, 2001; ADLER; MOCTEZUMA, 2010; ADLER, 2015).

Após a fase de leptospiremia, a bactéria se estabelece em determinados órgãos do hospedeiro e inicia-se a fase imune, onde há a produção de anticorpos anti-*Leptospira* (LEVETT, 2001). A eliminação de *Leptospiras* na urina ocorre entre 7 a 10 dias após o início da infecção, sendo que esta eliminação é maior nos primeiros meses de infecção (ACHA; SZYFRES, 2001).

A infecção por *Leptospira* afeta uma grande diversidade de mamíferos, incluindo animais domésticos e selvagens, e as manifestações clínicas variam entre as diferentes espécies e de acordo com o sorovar infectante. A transmissão ocorre, principalmente, pelo contato da pele ou mucosas com urina, água ou solo contaminados, destacando-se os roedores como os principais hospedeiros deste patógeno (LEVETT, 2001; ADLER, 2015), conforme mostra a figura 1.

Figura 1 – Ciclo de transmissão da leptospirose.



Fonte: Abdalla (2019).

Trata-se de uma das zoonoses que mais ocorrem mundialmente, destacando-se os países com clima subtropical ou tropical, pois fatores como temperatura, umidade e pluviosidade

característicos favorecerem a sobrevivência da *Leptospira* no ambiente (ADLER; MOCTEZUMA, 2010; ESCÓCIO et al., 2010; FÁVERO et al., 2017).

O método de referência para o diagnóstico da leptospirose é o teste de soro aglutinação microscópica (MAT), um teste indireto que detecta anticorpos contra a bactéria. O MAT indica o sorogrupo de *Leptospira* que causou a infecção e apresenta boa especificidade, uma vez que os anticorpos contra outras bactérias geralmente não reagem de forma cruzada com *Leptospira* (OIE, 2014).

Dentre as limitações do MAT, destaca-se a incapacidade de diagnóstico precoce, na fase aguda da doença, pelo fato de que os anticorpos começam a surgir de 7 a 10 dias após a infecção, fazendo com que a detecção da doença ocorra apenas no final da fase aguda. Outra desvantagem é que o teste não indica se a infecção é ativa, a não ser que o título de anticorpos alcançado seja alto ou se faça sorologia pareada. Além disso, o MAT não é capaz de diferenciar os anticorpos resultantes da infecção ou da vacinação, o que pode gerar resultados falsos positivos (ELLIS, 1994; AHMED et al., 2009; ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

Outras técnicas de diagnóstico disponíveis são os testes sorológicos de Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (ELISA), o isolamento de *Leptospiras* a partir de amostra clínica por cultivo bacteriológico e métodos moleculares como a PCR (SOARES, 2018).

A vacinação é a principal ferramenta de controle da leptospirose animal, induzindo a produção de anticorpos contra os sorovares presentes na vacina, embora a proteção heteróloga entre sorovares do mesmo sorogrupo possa ocorrer, não existe a proteção cruzada entre diferentes sorogrupos (CORTESE, 2014; MARTINS; LILENBAUM, 2017). Além disso, as bacterinas utilizadas atualmente apresentam curto prazo de proteção, por isso, diversas pesquisas buscam o desenvolvimento de uma nova vacina a partir de uma subunidade proteica ou pela construção de proteínas com epítomos imunogênicos conhecidos (DELLAGOSTIN et al., 2017).

Além da vacinação, o controle da leptospirose deve-se basear na eliminação dos fatores de risco para a doença, como a presença de roedores (DE ALMEIDA et al., 2016); e no tratamento dos animais doentes com antibioticoterapia (ADLER, 2015).

2.2 Proteômica aplicada à *Leptospira*

A proteômica é o estudo do conjunto de proteínas identificadas de um determinado organismo, sendo possível observar as mudanças na expressão proteica em resposta a um

determinado ambiente, seja dentro ou fora do organismo do hospedeiro, em diferentes condições de infecção, diferentes tecidos ou fluidos corporais (BARBOSA et al., 2012). Nas pesquisas com *Leptospira*, a proteômica é uma ferramenta que auxilia na compreensão das características fisiopatológicas desse microrganismo, que ainda não são totalmente compreendidas (NASCIMENTO FILHO et al., 2018).

A identificação de proteínas que são super expressas por cepas patogênicas sob condições que mimetizam a infecção, indicam candidatos potenciais para o desenvolvimento de vacinas e também para diagnóstico clínico (THONGBOONKERD, 2008). Em um estudo pioneiro, autores relataram que ocorreu um aumento significativo na expressão da OMP (*outer membrane protein*) Loa22 durante a infecção aguda em porquinhos da Índia quando comparados a outras OMPs (NALLY et al., 2007).

Vieira et al. (2009) avaliaram o perfil proteico de cepa virulenta de *L. interrogans* sorovar Pomona, proveniente de rim e fígado de hamster infectado e identificaram como OMP leptospirais mais prevalentes a OmpL1, LipL21, LipL31, LipL32 / Hap-1, LipL41, LipL45, LipL46, LruA / LipL71 e proteína semelhante a Loa22.

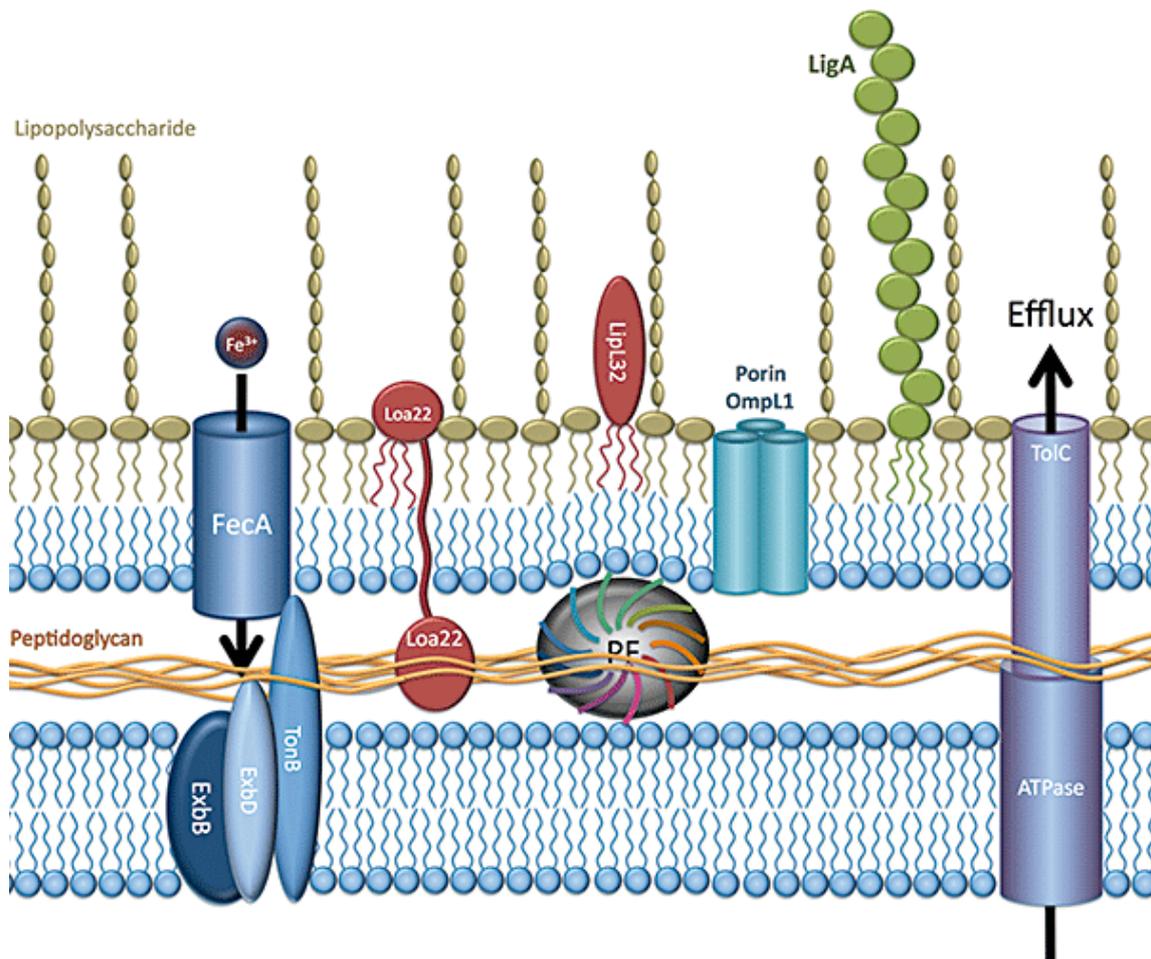
A proteína Lsa63 foi identificada apenas em condições de virulência, a mesma contém um domínio p83 / 100 que é conservado em antígenos amplamente distribuídos em espiroquetas. Para esta proteína foi apontada a função de mediar a adesão leptospiral aos componentes da matriz extracelular laminina e colágeno tipo IV, provavelmente mediando as interações patógeno-hospedeiro durante a infecção (VIEIRA et al., 2010).

Outra proteína identificada na superfície externa de *Leptospira* foi o fator de alongamento Tu, relacionado à virulência com função de ligação ao plasminogênio e fator H (WOLFF et al., 2013). Essa mesma proteína já foi identificada por Vieira et al. (2009) em múltiplas isoformas, com diferentes localizações e funções. Essas diferentes isoformas possivelmente refletem as modificações pós-traducionais, que acarretam localizações e funções diferentes da proteína (NASCIMENTO FILHO et al., 2018).

Em relação à metodologia de obtenção do proteoma de *Leptospira*, Malmstrom et al. (2009) publicaram um trabalho utilizando a cepa L1-130 virulenta de *L. interrogans* sorovar Copenhageni, com uma técnica que combinou 3 métodos proteômicos baseados em espectrometria de massas, identificando 2221 proteínas. Este estudo juntamente com Vieira et al. (2014) e Teixeira et al. (2015) validaram muitas OMP hipotéticas e atribuíram a função de ligação a componentes da matriz extracelular, com um papel na adesão e colonização das células do hospedeiro.

Haake e Matsunaga (2010) relataram que as proteínas mais abundantes da membrana externa de *Leptospira* expostas à superfície são lipoproteínas que estão integradas na bicamada lipídica por ácidos graxos amino-terminais, e demonstraram outros aspectos da membrana leptospiral, conforme mostra a figura 2. Além disso, apontaram que as proteínas de repetição do tipo imunoglobulina leptospiral (Lig) são fortemente induzidas pela osmolaridade e são mediadoras das interações com as proteínas da matriz extracelular do hospedeiro.

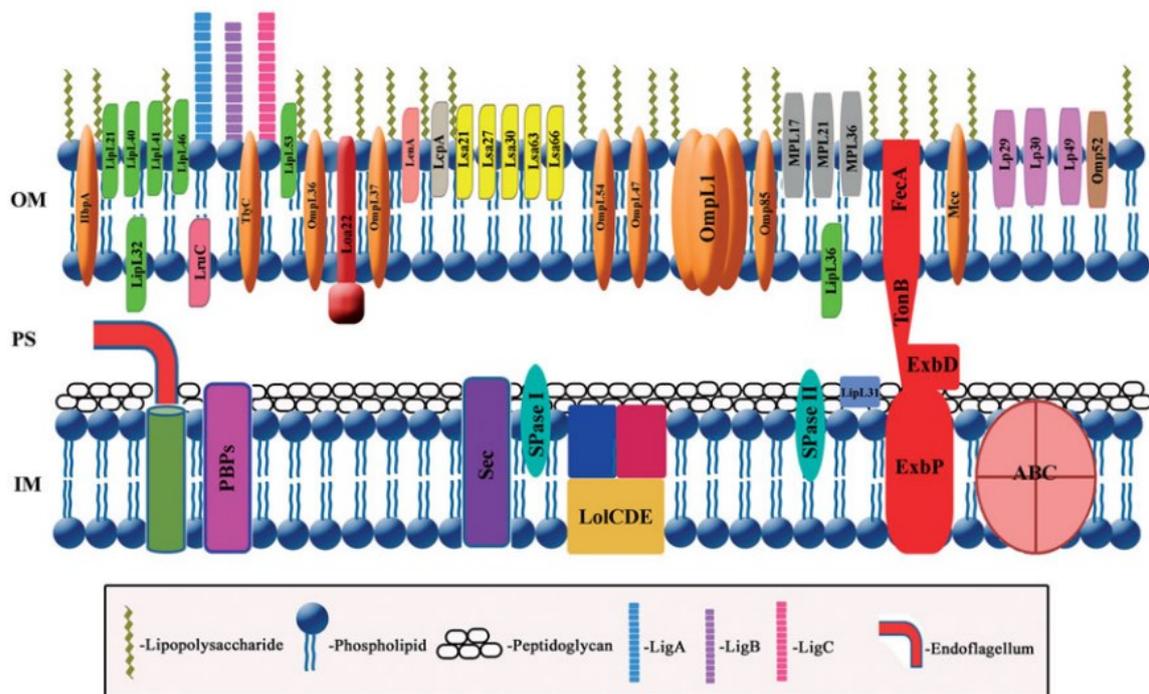
Figura 2 - Arquitetura da membrana leptospiral. A membrana externa da *Leptospira* contém uma mistura de lipopolissacarídeos, lipoproteínas expostas à superfície e proteínas transmembrana. As lipoproteínas de membrana externa mais abundantes são LipL32 e Loa22. Loa22 pode conter um novo segmento transmembrana conectando seus domínios de ligação ao peptidoglicano periplasmático e exposto à superfície. Os flagelos periplasmáticos (PF) estão localizados no periplasma. FecA é um receptor dependente de TonB para citrato férrico e aerobactina. TolC forma um canal de efluxo com bombas ATPase na membrana citoplasmática



Fonte: Haake; Matsunaga (2010).

Em um estudo posterior que revisou os diferentes tipos de proteínas da membrana externa de *Leptospira*, mais estruturas foram incorporadas à arquitetura da membrana externa leptospiral, conforme mostra a figura 3.

Figura 3 - A arquitetura da membrana externa da *Leptospira* possui duas membranas, onde a membrana externa não está ligada à camada de peptidoglicano e o espaço periplasmático contém o flagelo. A membrana externa contém LPS, lipoproteínas, proteínas transmembrana e proteínas de membrana externa periféricas. A membrana interna contém vários sistemas de transporte, peptidase de sinal de lipoproteína (SPase I e SPase II), Lol Pathway, LipL31 e proteínas de ligação à penicilina (PBPs).



Fonte: Raja; Natarajaseenivasan (2015).

O proteoma extracelular de *L. interrogans* sorovar Lai detectou 66 proteínas por MS / MS, 33 das quais foram previstas como proteínas extracelulares por análise de bioinformática. As proteínas extracelulares desempenham um papel importante na patogenicidade da *Leptospira*. Dessas 33 proteínas identificadas, 15 foram reguladas positivamente e 2 foram reguladas negativamente *in vivo*. Os autores sugeriram que o proteoma extracelular é complementar a outros estudos proteômicos, permitindo estudar proteínas possivelmente

relacionadas ao processo de infecção, auxiliando na escolha de alvos vacinais ou para testes de diagnóstico (ZENG et al., 2013).

Humphrsim et al. (2012) realizaram um estudo para caracterizar o proteoma do sorovar Canicola e compará-lo com os sorovares de Copenhageni e Pomona. Na metodologia foi empregada a técnica 2D-LC/MS que identificou 1653 proteínas no sorovar Canicola, sendo 60 dessas comuns a Copenhageni e Pomona, e 16 já relatadas na literatura como imunogênicas. Este estudo foi o primeiro a relatar o proteoma do sorovar Canicola e os autores sugeriram que a comparação proteômica de diferentes sorovares pode ser usada para a identificação de novas moléculas-alvo para o desenvolvimento de vacinas.

Zeng et al. (2015) caracterizaram o subproteoma de 2 cepas vacinais com virulência moderada (sorovares Canicola e Hebdomadis) para identificar proteínas expostas à superfície e comparar com uma cepa vacinal altamente virulenta (sorovar Lai). Eles detectaram 122 proteínas únicas expostas à superfície e destas, 10 proteínas altamente conservadas compreendendo 2 antígenos de reação cruzada conhecidos, (LipL32 e LA_3469) e outros dois novos antígenos (LA_0136 e LA_0505) que apresentaram imunorreatividade conservada entre 15 sorovares epidêmicos na China. Além disso, muitos fatores de virulência foram detectados nessas proteínas expostas à superfície identificadas, como Loa22, LipL32, LenC, LenF e OmpL37.

Monahan et al. (2008) compararam *Leptospiras* eliminadas na urina de ratos infectados com *Leptospiras* cultivadas *in vitro* para compreender as interações patógeno-hospedeiro, sendo que o perfil proteico foi diferente entre as amostras. Aparentemente, as proteínas são reguladas negativamente em portadores crônicos assintomáticos, evitando a depuração pelo sistema imune, facilitando sua persistência nos túbulos renais. Esses achados ajudam a elucidar os mecanismos da infecção crônica.

Análises do proteoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni foram realizadas para comparar bactérias atenuadas em cultivo com bactérias submetidas à privação de ferro e à presença de soro. Como resultado foram identificadas 563 proteínas, e os autores mostraram que ocorrem modificações no perfil proteico da bactéria submetida às condições de infecção, o que indicou prováveis fatores de virulência (ESHGHI et al., 2009).

Cao et al. (2010) utilizaram dados proteômicos comparados com dados de predição computacional a partir do genoma de *L. interrogans* serovar Lai, com o objetivo de realizar uma reanotação do genoma mais real, considerando as modificações pós-traducionais nas proteínas. Dentre estas modificações foram observadas, fosforilação, acetilação e metilação, indicando a presença de mecanismos de modificação semelhantes aos eucariotos,

provavelmente pela evolução da bactéria como patógeno de mamífero, o que abre perspectivas para a busca de candidatos terapêuticos.

Zhong et al. (2011) também utilizaram a combinação de genômica e proteômica para comparar cepa virulenta e não virulenta de *L. interrogans* sorovar Lai. Os resultados revelaram que alterações na expressão proteica ou mutações em genes importantes, como os que codificam Ser/Thr quinase, proteína CstA de privação de carbono, glutamino-sintetase, proteína ligante de GTP BipA, ribonucleotídeo difosfato redutase e transportador de fosfato, juntamente com a modificação translacional de lipoproteínas ou OMPs devem contribuir para a atenuação da virulência.

Nally et al. (2017) avaliaram o proteoma de célula inteira para comparar a *Leptospira* em condição de virulência ou atenuação e descreveram que as modificações pós-traducionais das proteínas, como metilação e acetilação, acontecem em resposta à infecção. Esses estudos são importantes para investigar os processos regulatórios da *Leptospira* patogênica para adaptação ao hospedeiro durante a infecção.

Srivastava et al. (2012) empregaram a proteômica para analisar as alterações que ocorrem no soro de paciente humano infectado com *Leptospira*, sendo observada a expressão diferencial de várias proteínas séricas em comparação ao soro de pessoas saudáveis e a investigação dessas proteínas pode elucidar a fisiopatologia da leptospirose, além de serem um alvo em potencial para o diagnóstico da doença.

Lessa-Aquino et al. (2015) demonstraram que uma abordagem em todo o genoma de *Leptospira interrogans* fornece uma base empírica para prever e classificar antígenos proteicos que geram anticorpos, baseados em características proteômicas estruturais, físicas e funcionais. Os resultados indicaram que 5% do proteoma de *Leptospira* corresponde a antígenos que induzem resposta de IgM ou IgG. Os autores discutiram que montar uma resposta imunológica contra um número reduzido de antígenos pode ter a vantagem de minimizar o consumo de energia e evitar uma reação inflamatória inata exacerbada.

Embora várias proteínas, inclusive as identificadas na proteômica, tenham sido testadas em modelos animais para leptospirose, ainda não foi alcançada uma vacina de amplo espectro que confira proteção cruzada entre os sorovares. Além disso, os avanços em imunoproteômica ainda são discretos, sendo que poucas proteínas super expressas em condições de infecção foram identificadas, e não houve progresso nessa direção. Há tendência de que os métodos proteômicos sem gel ganharão importância no projeto de proteomas em grande escala devido aos melhores resultados alcançados. Iniciativas proteômicas para compreender melhor diversos

aspectos da *Leptospira* e da leptospirose ainda são necessários (NASCIMENTO FILHO et al., 2018).

2.3 Vacinologia: a busca por candidatos à vacina contra leptospirose

As vacinas disponíveis comercialmente contra a leptospirose não mudaram muito nos últimos anos e são produzidas a partir de preparações de células inteiras inativadas (bacterinas) ou extratos de membrana celular. Essas vacinas geram vários efeitos colaterais e a maior parte destina-se ao uso animal, embora alguns países tenham aprovado bacterinas para uso humano (MCBRIDE et al., 2005; DELLAGOSTIN et al., 2017; LATA et al., 2018).

A bactéria gera uma resposta imunológica humoral baseada no LPS leptospiral, que é um antígeno que não induz a produção de células de memória por ser timo-dependente, desta forma a imunidade produzida pela bactéria possui curto prazo de duração sendo necessário reforço periódico. Além disso, a variabilidade imunogênica do LPS leptospiral faz com que a bactéria induza proteção específica contra os sorovares presentes na sua formulação, não ocorrendo a proteção cruzada contra outros sorovares (HAAKE; LEVETT, 2015).

Já está estabelecida mundialmente a vacinação de cães, bovinos e suínos, utilizando bacterinas que incluem os sorovares mais frequentes em cada região, ou isolados locais quando for possível. Para que este sistema seja mantido são necessários estudos constantes de monitoramento dos sorovares presentes ou emergentes em cada região (ELLIS, 2015; DA CUNHA et al, 2016).

Nos últimos anos, as pesquisas se direcionaram para a identificação de antígenos para o desenvolvimento de vacinas recombinantes (DELLAGOSTIN et al, 2011; LATA et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2018; SILVEIRA et al., 2018; FORTES et al., 2020) e apesar dos progressos alcançados, o desenvolvimento de uma vacina que gere imunidade cruzada entre os diferentes sorovares permanece indefinido.

A tecnologia mais avançada utilizada na produção de vacinas é a vacinologia reversa. É realizado o sequenciamento do genoma do agente, a avaliação de suas proteínas, previstas através da bioinformática e então determinada a posição provável das proteínas dentro do microrganismo. Por fim, é avaliada sua capacidade teórica de gerar resposta imunológica. A partir daí, os peptídeos selecionados podem ser sintetizados ou expressos em vetores para a comprovação de sua real capacidade de induzir imunidade em animais (ADU-BOBIE et al., 2003; DELLAGOSTIN et al., 2017).

O primeiro estudo contendo uma vacina de subunidade recombinante contra leptospirose foi utilizando as proteínas OmpL1 e a LipL41, como resultado elas geraram proteção contra o desafio com *L. kirschneri* sorovar Grippytyphosa (HAAKE et al., 1999). Porém, nenhum estudo foi capaz de comprovar que essa combinação de proteínas consiga induzir imunidade cruzada e esterilizante contra a doença (DELLAGOSTIN et al., 2017).

A proteína mais estudada como potencial candidata para compor uma vacina de subunidade é a LipL32. Sabe-se que é a proteína mais abundante da bactéria e está altamente conservada em todas as leptospirosas patogênicas (HAAKE et al., 2004; MALMSTROM et al., 2009). Quanto à sua localização, já foi descrita como componente da membrana externa (HAAKE et al., 2000), exposta à superfície da bactéria (GUERREIRO et al., 2001) e também subcelular - no folheto interno da membrana externa (PINNE; HAAKE, 2013), sendo atribuída a ação de ligação a componentes da matriz extracelular (HAUK et al., 2008). A expressão da LipL32 foi detectada em condições de infecção (CAIMANO et al., 2014), mas o estudo de Murray et al. (2009) mostrou que a deleção do gene que codifica esta proteína não interferiu na virulência bacteriana, não sendo necessária para a infecção aguda ou crônica por *L. interrogans*.

Como subunidade de uma vacina recombinante a LipL32 já foi amplamente avaliada com diferentes adjuvantes, sendo que todos os resultados obtidos mostraram que a proteína foi incapaz de gerar proteção contra a leptospirose (DELLAGOSTIN et al., 2017).

As *immunoglobulin-like proteins* (Lig) A e B, foram as subunidades que demonstraram resultados mais promissores em vacinologia reversa contra *Leptospira*. Essas proteínas possuem uma porção N-terminal altamente conservada que se mostrou imunogênica em condições de infecção (MATSUNAGA et al., 2003). Tanto LigA quanto LigB demonstraram a capacidade de gerar proteção em modelo animal (CAO et al., 2011), com resultados mais consistentes para Lig A (BRANGER et al., 2001; SEIXAS et al., 2007). Porém, LigA está presente em apenas 3 espécies de *Leptospira* (*interrogans*, *alstonii* e *kirschneri*) o que impede o estabelecimento de uma proteção estendida para as demais espécies da bactéria.

Para o avanço da vacinologia reversa, o sequenciamento do genoma das diferentes espécies de *Leptospira* é fundamental, pois fornece informações sobre as subunidades que poderão ser empregadas na vacina e também sobre os fatores de virulência conservados, que são essenciais para o desenvolvimento de vacinas recombinantes. É importante também, que a função desses fatores de virulência identificados esteja bem estabelecida, assim como seu potencial imunogênico (DELLAGOSTIN et al., 2017).

No estudo de Picardeau et al. (2008) comparou-se os genomas de *L. biflexa* e *L. interrogans* (espécies não patogênica e patogênica, respectivamente) e observaram que 78%

das proteínas expressas exclusivamente pela espécie patogênica, não possuíam função estabelecida. Nos últimos anos, o percentual dessas proteínas desconhecidas no genoma vem diminuindo, devido aos avanços em bioinformática com algoritmos capazes de atribuir função a estas moléculas. Porém muitas proteínas de *Leptospira* com papéis potencialmente importantes na patogenicidade e adaptação ao hospedeiro continuam não caracterizadas, sendo que tecnologias como CRISPR (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas), podem ser úteis nessa caracterização (FOUTS et al., 2016).

Diversos estudos que testaram a capacidade de proteção de proteínas (OMP) em modelos animais, utilizando a vacinologia reversa, não obtiveram eficácia ou proteção significativa (ATZINGEN et al., 2010; CHANG et al., 2007; YAN et al., 2010).

Hartwig et al. (2011) selecionaram 8 lipoproteínas recombinantes, sendo que 7 delas foram capazes de induzir resposta significativa de IgG em camundongos Balb-C, porém o desafio letal com *Leptospira* não foi realizado para avaliar a capacidade protetora dessas lipoproteínas.

Dando continuidade a este estudo, Hartwig et al. (2013) avaliaram a capacidade protetora da proteína LemA, que apresentou proteção significativa, com 88% de sobrevivência dos hamsters desafiados, e embora a infecção sub-letal tenha ocorrido nos animais sobreviventes, LemA demonstrou ser uma candidata em potencial para a vacina.

Uma utilização ampla da vacinologia reversa aplicada à *Leptospira* foi realizada por Murray et al. (2013), onde foram avaliadas 238 proteínas recombinantes, e nenhuma das combinações dessas proteínas foi protetora contra a infecção em hamsters, mesmo 70% delas sendo imunogênicas. Destaca-se que várias proteínas (Lig B, LipL41, LipL32) que sabidamente induzem resposta imune parcialmente protetora, não impediram a colonização renal.

Nenhuma vacina de subunidade, utilizando OMP, induziu imunidade estéril até o momento. Os progressos obtidos nos estudos do genoma, transcriptoma e proteoma de *Leptospira* spp. são fundamentais para uma seleção mais precisa de antígenos com potencial para compor uma vacina de subunidade contra leptospirose (DELLAGOSTIN et al., 2017).

Porém o potencial vacinal promissor de Lig foi demonstrado recentemente em um estudo de Silveira et al. (2018), que avaliou a imunidade protetora induzida pela proteína recombinante LigBrep em hamsters. A LigBrep corresponde aos domínios repetitivos das porções N-terminal de Lig A e LigB, que apresentam 100% de identidade. Como resultado deste estudo, LigBrep apresentou eficácia de 100% assim como a bacterina usada como controle, e ambas induziram imunidade esterilizante frente ao desafio homólogo. Quanto às subclasses de anticorpos, LigBrep induziu resposta mista com Th1 e Th2, caracterizada pela

presença de IgG1 e IgG2, enquanto a bacterina induz resposta apenas por Th1, caracterizada pela presença de IgG2.

Um aprofundamento no estudo da proteína recombinante LigBrep faz-se necessário para avaliação mais apurada da imunidade esterilizando, por meio da bacteriologia (SILVEIRA et al., 2018); avaliação da capacidade protetora frente ao desafio heterólogo e o tempo de duração da imunidade induzida.

2.4 Resposta imune à *Leptospira*

A infecção causada por *Leptospira* depende de vários fatores, que ainda não são totalmente conhecidos, e que variam de acordo com a espécie do hospedeiro e o sorovar infectante. Sabe-se que a resposta imune é ativada inicialmente por diferentes padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) que se ligam a diferentes receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) do hospedeiro, o que pode resultar em eliminação do patógeno e combate da infecção; progresso da infecção com colonização de alguns órgãos de predileção, como os rins; ou até generalização da infecção e morte do hospedeiro (ZUERNER, 2015).

A leptospirose pode se manifestar de 2 formas, sendo crônica quando um sorovar específico infecta um hospedeiro de manutenção, onde as manifestações clínicas são discretas ou inexistentes; como o que ocorre na Leptospirose genital bovina (LOUREIRO, LILENBAUM, 2020). Já a forma aguda da doença ocorre quando há a infecção de um hospedeiro considerado acidental para determinado sorovar, onde as manifestações clínicas são mais severas causando doença grave de curso mais rápido. Observa-se que a interação patógeno-hospedeiro, ou seja, a espécie infectada e o sorovar infectante, são fundamentais para definir o curso da infecção e o tipo das manifestações clínicas que surgirão (FAINE et al, 1999).

Adler e Faine (1977) em um trabalho inicial, estabeleceram a importância da resposta imune humoral, com produção de anticorpos, no controle da infecção por *Leptospira*. Porém, além da imunidade humoral, a imunidade mediada por células também é necessária para a proteção contra *Leptospira*, e paralelamente os processos de resposta imunológica podem estar envolvidos em danos teciduais durante a infecção (ZUERNER, 2015).

A maior parte dos estudos experimentais para *Leptospira* em modelo animal, utilizam o hamster sírio (*Mesocricetus auratus*) por serem suscetíveis à infecção aguda. Este é um fator limitante para o conhecimento da resposta imune à doença, principalmente na elucidação da

resposta imune celular, uma vez que faltam reagentes e insumos direcionados para esta espécie animal (DELLAGOSTIN et al., 2017).

Estudos envolvendo infecção experimental de outros hospedeiros mamíferos, notadamente o gado, ajudaram a estabelecer um papel proeminente para os componentes da resposta imune celular no desenvolvimento de imunidade protetora, especialmente em hospedeiros de manutenção (BOLIN; ALT, 2001; ZUERNER et al., 2011).

A expressão das proteínas de membrana externa nas *Leptospiras* patogênicas é variável de acordo com as condições a que bactéria está submetida, isso dificulta o reconhecimento do patógeno pelo organismo do hospedeiro (HAAKE et al., 1991).

A adesão bacteriana é um fator fundamental para o estabelecimento da infecção por *Leptospira*, desde os estágios iniciais até posteriormente, quando ocorre colonização renal. Para isso, as *Leptospiras* patogênicas expressam em sua superfície, proteínas responsáveis pela ligação a células do hospedeiro e também a outras macromoléculas. Para que uma proteína seja caracterizada como adesina, é imprescindível a sua localização na superfície bacteriana (PICARDEAU, 2017).

Sabe-se que as *Leptospiras* patogênicas são capazes de se ligar à várias células como fibroblastos, macrófagos, células endoteliais, células epiteliais dos rins, componentes da matriz extracelular como fibronectina, colágeno, laminina e elastina (PICARDEAU, 2017). Sendo um importante fator de evasão do sistema imune a capacidade da *Leptospira* de se ligar ao plasminogênio do hospedeiro e utilizar a plasmina para destruir componentes da matriz extracelular, coágulos de fibrina e clivar algumas proteínas do sistema complemento para evitar a opsonização (CASTIBLANCO-VALENCIA et al, 2016).

Os antígenos localizados na membrana externa da bactéria são capazes de realizar um movimento lateral através da bicamada de lipídeos, isso possibilita que a bactéria se movimente mesmo quando está ligada ao anticorpo, um fator importante para a colonização de tecidos (CHARON et al. 1981).

O LPS leptospiral é altamente imunogênico, mas nem sempre a resposta gerada é protetora. Além disso, a resposta imune ao LPS é sorovar-específica e dependente da interação sorovar-hospedeiro (ZUERNER, 2015).

2.4.1 Imunidade inata

O hospedeiro possui uma série de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) que tem por função reconhecer os PAMPs da *Leptospira* e gerar vários sinais intracelulares que dão início à resposta imune (IWASAKI; MEDZHITOV, 2010).

Dentre esses PRRs estão o receptores Toll-like (TLRs), que são os mais estudados sobre o reconhecimento de *Leptospira*, sendo descritos como envolvidos no reconhecimento desta bactéria o TLR 2 e 4, embora outros tenham sido descritos no reconhecimento de outras espiroquetas como TLR5 (BERNARDINO et al., 2008), TLR8 (CERVANTES et al., 2011), e TLR7 e TLR9 (PETZKE et al., 2009).

O estudo de Chassin et al. (2009) avaliou as funções dos TLR 2 e TLR 4 em camundongos, e os resultados mostraram que a ausência destes receptores acarretou menor sobrevivência à infecção por *Leptospira*, ou incapacidade de eliminar a bactéria.

