



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS**

ANDRESSA PENEDO DE PAIVA ESTRELLA

**Genômica Comparativa de Sorovares de *Leptospira interrogans* com Enfoque na
Predição de Fatores de Virulência**

Florianópolis

2021

ANDRESSA PENEDO DE PAIVA ESTRELLA

**Genômica Comparativa de Sorovares de *Leptospira interrogans* com Enfoque na
Predição de Fatores de Virulência**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Ruiz Mazzon

Co-orientador: Prof. Dr. Glauber Wagner

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Estrella, Andressa Penedo de Paiva
Genômica Comparativa de Sorovares de *Leptospira*
interrogans com Enfoque na Predição de Fatores de
Virulência / Andressa Penedo de Paiva Estrella ;
orientador, Ricardo Ruiz Mazzon, coorientador, Glauber
Wagner, 2021.
96 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis,
2021.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Fator de Virulência.
3. Ortologia. 4. Bioinformática. I. Mazzon, Ricardo Ruiz.
II. Wagner, Glauber. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e
Biociências. IV. Título.

Andressa Penedo de Paiva Estrella
**Genômica Comparativa de Sorovares de *Leptospira interrogans* com Enfoque
na Predição de Fatores de Virulência**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Ricardo Ruiz Mazzon
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Gislaine Fongaro
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Ângela Silva Barbosa
Instituto Butantan

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi
julgado adequado para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Biociências.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Ricardo Ruiz Mazzon
Orientador

Florianópolis, 2021.

AGRADECIMENTOS

A minha família, Silvana Penedo, Carlos Eduardo Estrella, Carlos Felipe Estrella, Jade, Jasper e Geraldo, por terem me tornado quem eu sou, terem possibilitado que eu chegasse até o mestrado e pelo apoio incondicional. Sem eles nada disso seria possível.

Ao meu orientador, Ricardo Ruiz Mazzon, um pesquisador incrível, por todo o carinho e apoio, pelos ensinamentos e críticas que me tornam uma cientista e pessoa melhor, e por ser um grande exemplo de como um cientista deve ser.

Ao meu co-orientador, Glauber Wagner, pela ajuda e a disponibilidade por contribuir tanto nesse trabalho.

Aos meus colegas de laboratório por todo apoio dado e incentivo prestado. Em especial, Bruno, Amanda e Juliana, por serem amigos maravilhosos e terem aguentado todos os meus surtos e preocupações.

Aos meus amigos mothcats por alegrarem meus dias e me apoiarem em tudo o que eu faço. Em especial, Charlotte, que sempre compreende e me apoia nos desafios da ciência e da academia.

À banca examinadora pela disponibilidade, e pelas colaborações essenciais que definitivamente virão.

Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro. Ao Programa de PósGraduação em Biotecnologia e Biociências pela formação. À Universidade Federal de Santa Catarina pelo apoio institucional.

RESUMO

Leptospira interrogans é uma espiroqueta e uma das bactérias causadoras da leptospirose, uma doença de suma importância devido a sua distribuição mundial. Sendo o sorovar Copenhageni o principal causador de leptospirose humana no Brasil. A capacidade de *L. interrogans* evadir do sistema imune está intimamente associada à presença de fatores de virulência. Este estudo propõe caracterizar o pangenoma de *L. interrogans*. Utilizando para isso a análise de 21 genomas depositados no NCBI, que foram agrupados em grupos ortólogos através do programa OrthoFinder. O pangenoma de *L. interrogans* é composto por 6.710 genes, sendo o genoma central composto por 2.890 genes, e o genoma acessório é composto por 3.820 genes, com 2.326 genes sendo genes únicos a apenas uma cepa. Tal estudo também permite inferir a função de genes de outras cepas não anotados através da comparação com a função de seus ortólogos anotados. Foi possível identificar 28 genes que são possíveis fatores de virulência. Ainda são necessários mais estudos para elucidar como se dá o transcriptoma dos sv. de *L. interrogans* para que seja possível fazer maiores inferências. Por se tratar de um estudo *in silico*, é necessário ainda estudos *in vivo* e *in vitro* para a confirmação das possibilidades aqui levantadas.

Palavras chave: Fator de Virulência. Ortologia. Sintenia.

