



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MEDICINA VETERINÀRIA

GABRIELA LETÍCIA DE MOURA E SOUZA

**IDENTIFICAÇÃO DE EPÍTOPOS LINEARES PARA LINFÓCITO B EM
PROTEÍNAS DE *Leptospira interrogans* sorovar *Copenhageni***

AREIA

2024

GABRIELA LETÍCIA DE MOURA E SOUZA

**IDENTIFICAÇÃO DE EPÍTOPOS LINEARES PARA LINFÓCITO B EM
PROTEÍNAS DE *Leptospira interrogans* sorovar *Copenhageni***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada ao Programa de Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof.(a) Dr.(a) Norma Lúcia de Souza Araújo.

Coorientador: Prof. (a) Dr. (a) Marcia Almeida de Melo.

AREIA

2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S729i Souza, Gabriela Leticia de Moura e.
Identificação de epítomos lineares para linfócito B
em proteínas de *Leptospira interrogans* sorovar
Copenhageni / Gabriela Leticia de Moura e Souza. -
Areia, 2024.
38 f. : il.

Orientação: Norma Lúcia de Souza Araújo.
Coorientação: Marcia Almeida de Melo.
TCC (Graduação) - UFPB/CCA.

1. Medicina Veterinária. 2. Aprendizado de máquina.
3. Bioinformática. 4. Diagnóstico. 5. Leptospirose. 6.
. I. Araújo, Norma Lúcia de Souza. II. Melo, Marcia
Almeida de. III. Título.

UFPB/CCA-AREIA

CDU 636.09 (02)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COORDENAÇÃO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS II – AREIA - PB**

DEFESA DO TRABALHO DE GRADUAÇÃO

Aprovada em 30/10/2024.

**“IDENTIFICAÇÃO DE EPÍTOPOS LINEARES PARA LINFÓCITO B EM
PROTEÍNAS DE *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni”**

Autor: GABRIELA LETÍCIA DE MOURA E SOUZA

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Norma Lúcia de Souza Araújo (Orientador)
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Documento assinado digitalmente
gov.br MARCIA ALMEIDA DE MELO
Data: 03/11/2024 17:15:42-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Marcia Almeida de Melo (Examinador)
Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

M.V Marquiliano Farias de Moura (Examinador)
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Á minha mãe, meu pai e professores, dedico. Sem a ajuda de todos, eu não teria chegado até aqui hoje.

AGRADECIMENTOS

À Deus porque minha mãe diz que ele nos protege com muito amor e cuidado.

À minha mãe por ter acreditado no meu sonho, por estar comigo sempre que pôde quando eu precisei, e vem sempre me incentivando para que eu possa realizar os meus objetivos e por sempre me apoiar dentro e fora do ambiente acadêmico.

Ao meu pai por me dar apoio para estar em Areia, em Patos, por me proporcionar conforto para realizar minhas atividades diárias, por finalmente ter deixado eu ficar com Maru.

Aos amigos: Aline, Bruna e Barbosa que me ajudaram com a juntada de documentos e deslocamento de João Pessoa até Areia para fazer minha matrícula no Curso de Medicina Veterinária.

À Profa. Dra. Ana Cristina por todo apoio me dado para minha inclusão na sala de aula e em todos os ambientes.

Aos meus apoiadores: Ewerton, Luana, Jéssica, Catherine, Michelly, Leila.

À minha orientadora, Profa. Dra. Norma Lúcia de Souza Araújo, por me incentivar a seguir naquilo que minha mente tenta alcançar, acreditando em mim e na realização deste estudo,

À minha Co Orientadora Profa. Dra. Marcia Almeida de Melo, pela oportunidade em me receber na UFCG de Patos, por ter paciência em me transmitir um conteúdo novo.

À Mestranda Juliana Freitas de Sousa pela paciência em me ajudar no meu projeto, pelos vídeos gravados para me apoiar.

Ao Prof. MSc. Marquiliano Farias de Moura,

Às profas. Dras. Fabiana Satake, Gisele, Sara, Lara Toledo, Isabela, Ivia.

Aos Profs. Drs. Alexandre, Rosemberg, Felipe, Luiz Eduardo, Suedney, Rafael.

À MV Dra. Caroline por abrir as portas para estágio na clínica 4 Patas em João Pessoa, e me orientar com muita paciência e por confiar em mim, serei eternamente grata.

Ao MV Thiago por me apoiar nos deslocamentos constantes de João Pessoa para a UFPB Areia.

Aos meus amigos de curso pela amizade, por compartilharem comigo esses anos de graduação e pela ajuda dentro e fora da universidade.

Aos professores, técnicos e residentes do Hospital Veterinário de Areia-PB por contribuírem na minha formação acadêmica.

À Profa. Dra. Carla pela oportunidade de estagiar na laticínios.

À equipe de laticínios por todo ensinamento e troca de experiências.

À Graça, Ceiça e Cicera pelo apoio fora da universidade.

À Dra. Thais Aranha por ter me ajudado fisicamente para que eu pudesse retornar às atividades normais.

Aos meus animais de estimação: Priscilla, Pantera e Laika (cadelas in memoriam), Astro (calopsita in memoriam), Bravo (calopsita), Chucrutes (hamster), Kiara e Espirro (gatas), Maru e Mel (cadelas) que me apoiaram emocionalmente e me incentivaram a seguir meu caminho na veterinária.

“O autismo vem com seu próprio conjunto de desafios, mas também com tantas forças únicas! Quando assumimos que o autista é capaz, ele só precisa de suporte, acomodações e apoio correto para ajudá-lo alcançar o sucesso”

Gretchen Stipp

RESUMO

As bactérias do gênero *Leptospira* são espiroquetas, morfológica e fisiologicamente semelhantes, porém sorológica e fisiologicamente distintas. As leptospiros patogênicas evadem a resposta imunológica e, para a diversidade de sorovares, são necessárias vacinas sorovares-específicas, que não apresentam imunidade duradoura. Esta monografia buscou identificar epítopos para linfócito B em cinco proteínas hipotéticas de membrana de *Leptospira interrogans* sorovar *Copenhageni*, utilizando ferramentas de bioinformática, na expectativa da obtenção de novos antígenos para diagnósticos e vacinas. A análise das proteínas para identificação de domínios, localização celular e predição de epítopos foi realizada nas plataformas: ProtParam, Pfam, InterPro, Prosite, SMART, BcePred, IEDB, ABCpred, DeepTMHMM e SignalP 6.0. Através das ferramentas de bioinformática, foi possível inferir a localização das proteínas hipotéticas Lpra_01, Lpra_02, Lpra_03, Lpra_04 e Lpra_05 de *Leptospira interrogans* sorovar *Copenhageni*, bem como identificar a presença de domínios e de epítopos. Entre as proteínas analisadas, os programas apontaram as proteínas Lpra_01 e Lpra_05 como proteínas de membrana, entretanto, apenas na primeira foram identificados epítopos que podem ser reconhecidos por linfócitos B, entretanto, faz-se necessária a realização de ensaios laboratoriais para confirmação desses resultados.

Palavras-chave: aprendizado de máquina; bioinformática; diagnóstico; leptospirose; vacina.

ABSTRACT

Bacteria of the genus *Leptospira* are spirochetes, morphologically and physiologically similar, but serologically and physiologically distinct. Pathogenic leptospires evade the immune response, and for the diversity of serovars, serovar-specific vaccines are necessary, which do not provide lasting immunity. This monograph sought to identify epitopes for B lymphocytes in five hypothetical membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar *Copenhageni*, by bioinformatics tools, in the hope of obtaining new antigens for diagnostics and vaccines. Protein analysis for domain identification, cellular localization and epitope prediction was performed on the platforms: ProtParam, Pfam, InterPro, Prosite, SMART, BcePred, IEDB, ABCpred, DeepTMHMM and SignIP 6.0. Using bioinformatics tools, it was possible to infer the location of the hypothetical proteins Lpra_01, Lpra_02, Lpra_03, Lpra_04 and Lpra_05 from *Leptospira interrogans* serovar *Copenhageni*, as well as identify the presence of domains and epitopes. Among the proteins analyzed, the programs identified the proteins Lpra_01 and Lpra_05 as membrane proteins, however, only in the first were identified epitopes that can be recognized by B lymphocytes, however, it is necessary to carry out laboratory tests to confirm these results.