TLR 4 foi apontado como responsável pela depuração das Leptospiras no fígado e também por induzir a expressão de citocinas nos macrófagos, como IL-1 β , IL-6 e quimiocinas (WANG et al., 2012). Sabe-se, por meio de um estudo conduzido em hamsters, que ocorre uma alta produção de citocinas inflamatórias na fase aguda da leptospirose (LOWANITCHAPAT et al., 2010; MATSUI et al., 2011). A IL-1 β , IL-6, IL-10, MCP-1 e TNF- α foram identificados na infecção aguda em humanos e camundongos (WANG et al., 2012).

Incoerências entre trabalhos que investigam os TLRs e vias de indução de citocinas podem indicar uma diferença da importância dos TLRs em diferentes tecidos e, principalmente, diferenças entre as espécies de hospedeiros no tocante à capacidade dos leucócitos em usar os diversos TLRs para o reconhecimento da *Leptospira* (ZUERNER, 2015).

Também existem receptores de reconhecimento de padrões moleculares associados à danos (DAMPs), e a ligação dos PRRs a PAMPs e DAMPs dão início a cascatas de sinalização intracelular que desencadeiam a resposta imune inata e ajuda a direcionar a resposta imune adquirida (IWASAKI; MEDZHITOV, 2010).

Os NLRs, são outro tipo de PRRs, e quando interagem com o PAMP ou DAMP apropriado levam à formação dos inflamassomas, que são estruturas formadas por proteínas. Ao serem formados, os inflamassomas ativam a caspase-1, que ativa as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-8. Caso o inflamassoma não seja devidamente regulado, o ciclo pró-inflamatório continua, provocando danos teciduais no hospedeiro (LEEMANS et al., 2011).

O inflamassoma NLR P3 é ativado pela interação dos TLR 2 e 4 com o LPS de *Leptospira* e está relacionado à doença renal crônica (VILAYSANE et al., 2010). Além disso, a glicoproteína leptospiral, que é um componente citotóxico da membrana externa, também ativa o inflamassoma NLR P3 e células mononucleares do sangue (DIAMENT et al., 2002).

2.4.1.1 Resposta celular

Os monócitos e macrófagos utilizam a ativação gerada pelos PRRs para fornecer imunidade inata ao hospedeiro no início da infecção (ZUERNER, 2015).

A presença de LPS e hemolisinas de *Leptospira* estimula os macrófagos a produzir citocinas e faz com que aumentem a sua atividade de fagocitose (ISOGAI et al., 1990; WANG et al., 2012).

O estudo de Isogai et al. (1986) provou a importância dos macrófagos na proteção contra a infecção por *Leptospira*, uma vez que a ausência da atuação dos macrófagos em camundongos prejudicou a eliminação da bactéria e aumentou a susceptibilidade à infecção.

Além disso, a atuação dos macrófagos é importante para que o anticorpo realize a opsonização. Esse processo é importante para superar um mecanismo de evasão da *Leptospira*, no qual ela prejudica a função do macrófago ou induz apoptose dele (BANFI et al., 1982; JIN et al., 2009).

O estudo de Scocchi et al. (1993) mostrou que neutrófilos de bovinos produziram dois peptídeos capazes de matar a *Leptospira*. Em outro estudo com hamsters, os neutrófilos formaram grandes agregados com as bactérias (ZUERNER et al., 2012).

Ficou estabelecido a importância da relação entre o anticorpo e a resposta inata, uma vez que os macrófagos e as células polimorfonucleares (granulócitos, eosinófilos e neutrófilos) precisam do anticorpo para a fagocitose (McGRATH et al., 1984; WANG et al., 1984).

Uma forma de comprometer o sistema imune do hospedeiro é a trombocitopenia causada pela *Leptospira*, visto que o LPS induz a agregação plaquetária, sendo as plaquetas responsáveis pela produção de peptídeos antimicrobianos e citocinas (COGNASSE et al., 2008) além de contribuírem para a formação e ativação de neutrófilos (YEAMAN, 2009).

2.4.2 Imunidade Adquirida

2.4.2.1 Resposta Humoral

A produção de anticorpos e, portanto, células B é fundamental para a proteção contra *Leptospira* (ADLER; FAINE, 1976, 1977; FOOKOLAE et al., 2020).

Os anticorpos aglutinantes de proteção que são produzidos durante a infecção são direcionados principalmente para o LPS bacteriano (PICARDEAU, 2017).

O desenvolvimento de anticorpos para o LPS leptospiral tem sido a chave para a proteção contra a infecção letal por vários sorovares de *Leptospira* em diferentes espécies de hospedeiro, mesmo que a imunidade mediada por anticorpos anti-LPS seja limitada aos sorovares relacionados (ZUERNER, 2015; PICARDEAU, 2017). Porém, o fato de o LPS ser específico ao sorovar, impede a sua utilização em uma vacina que seja capaz de induzir imunidade cruzada entre diversos sorovares.

Chassin et al. (2009) mostraram em um estudo realizado em camundongos que a presença do TLR4 (ativado por PAMPS de *Leptospira*) é necessária para a produção inicial de imunoglobulina M (IgM) por células B e para a depuração de leptospiros no sangue

O desenvolvimento de anticorpos contra proteínas de *Leptospira* tem maior chance de gerar imunidade cruzada (SRIKRAM et al., 2011).

As vacinas mais bem sucedidas até o momento são as bacterinas (compostas com a bactéria inteira inativada), sugerindo que uma mistura complexa de antígenos pode ser necessária para a proteção (ZUERNER, 2015).

2.4.2.2 Imunidade mediada por células

Os linfócitos B e T têm papéis importantes na resposta imune à *Leptospira* (ZUERNER, 2015).

De acordo com o estudo de Chassin et al. (2009), baseado na proteção contra o desafio letal com *Leptospira*, as células B são responsáveis pela produção de IFN- γ e depuração da *Leptospira* no fígado, e as células T fazem essa mesma função no rim. Neste estudo, camundongos infectados com *Leptospira* e deficientes de células T apresentaram maior dano ao tecido renal (avaliado por histologia) quando comparados a camundongos infectados deficientes de células B. Além disso, marcadores sorológicos de danos renais foram mais elevados nesses camundongos deficientes de células T.

Esses resultados indicam que a resposta imune mediada por células, envolvendo células T/Th1 são importantes na resposta imune à *Leptospira* (CHASSIN et al., 2009; ZUERNER, 2015).

Um estudo realizado em bovinos, a fim de compreender a leptospirose crônica, causada pelo sorovar Hardjo nesta espécie, mostrou que altos títulos de anticorpos para LPS não os

protege da infecção pelo sorovar Hardjo (BOLIN et al., 1989). Isso acontece porque as vacinas disponíveis, que induzem a produção de anticorpos contra LPS, falham em induzir uma resposta Th1 em bovinos (NAIMAN et al., 2001b, 2002; ZUERNER et al., 2011).

Ficou comprovado que as vacinas monovalentes com o sorovar Hardjo que impedem uma colonização renal significativa nos bovinos, além de estimularem a produção de anticorpos, induzem uma resposta imune mediada por células (BOLIN et al., 2000; BOLIN; ALT, 2001; ELLIS et al., 2000), com proliferação das células T CD4⁺ e das células T γ δ produzindo IFN- γ (NAIMAN et al., 2001b, 2002; BLUMERMAN et al., 2007a).

Estudos de eficácia com vacinas que induzem este tipo de resposta (mediada por células) preveniram colonização renal e eliminação da bactéria na urina a curto prazo (BOLIN et al., 2000; BOLIN; ALT, 2001; ELLIS et al., 2000; ZUERNER et al., 2011).

Estes estudos apontam para o importante papel da imunidade mediada por células na proteção contra *Leptospira* em hospedeiros de manutenção (ZUERNER, 2015).

A análise das células mononucleares do sangue periférico de bovinos vacinados com a vacina monovalente (sorovar Hardjo) e posteriormente desafiados, desvendam características da resposta Th1 e de células T γ δ que surgem em resposta à vacinação (NAIMAN et al., 2001a, b; ZUERNER et al., 2011).

As células T γ δ de bovinos possuem em sua superfície o receptor WC1, que se liga a uma diversidade de PAMPs, como lipoproteínas, ácido lipoteicóico e proteínas de repetição rica em leucina (LOIMARANTA et al., 2009).

Zuerner et al. (2011) identificaram em bovinos vacinados com sorovar monovalente, uma resposta de *recall* pelas células NK (CD 335⁺), expressando IFN- γ . Apesar das células NK serem geralmente consideradas como parte da resposta imune inata, nesse caso demonstraram capacidade de gerar uma resposta de recall a antígenos (COOPER et al., 2009).

Outros estudos detectaram que as células T CD4⁺ (Th1) estimuladas pela *Leptospira* apresentam aumento na transcrição de genes que codificam funções citotóxicas e uma quimiocina que atrai neutrófilos (CXCL6) (BLUMERMAN et al., 2007b).

Em pacientes humanos também foi relatada uma forte resposta de Th1 à infecção por *Leptospira*, com aumento significativo de células mononucleares de sangue periférico e presença de células T γ δ (DE FOST et al., 2003; BARRY et al., 2006).

2.4.3 Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC)

O MHC é um conjunto de genes que codifica moléculas (proteínas) expressas na superfície das células que processam os antígenos. Sendo assim, as células apresentadoras de antígeno utilizam as moléculas MHC para expor o antígeno às células sensíveis a eles (TIZARD, 2019).

O MHC é subdividido em 3 classes principais de genes (classe I, classe II e classe III) que estão agrupados em diferentes regiões do cromossomo, e os produtos expressos por cada classe têm distribuição e função diferentes. O MHC classe I é expresso na maioria das células nucleadas, funcionando como receptor para antígenos endógenos e com função de apresentar os peptídeos antigênicos aos linfócitos T CD8+ (citotóxicos). O MHC classe II é expresso em células B, macrófagos e células dendríticas, funcionando como receptor para antígenos exógenos e com função de apresentar os peptídeos antigênicos aos linfócitos T CD4+ (auxiliares/ helper). O MHC classe III codifica um pool de proteínas que estão relacionadas à imunidade inata, como por exemplo o complemento (TIZARD, 2019).

A nomenclatura das proteínas codificadas pelos alelos MHC varia de acordo com a espécie, por exemplo, em humanos chama-se HLA (antígeno leucocitário humano); em bovinos, BoLA (antígeno leucocitário bovino); em cães, DLA; em equinos, ELA e em suínos SLA (TIZARD, 2019).

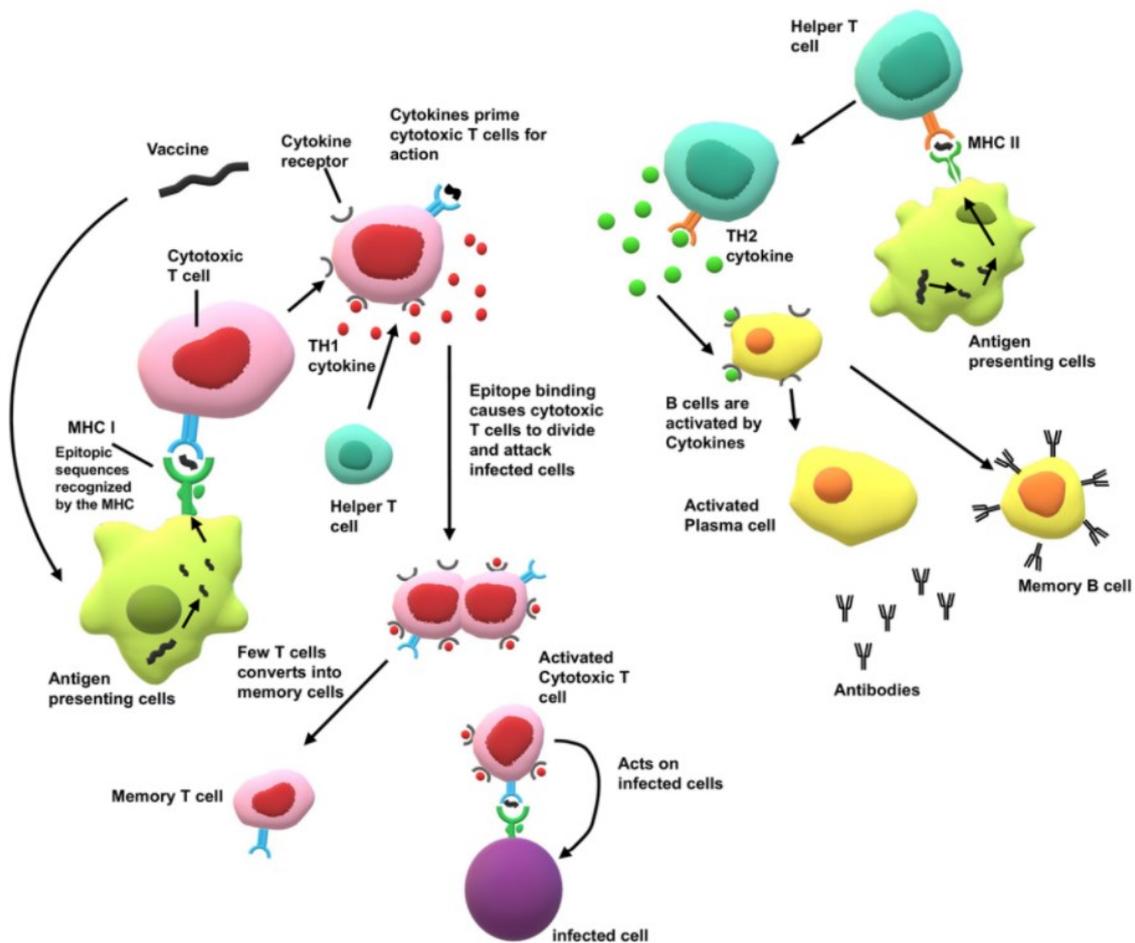
Em um estudo realizado por Lata et al. (2018) para a identificação de candidatos potenciais para o desenvolvimento de uma vacina contra leptospirose, a interação de ligação de epítomos de LTC (Linfócito T citotóxico) com o MHC classe I foi avaliada. Os autores afirmaram que os LTCs são instigadores vitais da imunidade celular e desempenham um papel relevante na eliminação das células infectadas. Além disso também foi realizado um estudo de simulação de dinâmica molecular para avaliar a estabilidade dos complexos epítomo-MHC-I produzidos.

De acordo com Lazarski et al. (2005) a avaliação da ligação entre os epítomos selecionados e as moléculas MHC é fundamental para o desenvolvimento de uma vacina, pois a imunogenicidade das células T está relacionada com a força de ligação dos epítomos com a molécula MHC.

O estudo de Kar et al. (2020) que buscou desenvolver uma vacina multi-epítomo contra o vírus SARS-CoV-2, afirmou que a vacina projetada tem a capacidade de desenvolver tanto resposta imune humoral quanto celular. Isso porque, quando a vacina é processada pelas células apresentadoras de antígeno, alguns dos epítomos antigênicos se ligam aos receptores MHC classe I, o que estimula o desenvolvimento das células T citotóxicas que atacam as células infectadas. Além disso, as células T ativadas se diferenciam em células T de memória. Da

mesma maneira, alguns epítomos antigênicos se ligam aos receptores MHC classe II, e sequencialmente as células B se diferenciam em células plasmáticas e células B de memória. As células plasmáticas, que são células B ativadas, produzem anticorpos neutralizantes que bloqueiam a interação do patógeno com a células do hospedeiro, conforme está esquematizado na figura 4.

Figura 4 – Ativação de resposta imune humoral e celular desencadeada por vacina multi-epítomo contra o vírus SARS-CoV-2.



Fonte: Kar et al. (2020).

2.5 Imunoinformática

O aumento da disponibilidade de dados ômicos (genômicos, proteômicos, metabolômicos, entre outros) e imunológicos, juntamente com os avanços tecnológicos nos algoritmos computacionais têm aprimorado o desenvolvimento de vacinas, sendo este processo

conhecido como imunoinformática. Essa abordagem que integra diferentes metodologias computacionais tem tornado mais rápida e prática a identificação dos melhores imunógenos e os candidatos a epítomos em potencial (YANG E YU, 2009; DE GREGÓRIO; RAPPUOLI, 2012; PATRONOV; DOYTCHINOVA, 2013).

Por isso, a imunoinformática tem se tornado universal quando se trata do desenvolvimento de vacinas, permitindo o acesso a informações baseadas no genoma e proteoma e oferecendo alto nível de confiança na predição dos candidatos vacinais (DELLAGOSTIN et al., 2017).

Recentemente, a utilização das ferramentas de imunoinformática foi extensivamente aceita para a triagem de imunógenos eficientes para compor novas vacinas contra doenças infecciosas (LATA et al., 2018).

Desta forma, os repositórios de dados ômicos aliados a ferramentas de imunoinformática que irão processar esses dados de forma direcionada ao interesse da pesquisa, são de fundamental importância para a realização de estudos *in silico*, que serão úteis para guiar os experimentos de laboratório, e dessa forma economizam tempo e investimento financeiro (OLI et al., 2020).

De acordo com Rappuoli (2000) e Soria-Guerra et al. (2015) a abordagem *in silico* pode ser positiva e capaz de fornecer diretrizes para os estudos *in vivo*, enquanto os métodos convencionais dependem do cultivo de patógenos e da extração de proteínas, sendo que o teste dessas proteínas em grande escala é caro e laborioso.

Além disso, a triagem por imunoinformática reduz significativamente o número de vacinas candidatas e, conseqüentemente, o número de animais de laboratório que seriam usados para os testes de eficácia. A imunoinformática possibilita a identificação de todos os antígenos de um patógeno, favorecendo descoberta de candidatos vacinais e até melhorando as vacinas existentes (LATA et al., 2018; LATA et al., 2020).

Um padrão de análises de imunoinformática foi observado recentemente no desenvolvimento de vacinas multiepítomo. De uma maneira geral trata-se de predição de epítomos de LTH (Linfócito T Helper) e LTC (Linfócito T Citotóxico); predição de epítomos lineares de célula B, relacionado a predição de epítomos para anticorpos; predição de epítomos indutores de INF- γ ; análises de antigenicidade, alergenicidade e características físico-químicas dos epítomos; e a estabilidade de ligação dos epítomos aos receptores das células imunes (molecular docking) (CAN et al., 2020; DONG et al., 2020; KALITA et al., 2020; KAR et al., 2020; SRIVASTAVA et al., 2020; UL QUAMAR et al., 2020a).

3 METODOLOGIA

3.1 Desenvolvimento de um protocolo simplificado para extração de proteína total de *L. interrogans*

Foram utilizadas amostras de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20, atenuada, autóctone, cedida pelo Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Fluminense - UFF, mantida em cultivo com meio EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris - DIFCO) enriquecido com *Leptospira* Enrichment EMJH - DIFCO.

Os cultivos permaneceram por aproximadamente 7 dias em estufa BOD a 30 °C, até atingirem a concentração celular de 10^8 células/mL, contadas em câmara de Neubauer no microscópio de campo escuro. O protocolo de extração de proteína total foi elaborado a partir da adaptação de um protocolo de preparo de extrato solúvel de *Leishmania amazonensis* (FUMAGALLI, 2008).

Um volume de 60 mL de meio de cultura contendo *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20, foi centrifugado a 20800 x g (equivalente a 15557 RCF) em temperatura ambiente, por 20 minutos. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e centrifugou-se novamente, na mesma rotação e temperatura, por 10 minutos.

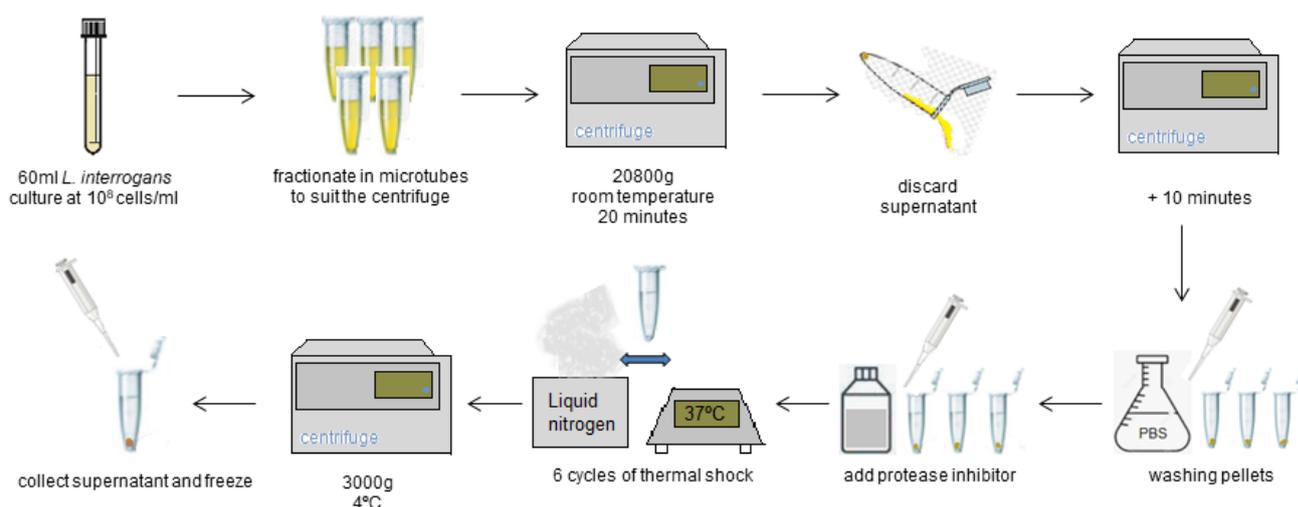
Os *pellets* foram lavados com PBS (Phosphate buffered saline) estéril (pH 7,4) e, em seguida, ressuspensos em 1,5 mL de *Protease inhibitor cocktail tablets – Complete* (Sigma-Aldrich). Então, foram realizados 6 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C.

O extrato obtido foi centrifugado a 3000 x g (equivalente a 2243 RCF), por 10 minutos, em centrífuga refrigerada a 4 °C. Ao fim, o sobrenadante foi coletado e congelado em ultra freezer a -80 °C.

Procedeu-se a dosagem proteica do extrato pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). O preparo da curva padrão foi feito com BSA (0 a 10 µg), e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (equipamento Multiskan Go) a 595 nm. O rendimento médio das extrações foi calculado pela média aritmética de todas as dosagens proteicas obtidas pelo método de Bradford.

As etapas do protocolo simplificado de obtenção de extrato proteico total de *Leptospira interrogans* estão sumarizadas na figura 5.

Figura 5 - Etapas do protocolo simplificado de obtenção de extrato proteico total de *Leptospira interrogans*.



Fonte: A autora.

3.2 Espectrometria de massas

Após a mensuração, 50 µg de proteína total da amostra seguiu para as etapas de redução com ditioneitol (DTT) 100 mM, alquilação com iodoacetamida 0,5 M e digestão com tripsina 1:50 (m/m). A etapa de dessalinização foi realizada com ZipTips C18 (Millipore, Billerica, MA, Estados Unidos).

A proteômica foi realizada no espectrômetro de massa LTQ-Orbitrap Velos acoplado à cromatografia líquida EASY-nLC II (ThermoFisher, Waltham, MA, Estados Unidos). Os dados foram coletados em um modo dependente da aquisição de dados em que os cinco íons precursores mais intensos de cada ciclo foram selecionados para fragmentação por dissociação induzida por colisão (CDI) por 90 s; uma voltagem de nanopulverização de 2,3 kV foi selecionada, a 250 ° C, para ionizar a amostra. Os tempos de injeção no íon trap e FT-MS foram de 100 ms cada, com uma resolução de 30.000 por meio da faixa de 300-1.800 m / z.

A análise dos dados brutos foi realizada no software Proteome Discoverer 4.1 (Thermo Fisher Scientific). Em relação ao banco de dados, foi feito o download das proteínas de *Leptospira* (filtrado pelo gênero *Leptospira*) do site Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) em novembro de 2019. A carbamidometilação foi definida como modificação fixa, enquanto a oxidação da metionina (M) foi definida como modificação variável. As clivagens máximas

foram selecionadas em três para a tripsina. O erro de massa do precursor e os fragmentos foram de 10 ppm e 0,5 Da, respectivamente.

3.3 Modelagem e validação *in silico* de proteínas com importância reconhecida: Loa 22, LipL32, Flagelina, Fator de alongação Tu e Fator de alongação Ts

Todos os servidores utilizados nesta pesquisa são de uso público e gratuito.

Foi utilizado o servidor *SWISS-MODEL* (<https://swissmodel.expasy.org/>) que usa o banco de dados de proteína remanescentes *Protein Data Bank* (PDB), e tem como pretensão eliminar algumas instabilidades. Os prováveis modelos foram classificados conforme seu valor, identidade de sequência, resolução e qualidade da estrutura. Essa construção de um modelo por homologia implicou basicamente em quatro etapas sucessivas: [1] identificação e seleção de modelo estrutural e seleção de proteínas-molde; [2] alinhamento das sequências-alvo de resíduos e estrutura(s) do modelo; [3] construção das coordenadas do modelo; [4] validação do modelo.

O processo de validação da estrutura tridimensional foi feito na plataforma de modelagem do *SWISS-MODEL*, que se baseia em avaliação da qualidade do empacotamento global da proteína, nos possíveis erros estruturais em regiões localizadas e nos parâmetros estereoquímicos por Ramachandran e descritor de qualidade *Q-Mean*.

A visualização da molécula foi feita através do *Chimera* (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>).

3.4 Caracterização físico-química *in silico* das proteínas não caracterizadas e das proteínas relatadas em outras pesquisas como geradoras de resposta imunológica

Para a caracterização físico-química *in silico* destes 2 grupos de proteínas (proteínas não caracterizadas e proteínas relatadas em outras pesquisas como geradoras de resposta imunológica) encontradas no proteoma realizado utilizou-se o servidor ExPASy - ferramenta ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>).

O ProtParam é uma ferramenta que realiza o cálculo de vários parâmetros físicos e químicos de proteínas, como o peso molecular, pI teórico, número de aminoácidos, meia-vida estimada, índice de instabilidade, índice alifático e média de hidropaticidade (GRAVY).

3.5 Avaliação da alergenicidade das proteínas

A alergenicidade dos 2 grupos de proteínas (proteínas não caracterizadas e proteínas relatadas em outras pesquisas como geradoras de resposta imunológica) foi avaliada usando os servidores AllerTOP v.2.0 e Allergen FP v.1.0.

O AllerTOP v.2.0 (<http://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/method.html>) utiliza um método baseado na transformação de covariância cruzada automática (ACC) de sequências de proteínas em vetores uniformes de igual comprimento. Então, as proteínas são classificadas com base em um conjunto de dados contendo 2.427 alérgenos conhecidos de diferentes espécies e 2.427 não alérgenos.

O Allergen FP v.1.0 (<http://ddg-pharmfac.net/AllergenFP/method.html>) também utiliza o método ACC e o mesmo conjunto de dados de alérgenos e não alérgenos, porém neste servidor, os subconjuntos de proteínas alergênicas e não alergênicas foram transformados em matrizes e uma impressão digital binária é gerada para cada proteína, sendo empregado o coeficiente de Tanimoto para determinar se a proteína é alergênica ou não.

3.6 Predição de antigenicidade das proteínas e outras características relevantes para um alvo vacinal

A avaliação da antigenicidade das proteínas foi realizada para selecionar as proteínas com maior capacidade de induzir resposta imune.

Para isso, os 2 grupos de proteínas (proteínas não caracterizadas e proteínas relatadas em outras pesquisas como geradoras de resposta imunológica) foram submetidas a análise em 3 servidores diferentes: [1] servidor VaxiJen v2.0; [2] servidor Vaxign: Vaccine Design e [3] servidor Scratch Protein Predictor.

O servidor VaxiJen v2.0 (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>) apresenta precisão de predição de 70% a 89%. A página de resultados do VaxiJen lista o alvo selecionado, a sequência da proteína, sua probabilidade de predição e uma declaração de antígeno protetor ou não antígeno, de acordo com um ponto de corte predefinido de 0,4.

O servidor Vaxign: Vaccine Design (<http://www.violinet.org/vaxign2/dynamic>) é um sistema de previsão e análise de alvos de vacina baseado no princípio da vacinologia reversa. Por meio de uma análise dinâmica, o Vaxign permite a entrada de sequência e execução dinâmica do sistema com a visualização de resultados. Dentro deste servidor, o Vaxign-ML fornece um score de antigenicidade para as proteínas. Além da antigenicidade, o Vaxign

também fornece resultados sobre a provável localização subcelular da proteína, a probabilidade de a proteína ser adesina (capacidade de adesão) e a similaridade das proteínas analisadas a proteínas humanas, de camundongo e de suínos.

O servidor Scratch Protein Predictor (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>) fornece uma probabilidade prevista de antigenicidade para as proteínas (ANTIGENpro), além de parâmetros físico-químicos como a predição de solubilidade das proteínas (SOLpro).

3.7 Seleção das proteínas com maior potencial para alvo vacinal

As proteínas, pertencentes aos 2 grupos avaliados, que foram consideradas como alérgeno por qualquer um dos servidores (AllerTOP ou Allergen FP) e as proteínas que apresentaram similaridade a proteínas humanas, de camundongos ou de suínos pelo servidor Vaxign, foram imediatamente eliminadas.

As proteínas com localização na membrana externa foram priorizadas para a seleção, desde que não se enquadrassem nos critérios eliminatórios mencionados no parágrafo acima.

As proteínas não eliminadas foram então submetidas a 4 critérios de seleção: 1) Ser considerada uma adesina, com *cut-off* de 0,5 em relação aos valores fornecidos pelo Vaxign; 2) Proteínas com score de antigenicidade igual ou maior que 60% no VaxiGn-ML score (servidor Vaxign); 3) Proteínas listadas como antígeno pelo servidor VaxiJen v2.0; 4) Proteínas com probabilidade prevista de antigenicidade (ANTIGENpro) igual ou superior a 0,6 nos valores fornecidos pelo Scratch Protein Predictor.

Assim, as proteínas que atenderam a pelo menos 2 critérios, dos 4 avaliados, foram selecionadas.

3.8 Análise das proteínas selecionadas nos servidores Immune Epitope Database (IEDB) e IFN epitope e avaliação individual dos peptídeos

As proteínas com maior potencial para alvo vacinal selecionadas foram submetidas a 4 análises diferentes no servidor Immune Epitope Database (IEDB) (<http://tools.iedb.org/main/>): [1] predição de ligação de epítomos de células T a moléculas de MHC classe I; [2] predição de ligação de epítomos de células T a moléculas de MHC classe II; [3] predição de imunogenicidade de células TCD4, que prediz a capacidade relativa de um complexo de

peptídeo / MHC para induzir uma resposta imune das células TCD4; [4] predição de epítipo linear de célula B.

O servidor IFN epitope (<http://crdd.osdd.net/raghava/ifnepitope/scan.php>) foi utilizado para prever epítopos indutores de interferon- γ , além de classificar esses peptídeos / epítopos, possibilitando identificar as melhores regiões antigênicas que irão induzir interferon- γ (DHANDA et al., 2013).

Em cada uma das análises mencionadas acima, os 5 melhores peptídeos (epítopos) de cada proteína foram selecionados, de acordo com os valores do percentil rank e dos scores. Esses peptídeos (epítopos) foram individualmente caracterizados quanto à solubilidade, pelo servidor PepCalc.com – Peptide property calculator (<https://pepcalc.com/>), e quanto à toxicidade e características bioquímicas (solubilidade, hidrofobicidade, hidropaticidade, anfipaticidade, hidrofiliabilidade, carga, ponto isoelétrico e peso molecular) pelo servidor ToxinPred – Designing and prediction of toxic peptides (<https://webs.iiitd.edu.in/raghava/toxinpred/index.html>).

3.9 Construção da proteína quimérica, *docking* molecular e simulação imunológica

Com base nos resultados obtidos da avaliação individual dos peptídeos, os melhores foram selecionados para construção de uma proteína quimérica candidata a vacina multiepítipo.

Os principais critérios para a construção da proteína quimérica foram acrescentar epítopos de LTH, de LTC, de células B, epítopos indutores de IFN- γ , ter afinidade de ligação à maior quantidade de alelos HLA, ser antigênico, imunogênico e ter potencial para induzir imunidade cruzada entre os sorovares.

Para potencial indução de imunidade cruzada foram acrescentados 2 peptídeos, sendo um deles epítipo de LTH conservado entre 44 sorovares de *Leptospira* patogênica, e o outro, epítipo de LTC conservado entre 46 sorovares.

Sequências ligantes específicas foram utilizadas na fusão dos epítopos peptídicos selecionados para a construção da proteína quimérica e um adjuvante genérico foi adicionado na porção N-terminal.

As sequências específicas utilizadas não serão citadas para proteção dos dados, devido ao processo de patente. A estrutura tridimensional da proteína quimérica foi desenvolvida utilizando o servidor LOMETS - Local Meta-Threading Server, version 3

(<https://zhanglab.dcmdb.med.umich.edu/LOMETS/>). Os servidores ModRefiner (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/ModRefiner/>) e GalaxyRefine (<http://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=REFINE>) foram utilizados no refinamento da estrutura terciária a partir do modelo 3D obtido para a proteína quimérica pelo servidor LOMETS.

A estrutura terciária foi validada utilizando o servidor ProSA-web (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) que analisa a qualidade global e local do modelo 3D, validando a estrutura com base no Z-score predito. Além disso, a qualidade geral dos ângulos *phi* e *psi* dos resíduos de aminoácidos da estrutura terciária do candidato vacinal foi determinado por análise no gráfico de Ramachandran usando servidor RAMPAGE (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>).

Após o desenho e construção, a proteína quimérica foi submetida a análises físico-químicas no servidor ProtParam, avaliação da alergenicidade (servidores AllerTOP e Allergen FP), toxicidade (servidor ToxinPred), antigenicidade (servidores Vaxign, VaxiJen v2.0 e Scratch - ANTIGENpro) e solubilidade (Scratch – SOLpro).