ABSTRACT

Leptospira interrogans is a spirochaeta and one of the bacteria responsible for leptospirosis, a disease of extreme importance because of its global distribution. The serovar Copenhageni being the principal pathogen causing human leptospirosis in Brazil. *L. interrogans*'s capacity of evading the immune system is closely linked to the presence of virulence factors. This work proposes to characterize the pangenome of *L. interrogans*. Utilizing for that an analysis of 21 genomes deposited on NCBI, that were clustered in orthologous groups by the software OrthoFinder. The pangenome is composed of 6.710 genes, with the core genome being composed of 2.890 genes, and the accessory genome being composed of 3.820 genes, with 2.326 genes being genes unique to only one strain. This study also allows us to infer the genes function not annotated of other strains by comparison with the function of annotated orthologues. It was possible to identify 28 genes that are possible virulence factors. It's still necessary for many studies to elucidate the transcriptome of *L. interrogans*' sv. to be able to make more inferences. As this is an *in silico* study, it's necessary yet *in vivo* and *in vitro* studies to confirm any possibility rouse here.

Key-words: Virulence Factor. Orthology. Sinteny.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Taxonomia do gênero <i>Leptospira</i> , incluindo a classificação de três grupos.....	13
Figura 2 - <i>Leptospira interrogans</i> em microscópio eletrônico de transmissão.....	14
Figura 3 - Fluxograma da geração de <i>heatmaps</i>	28
Figura 4. Análise do pangenoma.....	33
Figura 5 - <i>Heatmap</i> dos grupos ortólogos por sorovar.....	34
Figura 6 - Árvore filogenética com genoma total, colorida por país de isolamento.....	44
Figura 7 - Alinhamento entre LIL_RS20765 e LIMHP_RS19575.....	55
Figura 8 - Alinhamento entre FWJ33_RS01635 e LIL_RS20145.....	56
Figura 9 - Alinhamento entre LIC_RS13600 e LA_RS04190.....	57
Figura 10 - Alinhamento entre LA_RS13600 e BRAT_03860.....	58
Figura 11 - Análise de sintenia entre os cromossomos 1 da cepa referência e sv. Copenhageni str. FDAARGOS 203.....	59
Figura 12 - Análise de sintenia entre os cromossomos 1 da cepa referência e sv. Copenhageni str. SK1.....	60
Figura 13 - Análise de sintenia entre os cromossomos 1 da cepa referência e sv. Canicola str. 611.....	61
Figura 14 - Análise de sintenia entre os cromossomos 1 da cepa referência e sv. Canicola str. LJ178.....	62
Figura 15 - Análise de sintenia entre os cromossomos 1 da cepa referência e str. FMAS_KW1.....	63
Figura 16 - Análise de sintenia entre os cromossomos 1 da cepa referência e str. FMAS_AW1.....	64
Figura 17 - Análise de sintenia entre os cromossomos 1 da cepa referência e str. FMAS_KW2.....	65
Figura 18 - Análise de sintenia entre os cromossomos 1 da cepa referência e sv. Manilae str. UP-MMC-NIID LP.....	66

Figura 19 - Análise de sintenia entre os cromossomos 1 da cepa referência e sv. Manilae str. UP-MMC-NIID HP.....	67
Figura 20 - Análise de sintenia entre os cromossomos 2 da cepa referência e sv. Bratislava str. PigK151.....	68
Figura 21 - Análise de sintenia entre os cromossomos 2 da cepa referência e sv. Canicola str. 611.....	69
Figura 22 - Análise de sintenia entre os cromossomos 2 da cepa referência e sv. Canicola str. LJ178.....	70
Figura 23 - Análise de sintenia entre os cromossomos 2 da cepa referência e sv. Copenhageni str. FDAARGOS 203.....	71
Figura 24 - Análise de sintenia entre os cromossomos 2 da cepa referência e sv. Copenhganie str. SK1.....	72
Figura 25 - Análise de sintenia entre os cromossomos 2 da cepa referência e sv. Hardjo str. Norma.....	73
Figura 26 - Análise de sintenia entre os cromossomos 2 da cepa referência e sv. Hardjo str. L53.....	74
Figura 27 - Análise de sintenia entre os cromossomos 2 da cepa referência e sv. Manilae str. UP-MMC-NIID HP.....	75
Figura 28 - Análise de sintenia entre os cromossomos 2 da cepa referência e sv. Manilae str. UP-MMC-NIID LP.....	76
Figura 29 - Análise de sintenia entre os cromossomos 2 da cepa referência e str. FMAS_AW1.....	77
Figura 30 - Análise de sintenia entre os cromossomos 2 da cepa referência e str. FMAS_KW1.....	78
Figura 31 - Análise de sintenia entre os cromossomos 2 da cepa referência e str. FMAS_KW2.....	79
Figura 32 - Análise de sintenia entre os cromossomos 2 da cepa referência e sv. Lai str. 56601.....	80
Figura 33 - Análise de sintenia entre os cromossomos 2 da cepa referência e sv. Lai str. IPAV.....	81
Figura 34 - Análise de sintenia entre os cromossomos 2 da cepa referência e sv. Linhai	