Keywords: mbioachine learning; bioinformatics; diagnosis; leptospirosis; vaccine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Esquema anatômico da <i>Leptospira</i> (A) e seu corte transversal (B).	14
Figura 2 –	Ciclo zoonótico da leptospirose, suscetibilidade de vários hospedeiros acidentais e modos de transmissão.....	16
Figura 3 –	Parede celular de <i>Leptospira interrogans</i> e padrões moleculares associados ao patógeno.....	20
Figura 4 –	Resultados do DeepTMHMM para a proteína Lpra_01.....	26
Figura 5 –	Resultados do DeepTMHMM para a proteína Lpra_02.....	26
Figura 6 –	Resultados do DeepTMHMM para a proteína Lpra_03.....	27
Figura 7 –	Resultados do DeepTMHMM para a proteína Lpra_04.....	27
Figura 8 –	Resultados do DeepTMHMM para a proteína Lpra_05.....	28
Figura 9 –	Resultados do SignalP 6.0 para a proteína Lpra_01.....	29
Figura 10 –	Resultados do SignalP 6.0 para a proteína Lpra_02.....	29
Figura 11 –	Resultados do SignalP 6.0 para a proteína Lpra_03.....	30
Figura 12 –	Resultados do SignalP 6.0 para a proteína Lpra_04.....	30
Figura 13 –	Resultados do SignalP 6.0 para a proteína Lpra_05.....	31
Figura 14 –	Domínios identificados pelo Interpro na proteína Lpra_01.....	32
Figura 15 –	Domínios identificados pelo Interpro na proteína Lpra_03.....	32
Figura 16 –	Domínios identificados pelo Interpro na proteína Lpra_04.....	33
Figura 17 –	Domínios identificados pelo Interpro na proteína Lpra_05.....	33
Figura 18 –	Alinhamento das predições de epitopos preditas pelos programas ABCpred, IEDB, BcePred e BepiPred.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela1 – Informações das proteínas LPRA_01, LPRA_02, LPRA_03, LPRA_04 e LPRA_05 analisadas pelo ProtParam.....	25
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	AGENTE ETIOLÓGICO DA LEPTOSPIROSE	14
2.2	CURSO CLÍNICO DA PATOLOGIA	15
2.3	O SISTEMA IMUNE	16
2.3.1	Imunidade Inata	17
2.3.2	Imunidade Adquirida	18
2.3.3	Antígenos	19
2.3.4	A capacidade da leptospira evadir a resposta imunológica	20
3	METODOLOGIA	22
3.1	DO TIPO DA PESQUISA	22
3.2	DA OBTENÇÃO DAS PROTEÍNAS HIPOTÉTICAS	22
3.3	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS PROTEÍNAS HIPOTÉTICAS DE <i>Leptospira interrogans</i> sorovar <i>Copenhageni</i>	22
3.4	PREDIÇÃO E TRIAGEM DE EPÍTOPOS LINEARES POTENCIALMENTE RECONHECIDOS POR LINFÓCITOS B	23
3.5	DEEPTMHMM	23
3.6	SIGNALP 6.0	23
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
	REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Leptospira* são espiroquetas, morfológica e fisiologicamente semelhantes, porém sorológica e fisiologicamente distintas. São procariotos sensíveis, mas persistem em ambiente úmido, de temperatura temperada e pH neutro a ligeiramente alcalino (MCVEY, 2016). É um gênero que possui bactérias patogênicas e não patogênicas, que podem ser encontradas no mundo todo com mais de 200 sorovares distintos.

As espécies patogênicas podem acometer cães, gatos, suínos, equinos, bovinos e seres humanos, causando a leptospirose que é uma doença de caráter zoonótico. Em cada espécie animal, a doença se apresenta de uma maneira diferente, causando abortos em animais prenhes e perdas econômicas relevantes principalmente para criadores de animais de produção.

O sucesso da infecção ocorre pela ligação das leptospiros a componentes da matriz extracelular e às células do hospedeiro. A interação das leptospiros com receptores de reconhecimento de patógenos é uma questão fundamental na imunidade contra a leptospira, bem como na imunopatologia. As leptospiros patogênicas, mas não saprófitas, são capazes de escapar do sistema complemento do hospedeiro, circular no sangue e se espalhar pelos tecidos (Fraga; Barbosa; Isaac, 2011) As bactérias colonizam os túbulos renais de mamíferos, sendo eliminadas no ambiente pela urina.

Os órgãos-alvo da leptospirose humana incluem os rins e os pulmões. A associação de um processo autoimune com essas patologias tem sido explorada e diversos mecanismos que permitem a sobrevivência das leptospiros nos rins de animais reservatórios têm sido propostos. As leptospiros patogênicas evadem de mecanismos da resposta imunológica e para a diversidade de sorovares são necessárias vacinas sorovares-específicas, que não apresentam imunidade duradoura.

O advento da genômica permitiu a formação de bancos de dados completos e acessíveis que podem ser explorados em busca de proteínas que, com o auxílio de ferramentas da bioinformática, podem ser analisadas na expectativa da obtenção de novos antígenos para diagnósticos e vacinas.

Dessa forma, esta monografia teve como objetivo geral identificar epitopos para linfócito B em cinco proteínas hipotéticas de membrana de *Leptospira interrogans* sorovar *Copenhageni* utilizando ferramentas de bioinformática.

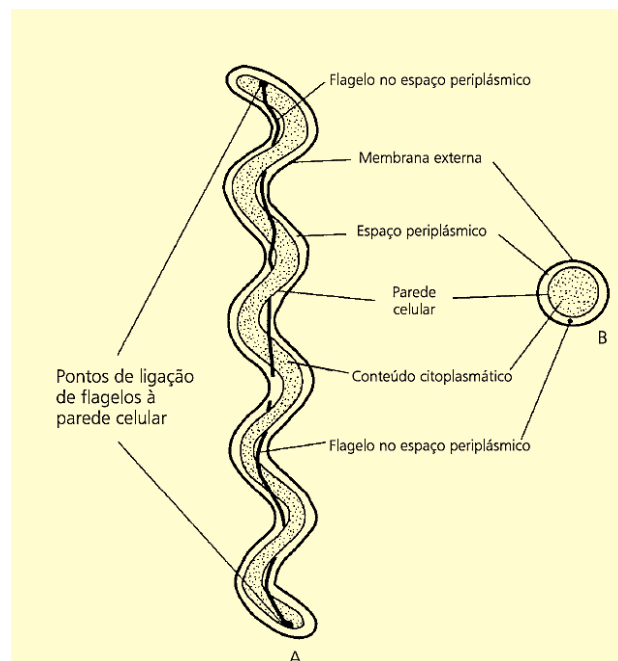
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. AGENTE ETIOLÓGICO DA LEPTOSPIROSE

Procariotos do gênero *Leptospira* são bactérias espiraladas (espiroquetas), contendo extremidades em forma de gancho, aeróbias obrigatórias, com formato helicoidal e flexível, que se movimentam através de 2 flagelos, (TAVARES, 2018). São bactérias Gram negativas, que são fracamente coradas, visualizadas através de microscópio de campo escuro ou de contraste de fase.

A *Leptospira* é uma bactéria relativamente frágil, podendo ser inativada por vários métodos, como dessecação, congelamento, calor (50°C/10min), sabão, sais biliares, detergentes, ambiente ácido e putrefação (MCVEY, 2016), mas consegue sobreviver em ambientes úmidos de água doce, de pH neutro a levemente alcalino e em temperatura ambiente (10°C à 34°C) por até 180 dias.

Figura 1 - Esquema anatômico da *Leptospira* (A) e seu corte transversal (B).



Fonte: P. J. Quinn *et al*, (2007)

2.2. CURSO CLÍNICO DA PATOLOGIA

A infecção pode ocorrer de forma direta ou indireta. A leptospira, quando em contato com um hospedeiro, atravessa a pele úmida ou mucosas. De acordo com a WOA (2022), o curso da infecção varia de animal para animal, sorovar para sorovar, existindo um período de incubação de 4 a 20 dias, seguido de um período de 7 à 10 dias de circulação na corrente sanguínea.