O docking molecular foi realizado por meio dos servidores PatchDock (<https://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/php.php>) e FireDock (<https://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/FireDock/php.php>) para avaliar a interação entre a proteína quimérica e diferentes receptores (MHC I, MHC II, TLR 2 e TLR 4). O encaixe dos complexos foi criado no PatchDock e refinado no FireDock, que previu a energia global dos complexos acoplados.

Para simulação imunológica foi utilizado o servidor C-IMMSIM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/C-ImmSim-10.1/>), a fim de caracterizar o perfil da resposta imune induzido pela proteína quimérica. C-IMMSIM é um modelo baseado em agente que usa pontuação específica de posição matrizes (PSSM) para predição de peptídeos derivadas de técnicas de aprendizado de máquina para predizer interações.

Foi simulada uma vacinação com 3 doses, sendo que a 1ª dose foi aplicada no dia 0, a 2ª dose foi aplicada no dia 30 e a 3ª dose no dia 90. Toda a simulação foi executada em 1.100 etapas de tempo, que são cerca de 12 meses.

4 RESULTADOS

O tempo necessário para realização de cada protocolo de extração de proteína total foi de aproximadamente 2 horas e 30 minutos. Ao final de cada protocolo obteve-se um volume de extrato proteico de aproximadamente 1,5 mL na concentração média de 1,76 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; totalizando 2640,00 μg de proteína por extração.

Quanto aos resultados obtidos na proteômica, foram identificadas 421 proteínas. O banco de dados do Uniprot detectou uma diversidade de proteínas comuns à outras espécies e sorovares de *Leptospira*, conforme evidenciado na tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição taxonômica das proteínas encontradas na proteômica de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20.

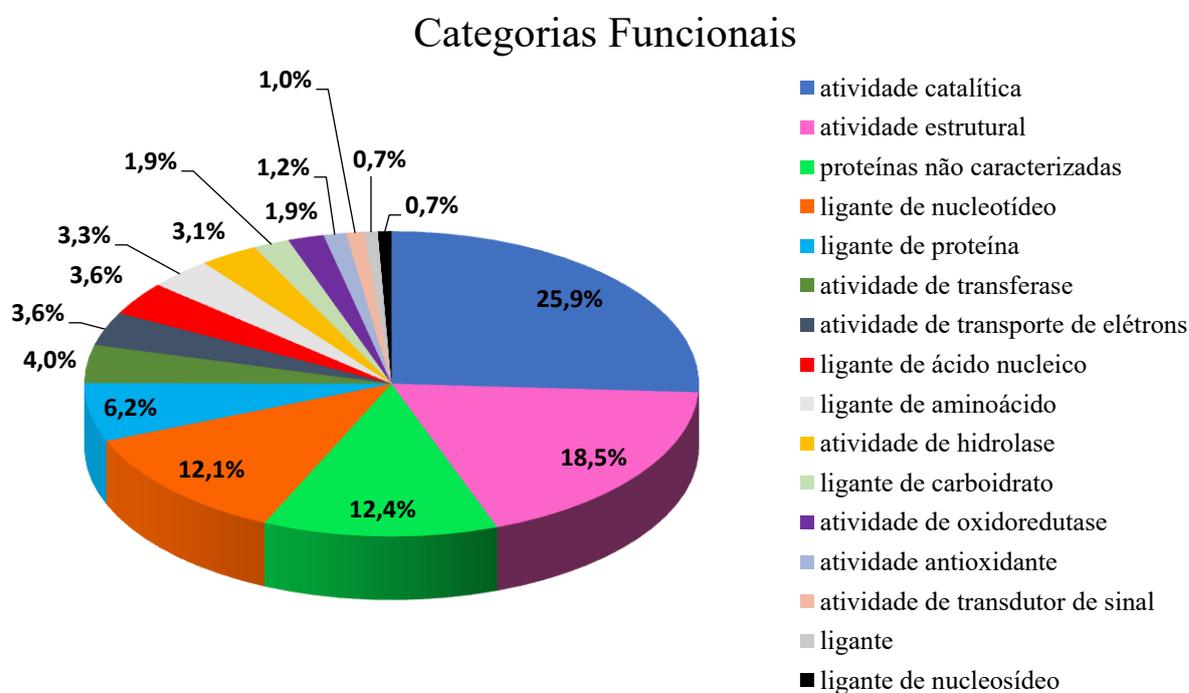
Espécie	Sorovar/Cepa	Número de proteínas
<i>L. interrogans</i>	Copenhageni cepa LT 2050	48
<i>L. interrogans</i>	Bataviae	41
<i>L. interrogans</i>	Hardjo	33
<i>L. interrogans</i>	Grippotyphosa	28
<i>L. interrogans</i>	Lora cepa TE 1992	22
<i>L. interrogans</i>	cepa 2006001854	19
<i>L. interrogans</i>	cepa FPW 1039	18
<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	17
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae cepa Verdun HP	14
<i>L. interrogans</i>	cepa VI 12758	13
<i>L. interrogans</i>	Canicola	8
<i>L. interrogans</i>	NE	7
<i>L. interrogans</i>	Australis	7
<i>L. interrogans</i>	Lai	6
<i>L. interrogans</i>	Malaya	4
<i>L. interrogans</i>	Manilae	3
<i>L. interrogans</i>	Zanãoi cepa LT 2156	3
<i>L. kirschneri</i>	cepa H1	50
<i>L. kirschneri</i>	cepa 200801925	3
<i>L. weilii</i>	NE	15
<i>L. borgpetersenii</i>	Hardjo-bovis cepa JB 197	7
<i>L. borgpetersenii</i>	Pomona	3
<i>L. noguchii</i>	Autumnalis	6
<i>L. sp.</i>	B5-022	6

<i>L. sp.</i>	P2653	3
<i>L. alstonii</i>	Pingchang cepa 80-412	5
<i>L. wolffii</i>	NE	3
<i>L. kmetyi</i>	NE	7
<i>L. adleri</i>	NE	4
<i>L. mayottensis</i>	200901116	3
<i>L. santarosai</i>	cepa CBC 1416	3
<i>L. semungkensis</i>	NE	3
<i>L. neocaledonica</i>	NE	3
<i>L. meyeri</i>	NE	3
<i>L. stimsonii</i>	NE	3

*NE: não especificado

Para um refinamento adicional do proteoma realizado neste estudo, as proteínas encontradas foram subdivididas em categorias de acordo com suas funções. Observou-se um total de 16 categorias diferentes, sendo que a maior parte do proteoma (25,9%) correspondeu a proteínas com atividade catalítica, conforme demonstrado na figura 6.

Figura 6 - Proteínas identificadas no proteoma de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20, agrupadas por categorias funcionais.



Fonte: A autora.

Dentre as categorias funcionais, 12,4% do proteoma correspondeu a proteínas não caracterizadas, conforme evidenciado na tabela 2.

Tabela 2 - Proteínas não caracterizadas encontradas na proteômica de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20.

Proteínas não caracterizadas	Chave de acesso	Função ou localização celular	Número de sequências encontradas da proteína
1	M6USG6	desconhecida	6
2	A0A0M4NJU9	desconhecida	4
3	A0A0E2CN14	proteína celular	4
4	M6TFA2	desconhecida	4
5	A0A2H1XA80	desconhecida	3
6	M3ETH8	desconhecida	4
7	M6G8E8	desconhecida	3
8	A0A0E2D0X7	desconhecida	3
9	M6AE33	desconhecida	3
10	Q04RW5	proteína celular	3
11	M3G459	desconhecida	3
12	A0A2M9ZW65	proteína de membrana	3
13	M3I8Y6	desconhecida	3
14	A0A0E2B664	proteína celular	3
15	A0A4R8MMT7	proteína de membrana	3

Algumas proteínas identificadas neste estudo foram relatadas em pesquisas anteriores como geradoras de resposta imunológica, conforme demonstrado na tabela 3.

Tabela 3 - Proteínas encontradas no proteoma de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20 e identificadas por outros autores como geradoras de resposta imunológica.

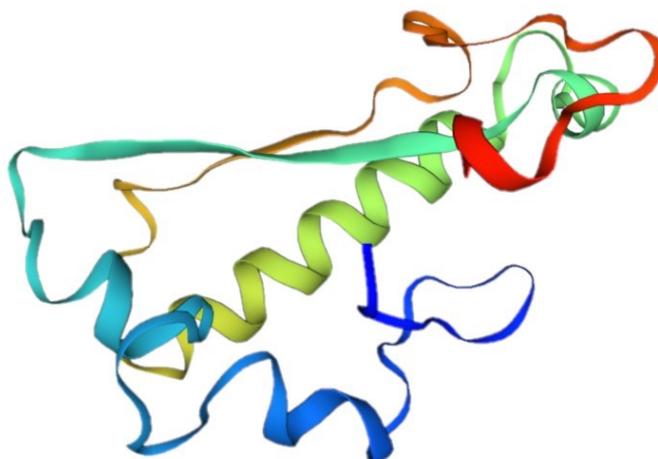
Referência	Chave de acesso	Identificação da proteína	Função/localização celular	pI	MW (KDa)
Sakolvaree et al., 2007	M3GCP1	Elongation factor Tu	alongamento de cadeias durante a síntese de polipeptídeos no ribossomo/ citoplasma	6,09	43,5
Sakolvaree et al., 2007	M6HEN0	Elongation factor Ts	alongamento de cadeias durante a síntese de polipeptídeos no ribossomo/ citoplasma	8,72	8,2

Seixas et al., 2007 Kositanãot et al., 2007	A0A076V7V5	Lip L32 (fragment)	principal lipoproteína de membrana externa da <i>Leptospira</i> patogênica	5,59	11,1
Seixas et al., 2007 Kositanãot et al., 2007 Muray et al., 2013	A0A2M9XTF4	Lip L32	principal lipoproteína de membrana externa da <i>Leptospira</i> patogênica	6,81	29,4
Sakolvaree et al., 2007 e Kositanãot et al., 2007	A0A0E2B0X3 A0A0E2B1F2 A0A3S9KKN1	Flagellin	Participa da estrutura do flagelo, relacionada à motilidade	6,96 7,08 8,81	28,2 31,3 31,1
Nally et al., 2007	A0A0A7KLA8	Loa 22 (fragment)	lipoproteína de membrana externa, é um fator de virulência	5,71	17,7
Sakolvaree et al., 2007	Q04TR4	ATP-dependent Clp protease, proteolytic subunit	hidrólise de proteínas em peptídeos na presença de ATP e magnésio; atua na degradação de proteínas dobradas/citoplasma	6,34	21,8
Kositanãot et al., 2007 Kositanãot et al., 2007	A0A0E2B3A8	HpcH/HpaI aldolase/citrate lyase family protein	atividade catalítica; atividade de liase; ligação de íons	6,54	37,0
Sakolvaree et al., 2007 Kositanãot et al., 2007	A0A0F6IFM5	Electron transfer flavoprotein, beta subunit	atividade de transporte de elétrons	5,74	27,1
Sakolvaree et al., 2007	M6TDT5	DNA polymerase III beta subunit	ligante de ácido nucléico, participa da replicação do DNA	8,75	9,8
Sakolvaree et al., 2007	A0A0F6IG44	Acetyl-CoA C-acetyltransferase	atividade de transferase	6,23	47,3
Sakolvaree et al., 2007	A0A0M5LEW4	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	atividade catalítica, participa do metabolismo da glicose	7,74	36,7
Sakolvaree et al., 2007	A0A0M4NCJ7	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase (Short chain dehydrogenase)	cataliza reação para biossíntese de ácidos graxos	8,24	26,0
Sakolvaree et al., 2007	A0A0E2B763	60 kDa chaperonin	participa da montagem estrutural de polipeptídeos/citoplasma	5,39	57,9
Kositanãot et al., 2007	M6G3A4 M6DCM9	Chaperone protein DnaK	participa da montagem estrutural de polipeptídeos	5,1 5,24	67,0 69,0
Kositanãot et al., 2007	M3EV56 M3EVA0 M6FJI6	Acyl-CoA dehydrogenase	cataliza reação de dehidrogenar o acyl-CoA	6,79 6,02 6,79	42,6 55,5 42,6

Murray et al., 2013	A0A0F6IFA5	Leucine rich repeat protein	Ligante de aminoácido	5,60	21,1
------------------------	------------	--------------------------------	-----------------------	------	------

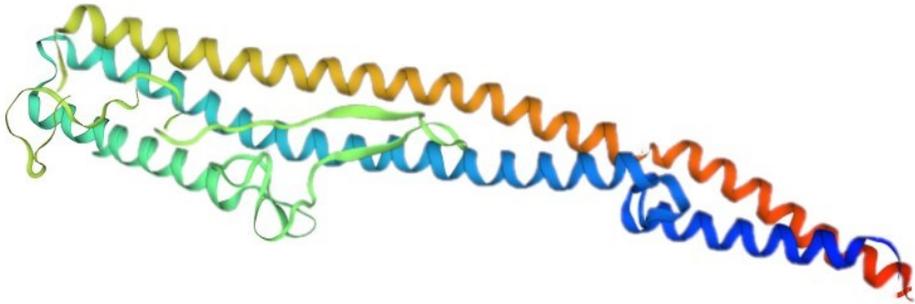
As estruturas tridimensionais de proteínas com importância reconhecida nas pesquisas sobre a *Leptospira*, identificadas neste proteoma, estão demonstradas nas figuras 7, 8, 9, 10 e 11. Em todas estas figuras pode-se observar pelo padrão de coloração, regiões específicas das proteínas: em azul é a porção N-terminal, onde começa a proteína; em vermelho, a porção C-terminal, onde termina a proteína. Também pode-se observar regiões de enovelamento (regiões alfa-hélice) e regiões de folha beta. As demais análises realizadas para a elaboração da estrutura tridimensional e validação da modelagem destas proteínas estão no Apêndice A.

Figura 7 - Estrutura tridimensional da proteína Loa 22 (A0A0A7KLA8), gerada pelo programa de bioinformática *Swiss-model*.



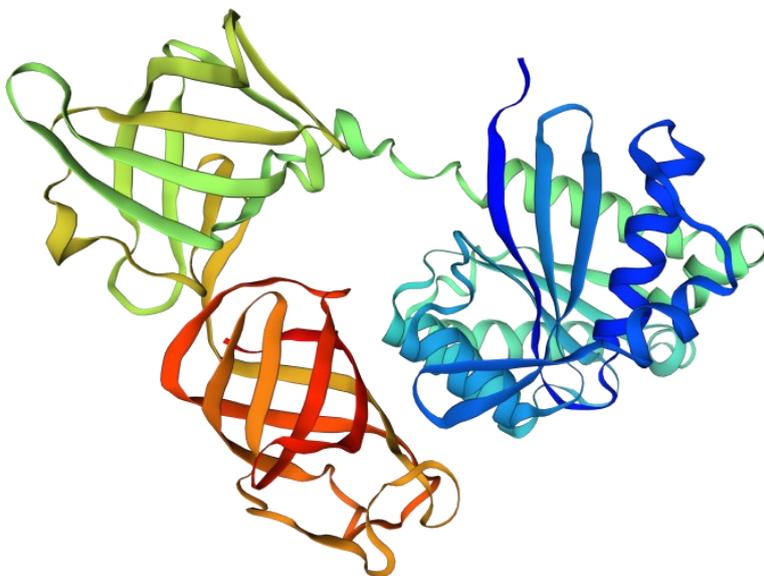
Fonte: A autora.

Figura 8 - Estrutura tridimensional da proteína Flagelina (A0A3S9KKN1), gerada pelo programa de bioinformática *Swiss-model*.



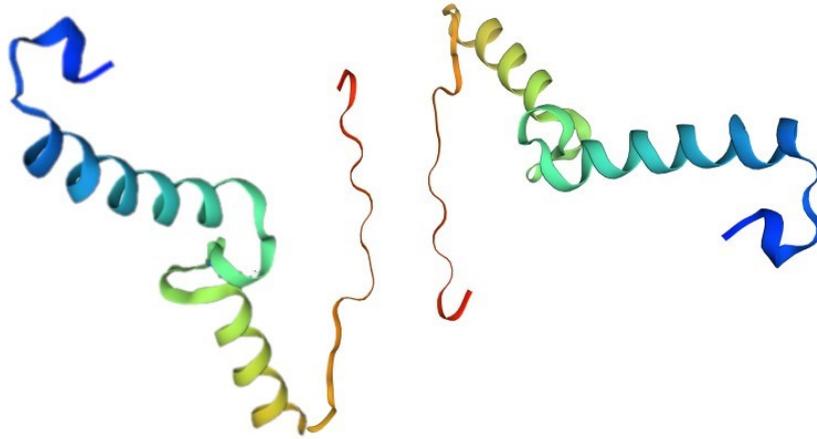
Fonte: A autora.

Figura 9 - Estrutura tridimensional da proteína Fator de alongação Tu (M3GCP1), gerada pelo programa de bioinformática *Swiss-model*.



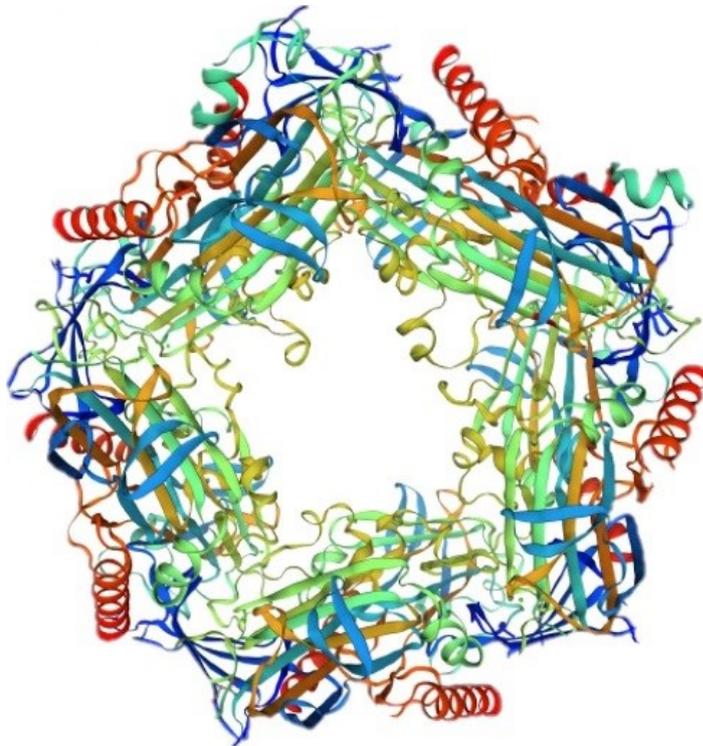
Fonte: A autora.

Figura 10 - Estrutura tridimensional da proteína Fator de alongação Ts (M6HEN0), gerada pelo programa de bioinformática *Swiss-model*.



Fonte: A autora.

Figura 11 - Estrutura tridimensional da proteína LipL32 (A0A2M9XTF4), gerada pelo programa de bioinformática *Swiss-model*.



Fonte: A autora.

Os dados da caracterização físico-química *in silico* das proteínas não caracterizadas e das proteínas relatadas em outras pesquisas como geradoras de resposta imune, se encontram nas tabelas 4 e 5, respectivamente.

Tabela 4 - Caracterização *in silico* das proteínas não caracterizadas encontradas no proteoma de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhagueni cepa M20.

chave de acesso	Nº aminoácidos	P.M. (Da)	pI	Resíduos carregados negativamente (Asp + Glu)	Resíduos carregados positivamente (Arg + Lys)	Meia-vida em reticulócitos de mamíferos	Meia-vida em <i>E. coli</i>	Índice de instabilidade	Índice alifático	GRAVY	SolPro
M6USG6	302	35818.90	8.50	51	54	30 horas	>10 horas	45.76 (instável)	84.30	-0.874	0.653307 (insolúvel)
A0A0M4NJU9	276	32021.29	8.30	40	42	30 horas	>10 horas	36.61 (estável)	74.86	-0.809	0.720581 (insolúvel)
A0A0E2CN14	153	17131.81	5.77	23	21	30 horas	>10 horas	28.90 (estável)	82.88	-0.243	0.551281 (solúvel)
M6TFA2	141	15933.17	8.69	16	18	30 horas	>10 horas	28.89 (estável)	79.57	-0.322	0.792923 (insolúvel)
A0A2H1XA80	143	16058.75	9.11	16	21	30 horas	>10 horas	41.26 (instável)	90.77	-0.256	0.904472 (solúvel)
M3ETH8	94	10390.93	8.81	7	12	30 horas	>10 horas	19.76 (estável)	65.43	-0.110	0.883053 (solúvel)
M6G8E8	41	4503.26	9.60	4	7	30 horas	>10 horas	35.24 (estável)	92.93	-0.388	0.918931 (insolúvel)
A0A0E2D0X7	74	8019.08	8.73	5	8	30 horas	>10 horas	55.81 (instável)	60.81	-0.408	0.682821 (solúvel)
M6AE33	602	64943.40	5.34	62	56	30 horas	>10 horas	26.60 (estável)	92.03	-0.094	0.507904 (solúvel)
Q04RW5	89	10509.94	5.56	17	16	30 horas	>10 horas	33.79 (estável)	94.16	-0.804	0.536535 (solúvel)
M3G459	174	19845.67	9.23	27	36	30 horas	>10 horas	21.16 (estável)	60.40	-0.980	0.557092 (insolúvel)
A0A2M9ZW65	232	26957.25	8.92	17	20	30 horas	>10 horas	31.84 (estável)	133.58	0.859	0.902331 (solúvel)
M318Y6	168	19216.69	5.85	27	25	30 horas	>10 horas	46.32 (instável)	84.11	-0.767	0.773248 (insolúvel)
A0A0E2B664	366	39321.06	5.19	46	40	30 horas	>10 horas	33.00 (estável)	82.57	-0.408	0.638708 (solúvel)
A0A4R8MMT7	634	69593.92	8.20	53	55	30 horas	>10 horas	30.65 (estável)	129.16	0.642	0.524075 (insolúvel)

Tabela 5 - Caracterização in silico das proteínas relacionadas em outras pesquisas como geradoras de resposta imunológica encontradas no proteoma de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20.

Identificação da proteína	chave de acesso	Nº aminoácidos	P. M. (Da)	pI	Resíduos carregados negativamente (Asp + Gln)	Resíduos carregados positivamente (Arg + Lys)	Meia-vida em reticulócitos de mamíferos	Meia-vida em <i>E. coli</i>	Índice de instabilidade	Índice alifático	GRAVY	SolPro
Elongation factor Tu	M3GCP1	401	43574.05	5.73	54	45	30 horas	>10 horas	33.76 (estável)	89.48	-0.166	0.811300 (solúvel)
Elongation factor Ts	M6HEN0	73	8217.58	8.79	11	13	30 horas	>10 horas	30.72 (estável)	96.16	-0.216	0.847392 (solúvel)
Lip L32 (fragment)	A0A076V7V5	97	11088.41	5.32	20	17	>20 horas	?	36.22 (estável)	57.42	-1.121	0.914033 (solúvel)
Lip L32	A0A2M9XTF4	272	29401.79	6.35	33	32	30 horas	>10 horas	32.22 (estável)	86.10	-0.178	0.836573 (solúvel)
Flagellin	A0A0E2BOX3	253	28179.13	6.45	28	27	30 horas	>10 horas	39.88 (estável)	86.92	-0.299	0.522054 (solúvel)
Flagellin	A0A0E2BIF2	281	31291.46	6.54	32	31	30 horas	>10 horas	38.67 (estável)	90.68	-0.347	0.647332 (solúvel)
Flagellin	A0A3S9KKN1	281	31072.36	8.75	31	33	30 horas	>10 horas	25.27 (estável)	86.19	-0.299	0.740976 (solúvel)
Loa 22 (fragment)	A0A0A7KLA8	166	17682.60	5.56	24	22	1.9 horas	>10 horas	41.95 (instável)	67.17	-0.694	0.927236 (solúvel)
ATP-dependent Clp protease, proteolytic subunit	Q04TR4	195	21769.90	5.94	23	21	30 horas	>10 horas	42.93 (instável)	96.62	-0.218	0.767155 (insolúvel)
HpcH/HpaI aldolase/citrate lyase family protein	A0A0E2B3A8	330	37062.48	6.07	42	36	30 horas	>10 horas	36.10 (estável)	90.00	-0.295	0.611029 (insolúvel)
Electron transfer flavoprotein, beta subunit	A0A0F6IFM5	253	27070.04	5.58	34	30	30 horas	>10 horas	27.83 (estável)	100.63	-0.116	0.889375 (solúvel)
DNA polymerase III beta subunit	M6TDT5	89	9807.42	8.82	10	12	30 horas	>10 horas	28.56 (estável)	106.29	-0.024	0.730652 (insolúvel)
Acetyl-CoA C-acetyltransferase	A0A0F6IG44	441	47338.37	5.87	58	52	30 horas	>10 horas	26.03 (estável)	89.86	-0.157	0.802514 (solúvel)
Glyceraldhyde-3-phosphate dehydrogenase	A0A0M5LEW4	335	36692.22	7.60	41	42	30 horas	>10 horas	25.60 (estável)	88.12	-0.155	0.619316 (insolúvel)
3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase	A0A0M4NCJ7	254	24063.01	8.39	22	24	30 horas	>10 horas	18.35 (estável)	97.32	0.217	0.797614 (insolúvel)
60 kDa chaperonin	A0A0E2B763	546	57969.76	5.29	78	68	30 horas	>10 horas	31.12 (estável)	96.12	-0.140	0.806804 (solúvel)
Chaperone protein DnaK	M6G3A4	626	67025.46	5.10	92	74	30 horas	>10 horas	28.91 (estável)	86.53	-0.340	0.799977 (insolúvel)
Chaperone protein DnaK	M6DCM9	644	68994.70	5.12	98	79	30 horas	>10 horas	30.18 (estável)	86.23	-0.353	0.672892 (insolúvel)
Acyl-CoA dehydrogenase	M3EV56	387	42596.56	6.36	48	46	30 horas	>10 horas	32.68 (estável)	79.95	-0.292	0.703705 (insolúvel)
Acyl-CoA dehydrogenase	M3EVA0	501	55539.22	5.70	64	52	30 horas	>10 horas	33.93 (estável)	81.66	-0.203	0.698600 (insolúvel)
Acyl-CoA dehydrogenase	M6FJ16	387	42610.54	6.36	48	46	30 horas	>10 horas	31.72 (estável)	79.72	-0.299	0.659261 (insolúvel)
Leucine rich repeat protein	A0A0F6IFA5	182	21162.47	5.53	19	17	30 horas	>10 horas	54.90 (instável)	123.24	-0.401	0.601264 (solúvel)

A predição de alergenicidade dos 2 grupos de proteínas, que foi considerado um critério excludente para a seleção das proteínas, está nas tabelas 6 e 7. Portanto, as proteínas que se apresentaram como alergênicas em qualquer um dos 2 servidores utilizados para análise, foram desconsideradas.

Tabela 6 – Predição de alergenicidade das proteínas não caracterizadas encontradas no proteoma de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20, utilizando os servidores AllerTOP v.2.0 e Allergen FP v.1.0.

Chave de acesso	AllerTOP v. 2.0	Allergen FP v.1.0
M6USG6	não-alérgeno	não-alérgeno
A0A0M4NJU9	não-alérgeno	não-alérgeno
A0A0E2CN14	não-alérgeno	alérgeno
M6TFA2	alérgeno	alérgeno
A0A2H1XA80	não-alérgeno	não-alérgeno
M3ETH8	não-alérgeno	não-alérgeno
M6G8E8	não-alérgeno	não-alérgeno
A0A0E2D0X7	não-alérgeno	não-alérgeno
M6AE33	não-alérgeno	não-alérgeno
Q04RW5	não-alérgeno	não-alérgeno
M3G459	não-alérgeno	não-alérgeno
A0A2M9ZW65	não-alérgeno	não-alérgeno
M3I8Y6	não-alérgeno	não-alérgeno
A0A0E2B664	alérgeno	alérgeno
A0A4R8MMT7	não-alérgeno	não-alérgeno

Tabela 7 – Predição de alergenicidade das proteínas relatadas em outras pesquisas como geradoras de resposta imunológica encontradas no proteoma de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20, utilizando os servidores AllerTOP v.2.0 e Allergen FP v.1.0.

Chave de acesso	AllerTOP v. 2.0	Allergen FP v.1.0
M3GCP1	não-alérgeno	alérgeno
M6HEN0	não-alérgeno	não-alérgeno
A0A076V7V5	não-alérgeno	não-alérgeno

A0A2M9XTF4	não-alérgeno	não-alérgeno
A0A0E2B0X3	não-alérgeno	não-alérgeno
A0A0E2B1F2	alérgeno	não-alérgeno
A0A3S9KKN1	não-alérgeno	não-alérgeno
A0A0A7KLA8	não-alérgeno	não-alérgeno
Q04TR4	não-alérgeno	não-alérgeno
A0A0E2B3A8	não-alérgeno	alérgeno
A0A0F6IFM5	alérgeno	não-alérgeno
M6TDT5	não-alérgeno	não-alérgeno
A0A0F6IG44	não-alérgeno	não-alérgeno
A0A0M5LEW4	não-alérgeno	não-alérgeno
A0A0M4NCJ7	não-alérgeno	alérgeno
A0A0E2B763	não-alérgeno	não-alérgeno
M6G3A4	não-alérgeno	não-alérgeno
M6DCM9	não-alérgeno	não-alérgeno
M3EV56	não-alérgeno	não-alérgeno
M3EVA0	alérgeno	não-alérgeno
M6FJI6	não-alérgeno	não-alérgeno
A0A0F6IFA5	não-alérgeno	não-alérgeno

Outro critério de exclusão avaliado foi a similaridade a proteínas humanas, de camundongos ou de suínos pelo servidor Vaxign: Vaccine Design, os resultados da análise de similaridade estão nas tabelas 8 e 9.

Tabela 8 – Avaliação de similaridade a proteínas humanas, de camundongos ou de suínos das proteínas não caracterizadas encontradas no proteoma de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20, utilizando o servidor Vaxign: Vaccine Design.

chave de acesso	Similaridade a proteína humana	Similaridade a proteína de camundongo	Similaridade a proteína suína
M6USG6	Não	Não	Não
A0A0M4NJU9	Não	Não	Não
A0A0E2CN14	Não	Não	Não

M6TFA2	Não	Não	Não
A0A2H1XA80	Não	Não	Não
M3ETH8	Não	Não	Não
M6G8E8	Não	Não	Não
A0A0E2D0X7	Não	Não	Não
M6AE33	Não	Não	Não
Q04RW5	Não	Não	Não
M3G459	Não	Não	Não
A0A2M9ZW65	Não	Não	Não
M3I8Y6	Não	Não	Não
A0A0E2B664	Não	Não	Não
A0A4R8MMT7	Não	Não	Não

Tabela 9 – Avaliação de similaridade a proteínas humanas, de camundongos ou de suínos das proteínas relatadas em outras pesquisas como geradoras de resposta imunológica encontradas no proteoma de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20, utilizando o servidor Vaxign: Vaccine Design.

Chave de acesso	Similaridade a proteína humana	Similaridade a proteína de camundongo	Similaridade a proteína suína
M3GCP1	Sim	Sim	Sim
M6HEN0	Não	Não	Não
A0A076V7V5	Não	Não	Não
A0A2M9XTF4	Não	Não	Não
A0A0E2BOX3	Não	Não	Não
A0A0E2B1F2	Não	Não	Não
A0A3S9KKN1	Não	Não	Não
A0A0A7KLA8	Não	Não	Não
Q04TR4	Sim	Sim	Sim
A0A0E2B3A8	Não	Não	Não
A0A0F6IFM5	Sim	Sim	Sim
M6TDT5	Não	Não	Não
A0A0F6IG44	Sim	Sim	Sim
A0A0M5LEW4	Sim	Sim	Sim

A0A0M4NCJ7	Sim	Sim	Sim
A0A0E2B763	Sim	Sim	Sim
M6G3A4	Sim	Sim	Sim
M6DCM9	Sim	Sim	Sim
M3EV56	Sim	Sim	Sim
M3EVA0	Sim	Sim	Sim
M6FJI6	Sim	Sim	Sim
A0A0F6IFA5	Sim	Sim	Sim

A avaliação da antigenicidade nos diferentes servidores utilizados e de outras características relevantes para um alvo vacinal, como localização celular e capacidade de adesão, estão demonstradas nas tabelas 10 e 11.

Tabela 10 – Dados de antigenicidade, localização subcelular e adesão das proteínas não caracterizadas encontradas no proteoma de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20, utilizando os servidores VaxiJen v2.0, Vaxign: Vaccine Design e Scratch Protein Predictor.

Chave de acesso	Localização	Capacidade de adesão	VaxiJen 2.0	VaxiGn-ML score	ANTIGENpro (Scratch Protein Predictor)
M6USG6	Desconhecida (Prob.=0.49)	0.218	0.4885 (Antígeno)	90.9	0.752430
A0A0M4NJU9	Desconhecida (Prob.=0.49)	0.434	0.4867 (Antígeno)	90.9	0.873183
A0A0E2CN14	Desconhecida (Prob.=0.20)	0.132	0.5370 (Antígeno)	68.5	0.654399
M6TFA2	Desconhecida (Prob.=0.20)	0.502	0.5475 (Antígeno)	60.9	0.843002
A0A2H1XA80	Desconhecida (Prob.=0.20)	0.513	0.3623 (Não-antígeno)	90.9	0.436922
M3ETH8	Desconhecida (Prob.=0.20)	0.821	0.7326 (Antígeno)	90.2	0.191281
M6G8E8	Desconhecida (Prob.=0.20)	---	1.0044 (Antígeno)	28.5	0.425843

A0A0E2D0X7	Desconhecida (Prob.=0.20)	0.812	0.6183 (Antígeno)	88.5	0.633839
M6AE33	Membrana externa (Prob.=0.95)	0.474	0.5461 (Antígeno)	98.4	0.746833
Q04RW5	Citoplasma (Prob.=0.90)	0.222	0.1493 (Não- antígeno)	72.6	0.778376
M3G459	Desconhecida (Prob.=0.20)	0.705	0.7229 (Antígeno)	90.9	0.859568
A0A2M9ZW65	Membrana citoplasmática (Prob.=1.00)	0.227	0.5867 (Antígeno)	80.6	0.092044
M3I8Y6	Desconhecida (Prob.=0.20)	0.365	0.5552 (Antígeno)	89.5	0.872039
A0A0E2B664	Desconhecida (Prob.=0.20)	0.567	0.8711 (Antígeno)	96.5	0.944269
A0A4R8MMT7	Membrana citoplasmática (Prob.=1.00)	0.177	0.5510 (Antígeno)	90.9	0.134693

Tabela 11 – Dados de antigenicidade, localização subcelular e adesão das proteínas relatadas em outras pesquisas como geradoras de resposta imunológica encontradas no proteoma de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20, utilizando os servidores VaxiJen v2.0, Vaxign: Vaccine Design e Scratch Protein Predictor.