str. 56609..... 82

Figura 35 - Proteínas anotadas na duplicação do cromossomo 2 de sv. Linhai str.
56609..... 83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados dos ortogrupos.....	30
Tabela 2 - Número de ortogrupos por cepa.....	31
Tabela 3 - Número de cepas por ortogrupo.....	32
Tabela 4 - Presença de fatores de virulência nas cepas.....	37

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Cepas selecionadas para as análises com código de acesso e origem (local e hospedeiro).....	25
Quadro 2 - Genes candidatos para diagnóstico a nível de espécie para <i>L. interrogans</i>	45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 A BACTÉRIA <i>Leptospira interrogans</i>	12
1.2 A DOENÇA LEPTOSPIROSE.....	14
1.3 MECANISMOS DE VIRULÊNCIA EM BACTÉRIAS.....	20
1.4 ORTOLOGIA E BIOINFORMÁTICA.....	22
1.5 JUSTIFICATIVA.....	23
1.6 OBJETIVOS.....	23
1.6.1 Objetivo Geral	23
1.6.2 Objetivos Específicos	24
2 METODOLOGIA	25
2.1 SELEÇÃO DE SOROVARES DE <i>Leptospira</i> sp. A SEREM ANALISADOS.....	25
2.2 IDENTIFICAÇÃO DE GRUPOS ORTÓLOGOS DE SOROVARES DE <i>L. interrogans</i>	26
2.3 REANOTAÇÃO DO GENOMA DE <i>L. interrogans</i> sv. Copenhageni str. FIOCRUZ L1-130.....	27
2.4 MONTAGEM DOS <i>HEATMAPS</i>	27
2.5 ÁRVORE FILOGENÉTICA.....	28

2.6 ANÁLISE DE PANGENOMA.....	28
2.5 ANÁLISE DE SINTENIA.....	29
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
3.1 ORTOGRUPOS.....	30
3.2 ÁRVORE FILOGENÉTICA.....	43
3.3 SINTENIA.....	58
4 CONCLUSÃO.....	85
REFERÊNCIAS.....	86

1 INTRODUÇÃO

1.1 A BACTÉRIA *Leptospira interrogans*

A ordem *Spirochaetales* está presente dentro da classe *Spirochaetia*, que por sua vez faz parte do filo Spirochaetes (FAINE et al., 1999). Essa ordem é então dividida em quatro famílias: *Spirochaetaceae*, *Brachyspiraceae*, *Brevinemataceae* e *Leptospiraceae*, sendo esta última a qual o gênero *Leptospira* está incluso (PASTER, 2015). A classe possui representantes patogênicos em diversas ordens como *Leptospiriales*, que contém o gênero *Leptospira*; *Brachyspiriales*, que contém *Brachyspira* spp., causadora de diarreia em suínos; *Spirochaetales*, que contém a bactéria *Treponema pallidum*, causadora da sífilis, e *Borrelia* spp., causadora da doença de Lyme (GUPTA; MAHMOOD; ADEOLU, 2013).