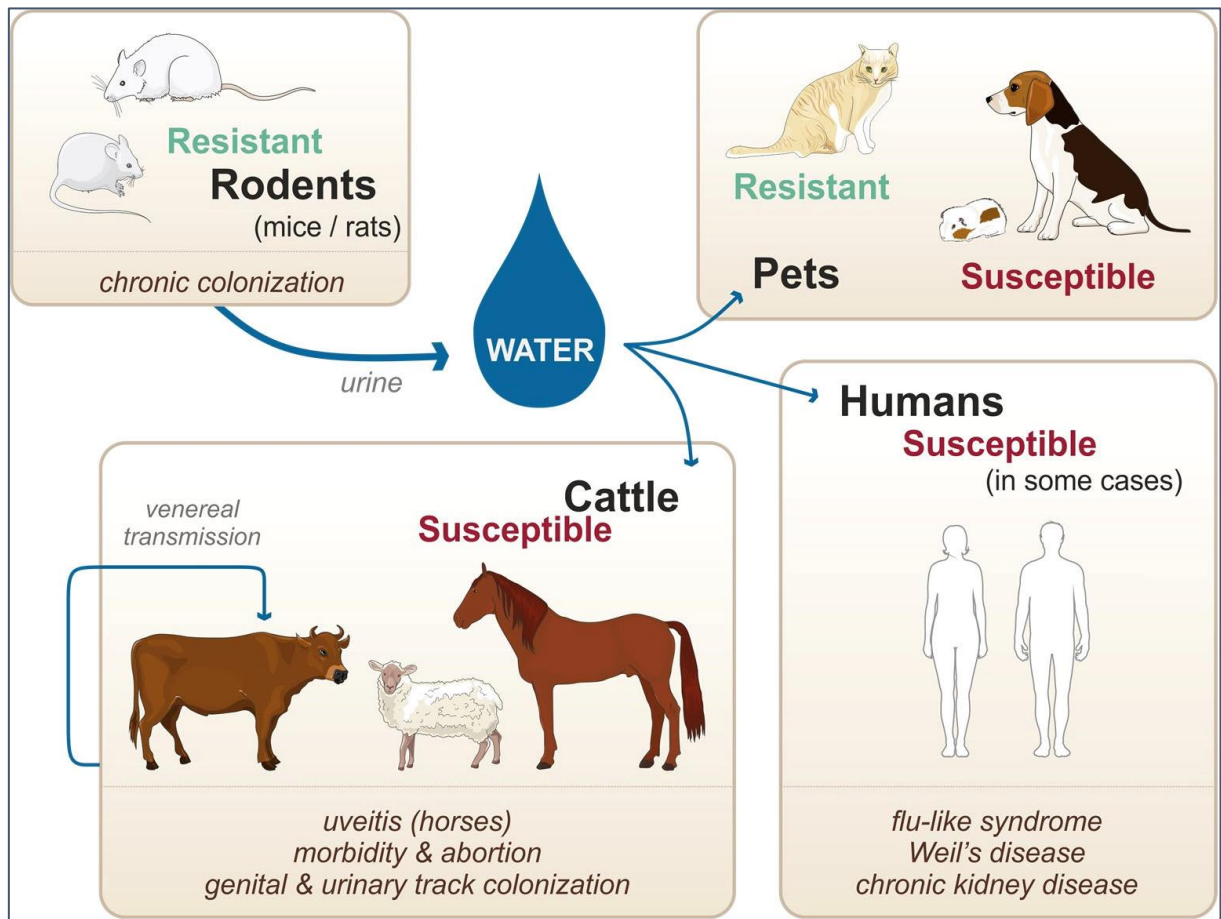
Os sintomas clínicos variam de acordo com o sorovar e o animal infectado. Segundo Quinn *et al* (2007), algumas sorovariedades parecem ter distribuição geográfica limitada, sendo um sorovar associado a uma espécie particular de hospedeiro, seu hospedeiro de manutenção.

Durante o curso da infecção, hospedeiros de manutenção se apresentam subclínicos ou com sintomas moderados, tal situação onde o parasita aloja-se e multiplica-se nos túbulos renais do hospedeiro, e este excreta-os através da urina por tempo prolongado no ambiente. Em contrapartida, os hospedeiros acidentais são altamente suscetíveis à infecção e tendem a desenvolver a forma sistêmica, mais severa da doença, na qual as espiroquetas além de se alojarem nos túbulos renais, podem também ser encontradas no sistema genital, meninges e no tecido ocular (WOA, 2022). A leptospirose pode causar em hospedeiros incidentais reações agudas devido às toxinas produzidas pelas bactérias. De acordo com a WOA (2022), os sintomas agudos são febre e anorexia, seguidos de sinais de hemorragia e anemia hemolítica secundária a danos endoteliais, petéquias na mucosa, icterícia, hematúria/hemoglobinúria, desidratação, vômitos e cólica. O dano renal agudo contribui para a rápida evolução do animal a óbito. A doença, quando afeta o sistema reprodutivo, tende a se apresentar por abortos/fetos natimortos prematuros, fetos mumificados, sangue presente no leite ou agalaxia. Caso o animal não aborte, os neonatos se apresentam fracos.

Animais de produção tendem a apresentar os sintomas reprodutivos da doença, causando um déficit na capacidade produtiva do animal. Trabalhadores que estão em contato direto com animais de fazenda tendem a ser mais suscetíveis a infecção pelo agente etiológico. Existe a imunização artificial, decorrente da vacinação preventiva para animais. Porém, para cada sorovar é necessária uma vacina específica, e esta

confere proteção temporária, que precisa ser renovada anualmente (Tizard, 2014; WOAH, 2022).

Figura 2 - Ciclo zoonótico da leptospirose, suscetibilidade de vários hospedeiros acidentais e modos de transmissão. Adaptado de Adler, 2015.



Fonte: Bonhomme e Werts (2022)

2.3. O SISTEMA IMUNE

O organismo do animal possui características ideais para a propagação da vida, atraindo outros microrganismos comensais e oportunistas, que se utilizam de suas reservas e ambiente próspero. Muitos dos microrganismos convivem em relação comensal com o animal, não trazendo efeitos adversos, e alguns convivem em relação simbiótica, como é o caso de algumas bactérias intestinais. No entanto, alguns desses micróbios evoluíram para se utilizarem das células e tecidos dos animais em que

vivem, em uma relação de parasitismo. A presença desses microrganismos traz efeitos deletérios para a saúde do animal, destruindo seus tecidos e células, também liberando citotoxinas decorrentes de seu metabolismo celular. É aí que entram os mecanismos de defesa do corpo contra esses agressores.

O organismo dispõe de vários mecanismos de defesa, alguns sendo mais efetivos contra certos tipos de microrganismos invasores do que outros, se tornando um sistema extremamente eficaz. De acordo com Abbas (2014), enquanto os mecanismos da imunidade inata reconhecem estruturas comuns a classes de microrganismos, as células da imunidade adquirida (linfócitos) expressam receptores que reconhecem especificamente uma variedade muito maior de moléculas produzidas pelos microrganismos, assim como substâncias não infecciosas. Essas moléculas são chamadas de antígenos.

A primeira barreira protetora é a pele íntegra, e após ela, o corpo dispõe de dois tipos de resposta imune: a inata e a adquirida.

2.3.1. Imunidade Inata

A resposta imune inata é a primeira que é ativada na presença de um agressor externo. Ela é rápida e inespecífica, ocorre logo que o agressor rompe a primeira barreira. De acordo com Tizard (2014), o sistema imune inato é uma rede de subsistemas conectados que não apresenta qualquer tipo de memória e, assim, cada episódio de infecção é tratado da mesma forma. Igualmente, a intensidade e a duração das respostas inatas, como a inflamação, não se alteram, independentemente da frequência com que um patógeno é encontrado.

A imunidade inata é mediada por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) presentes nas várias células de defesa, que se ligam aos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como as estruturas bacterianas e toxinas resultantes de seu metabolismo, e também reagem a padrões moleculares associados a lesão (DAMPs), resultantes de células do organismo mortas ou próximas da morte.

2.3.2. Imunidade Adquirida

A resposta imune adquirida é altamente específica e eficaz, capaz de reconhecer e destruir os patógenos e, posteriormente, aprender com todo esse processo (Tizard, 2014). Enquanto a imunidade inata não possui uma memória e reage da mesma maneira para todo tipo de invasão, a adquirida desenvolveu esse tipo de mecanismo, se tornando mais eficaz e intensa após múltiplas exposições do animal para o mesmo antígeno.

De acordo com Tizard (2014), a principal diferença entre os sistemas imune inato e adaptativo está no uso de receptores de superfície celular para reconhecimento de microrganismos invasores. As células do sistema imune inato dispõem de um número limitado de receptores pré-formados, enquanto as do sistema imune adaptativo constantemente produzem receptores novos, que conseguem se ligar a um grande número de moléculas estranhas.

É dividida em dois tipos de respostas: a celular e a humoral.

A resposta imunológica celular é mediada pelos linfócitos T, que medeia outras células do organismo (Abbas, 2014). Existem três tipos desses linfócitos: os linfócitos T auxiliares, os linfócitos T auxiliares e os linfócitos T reguladores.

Já a imunidade humoral é mediada por linfócitos tipo B, que secreta anticorpos após a diferenciação em plasmócitos. Poucos desses linfócitos circulam pelo corpo, se localizando principalmente no córtex dos linfonodos, na zona marginal do baço, na medula óssea, por todo o intestino e nas placas de Peyer (Tizard, 2014).

Os linfócitos B possuem grande número de receptores de antígeno idênticos em sua superfície. Dessa forma, cada linfócito B pode se ligar e responder a somente um único antígeno. Se um linfócito B encontra um antígeno que pode se ligar a seus receptores, responde, com a co-estimulação apropriada, secretando seus receptores nos fluidos corporais, nos quais são denominados anticorpos. Assim, cada linfócito B produz anticorpos com a mesma especificidade de ligação que seus receptores.