Chave de acesso	Localização	Capacidade de adesão	VaxiJen 2.0	VaxiGn- ML score	ANTIGENpro (Scratch Protein Predictor)
M3GCPI	Citoplasma (Prob.=1.00)	0.273	0.3793 (Não- antígeno)	91.4	0.624992
M6HEN0	Citoplasma (Prob.=1.00)	0.409	0.2325 (Não- antígeno)	90.6	0.051681
A0A076V7V5	Desconhecida (Prob.=0.20)	0.186	0.4810 (antígeno)	63.6	0.732112
A0A2M9XTF4	Desconhecida (Prob.=0.25)	0.454	0.3982 (Não- antígeno)	90.9	0.877204

A0A0E2B0X3	Periplasmática (Prob.=1.00)	0.270	0.3807 (Não- antígeno)	90.9	0.882084
A0A0E2B1F2	Periplasmática (Prob.=1.00)	0.243	0.3639 (Não- antígeno)	90.9	0.909218
A0A3S9KKN1	Periplasmática (Prob.=1.00)	0.285	0.3892 (Não- antígeno)	90.9	0.885491
A0A0A7KLA8	Desconhecida (Prob.=0.20)	0.434	0.7602 (Antígeno)	92.6	0.863795
Q04TR4	Citoplasma (Prob.=1.00)	0.160	0.3683 (Não- antígeno)	90.9	0.554788
A0A0E2B3A8	Citoplasma (Prob.=0.90)	0.174	0.4328 (Antígeno)	90.9	0.644577
A0A0F6IFM5	Citoplasma (Prob.=0.90)	0.245	0.6817 (Antígeno)	90.7	0.779286
M6TDT5	Desconhecida (Prob.=0.20)	0.449	0.4685 (Antígeno)	80.1	0.187299
A0A0F6IG44	Citoplasma (Prob.=1.00)	0.191	0.5042 (Antígeno)	98.0	0.327509
A0A0M5LEW4	Citoplasma (Prob.=1.00)	0.448	0.5339 (Antígeno)	95.1	0.740501
A0A0M4NCJ7	Citoplasma (Prob.=0.93)	0.671	0.5560 (Antígeno)	90.9	0.691463
A0A0E2B763	Citoplasma (Prob.=1.00)	0.327	0.5312 (Antígeno)	96.9	0.817982
M6G3A4	Citoplasma (Prob.=1.00)	0.294	0.6688 (Antígeno)	96.5	0.905830
M6DCM9	Citoplasma (Prob.=1.00)	0.250	0.6470 (Antígeno)	98.5	0.830586
M3EV56	Citoplasma (Prob.=1.00)	0.325	0.4506 (Antígeno)	90.9	0.509575
M3EVA0	Citoplasma (Prob.=1.00)	0.135	0.3475 (Não- antígeno)	95.3	0.369459
M6FJI6	Citoplasma (Prob.=1.00)	0.264	0.4441 (Antígeno)	90.9	0.469695
A0A0F6IFA5	Extracelular (Prob.=0.97)	0.408	0.0683 (Não- antígeno)	90.9	0.589154

Considerando todos os critérios avaliados que foram explicitados nas tabelas 6, 7, 8, 9, 10 e 11, foram selecionadas 17 proteínas (11 não caracterizadas e 6 relatadas em outras pesquisas como geradoras de resposta imunológica) que atenderam a no mínimo 2 critérios dentre os avaliados, apresentando assim, maior potencial para alvo vacinal. Estas proteínas estão discriminadas na tabela 12.

Tabela 12 – Proteínas com maior potencial para alvo vacinal selecionadas do proteoma de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20.

	chave de acesso
Proteínas não caracterizadas	M6USG6
	A0A0M4NJU9
	A0A2H1XA80
	M3ETH8
	A0A0E2D0X7
	M6AE33
	Q04RW5
	M3G459
	A0A2M9ZW65
	M3I8Y6
	A0A4R8MMT7
Proteínas relatadas em outras pesquisas como geradoras de resposta imunológica	A0A076V7V5 (LipL32 fragmento)
	A0A2M9XTF4 (LipL32)
	A0A0E2B0X3 (Flagelina)
	A0A3S9KKN1 (Flagelina)
	A0A0A7KLA8 (Loa22)
M6TDT5 (DNA polimerase)	

As 4 análises no servidor Immune Epitope Database (IEDB) e a análise no servidor IFN epitope das 17 proteínas selecionadas, juntamente com os resultados das avaliações dos

peptídeos/epítomos individuais (servidores PepCalc.com e ToxinPred) estão discriminadas nas tabelas 13, 14, 15, 16 e 17.

Tabela 13 - Predição de ligação de epítopos de células T a moléculas de MHC classe I, das 17 proteínas com maior potencial para alvo vacinal selecionadas do proteoma de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhaguen cepa M20 e caracterização destes epítopos.

Chave de acesso	Epítopo	Posição (início-fim)	Percentil rank	Aléio	Solubilidade	Toxicidade	Hidrofobicidade	Hidropaticidade	Amfipaticidade	Hidrofilicidade	Carga	pI	P.M. (Da)
M6US66	KAIQEQLW	65-74	0,987785	HLA-B*58:01	boa	Não toxina	-0,16	-0,69	0,87	0,14	-1	4,54	1215,52
	KAIQEQLW	65-74	0,987227	HLA-B*57:01	boa	Não toxina	-0,16	-0,69	0,87	0,14	-1	4,54	1215,52
	ASEDQMFY	254-262	0,987182	HLA-A*01:01	boa	Não toxina	-0,25	-1,11	0,69	0,32	-1	4,38	1118,34
	KNREAEQF	117-125	0,975999	HLA-B*15:01	boa	Não toxina	-0,33	-0,88	1,1	0,68	0	6,49	1151,47
	RYKKNVHL	263-271	0,971234	HLA-A*24:02	boa	Não toxina	-0,38	-0,94	1,25	0,14	3,5	10,3	1170,56
	KLDEKIFL	47-55	0,997942	HLA-A*02:01	boa	Não toxina	-0,2	-0,38	1,1	0,79	-1	4,68	1134,47
A0A0M4NJU9	KLDEKIFL	47-55	0,991031	HLA-A*02:06	boa	Não toxina	-0,2	-0,38	1,1	0,79	-1	4,68	1134,47
	KTHPRNSF	224-232	0,985581	HLA-B*57:01	boa	Não toxina	-0,34	-1,21	0,84	0,14	2,5	11,01	1099,38
	FYKHLDF	236-244	0,983234	HLA-A*24:02	baixa	Não toxina	-0,05	-0,17	0,71	-0,58	0,5	7,09	1210,53
	FQKDNYPE	193-201	0,970635	HLA-B*15:01	boa	Não toxina	-0,35	-2,14	0,69	0,26	-1	4,38	1203,39
	SELNQHQS	33-42	0,983052	HLA-B*44:03	baixa	Não toxina	-0,17	-0,77	0,52	-0,24	-0,5	5,25	1202,44
	SELNQHQS	33-42	0,974292	HLA-B*44:02	baixa	Não toxina	-0,17	-0,77	0,52	-0,24	-0,5	5,25	1202,44
A0A2HIXA80	IQKDKSTG	101-109	0,959598	HLA-B*15:01	boa	Não toxina	-0,28	-1,04	0,95	0,53	1	8,94	1023,28
	SELSEALKDY	91-100	0,953745	HLA-B*44:03	boa	Não toxina	-0,23	-0,79	0,62	0,62	-2	4,14	1154,37
	EAKSILPTK	20-28	0,920994	HLA-A*68:01	boa	Não toxina	-0,2	-0,48	0,96	0,53	1	8,94	986,3
	KFQGLFFTF	3-11	0,975872	HLA-A*23:01	baixa	Não toxina	0,13	0,72	0,55	-1	1	9,11	1134,47
	KFQGLFFTF	3-11	0,969757	HLA-A*24:02	baixa	Não toxina	0,13	0,72	0,55	-1	1	9,11	1134,47
	SAQINISTY	80-88	0,89551	HLA-B*35:01	baixa	Não toxina	-0,03	0,02	0,14	-0,64	0	5,88	996,21
A0A0E2D0X7	AQINISTYK	81-89	0,888226	HLA-A*11:01	baixa	Não toxina	-0,13	-0,32	0,55	-0,34	1	8,94	1037,31
	ASCPASNY	68-76	0,800169	HLA-A*30:02	baixa	Não toxina	-0,09	-0,29	0	-0,43	0	5,84	913,07
	RVNNEGMYK	22-30	0,92855	HLA-A*03:01	boa	Não toxina	-0,29	-0,8	0,82	0,26	1	8,93	1109,44
	KSCKAAPGF	30-38	0,864604	HLA-B*57:01	boa	Não toxina	-0,14	-0,19	0,82	0,2	2	9,36	908,19
	VTISLGQYY	66-74	0,816353	HLA-A*30:02	baixa	Não toxina	0,1	0,5	0,14	-1,07	0	5,87	1043,32
	KSCKAAPGF	30-38	0,77202	HLA-B*58:01	boa	Não toxina	-0,14	-0,19	0,82	0,2	2	9,36	908,19
M6AE33	VTISLGQYY	66-74	0,766566	HLA-A*01:01	baixa	Não toxina	0,1	0,5	0,14	-1,07	0	5,87	1043,32
	ITLKTYPGW	401-409	0,994222	HLA-B*57:01	baixa	Não toxina	0,03	-0,13	0,41	-0,79	1	8,94	1078,41
	LTFDGLSLR	183-191	0,982948	HLA-A*68:01	boa	Não toxina	-0,04	0,56	0,27	-0,22	0	6,19	1021,31
	ITLKTYPGW	401-409	0,977887	HLA-B*58:01	baixa	Não toxina	0,03	-0,13	0,41	-0,79	1	8,94	1078,41
	LADMASFTY	290-298	0,971218	HLA-A*01:01	baixa	Não toxina	0,08	0,64	0	-0,67	-1	3,8	1018,26
	QPDRKTSTL	236-244	0,971117	HLA-B*07:02	boa	Não toxina	-0,49	-1,71	0,82	0,77	1	9,1	1045,28
Q04RW5	RMVEGHQY	41-49	0,991259	HLA-B*15:01	baixa	Não toxina	-0,13	-0,4	0,55	-0,37	0	6,35	1172,5
	RMVEGHQY	41-49	0,985848	HLA-A*03:01	baixa	Não toxina	-0,13	-0,4	0,55	-0,37	0	6,35	1172,5
	RMVEGHQY	41-49	0,982054	HLA-A*32:01	baixa	Não toxina	-0,13	-0,4	0,55	-0,37	0	6,35	1172,5
	EEDGSLVSY	73-82	0,98081	HLA-B*44:03	boa	Não toxina	-0,06	-0,3	0,25	0,15	-3	3,58	1145,32
	RMVEGHQY	41-49	0,977437	HLA-A*30:02	baixa	Não toxina	-0,13	-0,4	0,55	-0,37	0	6,35	1172,5
	KADKKNQPYW	159-168	0,946111	HLA-B*57:01	boa	Não toxina	-0,39	-2,11	1,1	0,6	2	9,55	1206,5
M3G459	KADKKNQPYW	159-168	0,921507	HLA-B*58:01	boa	Não toxina	-0,39	-2,11	1,1	0,6	2	9,55	1206,5
	EVQILPNR	30-39	0,8925	HLA-A*68:01	boa	Não toxina	-0,13	-0,12	0,5	-0,05	0	6,36	1178,55
	REGSWKITLY	115-123	0,890991	HLA-B*44:03	boa	Não toxina	-0,32	-1,36	0,82	0,16	1	8,93	1139,4
	GVQTESITK	150-159	0,864119	HLA-A*11:01	boa	Não toxina	-0,16	-0,61	0,62	0,01	0	6,35	1125,39
	EIFFDFSR	87-95	0,983857	HLA-A*68:01	boa	Não toxina	-0,12	-0,2	0,41	-0,12	-1	4,38	1195,4

Tabela 13 - Continuação

Chave de acesso	Epitopo	Posição	Percentil rank	Alelo	Solubilidade	Toxicidade	Hidrofobicidade	Hidropaticidade	Amfipaticidade	Hidrofiliçidade	Carga	pI	P.M. (Da)	
M3I8Y6	NENMRITKLW	169-177	0,982799	HLA-B*44:02	boa	Não toxina	-0,42	-1,64	0,82	0,28	1	9,1	1191,5	
	NENMRITKLW	169-177	0,967091	HLA-B*44:03	boa	Não toxina	-0,42	-1,64	0,82	0,28	1	9,1	1191,5	
	KVVDISFKR	129-137	0,96543	HLA-A*31:01	boa	Não toxina	-0,3	-0,18	1,09	0,56	2	10,01	1091,44	
	SVIVELLSW	44-52	0,96244	HLA-B*57:01	baixa	Não toxina	0,23	1,61	0,14	0,14	-1	4	1045,38	
	GETPREFEL	88-96	0,977189	HLA-B*40:01	boa	Não toxina	-0,16	-0,42	0,55	0,28	-1	4,54	1061,33	
	RYLKIQETL	47-55	0,966968	HLA-A*24:02	boa	Não toxina	-0,28	-0,59	0,96	0,12	1	8,93	1163,52	
	RYLKIQETL	47-55	0,954231	HLA-A*23:01	boa	Não toxina	-0,28	-0,59	0,96	0,12	1	8,93	1163,52	
	FSSGLTSRY	40-48	0,943875	HLA-A*01:01	baixa	Não toxina	-0,16	-0,3	0,27	0,27	-0,34	1	9,1	1017,22
	QESLDKTEF	32-40	0,936927	HLA-B*44:03	boa	Não toxina	-0,34	-1,42	0,83	0,87	0,87	-2	4,14	1096,28
	LLNEGSHYL	142-150	0,984139	HLA-A*02:01	baixa	Não toxina	-0,02	-0,14	0,3	-0,52	-0,52	-0,5	5,25	1045,3
A0A04R8NMT7	LXLALFQLF	41-49	0,981413	HLA-A*23:01	baixa	Não toxina	0,32	1,98	0,14	-1,64	0	5,88	1127,53	
	APWDAPPLY	132-140	0,979785	HLA-B*35:01	baixa	Não toxina	0,12	0,26	0	-0,81	-1	3,8	1045,32	
	AYFDENLKF	193-201	0,977628	HLA-A*23:01	boa	Não toxina	-0,12	-0,5	0,55	-0,04	-1	4,38	1146,38	
	LXLALFQLF	41-49	0,977176	HLA-A*24:02	baixa	Não toxina	0,32	1,98	0,14	-1,64	0	5,88	1127,53	
	KSMPHWFDITW	19-28	0,996757	HLA-B*57:01	baixa	Não toxina	-0,11	-1,08	0,51	-0,52	0,5	7,09	1334,65	
	KSMPHWFDITW	19-28	0,987861	HLA-B*58:01	baixa	Não toxina	-0,11	-1,08	0,51	-0,52	0,5	7,09	1334,65	
	AIMPDIQIAK	36-44	0,959545	HLA-A*11:01	boa	Não toxina	-0,04	0,22	0,55	0,03	0	6,19	986,32	
	RIKIPNPK	77-85	0,954017	HLA-A*30:01	boa	Não toxina	-0,37	-1,29	1,09	0,62	3	11,17	1062,45	
	EKSMPHWF	17-25	0,942744	HLA-B*44:03	boa	Não toxina	-0,2	-1,41	0,85	0,18	-0,5	5,41	1190,46	
	KSMPSWFDITW	125-134	0,996206	HLA-B*57:01	baixa	Não toxina	-0,1	-0,84	0,37	-0,44	0	6,19	1284,58	
A0A2M9XTF4	LPYGTVIHY	51-59	0,995394	HLA-B*35:01	baixa	Não toxina	0,15	0,44	0,16	-1,18	0,5	7,09	1062,37	
	KSMPSWFDITW	125-134	0,991479	HLA-B*58:01	baixa	Não toxina	-0,1	-0,84	0,37	-0,44	0	6,19	1284,58	
	ETVKILLPY	45-53	0,973203	HLA-A*26:01	boa	Não toxina	-0,06	0,01	0,55	-0,24	0	6,35	1063,39	
	AIMPDIQIAK	142-150	0,959545	HLA-A*11:01	boa	Não toxina	-0,04	0,22	0,55	0,03	0	6,19	986,32	
	ETHEIVQRI	53-61	0,968954	HLA-A*68:02	boa	Não toxina	-0,25	-0,63	0,85	0,36	-0,5	5,41	1124,4	
	QQRADLGAY	179-187	0,963166	HLA-B*15:01	boa	Não toxina	-0,34	-1,08	0,82	0,46	1	8,93	1021,26	
	QQRADLGAY	179-188	0,959163	HLA-B*15:01	boa	Não toxina	-0,3	-1,1	0,74	0,18	1	8,83	1184,45	
	ETHEIVQRI	53-62	0,950775	HLA-A*68:01	boa	Não toxina	-0,4	-1,02	1,01	0,62	0,5	7,11	1280,6	
	RLNPTASMW	113-121	0,941511	HLA-B*58:01	baixa	Não toxina	-0,17	-0,5	0,27	-0,43	1	10,11	1075,37	
	AEFNKRFLE	128-136	0,982686	HLA-B*44:03	boa	Não toxina	-0,17	-0,16	0,82	-0,07	1	9,1	1171,48	
A0A0E2B0X3	GEANDVIGL	189-197	0,974493	HLA-B*40:01	boa	Não toxina	0,04	0,33	0,14	0,07	-2	3,67	887,09	
	AEFNKRFLE	128-136	0,973524	HLA-B*44:02	boa	Não toxina	-0,17	-0,16	0,82	-0,07	1	9,1	1171,48	
	RLFEGQFAR	134-142	0,959975	HLA-A*31:01	boa	Não toxina	-0,3	-0,58	0,82	0,21	1	9,95	1123,4	
	QQRADMGAY	207-215	0,955027	HLA-B*15:01	boa	Não toxina	-0,37	-1,29	0,82	0,51	1	8,93	1039,29	
	LITRPFYSK	57-65	0,92815	HLA-A*30:01	boa	Não toxina	-0,23	-0,73	0,68	-0,08	2	10,01	1068,36	
	AIADSLNEK	39-47	0,924683	HLA-A*11:01	boa	Não toxina	-0,18	-0,37	0,55	0,54	-1	4,38	960,17	
	EAIADSLNEK	38-47	0,917443	HLA-A*68:01	boa	Não toxina	-0,22	-0,68	0,62	0,79	-2	4,14	1089,3	
	GLTRPFYSK	56-65	0,884467	HLA-A*03:01	boa	Não toxina	-0,19	-0,7	0,61	-0,07	2	10,01	1125,43	
	VTPGDFSEW	69-77	0,85482	HLA-B*57:01	boa	Não toxina	-0,02	-0,49	0,14	-0,17	-2	3,67	1037,21	
	LPAKQLSSF	69-77	0,984408	HLA-B*35:01	baixa	Não toxina	-0,05	0,18	0,55	-0,31	1	9,11	990,29	
M6TDT5	LEISIKTSL	49-57	0,982458	HLA-B*40:01	boa	Não toxina	0,01	0,77	0,55	-0,11	0	6,35	1003,34	
	HAVEGVITTR	15-24	0,955804	HLA-A*68:01	boa	Não toxina	-0,09	0,17	0,52	-0,06	0,5	7,1	1082,37	
	FTSKQICR	81-89	0,952359	HLA-A*68:01	boa	Não toxina	-0,21	0,1	0,82	-0,11	2	9,55	1095,45	
	KVNTSEFLK	4-12	0,918008	HLA-A*11:01	boa	Não toxina	-0,25	-0,61	0,96	0,37	1	8,94	1063,36	

Tabela 14 - Predição de ligação de epítopos de células T a moléculas de MHC classe II, das 17 proteínas com maior potencial para alvo vacinal selecionadas do proteoma de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20 e caracterização destes epítopos.

Chave de acesso	Epítopo	Posição (início-fim)	Percentil rank	Aléio	Solubilidade	Toxicidade	Hidrofobicidade	Hidropaticidade	Amfipaticidade	Hidrofilicidade	Carga	pI	P.M. (Da)
M6USG6	AFANNKRLALSNYQ	95-109	0,08	HLA-DRB1*09:01	baixa	Não toxina	-0,18	-0,39	0,49	-0,35	2	10,01	1757,19
	ANNKRLALSNYQSG	97-111	0,08	HLA-DRB1*04:05	baixa	Não toxina	-0,24	-0,78	0,49	-0,13	2	10,01	1683,07
	FANNKRLALSNYQS	96-110	0,08	HLA-DRB1*04:05	baixa	Não toxina	-0,21	-0,57	0,49	-0,3	2	10,01	1773,19
	NKFLALSNYQSGVN	99-113	0,08	HLA-DRB1*04:05	baixa	Não toxina	-0,22	-0,62	0,49	-0,2	2	10,01	1711,13
	NNKFLALSNYQSGV	98-112	0,08	HLA-DRB1*04:05	baixa	Não toxina	-0,22	-0,62	0,49	-0,2	2	10,01	1711,13
A0A0M4NUJ9	MKMKRVLPFRVLF	66-80	0,24	HLA-DPAI*02:01/DPB1*14:01	baixa	Não toxina	-0,1	0,7	0,82	-0,27	4	12,02	1865,64
	KMKRVLPFRVLFK	67-81	0,31	HLA-DPAI*02:01/DPB1*14:01	boa	Não toxina	-0,19	0,31	1,06	0,01	5	12,03	1862,62
	LMKMKRVLPFRVLF	65-79	0,34	HLA-DPAI*02:01/DPB1*14:01	boa	Não toxina	-0,11	0,77	0,82	-0,23	4	12,02	1831,63
	VLMKMKRVLPFRIV	64-78	0,65	HLA-DPAI*02:01/DPB1*14:01	boa	Não toxina	-0,11	0,79	0,82	-0,21	4	12,02	1817,6
	KMKRVLPFRVLFK	67-81	0,92	HLA-DPAI*01:03/DPB1*04:01	boa	Não toxina	-0,19	0,31	1,06	0,01	5	12,03	1862,62
A0A2HXIA80	KQKIIFVYFGVIV	2-16	0,2	HLA-DPAI*01:03/DPB1*02:01	baixa	Não toxina	0,23	1,66	0,57	-1,04	2	9,72	1828,56
	QKIIFVYFGVIVG	3-17	0,22	HLA-DPAI*01:03/DPB1*02:01	baixa	Não toxina	0,31	1,89	0,33	-1,24	1	8,94	1757,44
	IIFVYFGVIVGLS	5-19	0,23	HLA-DPAI*01:03/DPB1*02:01	baixa	Não toxina	0,45	2,59	0	-1,55	0	5,88	1701,37
	KIIFVYFGVIVLGL	4-18	0,23	HLA-DPAI*01:03/DPB1*02:01	baixa	Não toxina	0,4	2,38	0,24	-1,37	1	8,94	1742,47
	IIFVYFGVIVGLS	5-19	0,24	HLA-DPAI*03:01/DPB1*04:02	baixa	Não toxina	0,45	2,59	0	-1,55	0	5,88	1701,37
M3ETH8	QGLFFFTILISFL	5-19	0,09	HLA-DPAI*03:01/DPB1*04:02	baixa	Não toxina	0,32	1,95	0,08	-1,41	0	5,88	1760,39
	MKKFQGLFFFTILL	1-15	0,11	HLA-DPAI*01:03/DPB1*04:01	baixa	Não toxina	0,14	1,11	0,57	-0,87	2	10,02	1834,53
	FQGLFFFTILISLF	4-18	0,13	HLA-DPAI*03:01/DPB1*04:02	baixa	Não toxina	0,33	1,89	0,08	-1,45	0	5,88	1794,4
	KFQGLFFFTILISL	3-17	0,13	HLA-DPAI*03:01/DPB1*04:02	baixa	Não toxina	0,22	1,44	0,33	-1,09	1	9,11	1775,4
	GLFFFTILISLFI	6-20	0,16	HLA-DPAI*03:01/DPB1*04:02	baixa	Não toxina	0,42	2,49	0	-1,54	0	5,88	1745,42
A0A0E2D0X7	FSQASDAAAIAIQEAC	6-20	0,04	HLA-DQAI*04:01/DQB1*04:02	baixa	Não toxina	-0,02	0,33	0,25	-0,09	-2	3,67	1482,77
	QASDAAAIAIQEACNR	8-22	0,04	HLA-DQAI*04:01/DQB1*04:02	boa	Não toxina	-0,21	-0,33	0,41	0,27	-1	4,38	1518,81
	SQASDAAAIAIQEACN	7-21	0,04	HLA-DQAI*04:01/DQB1*04:02	boa	Não toxina	-0,11	-0,09	0,25	0,09	-2	3,67	1449,7
	VFSQASDAAAIAIQEA	5-19	0,04	HLA-DQAI*04:01/DQB1*04:02	baixa	Não toxina	0,01	0,45	0,25	-0,12	-2	3,67	1478,77
	FSQASDAAAIAIQEAC	6-20	0,08	HLA-DQAI*03:01/DQB1*05:02	baixa	Não toxina	-0,02	0,33	0,25	-0,09	-2	3,67	1482,77
M6AE33	AQNLIKNAQSTVCTA	478-492	0,07	HLA-DRB1*13:02	baixa	Não toxina	-0,12	0,02	0,41	-0,29	1	8,57	1561,99
	QAQNLIKNAQSTVCT	477-491	0,07	HLA-DRB1*13:02	baixa	Não toxina	-0,18	-0,33	0,49	-0,24	1	8,57	1619,05
	YQAQNLIKNAQSTVTC	476-490	0,08	HLA-DRB1*13:02	baixa	Não toxina	-0,17	-0,37	0,49	-0,37	1	8,54	1681,12
	QNLIKNAQSTVCTAL	479-493	0,1	HLA-DRB1*13:02	baixa	Não toxina	-0,1	0,15	0,41	-0,37	1	8,57	1604,08
	SYQAQNLIKNAQSTV	475-489	0,1	HLA-DRB1*13:02	baixa	Não toxina	-0,19	-0,59	0,49	-0,28	1	8,94	1665,06
Q04RW5	ADEIRMYEGHQYS	36-50	0,4	HLA-DRB1*15:01	boa	Não toxina	-0,07	-0,04	0,42	-0,07	-2	4,14	1801,27
	DEIRMYEGHQYSG	37-51	0,55	HLA-DRB1*15:01	boa	Não toxina	-0,08	-0,19	0,42	-0,04	-2	4,14	1787,25
	NADIRMYEGHQY	35-49	0,55	HLA-DRB1*15:01	boa	Não toxina	-0,09	-0,22	0,42	-0,08	-2	4,14	1828,3
	EIRMYEGHQYSGK	38-52	0,67	HLA-DRB1*15:01	boa	Não toxina	-0,1	-0,21	0,66	-0,04	0	6,49	1800,34
	IRMYEGHQYSGKE	39-53	1,4	HLA-DRB1*15:01	boa	Não toxina	-0,1	-0,21	0,66	-0,04	0	6,49	1800,34
M5G459	MKRFCLAVTVAISY	1-15	1,8	HLA-DQAI*01:02/DQB1*06:02	baixa	Não toxina	0,08	1,39	0,41	-0,71	2	9,36	1715,36
	KRFCLAVTVAISYVC	2-16	1,9	HLA-DQAI*01:02/DQB1*06:02	baixa	Não toxina	0,07	1,45	0,41	-0,69	2	8,98	1687,3
	RFCLAVTVAISYCN	3-17	1,9	HLA-DQAI*01:02/DQB1*06:02	baixa	Não toxina	0,1	1,45	0,16	-0,87	1	8,38	1673,23
	QKFKFKNGAWKEYQ	76-90	2	HLA-DRB3*02:02	boa	Não toxina	-0,4	-1,8	1,47	0,54	4	10,01	1896,45
	IKKFKFKNGAWKEYQE	77-91	2,1	HLA-DRB3*02:02	boa	Não toxina	-0,4	-1,8	1,48	0,73	3	9,71	1897,43
A0A2M9ZVW65	IGFAVLMFLSIIVT	139-153	0,02	HLA-DPAI*03:01/DPB1*04:02	baixa	Não toxina	0,4	2,39	0	-1,43	0	5,88	1701,38

Tabela 14 - Continuação

Chave de acesso	Epítopo	Posição	Percentil rank	Aléio	Solubilidade	Toxicidade	Hidrofobicidade	Hidropaticidade	Amfipaticidade	Hidrofiliidade	Carga	pI	P.M. (Da)
M318Y6	EQEVEIFFDFSRLLI	83-97	0,03	HLA-DPAI*01:02:DPB1*02:01	boa	Não toxina	-0,08	0,01	0,5	0	-3	4,01	1907,32
	EVEIFFDFSRLLGF	85-99	0,04	HLA-DPAI*01:03:DPB1*02:01	baixa	Não toxina	0,06	0,64	0,33	-0,38	-2	4,14	1854,3
	QEVEIFFDFSRLLIG	84-98	0,04	HLA-DPAI*01:03:DPB1*02:01	boa	Não toxina	-0,03	0,22	0,42	-0,2	-2	4,14	1835,26
	VEIFFDFSRLLIGFS	86-100	0,05	HLA-DPAI*01:03:DPB1*02:01	baixa	Não toxina	0,08	0,82	0,25	-0,56	-1	4,38	1812,26
	LTDTRNLEVESENI	118-132	0,5	HLA-DQAI*03:01:DOB1*03:02	boa	Não toxina	-0,21	-0,46	0,42	0,41	-3	4,01	1746,13
	NKLDTRNLEVESE	116-130	0,5	HLA-DQAI*03:01:DOB1*03:02	boa	Não toxina	-0,33	-1,02	0,66	0,73	-2	4,41	1761,14
	KLIDTRNLEVESEN	117-131	0,52	HLA-DQAI*03:01:DOB1*03:02	boa	Não toxina	-0,33	-1,02	0,66	0,73	-2	4,41	1761,14
	SRYLKIQETLSSLOG	46-60	0,55	HLA-DRB1*04:01	boa	Não toxina	-0,22	-0,52	0,66	0,03	1	8,93	1723,19
	TSRYLKIQETLSSLO	45-59	0,55	HLA-DRB1*04:01	boa	Não toxina	-0,24	-0,54	0,66	0	1	8,93	1767,24
	DSTKIPFNPKSVL	401-415	0,01	HLA-DRB3*02:02	boa	Não toxina	-0,13	-0,38	0,49	-0,03	1	8,94	1707,17
A0A076V7V5	KFIPFNPKSVLKAV	404-418	0,01	HLA-DRB3*02:02	baixa	Não toxina	-0,08	0,09	0,73	-0,16	3	10,31	1702,29
	STKIPFNPKSVLK	402-416	0,01	HLA-DRB3*02:02	boa	Não toxina	-0,16	-0,41	0,73	-0,03	3	10,31	1720,26
	TKFIPFNPKSVLKA	403-417	0,01	HLA-DRB3*02:02	boa	Não toxina	-0,13	-0,23	0,73	-0,09	3	10,31	1704,26
	IDSTKIPFNPKSV	400-414	0,02	HLA-DRB3*02:02	boa	Não toxina	-0,12	-0,33	0,49	-0,03	1	8,94	1707,17
	RHNKNSLIRIKIPN	68-82	0,95	HLA-DRB1*11:01	boa	Não toxina	-0,44	-1,47	0,91	0,47	3,5	11,1	1854,37
	HNKNSLIRIKIPN	69-83	1,1	HLA-DRB1*11:01	boa	Não toxina	-0,43	-1,47	0,75	0,29	3,5	10,29	1869,38
	NKNSLIRIKIPNPP	70-84	1,1	HLA-DRB1*11:01	boa	Não toxina	-0,32	-1,28	0,75	0,09	3,5	10,3	1795,3
	EKSMPHWFDWIRVE	18-32	1,2	HLA-DQAI*01:01:DOB1*05:01	boa	Não toxina	-0,3	-1,17	0,65	0,12	3	10,3	1755,27
	GLYRIAFITYKPEV	208-222	0,22	HLA-DRB3*01:01	baixa	Não toxina	-0,06	-0,08	0,49	-0,3	1	8,83	1715,2
	LVRLYRIAFITYKPE	205-219	0,22	HLA-DRB3*01:01	baixa	Não toxina	-0,11	0,13	0,57	-0,42	3	10,29	1798,58
A0A0E2B0X3	RGLYRIAFITYKPEG	207-221	0,22	HLA-DRB3*01:01	boa	Não toxina	-0,21	-0,66	0,66	0	2	9,72	1772,25
	VRGLYRIAFITYKPG	206-220	0,22	HLA-DRB3*01:01	baixa	Não toxina	-0,14	-0,15	0,57	-0,3	3	10,29	1742,27
	LLVRGLYRIAFITYK	204-218	0,26	HLA-DRB3*01:01	baixa	Não toxina	-0,07	0,49	0,57	-0,54	3	10,29	1814,43
	QILTQAAATAMLAQAN	228-242	0,08	HLA-DQAI*01:02:DOB1*06:02	baixa	Não toxina	0,02	0,51	0,25	-0,61	0	5,88	1545,01
	VQRIRVLAVQAANGI	58-72	0,08	HLA-DRB4*01:01	baixa	Não toxina	-0,07	0,73	0,49	-0,32	2	12,01	1608,15
	YQLTQAAATAMLAQA	227-241	0,08	HLA-DQAI*01:02:DOB1*06:02	baixa	Não toxina	0,06	0,65	0,25	-0,78	0	5,88	1594,08
	QRIRVLAVQAANGY	59-73	0,09	HLA-DRB4*01:01	baixa	Não toxina	-0,1	0,36	0,49	-0,37	2	10,84	1672,19
	ILTQAAATAMLAQANM	229-243	0,1	HLA-DQAI*01:02:DOB1*06:02	baixa	Não toxina	0,08	0,87	0,17	-0,71	0	5,88	1548,07
	IQIRVLAIQTSNG	86-100	0,01	HLA-DRB4*01:01	baixa	Não toxina	-0,11	0,43	0,49	-0,3	2	12,01	1682,24
	IQIRVLAIQTSNGI	87-101	0,01	HLA-DRB4*01:01	baixa	Não toxina	-0,11	0,43	0,49	-0,3	2	12,01	1682,24
A0A0A0VKLAS	NIQIRVLAIQTSN	85-99	0,01	HLA-DRB4*01:01	baixa	Não toxina	-0,16	0,22	0,49	-0,29	2	12,01	1739,29
	QRIRVLAIQTSNGY	88-102	0,01	HLA-DRB4*01:01	baixa	Não toxina	-0,15	0,04	0,49	-0,33	2	10,84	1732,25
	RIRVLAIQTSNGHS	89-103	0,01	HLA-DRB4*01:01	baixa	Não toxina	-0,12	0,22	0,41	-0,33	2	10,84	1691,19
	NIFYSELRANAVKQA	119-133	0,44	HLA-DRB1*01:01	boa	Não toxina	-0,17	-0,25	0,58	-0,1	1	8,93	1724,16
	GNIFYSELRANAVKQ	118-132	0,58	HLA-DRB1*01:01	boa	Não toxina	-0,17	-0,4	0,58	-0,07	1	8,93	1710,14
	FYSELRANAVKQALI	121-135	0,71	HLA-DRB3*02:02	baixa	Não toxina	-0,09	0,23	0,58	-0,23	1	8,93	1723,22
	IFYSELRANAVKQAL	120-134	0,71	HLA-DRB1*01:01	baixa	Não toxina	-0,09	0,23	0,58	-0,23	1	8,93	1723,22
	YSELRANAVKQALIK	122-136	0,72	HLA-DRB3*02:02	boa	Não toxina	-0,2	-0,21	0,82	0,13	2	9,72	1704,22
	TREIKSILSNKIEA	23-37	0,32	HLA-DRB1*04:01	boa	Não toxina	-0,2	-0,15	0,82	0,39	1	8,93	1715,25
	REIKSILSNKIEA	24-38	0,33	HLA-DRB1*04:01	boa	Não toxina	-0,23	-0,33	0,91	0,62	0	6,57	1743,26
M6TD15	ITTREIKSILSNKI	21-35	0,34	HLA-DRB1*04:01	boa	Não toxina	-0,14	0,22	0,74	0,08	2	10,01	1729,33
	TTREIKSILSNKIE	22-36	0,34	HLA-DRB1*04:01	boa	Não toxina	-0,23	-0,31	0,82	0,4	1	8,93	1745,28
	VITREIKSILSNLK	20-34	0,58	HLA-DRB1*04:01	boa	Não toxina	-0,15	0,2	0,74	0,1	2	10,01	1715,3

Tabela 15 - Predição de imunogenicidade de células TCD₄, das 17 proteínas com maior potencial para alvo vacinal selecionadas do proteoma de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20 e caracterização dos peptídeos mais imunogênicos.