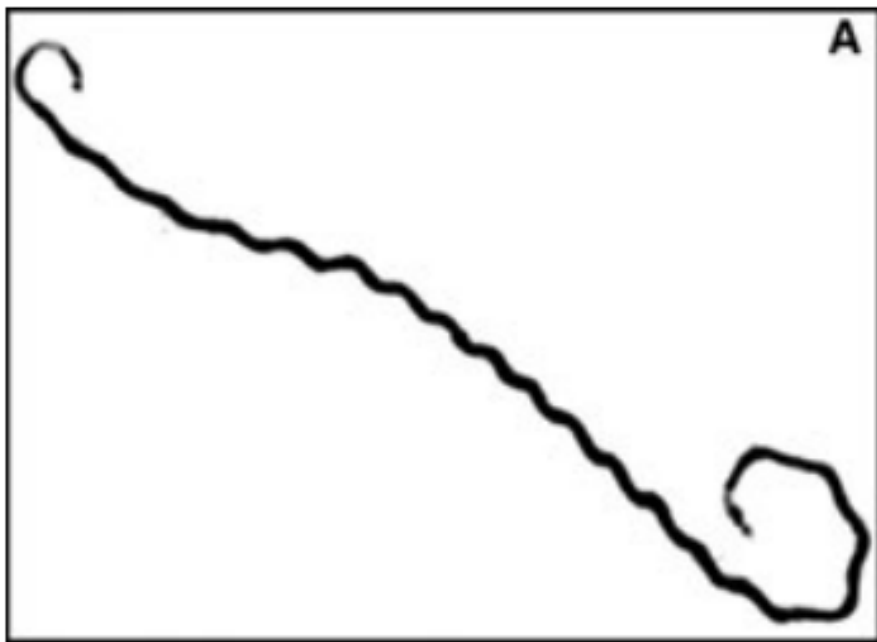
O gênero *Leptospira* compreende bactérias gram-negativas, que podem ser saprófitas, como é o caso de *L. biflexa*, ou patogênicas, como *L. interrogans* (PASTER, 1991), alvo deste projeto. Alguns autores também incluem um terceiro grupo intermediário, o qual não possui uma patogenicidade tão evidente, e compreende as seguintes espécies: *Leptospira inadai*, *Leptospira broomii*, *Leptospira fainei*, *Leptospira wolffii* e *Leptospira licerasiae* (BOURHY et al., 2014).

Historicamente, até 1989, o gênero *Leptospira* era dividido em duas espécies: *L. biflexa*, que compreendia todas as leptospiras saprofitas do gênero, isoladas do ambiente, e *L. interrogans*, que compreendia todas as leptospiras patogênicas (JOHNSON, 1996), sendo esta classificação baseada em características fenotípicas, principalmente (LEVETT, 2001). Até a chegada na classificação atual, houve uma substituição por uma classificação genotípica, além do estudo de diversas cepas deste gênero, sendo então definidas diversas espécies (LEVETT, 2001). Atualmente há 64 espécies dentro do gênero *Leptospira*, sendo 17 dessas espécies pertencentes ao clado P1, ou seja, patogênicas, capazes de causar leptospirose em humanos e outros animais (VINCENT, 2019).

As bactérias pertencentes ao gênero *Leptospira* são aeróbias obrigatórias, que crescem lentamente, possuindo como temperatura ótima de crescimento entre 28 e

30°C (SILVA, 2017), além disso, possuem uma característica morfológica marcante: suas extremidades terminam em forma de gancho (Fig. 1), aparentando portanto formar um ponto de interrogação (ADLER; MOCTEZUMA, 2010). Leptospiras possuem um diâmetro de cerca de 0,25 µm e um comprimento entre 6 e 25 µm, sendo elas, portanto, capazes de passar por filtros de 0,45 µm (BHARTI et al., 2003).

Figura 1 - *Leptospira interrogans* em microscópio eletrônico de transmissão.



Fonte: Fraga, Barbosa e Isaac (2011)

1.2 A DOENÇA LEPTOSPIROSE

A infecção causada por leptospiras pode apresentar-se de formas variadas, desde uma infecção com sinais subclínicos até uma doença febril indiferenciada, mas também pode apresentar quadros sistêmicos mais graves, que são menos frequentes. Por causa de sua ampla variação de sintomas, a leptospirose pode ser confundida com outras doenças como malária e dengue, sendo, portanto, necessário levar em consideração a leptospirose como diagnóstico diferencial (LEVETT, 2003). Sendo

assim, o diagnóstico dessa doença comumente não é confirmado (LEVETT et al., 2001).