Assim, os anticorpos produzidos pelos linfócitos B reconhecem os antígenos microbianos extracelulares, enquanto os linfócitos T reconhecem os antígenos produzidos pelos microrganismos intracelulares. Outra diferença importante entre os linfócitos B e T é que a maioria das células T reconhece apenas antígenos proteicos,

enquanto células B e anticorpos são capazes de reconhecer muitos tipos diferentes de moléculas, incluindo proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos e lipídios.

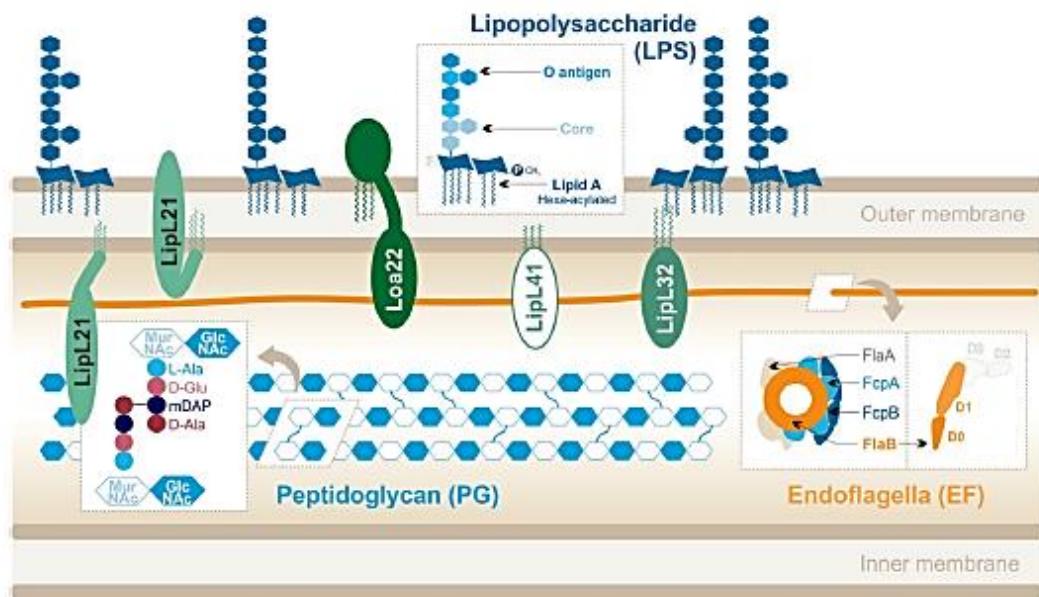
As leptospiros são patógenos extracelulares, a resposta imune adquirida depende da produção de anticorpos e da ativação da via clássica do sistema complemento. Na leptospirose, a maioria dos anticorpos específicos são produzidos contra o lipopolissacarídeo (LPS) (Fraga, Barbosa e Isaac, 2011).

2.3.3 Antígenos

De acordo com Tizard (2014), os principais componentes da superfície bacteriana incluem a parede celular e suas estruturas proteicas associadas, a cápsula, o pili e o flagelo. As bactérias Gram-positivas também contêm ácidos lipoteicoicos, inserido em uma camada espessa de peptidoglicanos, que estão envolvidos no transporte de íons através da parede celular. Em contraste, os organismos gram-negativos possuem uma fina camada de peptidoglicanos coberta por uma membrana mais externa constituída de lipopolissacarídeos (LPS). A maior parte da antigenicidade da bactéria gram-negativa está associada ao lipopolissacarídeo, que consiste em um oligossacarídeo ligado a um lipídeo (lipídeo A) e a uma série de trissacarídeos repetitivos. A estrutura desses trissacarídeos determina a antigenicidade do organismo. Entretanto, em geral, as proteínas estranhas são os melhores antígenos, especialmente se forem grandes, superiores a 1.000 Da.

Em relação às leptospiros, a camada de peptidoglicano (PG) está localizada um pouco mais próxima da membrana interna do que em outras bactérias e possuem dois endoflagelos (EFs), incrustados no periplasma, que lhes conferem grande motilidade. As leptospiros também são particularmente ricas em proteínas da membrana externa (OMPs), incluindo numerosas lipoproteínas que são os componentes mais abundantes da parede celular da bactéria. A *Leptospira* spp. difere da maioria das outras espiroquetas porque possui lipopolissacarídeos (LPSs) ancorados em sua membrana externa (Bonhomme e Werts, 2022).

Figura 3 – Parede celular de *Leptospira interrogans* e padrões moleculares associados ao patógeno: peptidoglicano (PG), endoflagelo (EF), lipoproteínas abundantes e lipopolissacarídeo atípico (LPS).



Fonte: Bonhomme e Werts (2022)

2.3.4. A capacidade da leptospira evadir a resposta imunológica

Leptospiras saprofíticas e patogênicas são capazes de formar biofilmes, ajudando-as a sobreviver em habitats ambientais e a colonizar os hospedeiros por constituir uma barreira contra as células e moléculas efetoras da imunidade, incluindo anticorpos e complemento (Fraga, Barbosa e Isaac, 2011).

Em bactérias vivas, o PG da leptospira não é reconhecido por os receptores NOD em hospedeiros humanos ou camundongos devido à sua forte associação com LipL21. Em humanos, bovinos e camundongos, escapam do reconhecimento pelo TLR5.

As leptospiras patogênicas são capazes de controlar todas as vias do sistema complemento, adquirindo reguladores negativos solúveis do hospedeiro. O controle da via alternativa é alcançado pela interação da *Leptospira* com a Fator H (FH) no soro humano que impede a ligação do Fator B (FB) ao C3b, acelerando a queda da C3-convertase C3bBb, e agindo como um cofator para a clivagem do C3b pelo Fator I (FI). Uma vez ligado à superfície da *Leptospira*, o FH permanece funcional e promove a clivagem de C3b mediada por FI, inativando o C3b pela geração do iC3b.

A leptospira também tem a capacidade de se ligar ao C4BP humano, um importante inibidor da fase fluida das vias clássica e da lectina. A proteína LcpA, exposta à superfície, liga-se ao C4BP solúvel do soro humano e permanece funcionalmente ativo quando ligado à proteína, atuando como cofator do Fator I na clivagem do C4b (Fraga, Barbosa e Isaac, 2011).

Embora a *Leptospira* não seja um patógeno intracelular, *L. interrogans* pode escapar do fagolisossomo para o citosol de macrófagos humanos, permitindo que os peptídeos leptospirais possam ser complexados com moléculas do MHC classe I e, posteriormente, apresentados aos linfócitos T CD8+. Linfócitos T CD8 específicos para peptídeos derivados da proteína leptospiral semelhante à imunoglobulina (Lig) A foram identificados em pacientes humanos, entretanto, mais estudos são necessários para avaliar a participação das populações de linfócitos T na imunidade contra leptospiros (Fraga, Barbosa e Isaac, 2011).

3 METODOLOGIA

3.1 DO TIPO DA PESQUISA

Foi adotada a tipologia de Gil (1991, 2002) e Vergara (2000) para classificar a pesquisa quanto aos procedimentos para a coleta e análise de dados. Essa pesquisa é básica, com abordagem metodológica exploratória, descritiva e bibliográfica, com direcionamento quantitativo.

3.2 DA OBTENÇÃO DAS PROTEÍNAS HIPOTÉTICAS

Foram selecionadas cinco proteínas hipotéticas de *Leptospira interrogans* sorovar *Copenhageni* obtidas no site do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), sob os seguintes códigos: A6J42_RS03385, A6J42_RS10460, A6J42_RS10630, A6J42_RS12740, A6J42_RS16700. Para facilitar a identificação de tais proteínas hipotéticas, neste trabalho as mesmas foram nomeadas Lpra_01, Lpra_02, Lpra_03, Lpra_04 e Lpra_05, respectivamente. Para serem analisadas pelos programas, as sequências de aminoácidos das proteínas foram utilizadas no formato FASTA.

3.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS PROTEÍNAS HIPOTÉTICAS DE *Leptospira interrogans* sorovar *Copenhageni*

Os parâmetros físicos e químicos das proteínas, como peso molecular e composição atômica, foram preditos pela plataforma ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) (Gasteiger *et al.*, 2005). As áreas capazes de enovelamento independente e que, conseqüentemente, possuem maior densidade, são regiões potencialmente capazes de determinar a função da proteína, que são nomeadas de domínios. Estas regiões foram identificadas por quatro tipos de bancos de dados: Pfam (Mistry *et al.*, 2021), InterPro (Paysan-Lafosse *et al.*, 2022), Prosite (Sigrist *et al.*, 2013) e SMART (Letunic, Khedkar e Bork, 2021).