Chave de acesso	Peptídeo	Posição (início-fim)	Score de imunogenicidade	Alélos*	Solubilidade	Toxicidade	Hidrofobicidade	Hidropaticidade	Amfipaticidade	Hidroflicidade	Carga	pI	P.M. (Da)
M6US66	FRLLSNVQGVNTI	101-115	906,975	HLA-DRB1:03:01 (54,0)	boa	Não toxina	-0,07	0,13	0,25	-0,56	1	9,1	1683,12
	KNVHLRLATLKYGK	266-280	899,207	HLA-DRB3:01:01 (53,0)	boa	Não toxina	-0,29	-0,76	1,08	0,31	3,5	10,01	1770,34
	MKVMKSFIFLAVLG	1-15	873,395	HLA-DRB3:01:01 (51,0)	baixa	Não toxina	0,21	1,88	0,49	-0,75	2	10,02	1663,44
	QLSKAFANNKFRLLAL	91-105	865,919	HLA-DRB1:03:01 (53,0)	boa	Não toxina	-0,18	-0,08	0,74	-0,13	3	11,17	1721,25
	ERPEFKRLISDTYRS	186-200	860,571	HLA-DRB4:01:01 (63,0)	boa	Não toxina	-0,49	-1,51	0,9	0,85	1	8,93	1897,32
A0A0M4NLU9	LFLAVLIAISTAVFS	6-20	930,646	---	baixa	Não toxina	0,36	2,5	0	-1,22	0	5,88	1565,15
	FYIKLDQDFRLFTK	236-250	925,537	HLA-DRB1:07:01 (61,0)	boa	Não toxina	-0,2	-0,5	0,83	-0,06	1,5	8,84	1971,51
	MKLOKLFLLAVLAIS	1-15	895,558	---	baixa	Não toxina	0,16	1,64	0,57	-0,71	2	10,02	1688,43
	MKMKVRLVPRVTLF	66-80	883,145	---	baixa	Não toxina	-0,1	0,7	0,82	-0,27	4	12,02	1865,64
	RHTVLMKMKVRLVLPF	61-75	881,845	---	boa	Não toxina	-0,17	0,3	0,91	-0,14	4,5	12,02	1855,61
A0A2HIXA80	AKSILPKPAISEL	21-35	968,276	HLA-DRB1:03:01 (53,0)	boa	Não toxina	-0,01	0,48	0,57	-0,05	1	8,94	1581,15
M3ETHS	SAQINISTYKLFASN	80-94	833,817	---	baixa	Não toxina	-0,06	0,03	0,33	-0,47	1	8,94	1657,07
A0A0E2DOX7	Nenhum peptídeo foi previsto												
M6AE33	NINPNAYASAPVVISI	106-120	982,984	HLA-DRB1:03:01 (67,0)	baixa	Não toxina	0,05	0,41	0	-0,61	0	5,88	1529,92
	DIRTAVTQRRNVYI	526-540	982,279	HLA-DRB4:01:01 (83,0)	boa	Não toxina	-0,28	-0,31	0,57	-0,02	2	10,75	1852,34
	DGKIVSPINVMFFLV	576-590	955,978	---	baixa	Não toxina	0,13	0,91	0,24	-0,7	0	6,18	1743,32
	LGELVGYSSRVGYQ	216-230	952,246	---	baixa	Não toxina	-0,03	0,22	0,33	-0,39	0	6,35	1627,06
	AHITFDGISLRLTILS	181-195	939,668	---	baixa	Não toxina	0,08	1,19	0,16	-0,51	0	6,19	1606,12
Q04RW5	FDGSLVSYQRVKRE	75-89	771,005	HLA-DRB1:07:01 (61,0)	boa	Não toxina	-0,44	-1,08	0,9	0,61	2	9,99	1840,28
	GLKSDQIKKFKKNGA	71-85	639,624	HLA-DRB3:01:01 (80,0)	boa	Não toxina	-0,36	-1,25	1,31	0,81	4	10,18	1662,19
A0A2M9ZW65	QKKFKKNGAWKEYQ	76-90	493,029	HLA-DRB3:02:02 (62,0)	boa	Não toxina	-0,4	-1,8	1,47	0,54	4	10,01	1896,45
	SWRIAITLSTILFVI	51-65	972,429	HLA-DRB1:03:01 (51,0)	baixa	Não toxina	0,19	1,69	0,16	-1,06	1	10,11	1733,36
	SLDLFAFVIEYSPVI	181-195	962,155	---	baixa	Não toxina	0,21	1,39	0,08	-0,76	-2	3,67	1713,22
	HSLINFLSNDPGAF	26-40	937,844	---	baixa	Não toxina	0,08	0,45	0,1	-0,61	-0,5	5,09	1645,07
	MKLLVAVYLHSLIN	16-30	92,774	HLA-DRB3:02:02 (53,0)	baixa	Não toxina	0,19	1,55	0,34	-1,01	1,5	8,94	1741,46
	IVELLSWRILAITLS	46-60	915,423	---	baixa	Não toxina	0,11	1,27	0,25	-0,69	0	6,36	1715,3
M318Y6	INLHSAEKLIRDKR	6-20	839,834	---	boa	Não toxina	-0,38	-0,91	1	0,66	2,5	10	1794,31
A0A4R8NM17	AYGVVTLASLFPILS	241-255	98,453	---	baixa	Não toxina	0,26	1,67	0	-1,05	0	5,88	1551,08
	IPLVIVVIVPTIILL	536-550	984,186	---	baixa	Não toxina	0,45	2,65	0	-1,64	0	5,88	1764,57

Tabela 15 - Continuação

Chave de acesso	Peptídeo	Posição (início-fim)	Score de imunogenicidade	Alélos*	Solubilidade	Toxicidade	Hidrofobicidade	Hidropaticidade	Amfipaticidade	Hidrofilicidade	Carga	pI	P.M. (Da)
A0A076VV5	AKLLIGDSTYKPSKK	286-300	983.121	HLA-DRB3:02:02 (60,0)	boa	Não toxina	-0,2	-0,42	0,98	0,37	3	9,84	1661,24
	HGFRESITLLPYF	11-15	98.073	---	baixa	Não toxina	0,09	0,71	0,34	-0,73	0,5	7,1	1806,37
	MPEELFFNQKLEE	271-285	972.828	---	boa	Não toxina	-0,1	-0,49	0,67	0,25	-3	4,1	1824,31
	VERMSAIMPQIAKA	31-45	893.544	HLA-DRB1:15:01 (50,0) HLA-DRB5:01:01 (55,0)	boa	Não toxina	-0,13	0,07	0,58	0,22	0	6,42	1660,19
	AMPDQIAKAAKAKP	36-50	88.094	HLA-DRB1:07:01 (67,0) HLA-DRB1:15:01 (57,0)	boa	Não toxina	-0,13	-0,13	0,82	0,32	2	9,72	1553,1
A0A2M9XT4	KYNSLIRIKIPPPK	71-85	723.039	HLA-DRB1:03:01 (85,0) HLA-DRB3:01:01 (85,0)	boa	Não toxina	-0,33	-1,2	0,9	0,31	4	10,47	1769,34
	EERHNKYNLSIRIKI	66-80	598.963	HLA-DRB1:03:01 (60,0) HLA-DRB4:01:01 (66,0)	boa	Não toxina	-0,47	-1,6	1,08	0,67	2,5	9,72	1901,38
	VPAVIAEMGVRMISP	86-100	963.402	---	baixa	Não toxina	0,1	1,11	0,25	-0,36	0	6,36	1570,16
A0A3S9KKV1	VRGLYRIAFITYPFG	206-220	935.669	HLA-DRB1:03:01 (56,0)	baixa	Não toxina	-0,14	-0,15	0,57	-0,3	3	10,29	1742,37
	EYKGSFVASVGLFPF	221-235	894.502	HLA-DRB4:01:01 (51,0)	baixa	Não toxina	0,14	1,08	0,33	-0,47	0	6,35	1550,05
	YLYVWPVAVIEMGV	81-95	894.489	HLA-DRB1:03:01 (60,0)	baixa	Não toxina	0,27	1,44	0,08	-1,13	-1	4	1710,29
	SAINPDQIAKAAKGGK	141-155	864.658	HLA-DRB1:15:01 (59,0)	boa	Não toxina	-0,14	-0,23	0,82	0,37	2	9,72	1529,04
	EDRQIQIVEVSQLVD	76-90	964.207	HLA-DRB5:01:01 (66,0)	boa	Não toxina	-0,31	-0,83	0,67	0,53	-3	3,92	1786,16
	IRVLAQAAANGHYTE	61-75	90.141	---	baixa	Não toxina	0,01	0,61	0,33	-0,41	0	6,35	1618,09
	VLTFISLSTAGKANS	151-165	904.079	HLA-DRB3:01:01 (63,0)	baixa	Não toxina	0,05	0,74	0,24	-0,47	1	9,11	1508,95
	EIVQRIRVLAVQAAN	56-70	884.697	HLA-DRB3:01:01 (50,0)	boa	Não toxina	-0,12	0,52	0,58	-0,12	1	9,95	1680,21
	RYQLTQAATAMLAQ	226-240	872.881	---	baixa	Não toxina	-0,07	0,23	0,41	-0,55	1	9,1	1679,19
	AEGFLEQTSNIQRI	76-90	946.761	HLA-DRB1:03:01 (60,0)	boa	Não toxina	-0,11	-0,13	0,5	-0,05	-1	4,54	1719,16
A0A0A7KLA8	AEVWSLITKQLVQ	246-260	944.604	HLA-DRB3:01:01 (54,0)	boa	Não toxina	-0,05	0,43	0,58	-0,1	-1	4,54	1658,16
	EQTNSIQIRVLAI	81-95	919.531	---	boa	Não toxina	-0,16	0,22	0,58	-0,1	1	9,95	1754,3
	RVLAIQTSNGYVNE	91-105	903.032	---	baixa	Não toxina	-0,14	-0,25	0,33	-0,19	0	6,35	1665,06
	QILVQSGTAMLAQAN	256-270	893.055	---	baixa	Não toxina	0,02	0,51	0,25	-0,6	0	5,88	1545,02
	KKGNIFYSELRAVAV	116-130	914.106	---	baixa	Não toxina	-0,2	-0,43	0,74	0,12	2	9,72	1710,18
	KQALIKQGPANRIV	131-145	85.292	HLA-DRB3:01:01 (58,0)	boa	Não toxina	-0,2	0,02	0,82	-0,01	3	11,17	1649,25
	ATDLEISIKTSLPAD	46-60	937.631	HLA-DRB3:01:01 (64,0) HLA-DRB5:01:01 (53,0)	boa	Não toxina	-0,07	0,08	0,33	0,24	-2	4,03	1573,97
	ITREKISILNLKI	21-35	932.731	HLA-DRB3:01:01 (74,0)	boa	Não toxina	-0,14	0,22	0,74	0,08	2	10,01	1729,33
	AKQLSSFLKQFTSKI	71-85	907.322	---	boa	Não toxina	-0,16	-0,15	0,9	-0,07	3	10,31	1726,27
	ISIKTSLPADVTQEG	51-65	904.548	HLA-DRB5:01:01 (63,0)	boa	Não toxina	-0,08	-0,04	0,41	0,11	-1	4,38	1558,97
SSEFKQFTSKIQICR	75-89	892.413	---	boa	Não toxina	-0,2	-0,1	0,82	-0,1	3	10,07	1786,34	

*Para a seleção dos alélos foi aplicado o cut off de 50,0 indicado pelo próprio servidor.

Tabela 16 - Continuação

Chave de acesso	Épitopo**	Posição (início-fim)	Score médio	Solubilidade	Toxicidade	Hidrofobicidade	Hidropaticidade	Amfipaticidade	Hidroflicidade	Carga	pI	P.M. (Da)
A0A2M9XTE4	LPSIKSSFVLESTIPGNET	26-46	0,5906	baixa	Não toxina	-0,06	-0,06	0,3	-0,08	-1	4,54	2207,77
	PTGEIGEPGDGL	100-112	0,5736	boa	Não toxina	-0,08	-0,86	0,2	0,62	-4	3,44	1256,48
	ATPEKSMPSW	120-130	0,5411	boa	Não toxina	-0,21	-1,24	0,56	0,36	-1	4,54	1262,54
	ITIPNPPKSFDELKSIDIK	184-202	0,5838	boa	Não toxina	-0,2	-0,71	0,65	0,44	0	6,46	2143,74
	LIFFPQIPGVSPLIHS	232-247	0,5307	baixa	Não toxina	0,21	0,96	0,09	-0,81	0,5	7,1	1644,24
A0A0EZBOX3	RTQILGLRAEM	24-35	0,5534	boa	Não toxina	-0,36	-0,48	0,82	0,38	2	11,7	1443,91
	GYLQETHEI	49-57	0,5255	boa	Não toxina	-0,12	-0,87	0,58	-0,07	-1,5	4,51	1089,31
A0A3S9KKN1	RTQVNGLRQAERNTE	53-68	0,5434	boa	Não toxina	-0,55	-1,87	0,77	0,89	0	6,53	1887,23
	QTSNGVSNEDRQLVQV	96-112	0,5645	boa	Não toxina	-0,27	-0,96	0,44	0,08	-1	4,38	1951,34
	YENMQASESRIRDADM	230-245	0,5388	boa	Não toxina	-0,39	-1,31	0,54	0,71	-2	4,32	1916,28
A0A0A7KLA8	AIGPEQAEQAKKGNV	106-120	0,5807	boa	Não toxina	-0,14	-0,68	0,74	0,49	0	6,49	1482,88
	GSSEPVSGLDAKDA	150-163	0,5592	boa	Não toxina	-0,15	-0,54	0,55	0,61	-2	4,03	1332,57
M6TDT5	Nenhum peptídeo foi previsto											

** Foram selecionados epítopos contendo de 9 a 24 resíduos de aminoácidos.

Tabela 17 - Predição de epítopos indutores de interferon-gama, das 17 proteínas com maior potencial para alvo vacinal selecionadas do proteoma de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20 e caracterização dos epítopos.

Chave de acesso	Epítipo	Score	Solubilidade	Toxicidade	Hidrofobicidade	Hidropaticidade	Amfipaticidade	Hidrofilicidade	Carga	pI	P.M. (Da)
M6USG6	NEAVEKIDELLKGGEL	0,7424106	boa	Não toxina	-0,18	-0,49	0,83	0,8	-3	4,26	1700,15
	EAVEKIDELLKGGELV	0,56903486	boa	Não toxina	-0,11	0,03	0,83	0,69	-3	4,26	1685,18
	AVEKIDELLKGGELVP	0,45921831	boa	Não toxina	-0,07	0,15	0,74	0,49	-2	4,41	1653,18
A0A0M4NJU9	EAEQFRKEEAEEKR	0,45321048	boa	Não toxina	-0,58	-2,05	1,57	1,66	0	6,68	1891,32
	REAEQFRKEEAEEKK	0,42564578	boa	Não toxina	-0,58	-2,05	1,57	1,66	0	6,68	1891,32
	FLAVLAIATAVFSQ	0,91248652	baixa	Não toxina	0,28	2,01	0,08	-1,09	0	5,88	1580,12
	AVLIAISTAVFSQON	0,86162988	baixa	Não toxina	0,11	1,11	0,17	-0,77	0	5,88	1562,02
	LAVLIAISTAVFSQQ	0,80543188	baixa	Não toxina	0,19	1,59	0,17	-0,91	0	5,88	1561,08
A0A2H1XA80	KLFLAVLIAISTAVF	0,79483616	baixa	Não toxina	0,3	2,29	0,24	-1,04	1	9,11	1606,25
	LFLAVLIAISTAVFS	0,76933718	baixa	Não toxina	0,36	2,5	0	-1,22	0	5,88	1565,15
	LEAYSELSEALKDYI	0,166579	boa	Não toxina	-0,09	-0,17	0,5	0,19	-3	4,01	1744,14
	LGFLVGLSEAKSIL	0,157977	baixa	Não toxina	0,19	1,53	0,33	-0,56	0	6,35	1546,12
	KHIFVFLGFLVGL	0,143056	baixa	Não toxina	0,4	2,38	0,24	-1,37	1	8,94	1742,47
MBETH8	TMKSCGKKI	0,093893	boa	Não toxina	-0,28	-0,52	1,22	0,53	3	9,81	995,39
	PTMKSCGKKI	0,051795	boa	Não toxina	-0,26	-0,63	1,1	0,48	3	9,81	1092,52
	GLFTFTILISLFI	0,452164	baixa	Não toxina	0,42	2,49	0	-1,54	0	5,88	1745,42
	FQGLFFFTILISLF	0,393824	baixa	Não toxina	0,33	1,89	0,08	-1,45	0	5,88	1794,4
	KKFQGLFFFTILIS	0,31702	baixa	Não toxina	0,11	0,93	0,57	-0,77	2	10,02	1790,41
	SAQINISTYKLFASN	0,279493	baixa	Não toxina	-0,06	0,03	0,33	-0,47	1	8,94	1657,07
	KFQGLFFFTILISL	0,25775	baixa	Não toxina	0,22	1,44	0,33	-1,09	1	9,11	1775,4
	SAQQGYYSQSAQVKC	10490713	baixa	Não toxina	-0,22	-0,87	0,58	-0,23	1	8,51	1647,99
	FSAQQGYYSQSAQVK	10463432	baixa	Não toxina	-0,19	-0,85	0,58	-0,33	1	8,83	1692,03
	GFSAQGGYYSQSAQV	10085758	baixa	Não toxina	-0,1	-0,61	0,33	-0,53	0	5,87	1620,91
M6AE33	PGFSAQQGYYSQSAQ	0,949147	baixa	Não toxina	-0,14	-1	0,33	-0,43	0	5,87	1618,89
	APGFSAQGGYYSQSA	0,473695	baixa	Não toxina	-0,08	-0,65	0,25	-0,47	0	5,87	1561,83
	Nenhum peptídeo foi previsto										
Q04RW5	SYQRVRKRE	0,189646	baixa	Não toxina	-0,82	-2,48	1,5	1,3	3	10,91	1221,5
	EKVLRLNEQELKNAD	0,152967	boa	Não toxina	-0,41	-1,29	0,99	0,95	-1	4,88	1799,24
	YEKVLRLNEQELKNA	0,024453	boa	Não toxina	-0,36	-1,15	0,99	0,59	0	6,57	1847,33
M3G459	LKNADEIIRMTVEGH	0,011002	boa	Não toxina	-0,09	0,09	0,58	0,14	-1	4,68	1778,33
	YVGVKVEGEEKKFKR	0,35856024	boa	Não toxina	-0,39	-1,46	1,4	1,08	2	9,43	1754,24
	PYVGVKVEGEEKKFK	0,18908289	boa	Não toxina	-0,28	-1,27	1,23	0,88	1	8,71	1695,17
	TPYVGVKVEGEEKKF	0,18560762	boa	Não toxina	-0,21	-1,05	0,99	0,65	0	6,57	1668,1
	GVKEGEEKKFKRDGV	0,14569418	boa	Não toxina	-0,44	-1,61	1,4	1,43	1	8,76	1706,15
DTPYVGVKVEGEEKK	0,13426547	boa	Não toxina	-0,3	-1,47	0,99	1,02	-1	4,88	1636,01	

Tabela 17 - Continuação

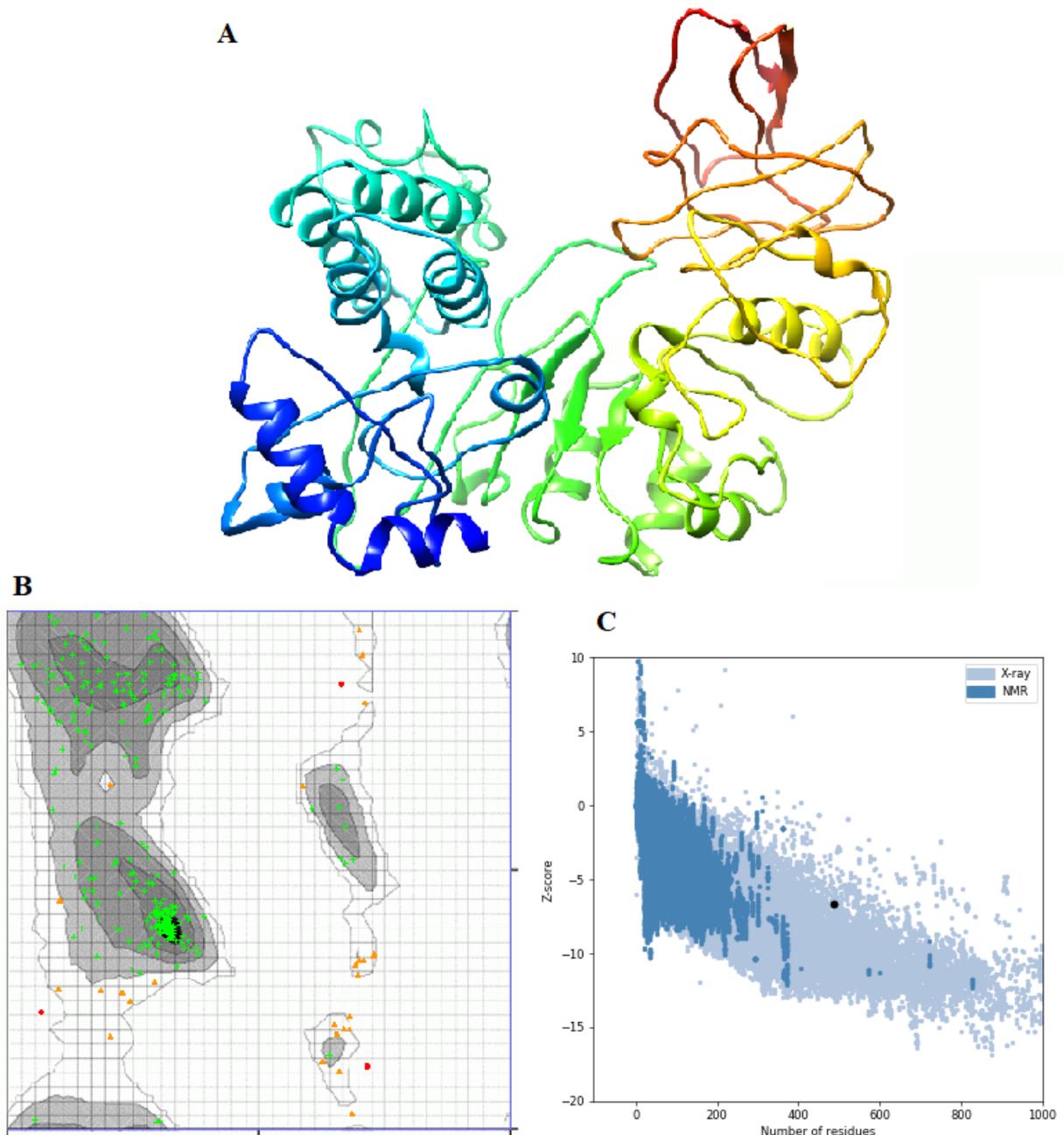
Chave de acesso	Epítipo	Score	Solubilidade	Toxicidade	Hidrofobicidade	Hidropaticidade	Amfipaticidade	Hidrofilicidade	Carga	pI	P.M. (Da)
A0A2M9ZW65	VISNGIWIWLEGTII	0,989809	baixa	Não toxina	0,28	1,63	0,08	-0,94	-1	4	1627,21
	PVISNGIWIWLEGTI	0,871066	baixa	Não toxina	0,23	1,23	0,08	-0,82	-1	4	1611,16
	ITLSTLLFVIFILK	0,835883	baixa	Não toxina	0,29	2,07	0,24	-1,26	1	8,94	1784,5
	VIEYSPVISNGIWIW	0,715222	baixa	Não toxina	0,22	1,19	0,08	-0,91	-1	4	1689,22
	ISNGIWIWLEGTIIL	0,632998	baixa	Não toxina	0,28	1,61	0,08	-0,96	-1	4	1641,24
M3I8Y6	VPLTNLIHSAEKLIR	0,264775	baixa	Não toxina	-0,08	0,31	0,59	-0,16	1,5	9,1	1704,28
	PLTNLIHSAEKLIRD	0,200644	boa	Não toxina	-0,16	-0,2	0,59	0,14	0,5	7,1	1720,23
	LITNLIHSAEKLIRDK	0,179618	boa	Não toxina	-0,23	-0,35	0,83	0,34	1,5	8,94	1751,29
	EVPLTNLIHSAEKLI	0,138491	baixa	Não toxina	0	0,38	0,51	-0,16	-0,5	5,41	1677,21
	TNLIHSAEKLIRDKR	0,127846	boa	Não toxina	-0,38	-0,91	1	0,66	2,5	10	1794,31
A0A4R8MMIT7	Nenhum peptídeo foi previsto										
A0A076V7V5	KLDDDDDDGDDTYKEE	0,683038	boa	Não toxina	-0,53	-2,53	0,66	1,9	-7	3,69	1772,9
	PVKLDDDDGDDTY	0,682775	boa	Não toxina	-0,39	-1,86	0,33	1,21	-6	3,5	1710,88
	VQKLDLDDDDGDDTYK	0,674221	boa	Não toxina	-0,46	-2,01	0,57	1,41	-5	3,77	1741,94
	QKLDLDDDDGDDTYKE	0,642978	boa	Não toxina	-0,53	-2,53	0,66	1,71	-6	3,73	1771,92
	KPVQKLDLDDDDGDDTI	0,604481	boa	Não toxina	-0,46	-2,03	0,57	1,57	-5	3,77	1675,88
A0A2M9XTE4	WVPAVIAEMGVRMIS	0,830313	baixa	Não toxina	0,13	1,15	0,25	-0,59	0	6,36	1659,26
	PLQKLDLDDDDGDDTY	0,732781	boa	Não toxina	-0,39	-1,89	0,33	1,19	-6	3,5	1724,91
	LLVRGLYRLAFTTYK	0,693721	baixa	Não toxina	-0,07	0,49	0,57	-0,54	3	10,29	1814,43
	KLDDDDDDGDDTYKEE	0,683038	boa	Não toxina	-0,53	-2,53	0,66	1,9	-7	3,69	1772,9
	LQKLDLDDDDGDDTYK	0,66809	boa	Não toxina	-0,46	-2,04	0,57	1,39	-5	3,77	1755,97
A0A0E2BOX3	QRADLGAYYNRLEHA	0,730338	boa	Não toxina	-0,31	-1,08	0,59	0,15	0,5	7,1	1777,14
	LGAYYNRLEHAACKGL	0,578068	baixa	Não toxina	-0,12	-0,35	0,59	-0,19	1,5	8,84	1676,13
	GAYYNRLEHAACKGLM	0,549451	baixa	Não toxina	-0,14	-0,47	0,59	-0,15	1,5	8,84	1694,16
	RADLGAYYNRLEHAA	0,471083	boa	Não toxina	-0,24	-0,73	0,51	0,1	0,5	7,1	1720,08
	KQRADLGAYYNRLEH	0,451194	boa	Não toxina	-0,4	-1,46	0,84	0,38	1,5	8,84	1834,24
A0A3S9KKN1	MGAYYNRLEYTAKGL	0,550732	baixa	Não toxina	-0,14	-0,51	0,49	-0,27	1	8,76	1750,22
	RPIAISSPGEANDVI	0,542426	boa	Não toxina	-0,07	0,07	0,25	0,13	-1	4,38	1538,93
	KQRADMGAYYNRLEY	0,498675	boa	Não toxina	-0,39	-1,46	0,74	0,29	1	8,76	1878,3
	GRPIAISSPGEANDV	0,474777	boa	Não toxina	-0,11	-0,25	0,25	0,25	-1	4,38	1482,82
	QRADMGAYYNRLEYT	0,472928	boa	Não toxina	-0,32	-1,25	0,49	0,07	0	6,41	1851,23
A0A0A7KLA8	IDAKDAKNR	0,681032	boa	Não toxina	-0,56	-1,71	1,09	1,38	1	8,93	1030,26
	GLDAKDAKNR	0,459671	boa	Não toxina	-0,49	-1,58	0,98	1,24	1	8,93	1087,33
	DGLTRPGFSYKKADV	0,365119	boa	Não toxina	-0,24	-0,79	0,65	0,42	1	8,83	1654,06
	GLTRPGFSYKKADVIT	0,331613	boa	Não toxina	-0,21	-0,61	0,65	0,19	2	9,72	1640,08
	SKTNAPVIKEGLKGL	0,311654	boa	Não toxina	-0,14	-0,3	0,82	0,31	2	9,72	1555,08
M6TDT5	KAIHAVEGVITREI	0,892302	boa	Não toxina	-0,06	0,34	0,67	0,09	0,5	7,11	1637,14
	LKAIHAVEGVITRE	0,86806	boa	Não toxina	-0,08	0,29	0,67	0,09	0,5	7,11	1637,14
	VEGVITREIKSILS	0,777494	boa	Não toxina	-0,07	0,46	0,58	0,11	0	6,49	1645,16
	SEFLKAIHAVEGVIT	0,71104	baixa	Não toxina	0,08	0,77	0,51	-0,23	-0,5	5,41	1614,1
	EGVITREIKSILSN	0,697491	boa	Não toxina	-0,15	-0,05	0,58	0,22	0	6,49	1660,13

A partir da seleção de diferentes epítomos de células B, LTH, LTC e indutores de interferon- γ projetou-se um novo candidato vacinal, cumprindo os critérios de afinidade de ligação, antigenicidade, não toxicidade, e não alergenicidade. Além desses epítomos, para melhorar a imunogenicidade, um adjuvante foi aplicado à porção N-terminal da proteína quimérica. Ligantes específicos a cada grupo de epítomos foram adicionados à sequência quimérica para prover a fusão dos diferentes peptídeos selecionados.