Aqueles casos mais graves de leptospirose, que envolviam febre, aumento do fígado e do baço, hemorragias e icterícia, foram identificados por Weil, em 1886, recebendo o nome então de síndrome de Weil (apud DAVIDSON et al., 1934). Tendo ainda, como a apresentação clássica da doença, sintomas como icterícia, hemorragia e falha aguda dos rins, com a síndrome de hemorragia pulmonar severa sendo uma complicação proeminente (GOUVEIA et al., 2008).

Em 1915, Inada e colaboradores descreveram o agente causador da leptospirose, assim como a associação de leptospiras com ratos e outros animais como reservatórios e a via de transmissão da doença a humanos. A leptospira aloja-se nos rins do animal reservatório, sendo excretada juntamente com a urina, a transmissão então se dá quando humanos entram em contato com essa urina, seja de forma direta, ou de modo indireto: através de materiais, solo e água contaminados (WILSON, 1966). Na presença de condições ambientais favoráveis, leptospiras podem viver até meses no ambiente (HARTSKEERL; COLLARES-PEREIRA; ELLIS, 2011).

Leptospirose é a zoonose mais disseminada no mundo todo, sendo uma doença que pode ser encontrada em quase todos os continentes, excluindo apenas Antártida (ADLER; MOCTEZUMA, 2010). Sendo ainda endêmica em regiões tropicais e subtropicais (HARTSKEERL; COLLARES-PEREIRA; ELLIS, 2011). Grupos associados ao contato com reservatórios da doença ou locais contaminados por estes são os principais grupos de risco afetados pela leptospirose, incluem-se nestes moradores de favelas, trabalhadores de esgotos, militares, atletas de esportes aquáticos e pessoas que participam de atividades recreacionais aquáticas. (COSTA et al., 2015; MORGAN et al., 2002; AGAMPODI et al., 2013; KATZ et al., 2002).

Em regiões tropicais, estima-se que 10 ou mais a cada 100.000 pessoas sejam diagnosticadas com leptospirose por ano (GENEVA, 2018). Sendo que a estimativa para o mundo como um todo seja de 500.000 pessoas diagnosticadas por ano (ABELA-RIDDER; SIKKEMA; HARTSKEERL, 2010).

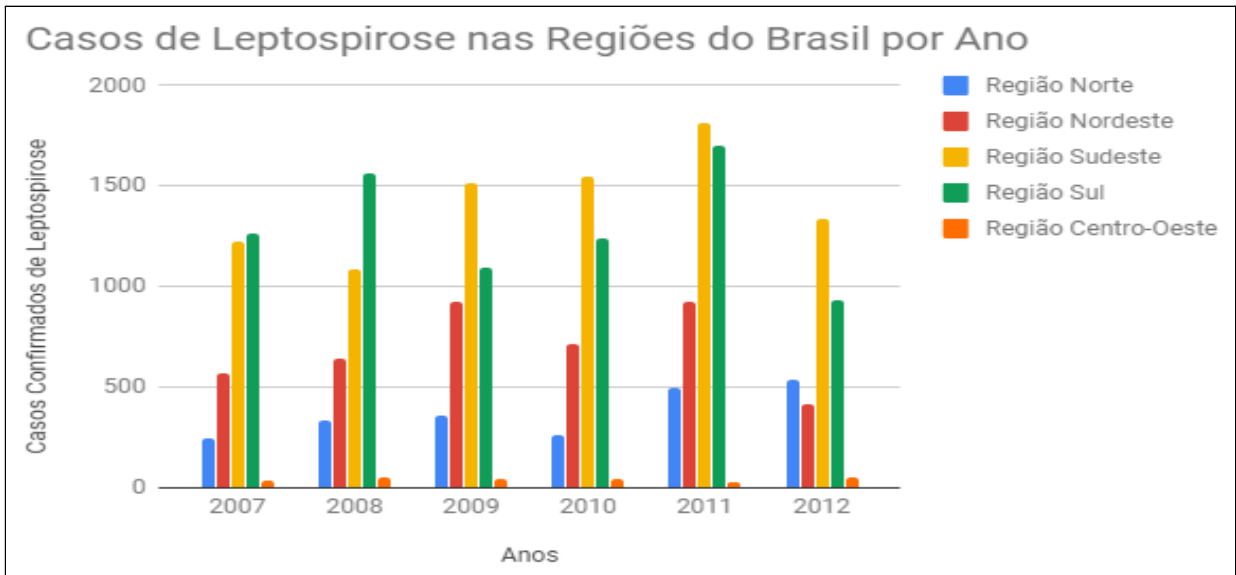
Também, essa doença possui uma maior prevalência nos trópicos, onde sua transmissão acaba por ser mais favorável, tendo em vista que leptospiras patogênicas