3.4 PREDIÇÃO E TRIAGEM DE EPÍTOPOS LINEARES POTENCIALMENTE RECONHECIDOS POR LINFÓCITOS B

Os epítomos lineares foram preditos pela avaliação da flexibilidade (Karplus, Schulz, 1985), hidrofiliidade (Parker, Guo e Hodges, 1986), superfícies expostas (Janin e Wodak, 1978) e polaridade (Ponnuswamy, Prabhakaran e Manavalan, 1980) por intermédio da plataforma BcePred (Saha e Raghava, 2004). Os threshold utilizados foram: flexibilidade (2), hidrofiliidade (1.9), superfícies expostas (2.3) e polaridade (1.8).

Para verificação da acessibilidade (Emini *et al.*, 1985), foi utilizado o *Epitope DataBase and Analysis Resource* (IEDB), padronizada à posição central 3, janela 6 e threshold de 1. A avaliação da antigenicidade foi estabelecida na posição central 4, janela 7 e threshold de 1,004 (Vita *et al.*, 2019).

Além do IEDB, foi utilizada o ABCpred, que é uma rede neural artificial com servidor treinado em epítomos de células B obtidos a partir do banco de dados Bcipep, com 65,93% de precisão (Saha; Raghava, 2006). No ABCpred, os parâmetros empregados foram threshold de 0.8, filtro de sobreposição ativado e restrição de tamanho em 16 aminoácidos.

Também foi empregado o Bepipred, que aplica um algoritmo *Random Forest* treinado em epítomos e aminoácidos não epítomos determinados a partir de estruturas cristalinas. A versão utilizada foi a Bepipred 2.0 (Jespersen *et al.*, 2017) com 0,5 de threshold. O Bepipred 3.0 (Clifford *et al.*, 2022) não foi empregado pois, em estudo recente (Sousa, 2024), se mostrou pouco eficaz na predição de epítomos sabidamente imunogênicos.

3.5 DEEPTMHMM

É um algoritmo capaz de detectar e prever a topologia estrutural alfa-helicoidal e beta-barril de proteínas transmembranas, desenvolvido pela Universidade Técnica da Dinamarca (*Technical University of Denmark*).

3. 6 SIGNALP 6.0

Peptídeos sinais (SPs) são sequências curtas de aminoácidos que controlam a secreção e translocação de proteínas em todos os organismos vivos. SignalP 6.0 é uma ferramenta que utiliza um modelo de aprendizagem de máquina capaz de prever substratos Sec clivados por SPase I (Sec/SPI) ou SPase II (Sec/SPII, lipoproteínas procarióticas) e substratos Tat clivados por SPase I (Tat/SPI)⁴.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise das sequências de aminoácidos pela ferramenta ProtParam resultou nas informações apresentadas na tabela 1.

Tabela 01 - Informações das proteínas LPRA_01, LPRA_02, LPRA_03, LPRA_04 e LPRA_05 analisadas pelo ProtParam.

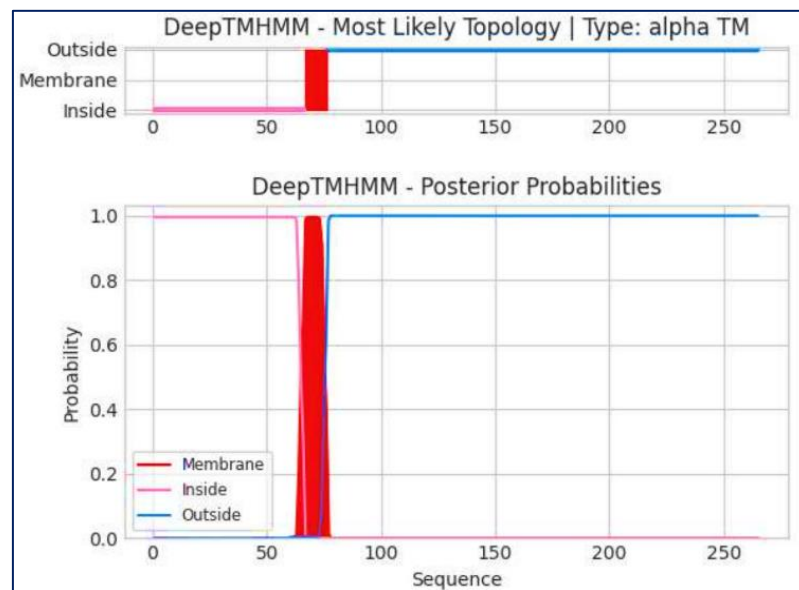
PROTEÍNA	LPRA_01	LPRA_02	LPRA_03	LPRA_04	LPRA_05
LOCUS TAG	A6J42_RS03385	A6J42_RS10460	A6J42_RS10630	A6J42_RS12740	A6J42_RS16700
TIPO DE GENE	Codificação de proteína	Codificação de proteína	Codificação de proteína	Codificação de proteína	Codificação de proteína
Nº DE AMINOÁCIDOS	265	228	180	246	221
PESO MOLECULAR	29818.68	26760.89	20070.73	28844.55	24890.32
ÍNDICE DE INSTABILIDADE	36.27 (Estável)	30.70 (Estável)	3.7 (Estável)	26.58 (Estável)	20.48 (Estável)

Fonte: Resultado da pesquisa

Para predizer a topologia e a localização dessas proteínas na bactéria, as sequências de aminoácidos foram avaliadas nas plataformas DeepTMHMM, SignalP 6.0 e Interpro.

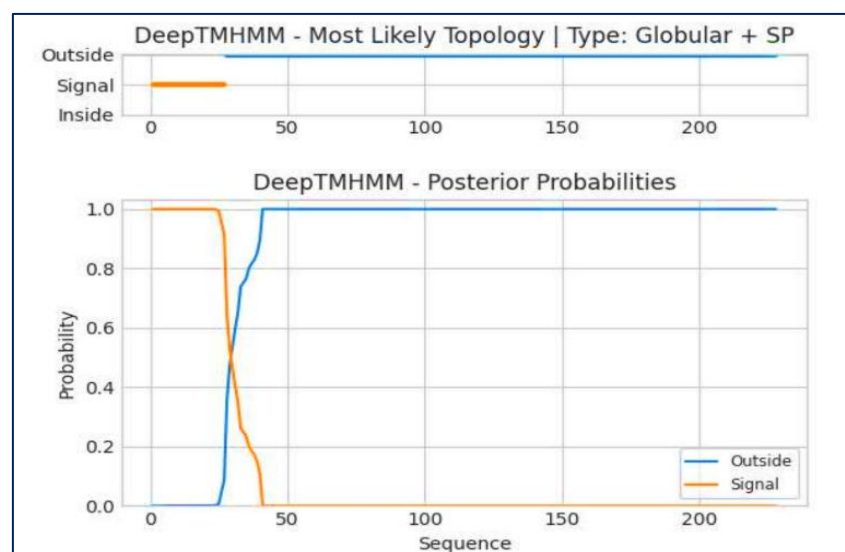
As figuras 2, 3, 4, 5 e 6 demonstram os resultados das análises as proteínas LPRA_01, LPRA_02, LPRA_03, LPRA_04 e LPRA_05, respectivamente, pelo DeepTMHMM verificando a presença de região transmembrana nas proteínas LPRA_01 e LPRA_05, sugerindo que devem ser proteínas da membrana plasmática ou da membrana externa.

Figura 4 - Resultados do DeepTMHMM para a proteína Lpra_01.



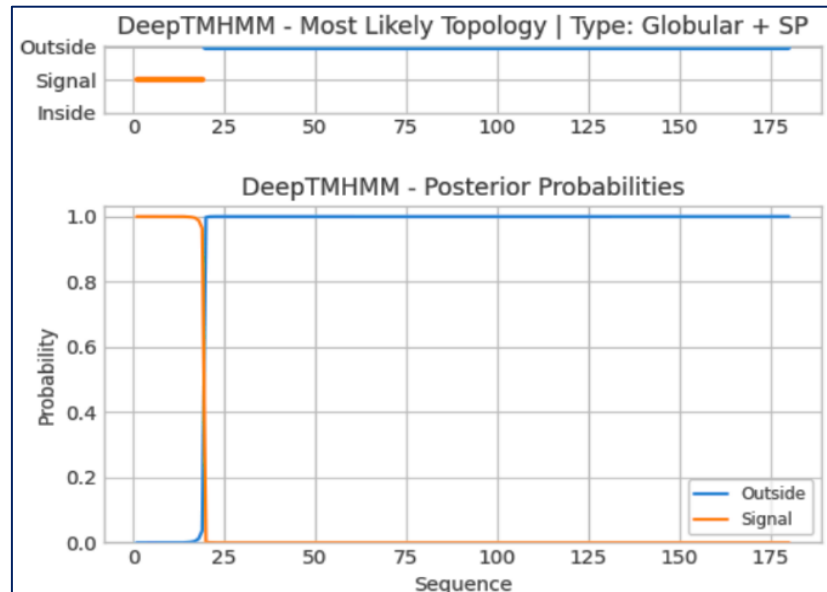
Fonte: Resultado da pesquisa

Figura 5 - Resultados do DeepTMHMM para a proteína Lpra_02.