Cinco estruturas tridimensionais da vacina projetada foram previstas pelo servidor LOMETS baseado em dez modelos de *threading*. A melhor estrutura da modelagem foi escolhida para análises adicionais de refinamento. O servidor da web ModRefiner e GalaxyRefine foram usados para melhorar a consistência da proteína modelada. A apresentação esquemática do modelo 3D da estrutura terciária da vacina multiepítomo é mostrado na figura 12A.

A estrutura refinada foi submetida à análise do gráfico de Ramachandran usando o servidor RAMPAGE. O gráfico de Ramachandran expôs 91,57% dos resíduos em regiões favorecidas, 7,55% são regiões permitidas, e 0,87% de resíduos na região *outlier* (figura 12B). ProSA-web verificou a qualidade e os erros potenciais no modelo 3D bruto. A pontuação Z para a vacina foi estimada em -6,7 (figura 12C). Os resultados gerais de RAMPAGE e ProSA-web validaram a excelente qualidade da proteína tridimensional modelada.

Figura 12 – (A) Estrutura tridimensional da proteína quimérica candidata a vacina multiepitopo. (B) Gráfico de Ramachandran. (C) Gráfico ProSa-web com valor de Z-score.



Fonte: A autora.

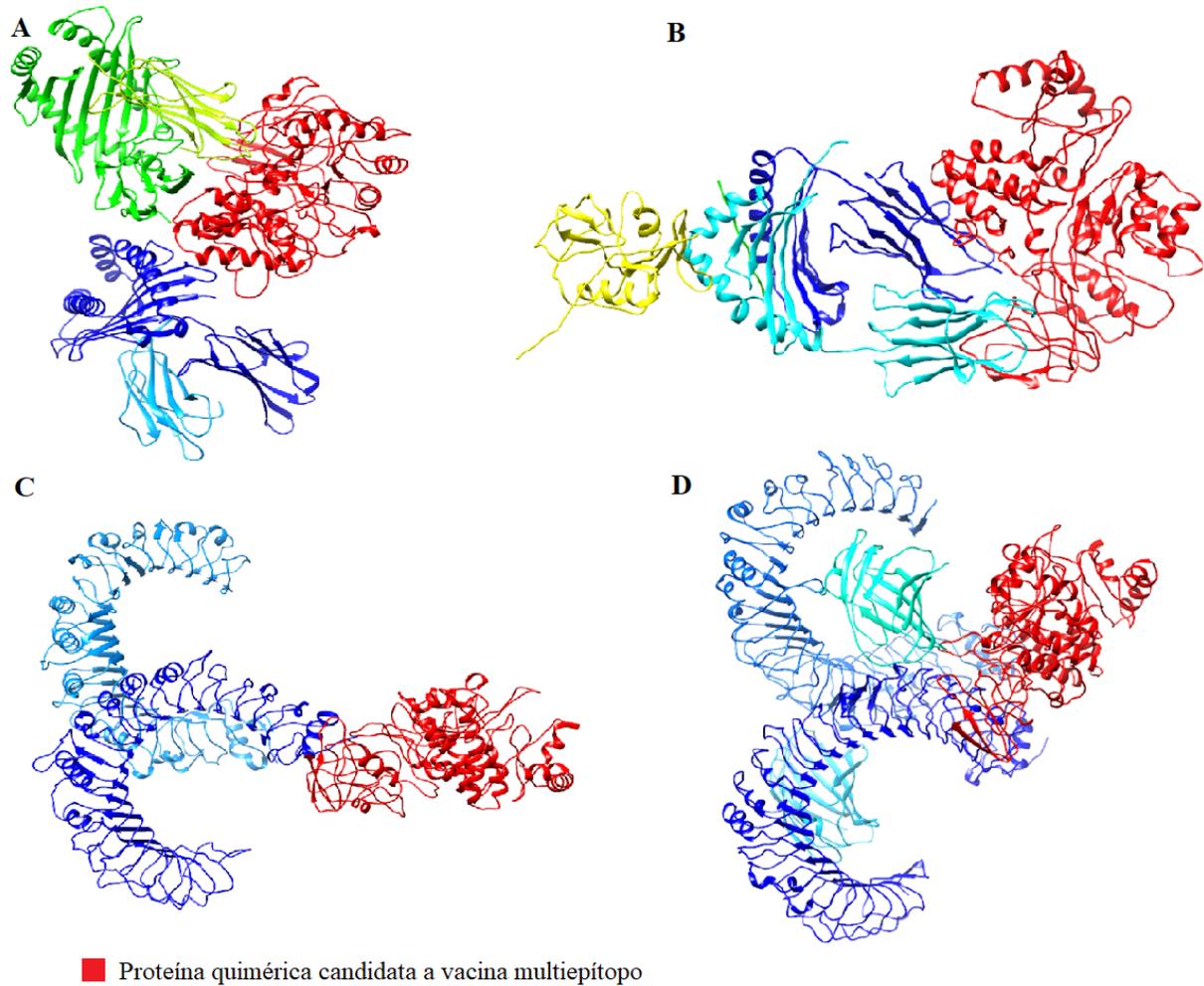
A sequência da vacina construída foi novamente testada quanto à antigenicidade, alergenicidade, toxicidade, solubilidade e cumpriu todos os critérios. No servidor VaxiJen v2.0, o limite padrão de 0,4 foi escolhido como critério de antigenicidade e o score apresentado pela proteína foi 0,8775. No servidor Vaxign a pontuação obtida foi de 90,4% e no ANTIGENpro a antigenicidade predita foi de 0,94. Os resultados especificam que a vacina construída é

altamente antigênica. A sequência da vacina nos servidores AllerTOP v.2 e AllergenFP foi estimada como não alergênica. A similaridade com proteínas de hospedeiro humano, camundongo e porco não foi encontrada, relevando mais um critério de seguridade do antígeno quimérico. O servidor ToxinPred avaliou a quimera como não tóxica.

Quanto às propriedades físico-químicas, a massa molecular da proteína final foi estimado em 49,5 kDa com uma pontuação teórica do ponto isoeletrico (pI) de 9,64. O valor do índice de instabilidade foi 26,73, sugerindo que a proteína é extremamente estável (sendo índice > 40: instabilidade). A pontuação do índice alifático de 54,57 indicou estabilidade térmica da proteína e a pontuação de GRAVY (hidropaticidade) foi de -0,490 indicando a solubilidade da quimera, confirmada pela análise da ferramenta SOLpro que estimou a proteína como solúvel com score de 0,835598.

Os resultados do docking molecular mostraram baixos valores de energia livre (indicando maior afinidade de ligação) quando acoplada ao MHC II (- 51,35 kcal / mol), seguido por MHC I (- 14,87 kcal / mol), TLR 4 (- 13,04 kcal / mol) e TLR 2 (- 11,75 kcal / mol). Esses valores indicam que a proteína quimérica apresentou afinidade de ligação válida aos quatro receptores avaliados, conforme mostra a figura 13.

Figura 13 – Docking molecular realizado nos servidores PatchDock e FireDock indicando as regiões de interação entre a proteína quimérica candidata a vacina multiepitopo e diferentes receptores. (A) receptor MHC I. (B) receptor MHC II. (C) TLR 2. (D) TLR 4.



Fonte: A autora.

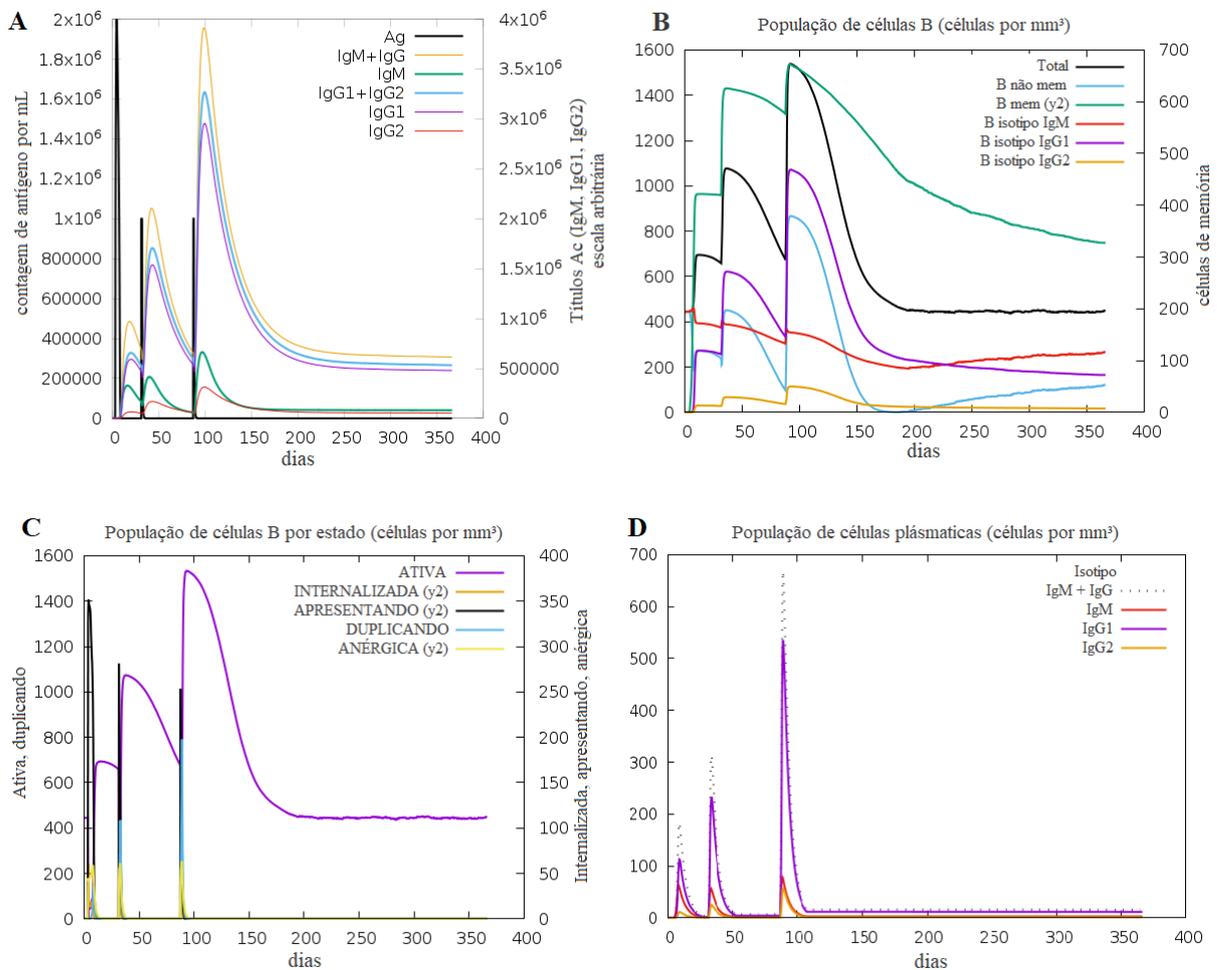
Em relação aos testes de simulação imunológica da proteína quimérica, pode-se observar uma atividade significativa das células imunológicas (figura 14).

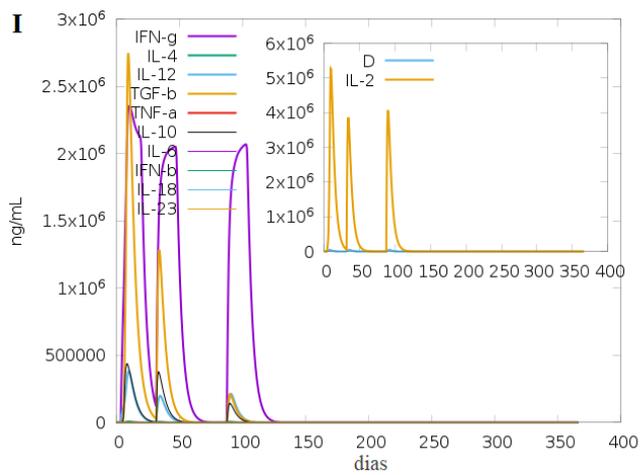
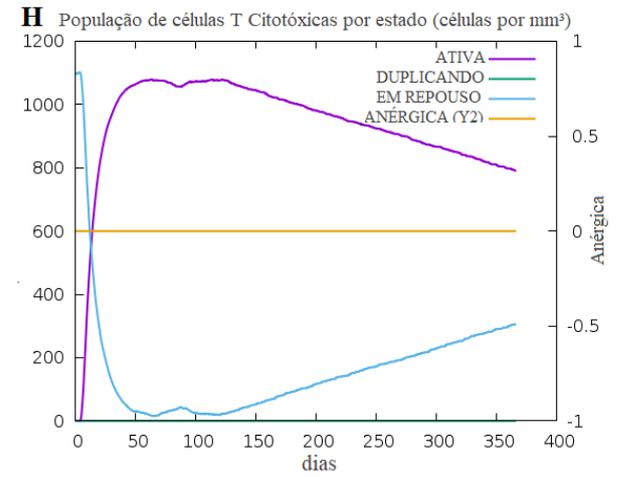
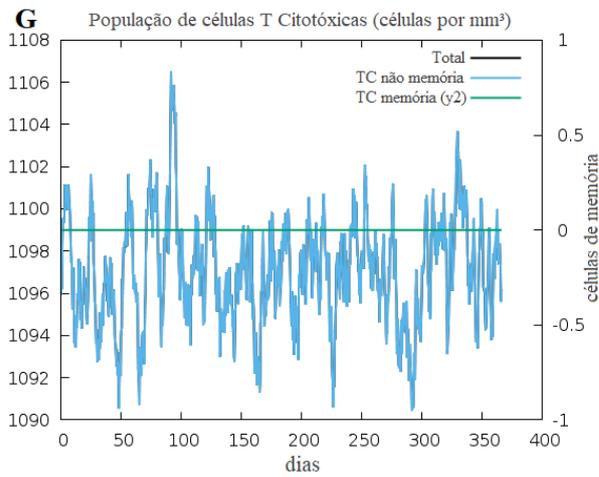
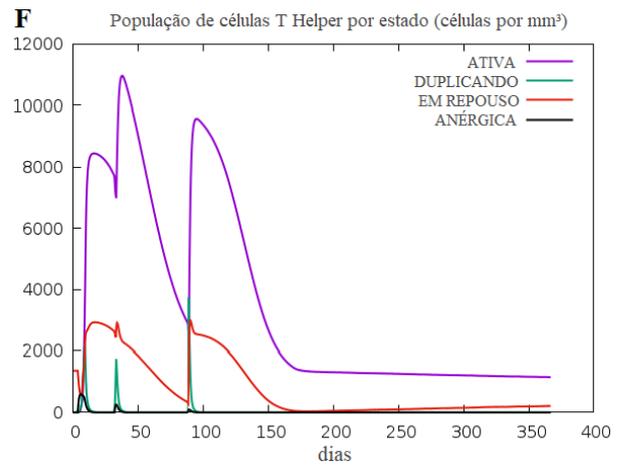
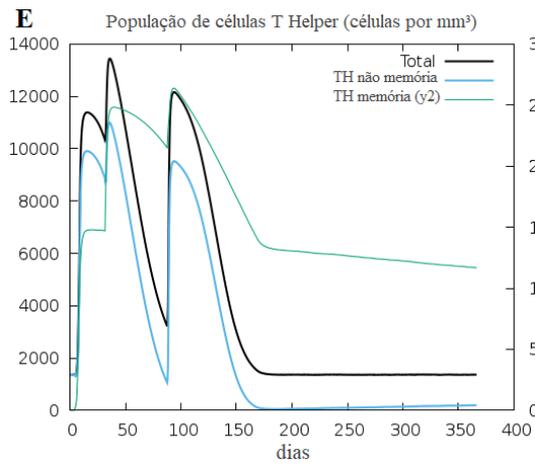
Observou-se a proliferação na resposta imune secundária e terciária quando comparadas à resposta primária. A atividade das imunoglobulinas (anticorpos IgG1 + IgG2, IgM e IgG + IgM) estava em níveis elevados com uma diminuição consistente na concentração do antígeno (figura 14A).

Níveis elevados de células B ativadas e formação de células B de memória foram observados (figura 14B - 14D). Nas figuras 14E, 14F, 14G e 14H se observou níveis elevados

de LTH e LTC, e o desenvolvimento de memória TH e TC. Níveis elevados de citocinas como IL-2 e IFN- γ podem ser observados na figura 14I.

Figura 14 – Resultados da simulação imunológica da proteína quimérica candidata a vacina multiepítipo utilizando o servidor C-IMMSIM. (A) Administração do antígeno e proliferação da resposta imune com a produção de imunoglobulinas. (B) População de células B. (C) População de células B por estado. (D) População de células plasmáticas. (E) População de células T Helper. (F) População de células T Helper por estado. (G) População de células T Citotóxicas. (H) População de células T Citotóxicas por estado. (I) Níveis de citocinas e interleucinas.





Fonte: A autora.

5 DISCUSSÃO

A metodologia de obtenção do extrato proteico, bem como a metodologia empregada na proteômica e as condições da amostra utilizada, são fatores que geram grande variação no número de proteínas encontradas em proteomas realizados em diferentes pesquisas. Além disso, o proteoma de uma amostra indica as proteínas que estão sendo expressas naquele determinado momento, portanto, os resultados são variáveis (EMIDIO et al., 2015).

Em relação aos grupos funcionais, as proteínas foram subdivididas em 16 categorias, estabelecidas de acordo com outros estudos que também analisaram o perfil proteico de *Leptospira* sp. (VIEIRA et al., 2009; HUMPHRYES et al., 2014), para que haja uma padronização dos resultados encontrados, facilitando a comparação entre os diferentes trabalhos.

Neste estudo, houve predomínio de proteínas com atividade catalítica, seguido de proteínas estruturais da bactéria. Nota-se que a maioria das categorias funcionais encontradas está relacionada ao metabolismo bacteriano.

A comparação do perfil proteico de diferentes sorovares de *Leptospira* e a observação das proteínas comuns entre eles, conforme foi explicitado na tabela 1, é importante para a identificação de moléculas alvo conservadas entre os diferentes sorovares, que podem ser empregadas para o desenvolvimento de novas vacinas com maior possibilidade de induzir imunidade cruzada (HUMPHRYES et al., 2014; GRASSMANN et al., 2017).

Ainda neste contexto, foi elaborada a tabela 3, listando as proteínas sabidamente capazes de induzir resposta imune. Essas proteínas foram assim identificadas por meio de estudos imunológicos em modelos animais: I) camundongos imunizados com LipL32 recombinante (SEIXAS et al., 2007); II) hamsters imunizados com pools de proteínas de *Leptospira borgpetersenii* (MURAY et al., 2013); III) por meio de imunoblotting: com soro de humanos infectados (KOSITANONT et al., 2007), camundongos infectados (SAKOLVAREE et al., 2007) e porquinhos da Índia infectados (NALLY et al., 2007).

As proteínas geradoras de resposta imunológica identificadas neste proteoma, cujas estruturas tridimensionais foram desenvolvidas, são proteínas amplamente discutidas em espécies patogênicas de *Leptospira*, por estarem envolvidas nos mecanismos de patogenia da doença. Vale ressaltar que todas as modelagens desenvolvidas são válidas, o que foi confirmado pelos níveis de confiabilidade obtidos nos testes de validação, tanto no gráfico de Ramachandran, quanto no descritor de qualidade.

No tocante a estas proteínas, a LipL32, mesmo sendo a proteína de membrana externa mais abundante de *Leptospira* patogênica, quando testada sozinha, como vacina de subunidade, apresentou baixa eficácia (SEIXAS et al., 2007). A Flagelina possui função na motilidade bacteriana, o que constitui um dos principais fatores relacionados à patogenicidade da *Leptospira* (FERNANDES et al., 2016). A Loa 22 é um fator de virulência determinante da infecção, sendo regulada positivamente nessas condições; ela aparece nos estudos realizados em diversas isoformas (RISTOW et al., 2007; NALLY et al., 2017).

O fator de alongamento Tu foi descrito por Wolff et al. (2013) como uma proteína localizada na superfície da bactéria, sendo um fator de virulência com função de interação com componentes da matriz extracelular do hospedeiro. Neste estudo, ele foi identificado com uma localização celular diferente (citoplasma), o que indica que fora das condições de virulência, esta proteína se apresenta em uma isoforma diferente e conseqüentemente com função diferente.

Menos estudado, o fator de alongamento Ts tem função de alongamento de cadeias durante a síntese de polipeptídeos no ribossomo, esta proteína não se localiza na membrana externa e, mesmo assim, apresenta características imunogênicas (SAKOLVAREE et al., 2007).

Diversas proteínas que compõem o perfil proteico de *Leptospira* ainda são desconhecidas. A caracterização dessas proteínas é importante, pois pode contribuir para o entendimento da patogenia da doença, que ainda não está totalmente elucidada (VIEIRA et al., 2009).

As proteínas Loa 22, LipL32, Flagelina, Fator de alongação Tu e Fator de alongação Ts mantêm sua importância em diversos aspectos relacionados a fisiopatogenia da *Leptospira*, porém o grupo das proteínas não caracterizadas, que correspondeu a 12,4% do proteoma, merece destaque. Após serem caracterizadas nesta pesquisa, essas proteínas constituíram a maior parte das proteínas selecionadas pelo seu potencial para alvo vacinal, ou seja, 11 das 17 proteínas com maior potencial para alvo vacinal (64,7%) correspondeu a proteínas não caracterizadas até então.

Isso mostra que a caracterização dessas proteínas, além de contribuir para o entendimento de fatores relacionados à infecção por *Leptospira*, pode nos revelar novos e importantes candidatos vacinais.

Para possibilitar que todas as proteínas bacterianas sejam exploradas, faz-se necessário um refinamento do proteoma, como foi realizado neste estudo, à medida que novos proteomas de outros sorovares de *Leptospira* spp. são publicados.

A seleção das proteínas com maior potencial para alvo vacinal passou por etapas eliminatórias de avaliação da alergenicidade e similaridade. As proteínas preditas como alergênicas a humanos ou ao hospedeiro não podem ser consideradas para o desenvolvimento de vacinas (LATA et al., 2018; DONG et al., 2020; KAR et al., 2020). Da mesma forma, a análise de similaridade é realizada para evitar a homologia das proteínas selecionadas a proteínas humanas ou do hospedeiro. Sendo que uma vacina ideal não deve ter sequências similares às proteínas humanas para evitar a indução de autoimunidade (DONG et al., 2020). A similaridade a proteínas de suínos e camundongos foi trazida como informação adicional para melhor caracterização das proteínas e para corroborar com seu emprego em outros estudos.

A avaliação da antigenicidade das proteínas indica sua potencialidade em ser reconhecida como um antígeno específico e induzir resposta imune, e por isso, a seleção dos melhores imunógenos é uma etapa fundamental para o desenvolvimento de uma vacina (LATA et al., 2018; KAR et al., 2020). Da mesma forma, a capacidade de adesão ou de ligação das proteínas a componentes da matriz extracelular do hospedeiro deve ser considerada (OLIVEIRA et al., 2018).

A localização da proteína é um fator tão relevante a ponto a direcionar as pesquisas sobre o desenvolvimento de vacinas contra leptospirose. Existe uma tendência em se pesquisar proteínas de membrana externa quando se trata de alvos vacinais, pelo fato de serem proteínas mais conservadas entre as espécies patogênicas de *Leptospira* e por desempenharem um papel importante na interação de patógenos com células hospedeiras, estando provavelmente associadas à patogênese (DELLAGOSTIN et al., 2017; LATA et al., 2018). Por estes motivos as proteínas de membrana foram priorizadas para a seleção dos alvos vacinais neste estudo.

Porém, não só as proteínas de membrana externa devem ser consideradas na busca por alvos vacinais. Na resposta imune à *Leptospira*, no momento em que as células são fagocitadas pelos macrófagos, diversos componentes bacterianos são expostos ao sistema imune pela digestão da bactéria (ZUERNER, 2015), isso significa, juntamente com os dados publicados em pesquisas anteriores de proteínas imunogênicas com variadas localizações celulares, que proteínas internas da *Leptospira* também são importantes na estimulação da resposta imune.

De acordo com Lata (2018); Lata et al. (2020); Lin et al. (2010) e Lin et al. (2016) estimular a imunidade humoral e mediada por células contra a leptospirose é essencial para o desenvolvimento de uma vacina eficaz. Desta forma, uma vacina de subunidade proteica deve conter epítomos de células B e T para ser capaz de induzir imunidade humoral e celular, respectivamente.

Essas afirmações são reforçadas pelo fato de que a vacina mais promissora desenvolvida até o momento é baseada na proteína de superfície Lig, porém a sua eficácia no desafio heterólogo e a duração da imunidade ainda é incerta (DELLAGOSTIN et al., 2017; LATA et al., 2018). Também nenhuma vacina de subunidade, utilizando proteína de membrana externa, induziu imunidade estéril (DELLAGOSTIN et al., 2017), possivelmente porque os antígenos localizados na membrana externa da bactéria são capazes de realizar um movimento lateral através da bicamada de lipídeos, isso possibilita que a bactéria se movimente mesmo quando está ligada ao anticorpo, um fator importante para a colonização de tecidos (CHARON et al. 1981).

Além disso, as proteínas expostas à superfície, lipoproteínas e LPS da bactéria constituem os PAMPs (Padrões Moleculares Associados à Patógenos) que são importantes no reconhecimento da bactéria assim que ela adentra o organismo do hospedeiro e na estimulação de células B, mas não necessariamente esses PAMPs estão associados à uma resposta imune eficaz e cruzada entre os sorovares (ZUERNER, 2015). Deve-se considerar que as vacinas baseadas em linfócitos B fornecem imunidade mediada por anticorpos que pode ser reprimida pelo aumento de antígenos (KAR et al., 2020).

O LTH é essencial na indução de respostas humorais vitais e na indução de LTC, conferindo imunidade a longo prazo; por isso, promover estímulo a esses linfócitos é crucial para o desenvolvimento de vacinas eficazes (KAR et al., 2020).

Portanto, neste estudo buscou-se construir uma proteína quimérica com peptídeos específicos para promover uma estimulação mais completa do sistema imune, acionando células B, LTH, LTC, induzindo IFN- γ e associando dois peptídeos conservados. Para com isso alcançar uma molécula capaz de gerar resposta imune cruzada entre os sorvares, duradoura e imunidade estéril contra leptospirose.

Por isso foram selecionados epítomos antigênicos que se ligam aos receptores MHC classe I e estimulam o desenvolvimento de LTC que combatem as células infectadas e diferenciam-se em células T de memória (KAR et al., 2020). Isso é importante pois, embora seja considerada uma bactéria extracelular, a *Leptospira* pode atravessar camadas celulares e transitar intracelularmente (BAROCCHI et al., 2002).

Também foram selecionados epítomos antigênicos que se ligam aos receptores MHC classe II e estimulam as células B pela via Th2. As células B se diferenciam em células

plasmáticas, que produzem anticorpos neutralizantes, e em células B de memória (KAR et al., 2020).

Os epítomos que se ligam aos receptores MHC classe II também estimulam Th1, que produz citocinas que mediam fagócitos, como IFN- γ . Na resposta imune à *Leptospira*, sabe-se que é necessária a ativação de Th1 para a produção de IFN- γ , que é responsável pela depuração da *Leptospira* no rim, estando associado à promoção de imunidade estéril, prevenindo a colonização renal e a eliminação da bactéria na urina (CHASSIN et al., 2009; ELLIS et al., 2000; ZUERNER et al., 2011). Por esse motivo, os epítomos indutores de IFN- γ também foram avaliados.

Dessa forma, procedeu-se a união desses diferentes epítomos em uma única molécula, com potencial para superar as limitações da bacterina usada comercialmente.

É importante destacar que a resposta aos epítomos das células T é dependente da compatibilidade com as proteínas HLA que são codificadas pelos alelos MHC, por isso as tabelas 13, 14 e 15 trouxeram os alelos MHC responsáveis pela ligação a cada epítomo listado. A capacidade de interação com o maior número de alelos foi um fator considerado durante a seleção dos peptídeos que compuseram a proteína quimérica neste estudo.

Os alelos MHC e as proteínas codificadas por eles – HLA, são altamente polimórficas, ou seja, apresentam uma grande variabilidade na população e a sua frequência de expressão varia de acordo com as etnias. Portanto, os epítomos selecionados devem se ligar ao maior número de alelos HLA para alcançar mais cobertura sobre a população (MAENAKA et al., 1999; SINGHVI et al., 2020).

Respeitando as especificidades biológicas, demonstramos um processo racional para o desenvolvimento de antígenos vacinais quiméricos para imunização humana, este mesmo processo pode ser estendido para o desenvolvimento de vacinas de uso veterinário. Os alvos vacinais em potencial identificados nesta pesquisa podem ser empregados para a construção de uma vacina para animais, desde que a predição de ligação dos epítomos de células T a moléculas de MHC classe I e II seja adaptada aos alelos MHC específicos da espécie para a qual a vacina será desenvolvida.

As vacinas contra *Leptospira* mais bem-sucedidas produzidas até o momento são compostos de bactérias inteiras mortas (BEY; JOHNSON, 1982), sugerindo que uma mistura complexa de antígenos pode ser necessária para proteção e também para uma estimulação mais complexa do sistema imune, ativando imunidade celular e humoral (ZUERNER, 2015).

Estudos recentes apontam que as vacinas multiepítopo são mais vantajosas do que vacinas de epítopo único ou vacinas convencionais, por apresentarem baixo custo de fabricação, demandar pouco tempo para desenvolvimento, terem estabilidade e especificidade. Além disso, elas são capazes de induzir resposta imune humoral e celular significativas, simultaneamente devido à presença de epítomos de células T e B (AHMAD et al., 2021; UL QAMAR et al., 2020a; UL QAMAR et al., 2020b).

De acordo com Li et al. (2014) as vacinas constituídas por peptídeos geralmente são mais seguras pelo fato de os epítomos não apresentarem respostas reatogênicas. Os epítomos de células T são essenciais para a estimulação imune adaptativa e são suficientes para cooperar com as moléculas de MHC. Portanto, a seleção de epítomos fixos com MHC é um aspecto essencial na previsão de epítomos potentes de células T. Além disso, o reconhecimento das células T CD4⁺ e CD8⁺ é crítico durante o desenvolvimento de vacinas baseadas em múltiplos epítomos (LATA et al., 2018, KAR et al., 2020; UL QAMAR et al., 2020a; UL QAMAR et al., 2020b).

Previmos epítomos de células B e T a partir dos antígenos analisados e os juntamos usando ligantes específicos a fim de construir vacina baseada em epítopo. Para gerar sequências com imunogenicidade juncional reduzida, os ligantes utilizados foram integrados entre os epítomos selecionados, permitindo o projeto racional de uma vacina com múltiplos epítomos, além de melhorarem a solubilidade final do constructo proteico. O adjuvante no N-terminal também foi fundido nas sequências de epítomos para uma melhor expressão e melhoria da bioatividade da vacina.

A avaliação de imunoinformática da vacina construída especificou muitos epítomos MHC Classe I, MHC Classe II, IFN- γ e células B lineares. Estudos anteriores indicam que IFN- γ também promove proteção geral contra *Leptospira* nos rins dos animais. A falta da função alergênica da vacina proteica aumentou ainda mais sua eficácia como vacina candidata. A vacina multiepítopo construída mostrou pontuações mais altas de antigenicidade tanto no servidor ANTIGENpro e Vaxign, quanto no servidor Vaxijen v2.0.

O peso molecular da proteína final (P.M.) foi previsto em 49,5 kDa e foi estimado ser altamente solúvel na expressão, juntamente com sua imunogenicidade virtual. A solubilidade da proteína recombinante superexpressa no hospedeiro *E. coli* é crítica para numerosos estudos bioquímicos e funcionais. O pI teórico estimado é de 9,64, sugerindo que a vacina construída é básica. A pontuação prevista para o índice de instabilidade foi de 26,73, o que sugere que a

proteína seria extremamente estável na expressão, firmando ainda mais sua probabilidade como antígeno vacinal. O índice alifático mostra que existem cadeias laterais alifáticas na proteína, representando possível hidrofobicidade e estabilidade térmica. O conhecimento sobre as estruturas secundárias e terciárias da proteína alvo é vital no desenvolvimento de vacinas. A estrutura 3D da vacina candidata melhorou consideravelmente após o refinamento e exibiu características apropriadas com base nos resultados do gráfico de Ramachandran. O resultado do gráfico de Ramachandran indica que 91,57% dos resíduos são iniciados nas regiões favorecidas e 7,55% são regiões permitidas, com apenas 0,87% resíduos na região outlier; isso sugere que a qualidade de todo o modelo é aceitável.

Na simulação imunológica realizada para a proteína quimérica, a quantidade de doses e o intervalo entre elas foi estabelecido com base em outros estudos. Os mesmos afirmam que o tempo mínimo recomendado entre a 1ª e a 2ª dose para a maioria das vacinas usadas atualmente é de 4 semanas e a eficiência da dose de reforço aumenta com 90 dias após o início da vacinação, sendo que atrasar o reforço além desse período não melhora o pico de anticorpos secundários (CASTIGLIONE et al., 2012; KAR et al., 2020; UL QAMAR et al., 2020b).

Uma das principais características na validação de uma vacina candidata é a triagem de imunorreatividade em relação à produção de anticorpos. A simulação imune mostrou resultados consistentes com as respostas imunes típicas. Após a exposição repetida ao antígeno, houve um aumento geral nas respostas imunes geradas.

O desenvolvimento de células B e células T de memória foi evidente, com a memória nas células B durando vários meses. As células T auxiliares foram particularmente estimuladas. Outra observação interessante foi que os níveis de IFN- γ e IL-2 aumentaram após a primeira injeção e atingiram níveis máximos após a terceira exposição ao antígeno. Isso indica níveis elevados de células TH e, conseqüentemente, produção eficiente de Anticorpos, apoiando uma resposta humoral.