são capazes de sobreviver por mais tempo em ambientes que sejam quentes e úmidos (HARTSKEERL; COLLARES-PEREIRA; ELLIS, 2011). De todo modo, Porém sua transmissão ocorre tanto em países industrializados quanto em países em desenvolvimento (BHARTI et al., 2003), havendo uma incidência sazonal, com o pico nos trópicos ocorrendo junto com a estação chuvosa (LEHMANN et al., 2014).

De acordo com a Portaria número 204 do Ministério da Saúde (2016), a leptospirose é uma doença de notificação compulsória e imediata no Brasil. Sendo que a região sul do Brasil costuma possuir o maior número absoluto de casos de leptospirose no país (BLAZIUS, 2005).

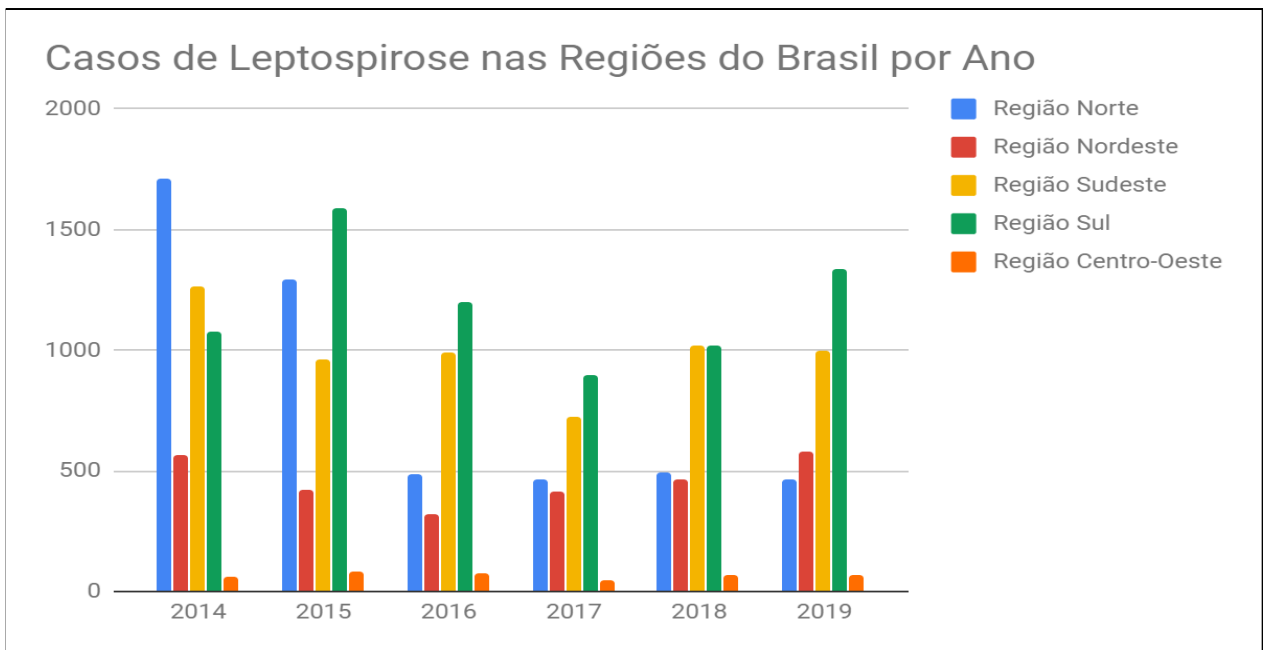
Houve um total de 48.316 casos confirmados de leptospirose entre 2007 e 2019, sendo 16.016 casos na região sul, com a maior parte dos casos (6.485 casos) na região sul provenientes de Santa Catarina (DATASUS, 2021). Tornando assim Santa Catarina o estado com o maior número de casos totais confirmados de leptospirose entre 2007 e 2019. Nos gráficos 1 e 2, há uma comparação entre as regiões do Brasil dos casos confirmados de leptospirose por ano, com a região Sul e Sudeste possuindo os maiores números de casos na maioria dos anos (dos 12 anos contabilizados, a região Sul lidera em 6 destes anos, e a região Sudeste em 5 deles), com a região Sul assumindo a liderança nos últimos 5 anos. No gráfico 3, há uma comparação entre os estados da região Sul do país quanto aos casos de leptospirose por 100 mil habitantes a cada ano, podendo notar que Santa Catarina lidera o número de casos em todos os anos apresentados.