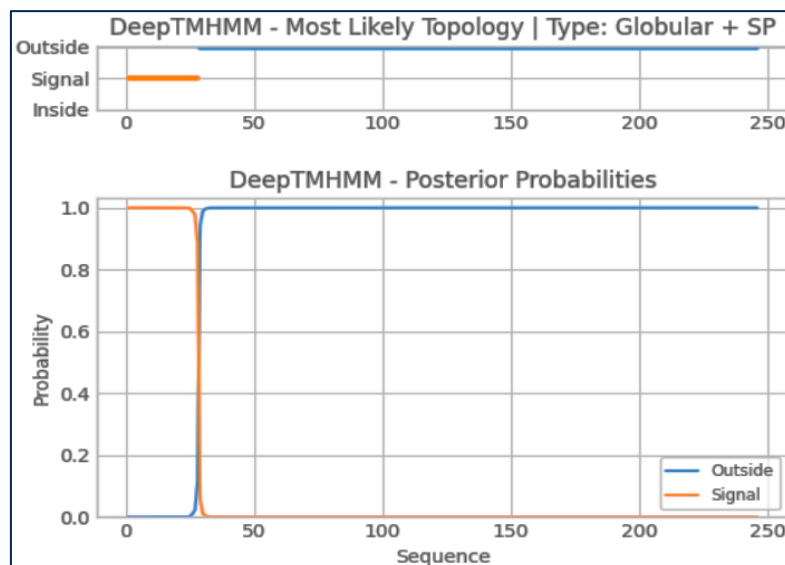
Fonte: Resultado da pesquisa

Figura 6 - Resultados do DeepTMHMM para a proteína Lpra_03.



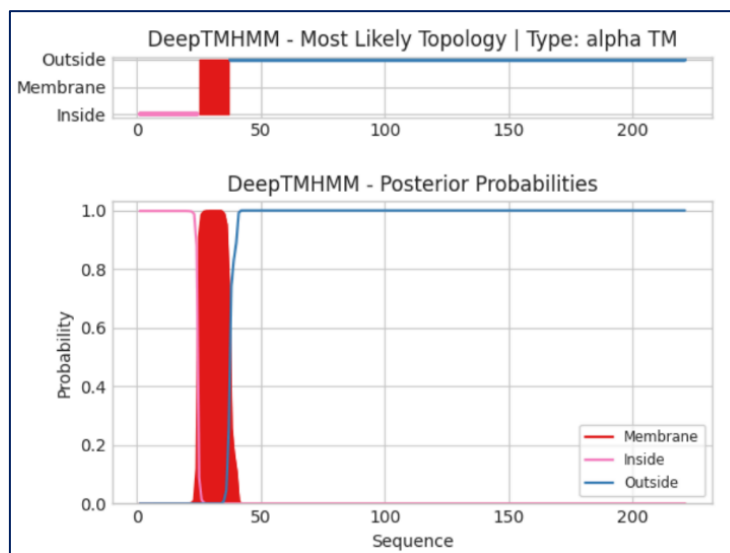
Fonte: Resultado da pesquisa

Figura 7 - Resultados do DeepTMHMM para a proteína Lpra_04.



Fonte: Resultado da pesquisa

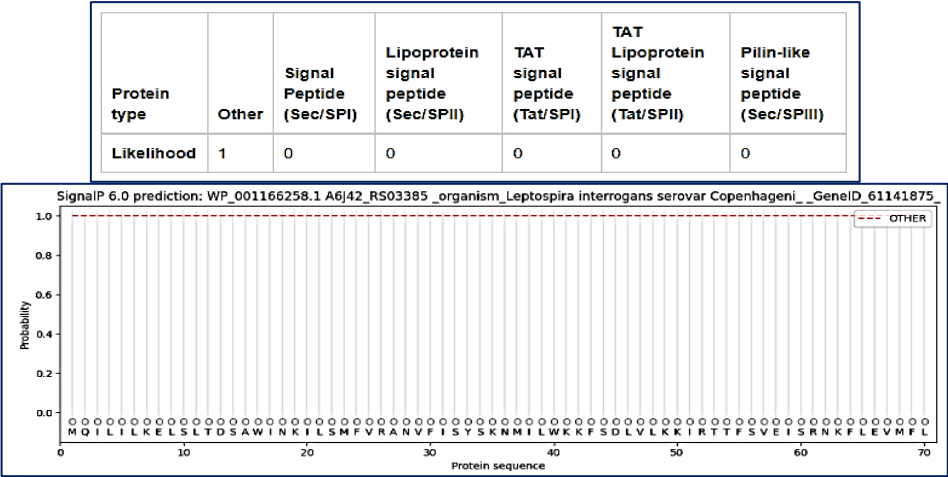
Figura 8 - Resultados do DeepTMHMM para a proteína Lpra_05.



Fonte: Resultado da pesquisa

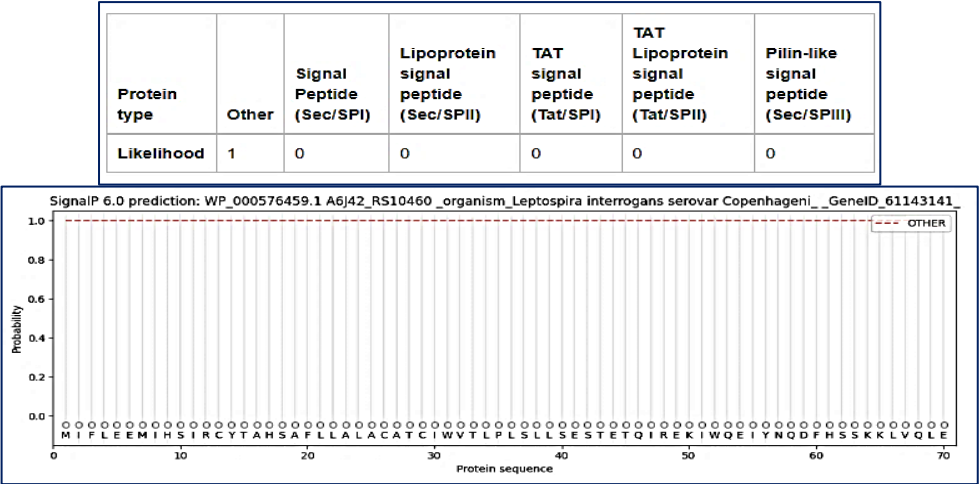
As figuras 9, 10, 11, 12 e 13 demonstram os resultados da submissão ao SignalP 6.0 das sequências de aminoácidos das proteínas LPRA_01, LPRA_02, LPRA_03, LPRA_04 e LPRA_05, respectivamente. O programa identificou a presença de um peptídeo sinal Sec/SPI e um peptídeo sinal de lipoproteína para as proteínas LPRA_03 e LPRA_04, respectivamente, sugerindo que essas duas proteínas devem ser secretadas pelas células. SecB é uma chaperona necessária para a exportação de proteínas. SecA é uma ATPase que direciona o movimento da proteína para a membrana. SecY, SecE, SecG, SecD, SecF e YajC são proteínas integrais da membrana. SecY, SecE e SecG formam um complexo o hetero-trimérico SecYEG, que constitui um canal para passagem de polipeptídeos (Mori e Ito, 2001). O encontro do peptídeo sinal para essas proteínas infere que as proteínas LPRA_03 e LPRA_04 são secretadas pela *Leptospira interrogans* serovar *Copenhageni*.

Figura 9 - Resultados do SignalP 6.0 para a proteína Lpra_01.



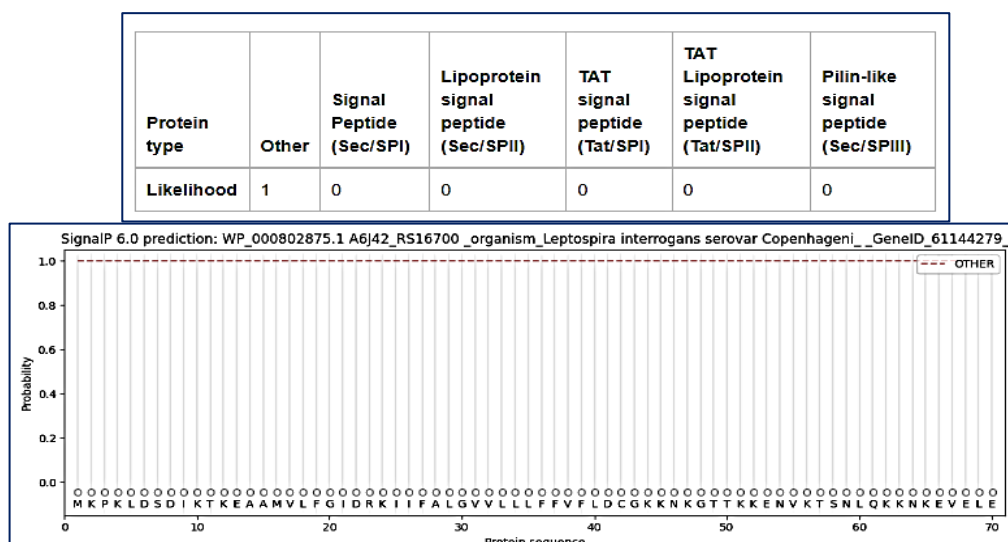
Fonte: Resultado da pesquisa

Figura 10 - Resultados do SignalP 6.0 para a proteína Lpra_02.