Portanto, os resultados obtidos nos testes de simulação imunológica da proteína quimérica foram significativos para uma resposta imune contra *Leptospira*. Observou-se uma resposta imunológica robusta dos principais componentes da imunidade, ou seja, mediada por células (LTH e LTC), humoral (células B) e também de IFN- γ com as 3 doses administradas, no período estabelecido.

Os altos níveis de células B ativadas e a presença de células B de memória indicam uma resposta imune eficaz e de longa duração, bem como, os altos níveis de LTH e LTC com

desenvolvimento de respectivas células de memória são fatores cruciais para desencadear a resposta imune (UL QAMAR et al., 2020b).

Assim, a proteína quimérica construída, composta por uma diversidade de peptídeos conservados, especificamente selecionados para estimular todos os componentes necessários do sistema imunológico para gerar uma resposta imune efetiva e duradoura contra leptospirose abrangendo imunidade humoral, celular e com potencial para induzir imunidade cruzada e estéril, é um alvo potencial para a composição de uma nova vacina, que supere as limitações da bacterina usada atualmente.

6 CONCLUSÃO

O estudo aprofundado do perfil proteico de *Leptospira* associado a triagem de alvos vacinais por meio da imunoinformática, possibilitou a identificação e caracterização das proteínas mais antigênicas, resultando na construção de uma proteína quimérica com características desejáveis para um bom imunógeno. Desta forma, foi possível direcionar os estudos *in vivo* a serem realizados, poupando tempo, recursos financeiros e diminuindo a utilização de animais de laboratório.

Foram identificados epítomos de células B, LTH, LTC e IFN- γ oriundos das proteínas que apresentaram maior potencial antigênico, muitas delas caracterizadas nesta pesquisa, e que tiveram sua importância demonstrada como candidatas a alvo vacinal.

A proteína quimérica desenvolvida reúne as características necessárias para um imunógeno eficaz contra leptospirose, desencadeando tanto imunidade humoral quanto celular e requer investigação adicional, especialmente *in vivo*, para a validação de sua eficácia.

Essa tese abre novas possibilidades para pesquisas futuras no desenvolvimento de vacinas contra leptospirose, sendo possível intensificar a investigação dos epítomos candidatos em potencial identificados, bem como testar a resposta imune induzida pela proteína quimérica com diferentes adjuvantes *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Zoonoses and Communicable Diseases common to man and animals. 3^a ed., Washington: **Pan American Health Organization**, p.233 – 246, 2001.
- ADLER, B. *Leptospira* and Leptospirosis. 1^a ed. Austrália: Springer, 2015. 295 p.
- ADLER, B.; FAINE, S. Host immunological mechanisms in the resistance of mice to leptospiral infections. **Infection and immunity**, v. 17, n. 1, p. 67-72, 1977.
- ADLER, B.; FAINE, S. Susceptibility of mice treated with cyclophosphamide to lethal infection with *Leptospira interrogans* serovar Pomona. **Infection and immunity**, v. 14, n. 3, p. 703-708, 1976.
- ADLER, B.; MOCTEZUMA, A.P. *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v.140, p.287-296, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012>
- ADU-BOBIE, J.; CAPECCHI, B.; SERRUTO, D.; RAPPUOLI, R.; PIZZA, M. Two years into reverse vaccinology. **Vaccine**, v. 21, n. 7-8, p. 605-610, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00566-2](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00566-2)
- AHMAD, S.; WAHEED, Y.; ISMAIL, S.; ABBASI, S. W.; NAJMI, M. H. A computational study to disclose potential drugs and vaccine ensemble for COVID-19 conundrum. **Journal of molecular liquids**, v. 324, p. 114734, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114734>
- AHMED, A.; ENGELBERTS, M. F.; BOER, K. R.; AHMED, N.; HARTSKEERL, R. A. Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic *Leptospira* species in clinical materials. **PLoS One**, v. 4, n. 9, p. 1-8, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007093>
- ATZINGEN, M. V.; GONÇALES, A. P.; DE MORAIS, Z. M.; ARAUJO, E. R.; DE BRITO, T.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. Characterization of leptospiral proteins that afford partial protection in hamsters against lethal challenge with *Leptospira interrogans*. **Journal of medical microbiology**, v. 59, n. 9, p. 1005-1015, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.021485-0>
- BANFI, E.; CINCO, M.; BELLINI, M.; SORANZO, M. R. The role of antibodies and serum complement in the interaction between macrophages and leptospire. **Microbiology**, v. 128, n. 4, p. 813-816, 1982. DOI: <https://doi.org/10.1099/00221287-128-4-813>
- BARBOSA, E. B.; VIDOTTO, A.; POLACHINI, G. M.; HENRIQUE, T.; DE MARQUI, A. B. T.; TAJARA, E. H. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 3, p. 366-375, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0104-42302012000300019>
- BAROCCHI, M. A.; KO, A. I.; REIS, M. G.; MCDONALD, K. L.; RILEY, L. W. Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but nonintracellular pathogen. **Infection and immunity**, v. 70, n. 12, p. 6926-6932, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.70.12.6926-6932.2002>

BARRY, M.; WISNEWSKI, A. V.; MATTHIAS, M. A.; INOUE, S. K.; VINETZ, J. M. Suburban leptospirosis: atypical lymphocytosis and γ - δ T cell response. **Clinical infectious diseases**, v. 43, n. 10, p. 1304-1307, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1086/508537>

BERNARDINO, A. L.; MYERS, T. A.; ALVAREZ, X.; HASEGAWA, A.; PHILIPP, M. T. Toll-like receptors: insights into their possible role in the pathogenesis of Lyme neuroborreliosis. **Infection and immunity**, v. 76, n. 10, p. 4385-4395, 2008. DOI: 10.1128/IAI.00394-08

BLUMERMAN, S. L.; HERZIG, C. T.; BALDWIN, C. L. WC1+ γ δ T cell memory population is induced by killed bacterial vaccine. **European journal of immunology**, v. 37, n. 5, p. 1204-1216, 2007a. DOI: <https://doi.org/10.1002/eji.200636216>

BLUMERMAN, S. L.; HERZIG, C. T.; WANG, F.; COUSSENS, P. M.; BALDWIN, C. L. Comparison of gene expression by co-cultured WC1+ γ δ and CD4+ $\alpha\beta$ T cells exhibiting a recall response to bacterial antigen. **Molecular immunology**, v. 44, n. 8, p. 2023-2035, 2007b. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2006.09.020>

BOLIN, C. A.; ALT, D. P. Use of a monovalent leptospiral vaccine to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo. **American journal of veterinary research**, v. 62, n. 7, p. 995-1000, 2001. DOI: <https://doi.org/10.2460/ajvr.2001.62.995>

BOLIN, C. A.; ALT, D. P.; ZUERNER, R. L. Protection of cattle from renal and genital tract colonization with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. In: **Proceedings of the 21st World Buiatrics Congress**. Punte del Este, Uruguay. 2000.

BOLIN, C. A.; ZUERNER, R. L.; TRUEBA, G. Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine containing *Leptospira interrogans* serovar Hardjo type hardjo-bovis on type hardjo-bovis infection of cattle. **American journal of veterinary research**, v. 50, n. 12, p. 2004-2008, 1989.

BRANGER, C., SONRIER, C., CHATRENET, B., KLONJKOWSKI, B., RUVOEN-CLOUET, N., AUBERT, A., ANDRÉ-FONTAINE, G.; ELOIT, M. 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. DOI: 10.1128/IAI.69.11.6831-6838.2001

CAIMANO, M. J.; SIVASANKARAN, S. K.; ALLARD, A.; HURLEY, D.; HOKAMP, K.; GRASSMANN, A. A.; HINTON, J. C. D.; NALLY, J. E. A model system for studying the transcriptomic and physiological changes associated with mammalian host-adaptation by *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. **Plos pathogens**, v. 10, n. 3, p. e1004004, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004004>

CAN, H.; KÖSEOĞLU, A. E.; ALAK, S. E.; GÜVENDI, M.; DÖŞKAYA, M.; KARAKAVUK, M.; GURUZ, A. Y.; ÜN, C. In silico discovery of antigenic proteins and epitopes of SARS-CoV-2 for the development of a vaccine or a diagnostic approach for COVID-19. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-16, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79645-9>

CAO, X. J.; DAI, J. XU, H.; NIE, S.; CHANG, X.; HU, B. Y.; SHENG, Q. H.; WANG, L. S.; NING, Z. B.; LI, Y. X.; GUO, X. K.; ZHAO, G. P.; ZENG, R. High-coverage proteome

analysis reveals the first insight of protein modification systems in the pathogenic spirochete *Leptospira interrogans*. **Cell research**, v. 20, n. 2, p. 197-210, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1038/cr.2009.127>

CAO, Y., FAISAL, S. M., YAN, W., CHANG, Y. C., MCDONOUGH, S. P., ZHANG, N., AKEY, B. L.; CHANG, Y. F. 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.07.070>

CASTIBLANCO-VALENCIA, M. M.; FRAGA, T. R.; PAGOTTO, A. H.; DE TOLEDO SERRANO, S. M.; ABREU, P. A. E.; BARBOSA, A. S.; ISAAC, L. Plasmin cleaves fibrinogen and the human complement proteins C3b and C5 in the presence of *Leptospira interrogans* proteins: a new role of LigA and LigB in invasion and complement immune evasion. **Immunobiology**, v. 221, n. 5, p. 679-689, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2016.01.001>

CASTIGLIONE, F.; MANTILE, F.; DE BERARDINIS, P.; PRISCO, A. How the interval between prime and boost injection affects the immune response in a computational model of the immune system. **Computational and mathematical methods in medicine**, v. 2012, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1155/2012/842329>

CERVANTES, J. L.; DUNHAM-EMS, S. M.; LA VAKE, C. J.; PETZKE, M. M.; SAHAY, B.; SELLATI, T. J.; RADOLF, J. D.; SALAZAR, J. C. Phagosomal signaling by *Borrelia burgdorferi* in human monocytes involves Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR8 cooperativity and TLR8-mediated induction of IFN- β . **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 9, p. 3683-3688, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1013776108>

CHANG, Y. F.; CHEN, C. S.; PALANIAPPAN, R. U.; HE, H.; MCDONOUGH, S. P.; BARR, S. C.; YAN, W.; FAISAL, S. M.; PAN, M. J.; CHANG, C. F. Immunogenicity of the recombinant leptospiral putative outer membrane proteins as vaccine candidates. **Vaccine**, v. 25, n. 48, p. 8190-8197, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.09.020>

CHARON, N. W.; LAWRENCE, C. W.; & O'BRIEN, S. Movement of antibody-coated latex beads attached to the spirochete *Leptospira interrogans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 11, p. 7166-7170, 1981. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.78.11.7166>

CHASSIN, C.; PICARDEAU, M.; GOUJON, J. M.; BOURHY, P.; QUELLARD, N.; DARCHE, S.; BADELL, E.; FANTON D'ANDON, M.; WINTER, N.; LACROIX-LAMANDÉ, S.; BUZONI-GATEL, D.; VANDERWALLE, A.; WERTS, C. 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. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900506>

COGNASSE, F.; HAMZEH-COGNASSE, H.; LAFARGE, S.; DELEZAY, O.; POZZETTO, B.; MCNICOL, A.; GARRAUD, O. Toll-like receptor 4 ligand can differentially modulate the release of cytokines by human platelets. **British journal of haematology**, v. 141, n. 1, p. 84-91, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.06999.x>

COOPER, M. A.; ELLIOTT, J. M.; KEYEL, P. A.; YANG, L.; CARRERO, J. A.; YOKOYAMA, W. M. Cytokine-induced memory-like natural killer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 6, p. 1915-1919, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0813192106>

CORTESE, V. S.; GALLO, G. F.; CLEARY, D. L.; GALVIN, J. E.; LEYH R. D. Efficacy of a flexible schedule for administration of a *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo bacterin to beef calves. **American Journal of Veterinary Research**, v. 75, p. 507-512, 2014. DOI: <https://doi.org/10.2460/ajvr.75.5.507>

DA CUNHA, C. E. P.; FELIX, S. R.; NETO, A. C. P. S.; CAMPELLO-FELIX, A.; KREMER, F. S.; MONTE, L. G.; AMARAL, M. G.; NOBRE, M. O.; SILVA, E. F.; HARTLEBEN, C. B.; McBRIDE, A. J. A.; DELLAGOSTIN, O. A. Infection with *Leptospira kirschneri* serovar Mozdok: first report from the southern hemisphere. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 94, n. 3, p. 519-521, 2016. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0505>

DE ALMEIDA PAIM, E. R.; CIUFFA, A. Z.; GOMES, D. O.; REZENDE, L. M.; SILVA, D. M.; PIRES, B. C.; CUCCATO, L. P.; REIS, T. F.; LIMA, A. M. C. Seroepidemiology of leptospirosis in dairy cattle in Ipameri, state of Goiás, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 4, p. 1937-1946, 2016. DOI: [10.5433/1679-0359.2016v37n4p1937](https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n4p1937)

DE FOST, M.; HARTSKEERL, R. A.; GROENENDIJK, M. R.; VAN DER POLL, T. Interleukin 12 in part regulates gamma interferon release in human whole blood stimulated with *Leptospira interrogans*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, n. 2, p. 332-335, 2003. DOI: [10.1128/CDLI.10.2.332-335.2003](https://doi.org/10.1128/CDLI.10.2.332-335.2003)

DE GREGORIO, E.; RAPPUOLI, R. Vaccines for the future: learning from human immunology. **Microbial biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 149-155, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00276.x>

DELLAGOSTIN, O. A.; GRASSMANN, A. A.; HARTWIG, D. D.; FÉLIX, S. R.; DA SILVA, E. F.; MCBRIDE, A. J. Vacinas recombinantes contra a leptospirose. **Vacinas humanas**, v. 7, n. 11, pág. 1215-1224, 2011. DOI: <https://doi.org/10.4161/hv.7.11.17944>

DELLAGOSTIN, O. A.; GRASSMANN, A. A.; RIZZI, C.; SCHUCH, R. A.; JORGE, S.; OLIVEIRA, T. L.; MCBRIDE, A. J. A.; HARTWIG, D. D. Reverse vaccinology: an approach for identifying leptospiral vaccine candidates. **Internacional Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1, p. 158, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms18010158>

DHANDA, S. K.; VIR, P.; RAGHAVA, G. P. Designing of interferon-gamma inducing MHC class-II binders. **Biology direct**, v. 8, n. 1, p. 1-15, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1186/1745-6150-8-30>

DIAMENT, D.; BRUNIALTI, M. K. C.; ROMERO, E. C.; KALLAS, E. G.; SALOMAO, R. Peripheral blood mononuclear cell activation induced by *Leptospira interrogans* glycolipoprotein. **Infection and immunity**, v. 70, n. 4, p. 1677-1683, 2002. DOI: [10.1128/IAI.70.4.1677-1683.2002](https://doi.org/10.1128/IAI.70.4.1677-1683.2002)

DJELLOUADJI, Z.; ROUX, V.; RAOULT, D.; KODJO, A.; DRANCOURT, M. Rapid MALDI-TOF mass spectrometry identification of *Leptospira* organisms. **Veterinary**

microbiology, v. 158, n. 1-2, p. 142-146, 2012. DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.01.028>

DONG, R.; CHU, Z.; YU, F.; ZHA, Y. Contriving multi-epitope subunit of vaccine for COVID-19: immunoinformatics approaches. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 1784, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01784>

DOYTCHINOVA, I. A.; FLOWER, D. R. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. **BMC bioinformatics**, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-4>

ELLIS, W. A. Animal leptospirosis. **Leptospira and leptospirosis**, p. 99-137, 2015. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_6

ELLIS, W. A.; MCDOWELL, S. W. J.; MACKIE, D. P.; POLLOCK, J. M.; TAYLOR, M. J. Immunity to bovine leptospirosis. In: **Proceedings of the 21st world buiatrics congress**, Punta del Este, Uruguay. 2000. p. 10601-10611.

ELLIS, W.A. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. Veterinary Clinics of North America: **Food Animal Practice**, v.10, n.3, p.463-478, 1994. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30532-6](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30532-6)

ESCÓCIO, C.; GENOVEZ, M. E.; CASTRO, V.; PIATTI, R. M.; GABRIEL, F. H. L.; CHIEBAO, D. P.; AZEVEDO, S. S.; VIEIRA, S. R.; CHIBA, M. Influência das condições ambientais na transmissão da leptospirose entre criações de ovinos e bovinos da região de Sorocaba, SP. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 3, p. 371-379, 2010.

ESHGHI, A.; CULLEN, P. A.; COWEN, L.; ZUERNER, R. L.; CAMERON, C. E. Global proteome analysis of *Leptospira interrogans*. **Journal of proteome research**, v. 8, n. 10, p. 4564-4578, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1021/pr9004597>

FAINE, S. B.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. *Leptospira* and leptospirosis. 2.ed. Melbourne, Australia: MediSci, 1999. 296p.

FÁVERO, J. F.; DE ARAÚJO, H. L.; LILENBAUM, W.; MACHADO, G.; TONIN, A. A.; BALDISSERA, M. D.; STEFANI, L. M.; DA SILVA, A. S. Bovine leptospirosis: Prevalence, associated risk factors for infection and their cause-effect relation. **Microbial Pathogenesis**, v. 107, p. 149-154, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.032>

FIALHO, R. N.; MARTINS, L.; PINHEIRO, J. P.; BETTENCOURT, B. F.; COUTO, A. R.; SANTOS, M. R.; PEIXOTO, M. J.; GARRETT, F.; LEAL, J.; TOMÁS, A. M.; BRUGES-ARMAS, J. Role of human leukocyte antigen, killer-cell immunoglobulin-like receptors, and cytokine gene polymorphisms in leptospirosis. **Human immunology**, v. 70, n. 11, p. 915-920, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2009.08.007>

FOOKOLAE, S. P.; TALEBISHELIMAKI, S.; RAD, M. T. S.; ROKNI, M. A. In silico prediction of B cell epitopes of the hemolysis-associated protein 1 for vaccine design against leptospirosis. **Journal of Current Biomedical Reports**, v. 1, n. 1, p. 32-37, 2020.

FORTES, T. P.; NETO, A. C. P. S.; MACHADO, G. B.; DEWES, C.; PACHECO, P. S. SILVA, J. P. M.; VASCONCELLOS, F. A.; DA SILVA, É. F. Potencial antigênico de

proteínas recombinantes de *Leptospira Interrogans*. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 56629-56636, 2020. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv6n8-177>

FOUTS, D. E.; MATTHIAS, M. A.; ADHIKARLA, H.; ADLER, B.; AMORIM-SANTOS, L.; BERG, D. E.; BULACH, D.; BUSCHIAZZO, A.; CHANG, Y. F.; GALLOWAY, R. L.; HAAKE, D. A.; HAFT, D.H.; HARTSKEERL, R.; KO, A.I.; LEVETT, P. N.; MATSUNAGA, J.; MECHALY, A. E.; MONK, J. M.; NASCIMENTO, A. L. T.; NELSON, K. E.; PALSSON, B.; PEACOCK, S. J.; PICARDEAU, M.; RICALDI, J. N.; THAIPANDUNGPANIT, J.; WUNDER JR., E. A.; YANG, X. F.; ZHANG, J. J.; VINETZ, J. M. What makes a bacterial species pathogenic?: comparative genomic analysis of the genus *Leptospira*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 2, p. e0004403, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004403>

GASTEIGER E.; HOOGLAND C.; GATTIKER A.; DUVAUD S.; WILKINS M.R.; APPEL R.D.; BAIROCH A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. **The proteomics protocols handbook**, p. 571-607, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>

GRASSMANN, A. A.; SOUZA, J. D.; MCBRIDE, A. J. A universal vaccine against leptospirosis: are we going in the right direction?. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 256, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00256>

GUERREIRO, H.; CRODA, J.; FLANNERY, B.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; REIS, M. G.; LEVETT, P. N.; KO, A. I.; HAAKE, D. A. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. **Infection and immunity**, v. 69, n. 8, p. 4958-4968, 2001. DOI: 10.1128/IAI.69.8.4958-4968.2001

HAAKE, D. A.; CHAO, G.; ZUERNER, R. L.; BARNETT, J. K.; BARNETT, D.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; LEVETT, P. N.; BOLIN, C. A. 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. DOI: 10.1128/IAI.68.4.2276-2285.2000.

HAAKE, D. A.; LEVETT, P. N. Leptospirosis in humans. **Leptospira and leptospirosis**, p. 65-97, 2015. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_5

HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. *Leptospira*: a spirochaete with a hybrid outer membrane. **Molecular microbiology**, v. 77, n. 4, p. 805-814, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07262.x>

HAAKE, D. A.; MAZEL, M. K.; MCCOY, A. M.; MILWARD, F.; CHAO, G.; MATSUNAGA, J.; WAGAR, E. A. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. **Infection and immunity**, v. 67, n. 12, p. 6572-6582, 1999. DOI: 10.1128/IAI.67.12.6572-6582.

HAAKE, D. A.; SUCHARD, M. A.; KELLEY, M. M.; DUNDOO, M.; ALT, D. P.; ZUERNER, R. L. Molecular evolution and mosaicism of leptospiral outer membrane proteins involves horizontal DNA transfer. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 9, p. 2818-2828, 2004. DOI: 10.1128/JB.186.9.2818-2828.2004

HAAKE, D. A.; WALKER, E. M.; BLANCO, D. R.; BOLIN, C. A.; MILLER, M. N.; LOVETT, M. A. Changes in the surface of *Leptospira interrogans* serovar Grippotyphosa during in vitro cultivation. **Infection and immunity**, v. 59, n. 3, p. 1131-1140, 1991.

HARTWIG, D. D.; FORSTER, K. M.; OLIVEIRA, T. L.; AMARAL, M.; MCBRIDE, A. J.; DELLAGOSTIN, O. A. A prime-boost strategy using the novel vaccine candidate, LemA, protects hamsters against leptospirosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 20, n. 5, p. 747-752, 2013. DOI: 10.1128/CVI.00034-13

HARTWIG, D. D.; SEIXAS, F. K.; CERQUEIRA, G. M.; MCBRIDE, A. J.; DELLAGOSTIN, O. A. Characterization of the immunogenic and antigenic potential of putative lipoproteins from *Leptospira interrogans*. **Current microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1337-1341, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9865-1>

HAUK, P.; MACEDO, F.; ROMERO, E. C.; VASCONCELLOS, S. A.; DE MORAIS, Z. M.; BARBOSA, A. S.; HO, P. L. In LipL32, the major leptospiral lipoprotein, the C terminus is the primary immunogenic domain and mediates interaction with collagen IV and plasma fibronectin. **Infection and immunity**, v. 76, n. 6, p. 2642-2650, 2008. DOI: 10.1128/IAI.01639-07

HUMPHRYES, P. C.; WEEKS, M. E.; COLDHAM, N. G. Characterisation of the proteome of *Leptospira interrogans* serovar Canicola as a resource for the identification of common serovar immunogenic proteins. **International Journal of Proteomics**, v. 2014, 2014. DOI: 10.1155 / 2014/572901

HUMPHRYES, P. C.; WEEKS, M. E.; GIELBERT, A.; THOMSON, G.; COLDHAM, N. G. Analysis of multiple *Leptospira interrogans* serovar Canicola vaccine proteomes and identification of LipL32 as a biomarker for potency. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 4, p. 587-593, 2012. DOI: 10.1128 / CVI.05622-11

ISOGAI, E.; ISOGAI, H.; FUJII, N.; OGUMA, K. Macrophage activation by leptospiral lipopolysaccharide. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v. 273, n. 2, p. 200-208, 1990. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0934-8840\(11\)80250-1](https://doi.org/10.1016/S0934-8840(11)80250-1)

ISOGAI, E.; KITAGAWA, H.; ISOGAI, H.; KUREBAYASHI, Y.; ITO, N. Phagocytosis as a defense mechanism against infection with leptospires. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. Series A: Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology*, v. 261, n. 1, p. 65-74, 1986. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0176-6724\(86\)80063-3](https://doi.org/10.1016/S0176-6724(86)80063-3)

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. **Science**, v. 327, n. 5963, p. 291-295, 2010. DOI: 10.1126/science.1183021

JIN, D.; OJCIUS, D. M.; SUN, D.; DONG, H.; LUO, Y.; MAO, Y.; YAN, J. *Leptospira interrogans* induces apoptosis in macrophages via caspase-8-and caspase-3-dependent pathways. **Infection and immunity**, v. 77, n. 2, p. 799-809, 2009. DOI: 10.1128/IAI.00914-08

KALITA, P.; PADHI, A. K.; ZHANG, K. Y.; TRIPATHI, T. Design of a peptide-based subunit vaccine against novel coronavirus SARS-CoV-2. **Microbial Pathogenesis**, v. 145, p. 104236, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104236>

KAR, T.; NARSARIA, U.; BASAK, S.; DEB, D.; CASTIGLIONE, F.; MUELLER, D. M.; SRIVASTAVA, A. P. A candidate multi-epitope vaccine against SARS-CoV-2. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-24, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67749-1>

LATA, K. S.; KUMAR, S.; VAGHASIA, V.; SHARMA, P.; BHAIAPPANVAR, S. B.; SONI, S.; DAS, J. 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. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25281-3>

LATA, K. S.; VAGHASIA, V.; BHAIAPPANVAR, S.; PATEL, S.; DAS, J. Vaccine Design Against Leptospirosis Using an Immunoinformatic Approach. **Methods in molecular biology** (Clifton, NJ), v. 2131, p. 173-184, 2020. DOI: [10.1007/978-1-0716-0389-5_7](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0389-5_7)

LAZARSKI, C. A.; CHAVES, F. A.; JENKS, S. A.; WU, S.; RICHARDS, K. A.; WEAVER, J. M.; SANT, A. J. The kinetic stability of MHC class II: peptide complexes is a key parameter that dictates immunodominance. **Immunity**, v. 23, n. 1, p. 29-40, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.05.009>

LEEMANS, J. C.; CASSEL, S. L.; SUTTERWALA, F. S. Sensing damage by the NLRP3 inflammasome. **Immunological reviews**, v. 243, n. 1, p. 152-162, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01043.x>

LESSA-AQUINO, C.; WUNDER JR; E. A., LINDOW; J. C.; RODRIGUES, C. B.; PABLO, J.; NAKAJIMA, R.; JASINSKAS, A.; LIANG, L.; REIS, M. G.; KO, A. I.; MEDEIROS, M. A.; FELGNER, P. L. Proteomic features predict seroreactivity against leptospiral antigens in leptospirosis patients. **Journal of proteome research**, v. 14, n. 1, p. 549-556, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1021/pr500718t>

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**. v.14, n.2, p.296-326, 2001.

LI, W.; JOSHI, M. D.; SINGHANIA, S.; RAMSEY, K. H.; MURTHY, A. K. Peptide vaccine: progress and challenges. **Vaccines**, v. 2, n. 3, p. 515-536, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines2030515>

LOIMARANTA, V.; HYTÖNEN, J.; PULLIAINEN, A. T.; SHARMA, A.; TENOVUO, J.; STRÖMBERG, N; FINNE, J. Leucine-rich repeats of bacterial surface proteins serve as common pattern recognition motifs of human scavenger receptor gp340. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 28, p. 18614-18623, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M900581200>

LOUREIRO, A. P.; LILENBAUM, W. Genital bovine leptospirosis: A new look for an old disease. **Theriogenology**, v. 141, p. 41-47, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.011>

LOWANITCHAPAT, A.; PAYUNGPORN, S.; SEREEMASPUN, A.; EKPO, P.; PHULSUKSOMBATI, D.; POOVORAWAN, Y.; CHIRATHAWORN, C. Expression of TNF- α , TGF- β , IP-10 and IL-10 mRNA in kidneys of hamsters infected with pathogenic *Leptospira*. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 33, n. 5, p. 423-434, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2009.05.001>

MAENAKA, K.; JONES, E. Y. MHC superfamily structure and the immune system. **Current opinion in structural biology**, v. 9, n. 6, p. 745-753, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(99\)00039-1](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(99)00039-1)

MALMSTRÖM, J.; BECK, M.; SCHMIDT, A.; LANGE, V.; DEUTSCH, E. W.; AEBERSOLD, R. Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen

Leptospira interrogans. **Nature**, v. 460, n. 7256, p. 762-765, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature08184>

MARINHO, M. Leptospirose: fatores epidemiológicos, fisiopatológicos e imunopatogênicos. **Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n. 3, p. 428-434, 2012.

MARTINS, G.; LILENBAUM, W. Control of bovine leptospirosis: Aspects for consideration in a tropical environment. **Research in Veterinary Science**, v.112, 156-160, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.03.021>

MATSUI, M.; ROULEAU, V.; BRUYÈRE-OSTELLS, L.; GOARANT, C. Gene expression profiles of immune mediators and histopathological findings in animal models of leptospirosis: comparison between susceptible hamsters and resistant mice. **Infection and immunity**, v. 79, n. 11, p. 4480-4492, 2011. DOI: 10.1128/IAI.05727-11

MATSUNAGA, J.; BAROCCHI, M. A.; CRODA, J.; YOUNG, T. A.; SANCHEZ, Y.; SIQUEIRA, I.; BOLIN, C. A.; REIS, M. G.; RILEY, L. W.; HAAKE, D. A.; KO, A. I. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Molecular microbiology**, v. 49, n. 4, p. 929-946, 2003. DOI:<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03619.x>

MCBRIDE, A. J.; ATHANAZIO, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. Leptospirosis. **Current opinion in infectious diseases**, v. 18, n. 5, p. 376-386, 2005. DOI:10.1097/01.qco.0000178824.05715.2c

MCGRATH, H.; ADLER, B.; VINH, T.; FAINE, S. Phagocytosis of virulent and avirulent leptospires by guinea-pig and human polymorphonuclear leukocytes in vitro. **Pathology**, v. 16, n. 3, p. 243-249, 1984.

MIRAGAIA, L. S. Interação de proteínas de membrana de *Leptospira* com vitronectina humana. 2016. 68f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

MONAHAN, A. M.; CALLANAN, J. J.; NALLY, J. E. Proteomic analysis of *Leptospira interrogans* shed in urine of chronically infected hosts. **Infection and immunity**, v. 76, n. 11, p. 4952-4958, 2008. DOI: 10.1128 / IAI.00511-08

MURRAY, G. L., LO, M., BULACH, D. M., SRIKRAM, A., SEEMANN, T., QUINSEY, N. S., SERMSWAN, R. W.; ALLEN, A.; ADLER, B. Evaluation of 238 antigens of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo for protection against kidney colonisation. **Vaccine**, v. 31, n. 3, p. 495-499, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.11.028>

MURRAY, G. L., SRIKRAM, A., HOKE, D. E., WUNDER, E. A., HENRY, R., LO, M., ZHANG, K.; SERMSWAN, R. W.; KO, A. I.; ADLER, B. Major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with *Leptospira interrogans*. **Infection and immunity**, v. 77, n. 3, p. 952-958, 2009. DOI: 10.1128/IAI.01370-08

NAIMAN, B. M.; ALT, D.; BOLIN, C. A.; ZUERNER, R.; BALDWIN, C. L. 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, 2001a. DOI: 10.1128/IAI.69.12.7550-7558.2001

- NAIMAN, B. M.; ALT, D.; BOLIN, C. A.; ZUERNER, R.; BALDWIN, C. L. 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, 2001b. DOI: 10.1128/IAI.69.12.7550-7558.2001
- NAIMAN, B. M.; BLUMERMAN, S.; ALT, D.; BOLIN, C. A.; BROWN, R.; ZUERNER, R.; BALDWIN, C. L. Evaluation of type 1 immune response in naïve and vaccinated animals following challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo: involvement of WC1+ $\gamma\delta$ and CD4 T cells. **Infection and immunity**, v. 70, n. 11, p. 6147-6157, 2002. DOI: 10.1128/IAI.70.11.6147-6157.2002
- NALLY, J. E., WHITELEGGE, J. P., BASSILIAN, S., BLANCO, D. R., LOVETT, M. A. Characterization of the outer membrane proteome of *Leptospira interrogans* expressed during acute lethal infection. **Infection and immunity**, v. 75, n. 2, p. 766-773, 2007. DOI: 10.1128/IAI.00741-06
- NALLY, J. E.; GRASSMANN, A. A.; PLANCHON, S.; SERGEANT, K.; RENAUT, J.; SESHU, J.; MCBRIDE, A. J.; CAIMANO, M. J. Pathogenic Leptospire modulate protein expression and post-translational modifications in response to mammalian host signals. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 362, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00362>
- NASCIMENTO FILHO, E. G.; VIEIRA, M. L.; TEIXEIRA, A. F.; SANTOS, J. C.; FERNANDES, L. G.; PASSALIA, F. J.; DAROZ, B. B.; ROSSINI, A.; KOCHI, L. T.; CAVENAGUE, M. F.; PIMENTA, D. C.; Nascimento, A. L. T. O. Proteomics as a tool to understand *Leptospira* physiology and virulence: Recent advances, challenges and clinical implications. **Journal of Proteomics**, v. 180, p. 80-87, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.02.025>
- OLI, A. N.; OBIALOR, W. O.; IFEANYICHUKWU, M. O.; ODIMEGWU, D. C.; OKOYEH, J. N.; EMECHEBE, G. O.; ADEJUMO, S. A.; IBEANU, G. C. Immunoinformatics and vaccine development: an overview. **ImmunoTargets and therapy**, v. 9, p. 13, 2020. DOI: 10.2147/ITT.S241064
- ONG, E.; COOKE, M. F.; HUFFMAN, A.; XIANG, Z.; WONG, M. U.; WANG, H.; SEETHARAMAN, M.; VELDEZ, N.; HE, Y. Vaxign2: the second generation of the first Web-based vaccine design program using reverse vaccinology and machine learning. **Nucleic Acids Research**, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkab279>
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL (OIE). Terrestrial Manual. Leptospirosis. chap. 2.1.9., 2014. Disponível em: Acesso em: 08 de janeiro de 2021.
- PAIXÃO, A. P.; SANTOS, H. P.; ALVES, L. M. C.; PEREIRA, H. M.; CARVALHO, R. F. B.; COSTA FILHO, V. M.; OLIVEIRA, E. A. A.; SOARES, D. M.; BESERRA, B. A. *Leptospira* spp. em bovinos leiteiros do estado do Maranhão, Brasil: frequência, fatores de risco e mapeamento de rebanhos reagentes. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.83, p. 1-12, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/1808-1657001022014>
- PATRONOV, A.; DOYTCHINOVA, I. T-CELL EPITOPE VACCINE DESIGN BY IMMUNO INFORMATICS. **Open biology**, v. 3, n. 1, p. 120139, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1098/rsob.120139>

PETZKE, M. M.; BROOKS, A.; KRUPNA, M. A.; MORDUE, D.; SCHWARTZ, I. Recognition of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete, by TLR7 and TLR9 induces a type I IFN response by human immune cells. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 8, p. 5279-5292, 2009. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901390>

PICARDEAU, M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita?. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 297-307, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.5>

PICARDEAU, M.; BULACH, D. M.; BOUCHIER, C.; ZUERNER, R. L.; ZIDANE, N.; WILSON, P. J.; CRENO, S.; KUCZEK, E. S.; BOMMEZZADRI, S.; DAVIS, J. C.; MCGRATHA.; JOHNSON, M. J.; BOURSAUX-EUDE, C.; SEEMANN, T.; ROUY, Z.; COPPEL, R. L.; ROOD, J. I.; LAJUS, A.; DAVIES, J. K.; MÉDIGUE, C.; ADLER, B. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. **PLoS one**, v. 3, n. 2, p. e1607, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001607>

PINNE, M.; HAAKE, D. A. LipL32 is a subsurface lipoprotein of *Leptospira interrogans*: presentation of new data and reevaluation of previous studies. **PLoS one**, v. 8, n. 1, p. e51025, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051025>

PIRES, A.V. Bovinocultura de corte. Piracicaba: FEALQ, v.2, p. 971-975, chap.51, 2010.