Gráfico 1. Casos de leptospirose nas regiões do Brasil por ano.



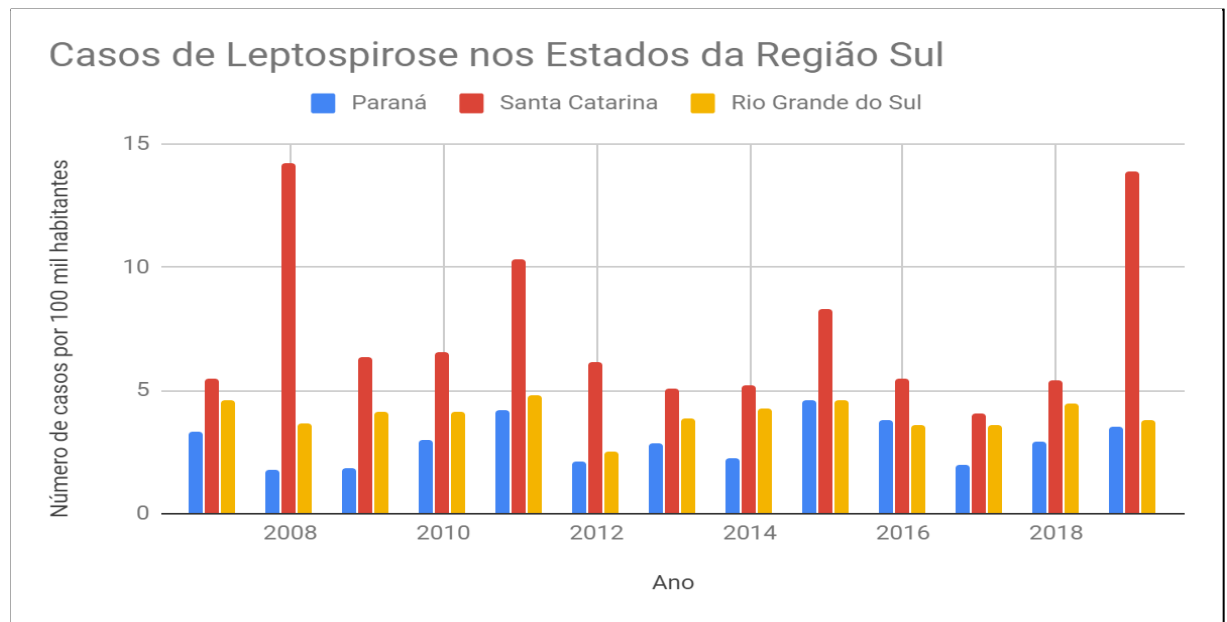
Fonte: DATASUS, 2021

Gráfico 2. Casos de leptospirose nas regiões do Brasil por ano.



Fonte: DATASUS, 2021

Gráfico 3. Casos de leptospirose nos estados da região sul do Brasil por 100 mil habitantes por ano.



Fonte: DATASUS, 2021

É possível que os casos de leptospirose em humanos sejam subnotificados, devido a todas as complicações para o reconhecimento da doença, havendo então uma incidência real maior do que a registrada (SILVA, 2017).