Fonte: Resultado da pesquisa

Protein type	Other	Signal Peptide (Sec/SPI)	Lipoprotein signal peptide (Sec/SPII)	TAT signal peptide (TaT/SPI)	TAT Lipoprotein signal peptide (TaT/SPII)	Pilin-like signal peptide (Sec/SPIII)
Likelihood	0.0002	0.9992	0.0002	0.0001	0.0001	0.0001

Figura 13 - Resultados do SignalP 6.0 para a proteína Lpra_05.

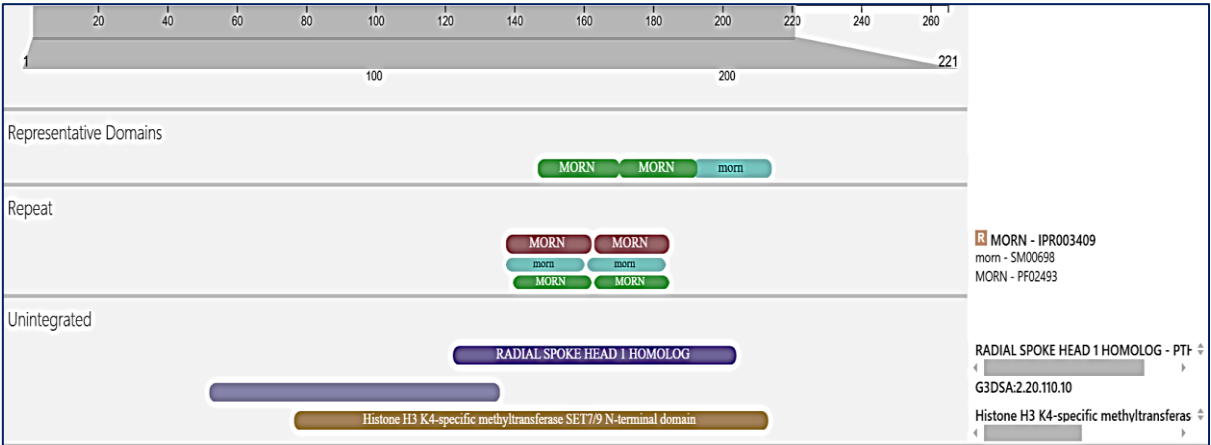
Fonte: Resultado da pesquisa

Através da análise pelo InterPro, foi observada a presença do motivo (*motif*) MORN (*Membrane Occupation and Recognition Nexus*) e dos domínios *Radial Spoke Head I* e N-terminal de metiltransferase específica para Histona H3 nas proteínas Lpra_01, Lpra_03, Lpra_04 e Lpra_05, como demonstrado nas figuras 14, 15, 16 e 17.

Os motivos MORN contém de 2 a 20 aminoácidos foi encontrado em diferentes proteínas e estão envolvidos em muitas funções tendo sido relatados em plantas, animais e protistas. O modo como os diferentes motivos MORN impactam as propriedades funcionais das proteínas é pouco compreendido, entretanto influencia nas interações proteína-membrana, proteína-proteína e modificações pós-tradução (Zhou *et al.*, 2022).

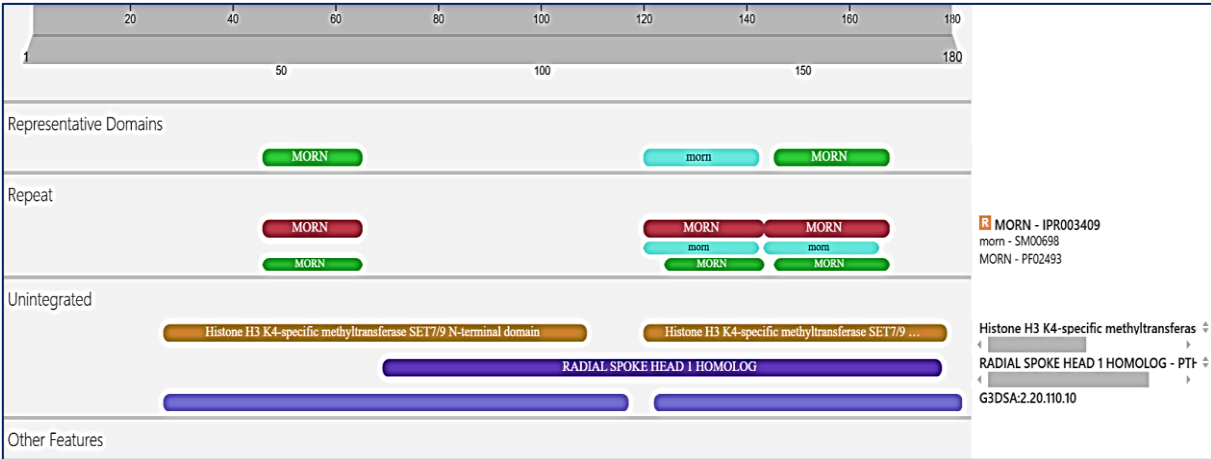
O domínio *Radial Spoke Head I* é encontrado em proteínas associadas à motilidade dos cílios e flagelos em eucariotos (Grossman-Haham *et al.*, 2021), sugerindo que as proteínas Lpra_01, Lpra_03 e Lpra_05 possam estar associadas ao flagelo da leptospira.