PUCHE, R.; FERRÉS, I.; CARABALLO, L.; RANGEL, Y.; PICARDEAU, M.; TAKIFF, H.; IRAOLA, G. *Leptospira venezuelensis* sp. nov., a new member of the intermediate group isolated from rodents, cattle and humans. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, p. 513–517, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002528>

RAJA, V.; NATARAJASEENIVASAN, K. Pathogenic, diagnostic and vaccine potential of leptospiral outer membrane proteins (OMPs). **Critical reviews in microbiology**, v. 41, n. 1, p. 1-17, 2015. DOI: 10.3109/1040841X.2013.787387

RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology. **Current opinion in microbiology**, v. 3, n. 5, p. 445-450, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00119-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00119-3)

SCOCCHI, M.; ROMEO, D.; CINCO, M. Antimicrobial activity of two bactericins against spirochetes. **Infection and immunity**, v. 61, n. 7, p. 3081-3083, 1993.

SEIXAS, F. K., DA SILVA, É. F., HARTWIG, D. D., CERQUEIRA, G. M., AMARAL, M., FAGUNDES, M. Q., DOSSA, R. G.; DELLAGOSTIN, O. A. Recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing the LipL32 antigen of *Leptospira interrogans* protects hamsters from challenge. **Vaccine**, v. 26, n. 1, p. 88-95, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.10.052>

SILVEIRA, M. M.; MONTANO, M. A.; CONRAD, N. L.; SOUZA, J. D.; GRASSMANN, A. A.; MCBRIDE, A. J. A. Vacina inativada associada à proteína de membrana externa contra leptospirose. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 1, n. 2, p. 459-473, 2018.

SINGHVI, N.; SINGH, Y.; SHUKLA, P. Computational approaches in epitope design using DNA binding proteins as vaccine candidate in Mycobacterium tuberculosis. **Infection**,

Genetics and Evolution, v. 83, p. 104357, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104357>

SOARES, P. M. Situação da leptospirose em bovinos destinados ao abate no triângulo mineiro: sorologia, isolamento e epidemiologia. 2018. 99f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

SORIA-GUERRA, R. E.; NIETO-GOMEZ, R.; GOVEA-ALONSO, D. O.; ROSALES-MENDOZA, S. An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: implications on vaccine development. **Journal of biomedical informatics**, v. 53, p. 405-414, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbi.2014.11.003>

SRIKRAM, A.; ZHANG, K.; BARTPHO, T.; LO, M.; HOKE, D. E.; SERMSWAN, R. W.; ADLER, B.; MURRAY, G. L. Cross-protective immunity against leptospirosis elicited by a live, attenuated lipopolysaccharide mutant. **Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 6, p. 870-879, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiq127>

SRIVASTAVA, R.; RAY, S.; VAIBHAV, V.; GOLLAPALLI, K.; JHAVERI, T.; TAUR, S.; DHALI, S.; GOGTAY, N.; THATTE, U.; SRIKANTH, R.; SRIVASTAVA, S. Serum profiling of leptospirosis patients to investigate proteomic alterations. **Journal of proteomics**, v. 76, p. 56-68, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.04.007>

SRIVASTAVA, S.; VERMA, S.; KAMTHANIA, M.; KAUR, R.; BADYAL, R. K.; SAXENA, A. K.; SHIN, H.J.; KOLBE, M.; PANDEY, K. C. Structural basis for designing multiepitope vaccines against COVID-19 infection: In silico vaccine design and validation. **JMIR bioinformatics and biotechnology**, v. 1, n. 1, p. e19371, 2020. DOI: 10.2196/19371

TAHIR UL QAMAR, M.; REHMAN, A.; TUSLEEM, K.; ASHFAQ, U. A.; QASIM, M.; ZHU, X.; FATIMA, I.; SHAHID, F.; CHEN, L. L. Designing of a next generation multiepitope based vaccine (MEV) against SARS-COV-2: Immunoinformatics and in silico approaches. **PLoS one**, v. 15, n. 12, p. e0244176, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244176>

TEIXEIRA, A. F.; DE MORAIS, Z. M.; KIRCHGATTER, K.; ROMERO, E. C.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T. Features of two new proteins with OmpA-like domains identified in the genome sequences of *Leptospira interrogans*. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0122762, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122762>

THONGBOONKERD, V. Biomarker discovery in glomerular diseases using urinary proteomics. **Proteomics Clinical Applications**, v. 2, n. 10-11, p. 1413-1421, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1002/prca.200800036>

TIZARD, I. *Imunologia Veterinária*. 10^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2019. 101p.

UL QAMAR, M. T.; SHAHID, F.; ASLAM, S.; ASHFAQ, U. A.; ASLAM, S.; FATIMA, I.; FAREED, M.M.; ZOHAIB, A.; CHEN, L. L. Reverse vaccinology assisted designing of multiepitope-based subunit vaccine against SARS-CoV-2. **Infectious diseases of poverty**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2020b. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40249-020-00752-w>

UL QAMAR, M.T.; REHMAN, A.; TUSLEEM, K.; ASHFAQ, U. A.; QASIM, M.; ZHU, X.; FATIMA, I.; SHAHID, F.; CHEN, L. L. Designing of a next generation multiepitope based

vaccine (MEV) against SARS-COV-2: Immunoinformatics and in silico approaches. **PloS one**, v. 15, n. 12, p. e0244176, 2020a. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244176>

VIEIRA, M. L.; DE MORAIS, Z. M.; GONÇALES, A. P.; ROMERO, E. C.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. Lsa63, a newly identified surface protein of *Leptospira interrogans* binds laminin and collagen IV. **Journal of Infection**, v. 60, n. 1, p. 52-64, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2009.10.047>

VIEIRA, M. L.; FERNANDES, L. G.; DOMINGOS, R. F.; OLIVEIRA, R.; SIQUEIRA, G. H.; SOUZA, N. M.; TEIXEIRA, A. R. F.; ATZINGEN, M. V.; NASCIMENTO, A. L. T. O. Leptospiral extracellular matrix adhesins as mediators of pathogen–host interactions. **FEMS Microbiology Letters**, v. 352, n. 2, p. 129-139, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12349>

VIEIRA, M. L.; PIMENTA, D. C.; DE MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. Proteome analysis of *Leptospira interrogans* virulent strain. **The open microbiology journal**, v. 3, p. 69, 2009. DOI: 10.2174 / 1874285800903010069

VILAYSANE, A.; CHUN, J.; SEAMONE, M. E.; WANG, W.; CHIN, R.; HIROTA, S.; LI, Y.; CLARK, S. A.; TSCHOPP, J.; TRPKOV, K.; HEMMELGARN, B. R.; BECK, P. L.; MURUVE, D. A. The NLRP3 inflammasome promotes renal inflammation and contributes to CKD. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 21, n. 10, p. 1732-1744, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1681/ASN.2010020143>

WANDERSMAN, C.; STOJILJKOVIC, I. Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, n. 2, p. 215-220, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00078-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00078-3)

WANG, B. O. Y. A. O.; SULLIVAN, J. A.; SULLIVAN, G. W.; MANDELL, G. L. Role of specific antibody in interaction of leptospires with human monocytes and monocyte-derived macrophages. **Infection and immunity**, v. 46, n. 3, p. 809-813, 1984.

WANG, H.; WU, Y.; OJCIUS, D. M.; YANG, X. F.; ZHANG, C.; DING, S.; YAN, J. Leptospiral hemolysins induce proinflammatory cytokines through Toll-like receptor 2-and 4-mediated JNK and NF- κ B signaling pathways. **PloS one**, v. 7, n. 8, p. e42266, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042266>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. 2003. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42667/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf>. Acesso em 30 jun, 2021.

WOLFF, D. G.; CASTIBLANCO-VALENCIA, M. M.; ABE, C. M.; MONARIS, D.; MORAIS, Z. M.; SOUZA, G. O.; VASCONCELLOS, S. A.; ISAAC, L.; ABREU, P. A. E.; BARBOSA, A. S. Interaction of *Leptospira* elongation factor Tu with plasminogen and complement factor H: a metabolic leptospiral protein with moonlighting activities. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e81818, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081818>

YAN, W.; FAISAL, S. M.; MCDONOUGH, S. P.; CHANG, C. F.; PAN, M. J.; AKEY, B.; CHANG, Y. F. Identification and characterization of OmpA-like proteins as novel vaccine candidates for Leptospirosis. **Vaccine**, v. 28, n. 11, p. 2277-2283, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.12.071>

YANG, X.; YU, X. An introduction to epitope prediction methods and software. **Reviews in medical virology**, v. 19, n. 2, p. 77-96, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1002/rmv.602>

YEAMAN, M. R. Platelets in defense against bacterial pathogens. **Cellular and molecular life sciences**, v. 67, n. 4, p. 525-544, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0210-4>

ZENG, L. B.; ZHUANG, X. R.; HUANG, L. L.; ZHANG, Y. Y.; CHEN, C. Y.; DONG, K.; ZHANG, Y.; CUI, Z. L.; DING, X. L.; CHANG, Y. F.; GUO, X. K.; ZHU, Y. Z. Comparative subproteome analysis of three representative *Leptospira interrogans* vaccine strains reveals cross-reactive antigens and novel virulence determinants. **Journal of proteomics**, v. 112, p. 27-37, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.08.015>

ZENG, L.; ZHANG, Y.; ZHU, Y.; YIN, H.; ZHUANG, X.; ZHU, W.; GUO, X.; QIN, J. Extracellular proteome analysis of *Leptospira interrogans* serovar Lai. **Omics: a journal of integrative biology**, v. 17, n. 10, p. 527-535, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1089/omi.2013.0043>

ZHONG, Y.; CHANG, X.; CAO, X. J.; ZHANG, Y.; ZHENG, H.; ZHU, Y.; CAI, C.; CUI, Z.; ZHANG, Y.; LI, Y. Y.; JIANG, X. G.; ZHAO, G. P.; WANG, S.; LI, Y.; ZENG, R.; LI, X.; GUO, X. K. Comparative proteogenomic analysis of the *Leptospira interrogans* virulence-attenuated strain IPAV against the pathogenic strain 56601. **Cell research**, v. 21, n. 8, p. 1210-1229, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1038/cr.2011.46>

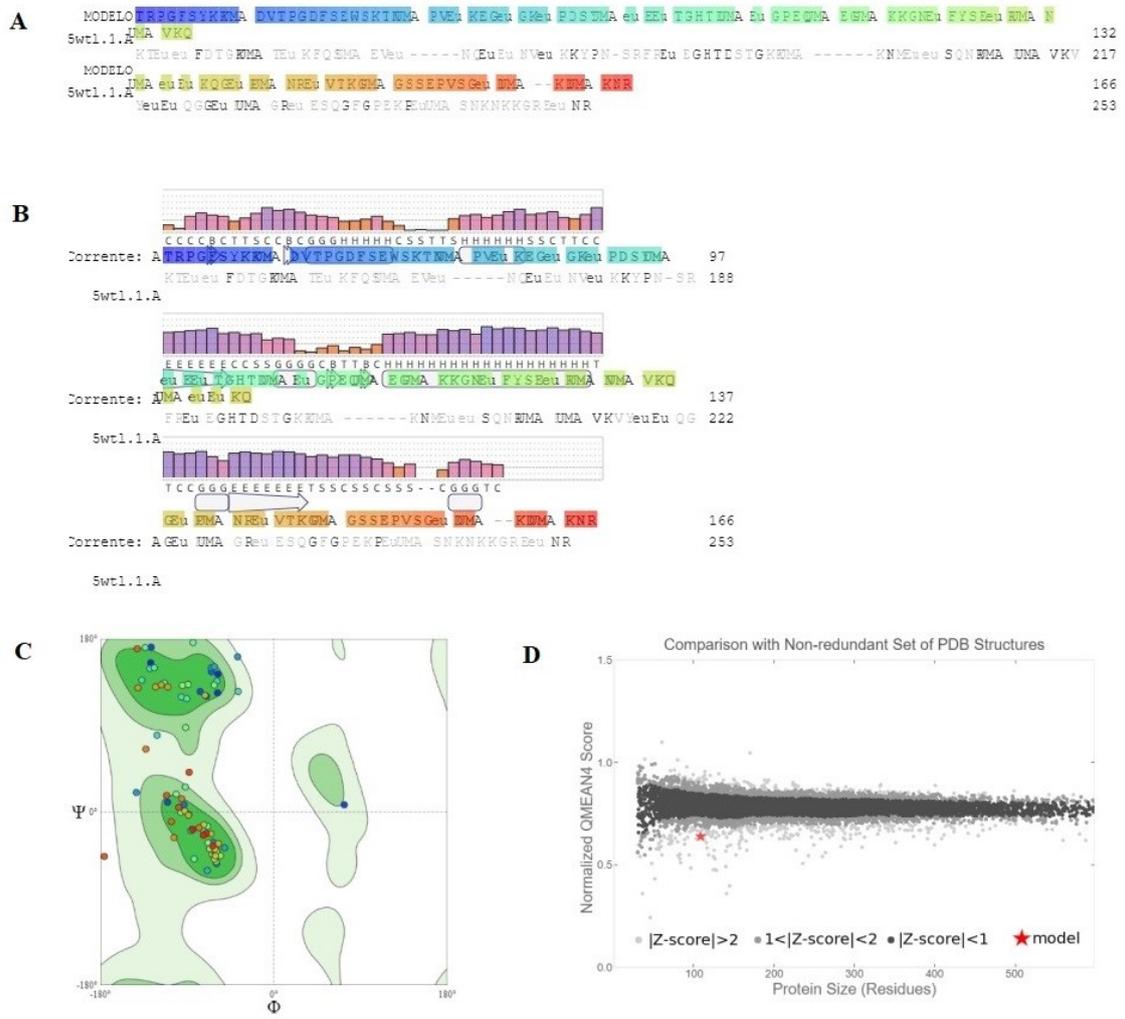
ZUERNER R. L. Host Response to *Leptospira* Infection. In: ADLER B. (eds) *Leptospira* and Leptospirosis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 387. Springer, Berlin, Heidelberg. 2015. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_9

ZUERNER, R. L.; ALT, D. P.; PALMER, M. V. Development of chronic and acute golden Syrian hamster infection models with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. **Veterinary pathology**, v. 49, n. 2, p. 403-411, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1177/0300985811409252>

ZUERNER, R. L.; ALT, D. P.; PALMER, M. V.; THACKER, T. C.; OLSEN, S. C. *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo vaccine induces a Th1 response, activates NK cells, and reduces renal colonization. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, n. 4, p. 684-691, 2011. DOI: [10.1128/CVI.00288-10](https://doi.org/10.1128/CVI.00288-10)

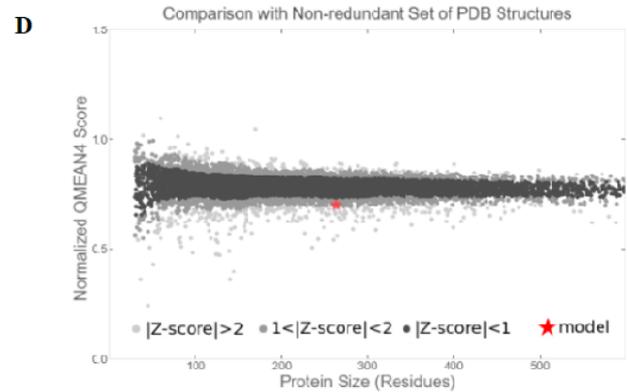
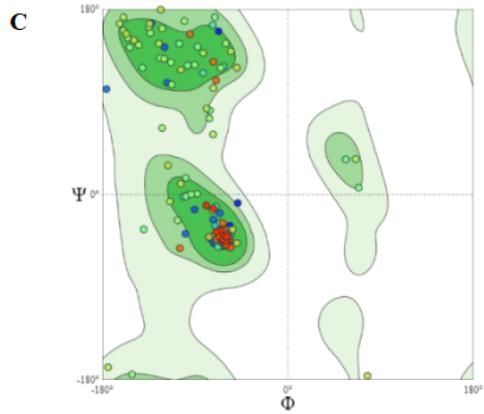
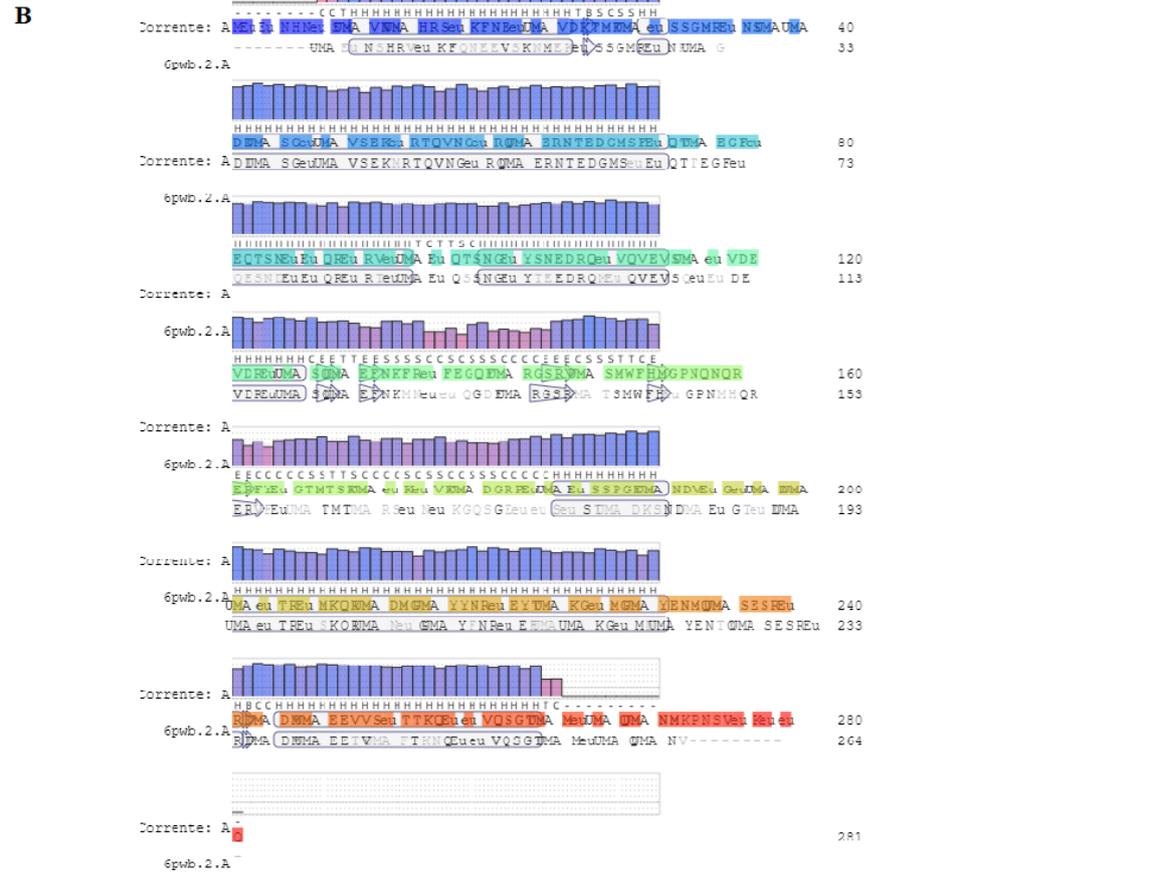
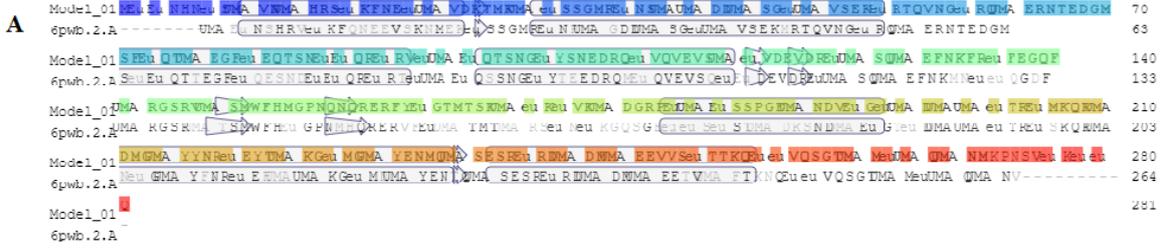
APÊNDICE A – ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA REALIZADAS PARA A ELABORAÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL E VALIDAÇÃO DA MODELAGEM DAS PROTEÍNAS Loa 22, FLAGELINA, FATOR DE ELONGAÇÃO TU E FATOR DE ELONGAÇÃO TS E LipL32

Figura 1 - Análises realizadas no programa Swiss-model para construção da estrutura tridimensional da proteína Loa 22 (A0A0A7KLA8), a partir das sequências de aminoácidos obtidas no proteoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20. **A.** Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína Loa 22 com o Template. **B.** Adição do gráfico de barras indicando as regiões de maior enovelamento na estrutura da proteína. **C.** Gráfico de Ramachandran evidenciando a aceitabilidade do modelo com base na estequiometria das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos da estrutura. **D.** Gráfico descritor de qualidade indicando a validação da estrutura.



Fonte: A autora.

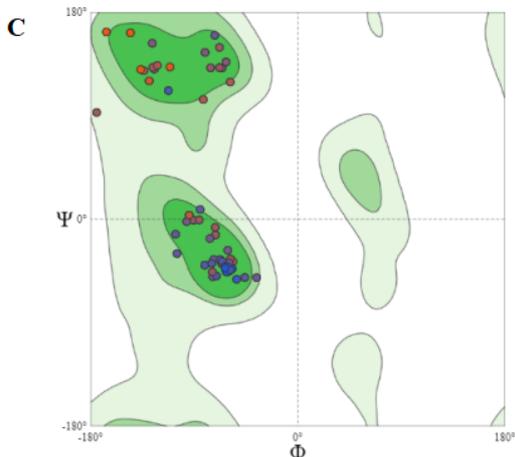
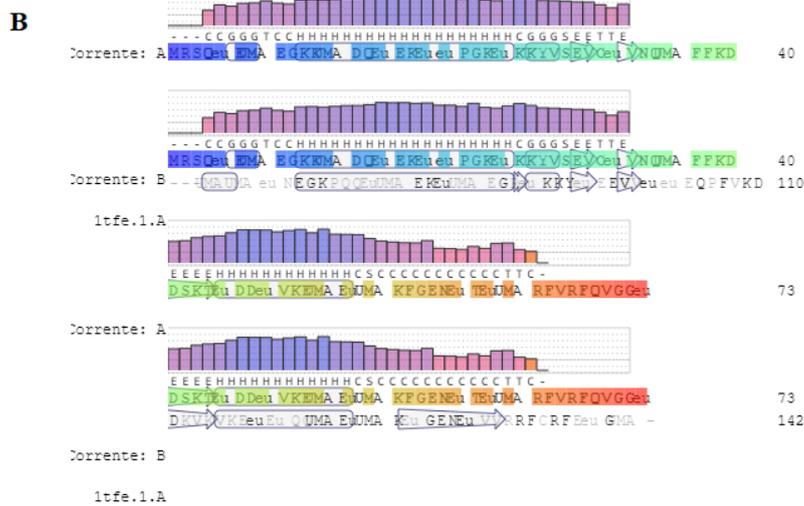
Figura 2 - Análises realizadas no programa Swiss-model para construção da estrutura tridimensional da proteína Flagelina (A0A3S9KKN1), a partir das sequências de aminoácidos obtidas no proteoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20. **A.** Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína Flagelina com o Template. **B.** Adição do gráfico de barras indicando as regiões de maior enovelamento na estrutura da proteína. **C.** Gráfico de Ramachandran evidenciando a aceitabilidade do modelo com base na estereoquímica das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos da estrutura. **D.** Gráfico descritor de qualidade indicando a validação da estrutura.



Fonte: A autora.

Figura 3 - Análises realizadas no programa Swiss-model para construção da estrutura tridimensional da proteína Fator de alongação Tu (M3GCP1), a partir das sequências de aminoácidos obtidas no proteoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20. **A.** Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína Fator de alongação Tu com o Template. **B.** Adição do gráfico de barras indicando as regiões de maior enovelamento na estrutura da proteína. **C.** Gráfico de Ramachandran evidenciando a aceitabilidade do modelo com base na estereoquímica das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos da estrutura. **D.** Gráfico descritor de qualidade indicando a validação da estrutura.

Figura 4 - Análises realizadas no programa Swiss-model para construção da estrutura tridimensional da proteína Fator de alongação Ts (M6HEN0), a partir das sequências de aminoácidos obtidas no proteoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20. **A.** Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína Fator de alongação Ts com o Template. **B.** Adição do gráfico de barras indicando as regiões de maior enovelamento na estrutura da proteína. **C.** Gráfico de Ramachandran evidenciando a aceitabilidade do modelo com base na estereoquímica das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos da estrutura. **D.** Gráfico descritor de qualidade indicando a validação da estrutura.



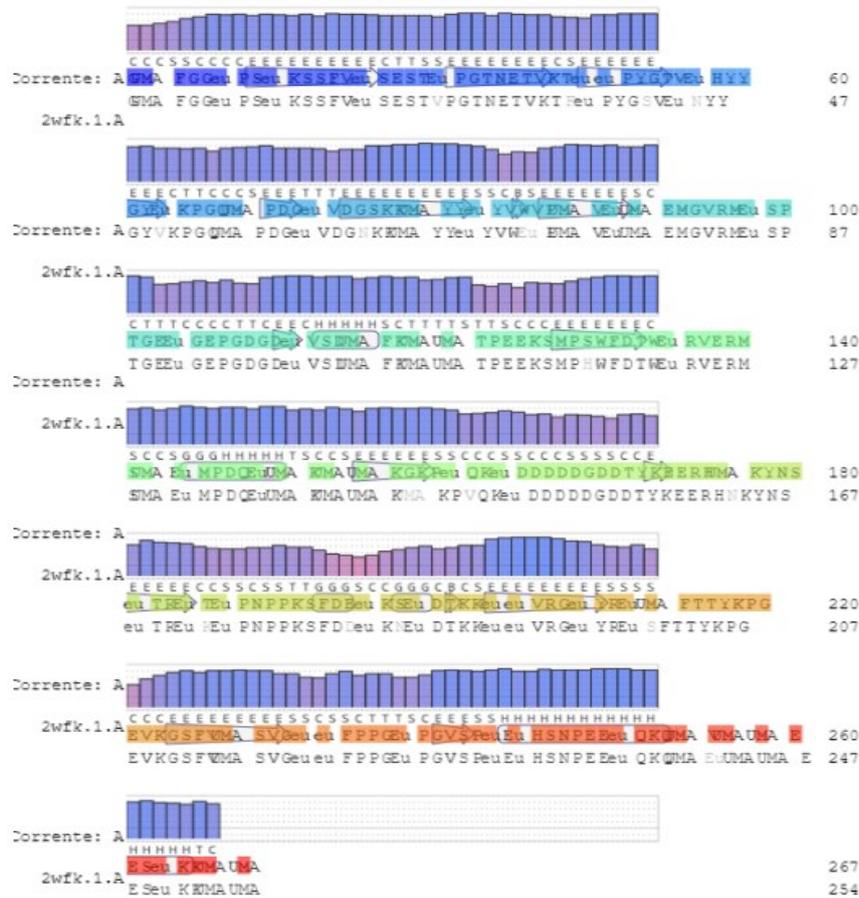
Fonte: A autora.

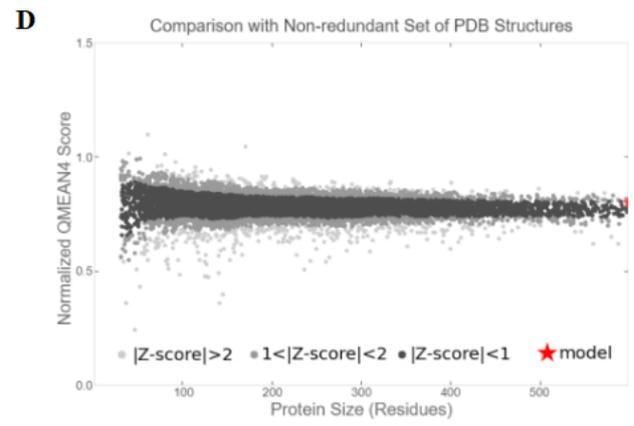
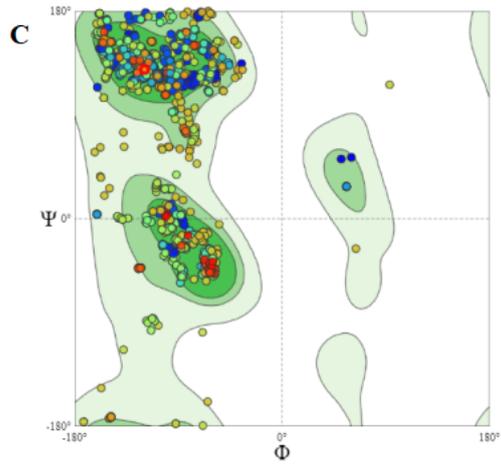
Figura 5 - Análises realizadas no programa Swiss-model para construção da estrutura tridimensional da proteína LipL32 (A0A2M9XTF4), a partir das sequências de aminoácidos obtidas no proteoma de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa M20. **A.** Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína LipL32 com o Template. **B.** Adição do gráfico de barras indicando as regiões de maior enovelamento na estrutura da proteína. **C.** Gráfico de Ramachandran evidenciando a aceitabilidade do modelo com base na estereoquímica das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos da estrutura. **D.** Gráfico descritor de qualidade indicando a validação da estrutura.

A

MODELO: A **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 95
 --- **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 95
 MODELO: B **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 95
 --- **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 95
 MODELO: C **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 95
 --- **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 95
 MODELO: D **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 95
 --- **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 95
 MODELO: E **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 95
 --- **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 95
 MODELO: F **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 95
 GMA FGGeu PSeu KSSFVeu SEStVPGTNETVKTReu PYG@VEU || YGY/KPGGMA PDGeu VDG/KKMA YYeu YVWEMA EMA VEUMA EMGV 82
 MODELO: G **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 170
 --- **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 170
 MODELO: H **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 170
 --- **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 170
 MODELO: I **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 170
 --- **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 170
 MODELO: J **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 170
 --- **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 170
 2wfk.1.A **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 170
 --- **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 170
 MODELO: A **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 170
 --- **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 170
 MODELO: B **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 157
 KREERMA KYNSeu TRSeu TRSeu PNPpKSFDeu KSeu DTKReu VRGeu YReu @FTTYKPGEVKGSFWMA SVGeu FPPGeu PGVSeu 245
 --- KREERMA KYNSeu TRSeu TRSeu PNPpKSFDeu KSeu DTKReu VRGeu YReu @FTTYKPGEVKGSFWMA SVGeu FPPGeu PGVSeu 245
 MODELO: C **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 245
 --- **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 245
 MODELO: D **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 245
 --- **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 245
 MODELO: E **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 245
 --- **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 245
 MODELO: F **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 245
 --- **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 245
 MODELO: G **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 245
 --- **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 245
 MODELO: H **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 232
 KREERH|KYNSeu TRSeu TRSeu PNPpKSFDeu KSeu DTKReu VRGeu YReu @FTTYKPGEVKGSFWMA SVGeu FPPGeu PGVSeu 232
 --- KREERH|KYNSeu TRSeu TRSeu PNPpKSFDeu KSeu DTKReu VRGeu YReu @FTTYKPGEVKGSFWMA SVGeu FPPGeu PGVSeu 232
 MODELO: I **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 267
 --- **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 267
 MODELO: J **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 267
 --- **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 267
 2wfk.1.A **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 267
 --- **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 267
 MODELO: A **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 267
 --- **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 267
 MODELO: B **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 267
 --- **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 267
 MODELO: C **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 267
 --- **GGG GGG KSSFF** **SEST** **POTNETVKT** **eu** **RYG** **VEU** **HY** 267
 HSNPESeu QKQMA @UMAUMA EESeu KMAUMA 254

B





Fonte: A autora.