Figura 14 – Domínios identificados pelo Interpro na proteína Lpra_01



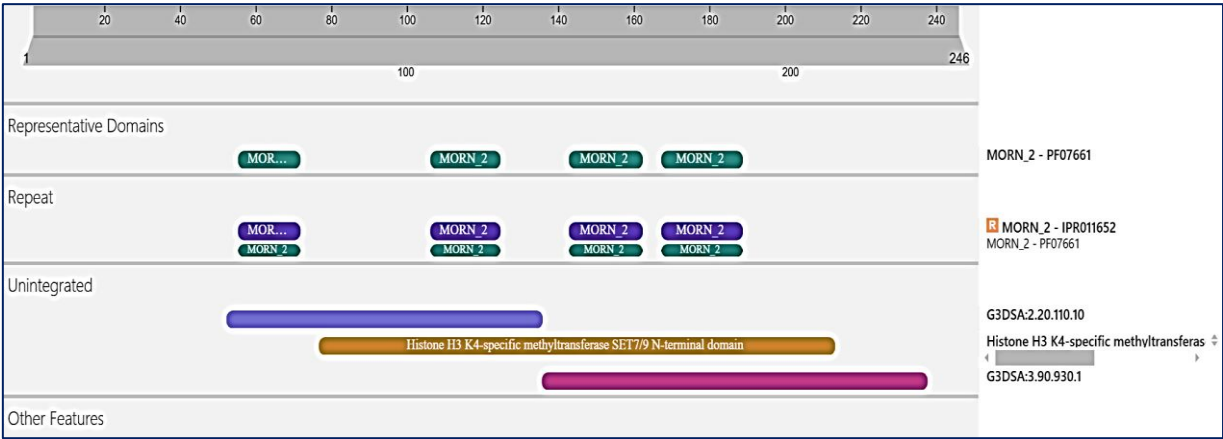
Fonte: Resultado da pesquisa

Figura 15 - Domínios identificados pelo Interpro na proteína Lpra_03



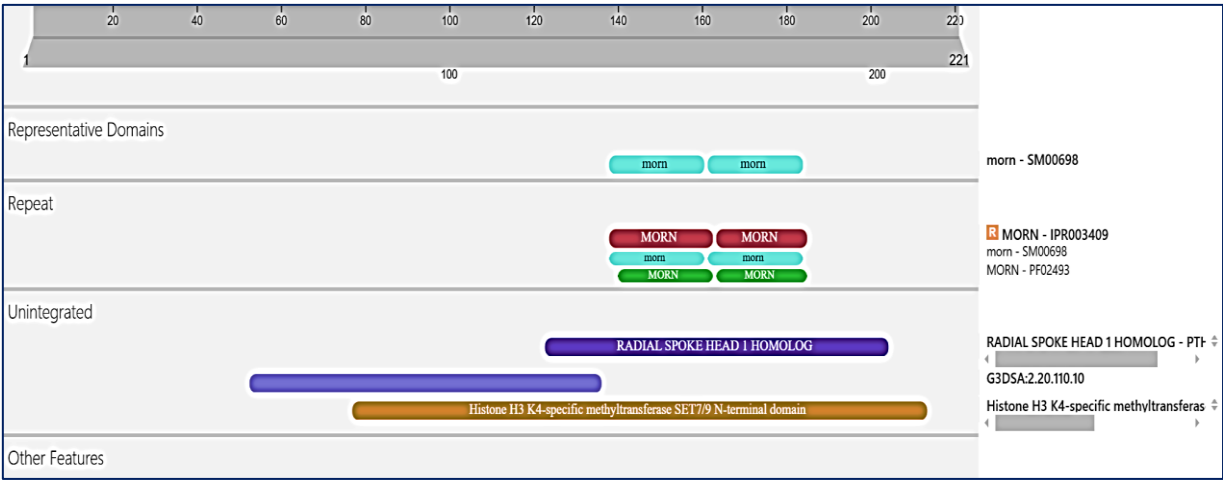
Fonte: Resultado da pesquisa

Figura 16 - Domínios identificados pelo Interpro na proteína Lpra_04



Fonte: Resultado da pesquisa

Figura 17 - Domínios identificados pelo Interpro na proteína Lpra_05



Fonte: Resultado da pesquisa

Como as proteínas Lpra_01 e Lpra_05 apresentaram características de proteínas de membrana, foram selecionadas para a análise pelos programas preditores de epitopos, entretanto a proteína Lpra_05 não apresentou superfícies expostas necessária para a predição de epítopos. Entretanto, apenas a proteína Lpra_01 tinha todas as características necessárias para a predição de epítopos para linfócito B, cujo trecho comum identificado pelos programas ABCpred, IEDB, BcePred e BepiPred é composto de 13 aminoácidos na região 216 a 229 (Figura 16).

Figura 18 - Alinhamento das predições de epítopos preditas pelos programas ABCpred, IEDB, BcePred e BepiPred



Fonte: Resultado da pesquisa

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através das ferramentas de bioinformática, foi possível inferir a localização das proteínas hipotéticas Lpra_01, Lpra_02, Lpra_03, Lpra_04 e Lpra_05 de *Leptospira interrogans* sorovar *Copenhageni*, bem como identificar a presença de domínios e de epitopos. Entre as proteínas analisadas, os programas apontaram a Lpra_01 como uma proteína de membrana com epitopos que podem ser reconhecidos por linfócitos B, entretanto, faz-se necessária a realização de ensaios laboratoriais para confirmação desses resultados.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K. *et al.* **Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico**. Rio de Janeiro, Brazil: Saunders, 2014.

BONHOMME D.; WERTS, C. Host and species-specificities of pattern recognition receptors upon infection with *Leptospira interrogans*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 1-17, 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **CASOS CONFIRMADOS DE LEPTOSPIROSE - Brasil, UF e Regiões**. [s.l.]. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leptospirose/publicacoes/casos-e-obitos-2000-a-2024.pdf>>. Acesso em: 7 out. 2024.

LETUNIC, I.; KHEDKAR, S.; BORK, P.; **SMART: recent updates, new developments and status in 2020**. *Nucleic Acids Res.*, v. 8, n. 49(D1), p. D458-D460, 2021. doi: 10.1093/nar/gkaa937. PMID: 33104802; PMCID: PMC7778883.

CHRISTIAN, J. A.; SIGRIST, E. C.; CERUTTI, L.; CUCHE, B. A.; HULO, N.; BRIDGE, A.; BOUGUELERET, L.; XENARIOS, I. New and continuing developments at PROSITE **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1, p. D344–D347, 2013. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1067>

CHOU, P. FASMAN, GD. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.**, v. 47, p. 45-148, 1978.

EMINI, EA. HUGHES, JV. PERLOW, DS. BOGER, J. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. **J Virol.**, v. 55, p. 836-839, 1985.

F, S. RAGHAVA G.P.S. Prediction of Continuous B-cell Epitopes in an Antigen Using Recurrent Neural Network. **Proteins**, v. 65, n 1, p. 40-48 PMID: 16894596, 2006.

FRAGA, T. R.; BARBOSA, A. S.; ISAAC, L. Leptospirosis: Aspects of Innate Immunity, Immunopathogenesis and Immune Evasion From the Complement System. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 73, p. 408–419, 2011.

FERREIRA, F. L. **Caracterização funcional de proteínas hipotéticas de *Leptospira interrogans* como adesinas e potenciais antígenos vacinais e para diagnóstico**. 2022. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

GIL, A. C.; VERGARA, S. C. Tipo de pesquisa. **Universidade Federal de Pelotas. Rio Grande do Sul**, p. 31, 2015. Disponível em: https://www.dbd.puc-rio.br/pergamum/tesesabertas/0212238_04_cap_05.pdf. Acesso em: 7 out. 2024.

GIL, A. C. Como classificar as pesquisas. **Como elaborar projetos de pesquisa**, v. 4, n. 1, p. 44-45, 2002.

GROSSMAN-HAHAM, I. *et al.* Structure of the radial spoke head and insights into its role in mechanoregulation of ciliary beating. **Nat Struct Mol Biol**, v. 28, n. 1, p. 20-28, 2021

HALLGREN, J. *et al.* **DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks**. 2022.
<https://doi.org/10.1101/2022.04.08.487609>

JESPERSEN, M. C. PETERS, B. NIELSEN, M. MARCATILI, P. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. **Nucleic Acids Res.**, v. 45, p. W24-W29, 2017 (Web Server issue). doi: 10.1093/nar/gkx352.

KARPLUS, PA. SCHULZ, GE. Prediction of chain flexibility in proteins. **Naturwissenschaften**, v. 72, p. 212-213, 1985.

LARSEN, J. E. P.; LUND, O. NIELSEN, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. **Immunome Res.**, v. 2. n. 2, p. 1-7, 2006.

LETUNIC, I.; KHEDKAR, S.; BORK, P. SMART: recent updates, new developments and status in 2020. **Nucleic Acids Res.**, v. 8, n. D1, p. D458-D460, 2021. doi: 10.1093/nar/gkaa937. PMID: 33104802; PMCID: PMC7778883.

KOLASKAR, AS. TONGAONKAR, PC. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. **FEBS Lett.**, v. 276, p. 172-174, 1990.

MARINHO, Márcia. Leptospirose: fatores epidemiológicos, fisiopatológicos e imunopatogênicos. **Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n. 3, p. 428-434, 2008.

MCVEY, Scott. KENNEDY, M. CHENGAPPA, M. M. **Microbiologia Veterinária**. 3^a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

MISTRY, J.; CHUGURANSKY, S.; WILLIAMS, L.; QURESHI, M.; SALAZAR, G.A.; SONNHAMMER, E.L.L.; TOSATTO, S.C.E.; PALADIN, L.; RAJ, S.; RICHARDSON, L.J.; FINN, R.D.; BATEMAN, A.; **Pfam: The protein families database in 2021**. Nucleic Acids Research (2021) doi: 10.1093/nar/gkaa913

MORI H.; ITO K. The Sec protein-translocation pathway. **TRENDS in Microbiology**, v. 9, n. 10, 2001.

PARKER, JM. GUO, D. HODGES, RS. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. **Biochemistry**, v. 25, p. 5425-5432, 1986.

PAYSAN-LAFOSSSE, T. *et al.* **InterPro in 2022**. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. D1, p. D418–D427, 2022, (doi: 10.1093/nar/gkac993)

QUINN, P. J. *et al.* **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2007.

SAHA, S. RAGHAVA, G.P.S. **BcePred: Prediction of Continuous B-Cell Epitopes in Antigenic Sequences Using Physico-chemical Properties**. In G. Nicosia, V.Cutello, P.J. Bentley and J.Timis (Eds.) ICARIS 2004, LNCS 3239, 197-204, Springer,2004.

SANTOS, Luciane Amorim *et al.* ***Leptospira interrogans* sorovar *Copenhageni* e *icterohaemorrhagiae*: relação evolutiva, diferenças genéticas e associação com desfecho clínico**. 2015. Tese de Doutorado.

TEUFEL, F. *et al.* SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. **Nature Biotechnology**, v. 40, p. 1023–1025, 2022.

TIZARD, I. **Imunologia Veterinária**. [s.l.] Elsevier Editora Ltda, 2014.

TAVARES, José Caetano. **Microbiologia e farmacologia simplificada**. Thieme Revinter Publicações LTDA, 2018.

WOAH. ***Leptospira interrogans* ssp. (infection with) aetiology epidemiology diagnosis prevention and control potential impacts of disease agent beyond clinical illness references**. World Organization for Animal Health. Disponível em: <<https://www.woah.org/app/uploads/2022/02/leptospira-interrogans-ssp-infection-with.pdf>>. Acesso em: 7 out. 2024.

ZHOU, J. *et al.* Membrane occupation and recognition nexus (MORN) motif controls protein localization and function. **FEBS Letters**, v. 596, p. 1839–1850, 2022.