A leptospirose também possui uma grande importância na pecuária, tendo em vista que é capaz de afetar bovinos, suínos e ovinos. Causando diversos problemas, que se traduzem em perda financeira de pecuaristas, envolvendo distúrbios reprodutivos, principalmente abortos, mastite atípica com queda na produção de leite, insuficiência hepática e renal, icterícia e febre (LANGONI, 1999).

Ainda não há uma vacina potente e efetiva sendo comercializada, apesar da importância de combater-se essa doença, as vacinas que foram desenvolvidas até o momento não oferecem proteção contra outros sorovares além daqueles utilizados para fazer a vacina, também, não induzem memória imunológica, fazendo-se necessário reforços anuais (FRAGA; BARBOSA; ISAAC, 2011). O gênero *Leptospira* apresenta aproximadamente 300 sorovares (sv) patogênicos, causadores da leptospirose (COSATE et al., 2017), o que torna inviável a produção de uma vacina que seja capaz de abranger todos os sorovares patogênicos (FRAGA; BARBOSA; ISAAC, 2011). Esses sorovares são classificados a partir de uma análise da heterogeneidade

estrutural no componente carboidrato do lipopolissacarídeo presente na membrana externa da bactéria (BOURHY et al., 2014).

A análise destes sorovares é de suma importância epidemiológica, tendo em vista que provê informações acerca dos possíveis hospedeiros reservatórios envolvidos nessa transmissão (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009), apesar dessa divisão em sorovares não ter uma base taxonômica (JOHNSON, 1996). Em geral, esses sorovares são adaptados para hospedeiros mamíferos específicos, podendo cada sorovar ser adaptado a mais de um hospedeiro (HARTSKEERL; COLLARES-PEREIRA; ELLIS, 2011). O sorovar Copenhageni possui uma alta mortalidade, sendo ainda o maior causador de leptospirose humana (ADLER et al., 2011).

As cepas FMAS_KW1, FMAS_KW2 e FMAS_AW1 foram isoladas de um estudo clínico prospectivo de casos de doença febril indiferenciada (SENEVIRATHA et al., 2020). A cepa SK1, pertencente ao sorovar Copenhageni, foi isolada de um caso grave de leptospirose, apresentando falência hepática e renal (LARSON et al., 2017). Sv. Copenhageni str. FIOCRUZ L1-130 foi isolada de um caso de leptospirose severa. Sv. Lai str. 56601 é considerada uma cepa virulenta (ZHONG et al., 2011), assim como sv. Manilae str. UP-MMC-NIID LP (SATOU et al., 2015). Enquanto sv. Manilae str. UP-MMC-NIID HP e sv. Canicola str. IPAV são cepas avirulentas devido a múltiplas passagens em meio de cultura (ZHONG et al., 2011; SATOU et al., 2015).

Não há informações de virulência das cepas sv. Bratislava str. PigK151 (ALT et al., 2015), sv. Canicola str. LJ178, sv. Copenhageni str. FDAARGOS_203, sv. Hardjo strain L53 e sv. Hardjo str. Norma, além da sua capacidade de causar leptospirose em seus respectivos hospedeiros.

1.3 MECANISMOS DE VIRULÊNCIA EM BACTÉRIAS

O sistema complemento de seres humanos possui três vias de ativação que podem promover o reconhecimento de patógenos, sendo capaz de reconhecer e destruir microorganismos, (FRAGA et al., 2013). Em resposta à pressão seletiva ocasionada pela resposta imune dos hospedeiros, patógenos evoluíram famílias de fatores de virulência, ou seja, proteínas e outros agentes que são importantes para a

capacidade deste patógeno de infectar seu hospedeiro, incluindo fatores que favorecem invasão, crescimento e reprodução, através da evasão das defesas imunológicas do hospedeiro, assim como a aquisição de recursos provenientes do hospedeiro (ARMSTRONG, 2006).

De acordo com Fraga, Isaac e Barbosa (2016), a via alternativa, uma das vias de ação do sistema complemento, inicia-se com a hidrólise espontânea de uma cadeia presente no elemento C3. Na ativação do sistema complemento, são gerados fragmentos C3b e C4b, que podem ligarem-se covalentemente a superfícies propícias, como é o caso de células invasoras localizadas perto do local de ativação. E, nessas superfícies, formam-se convertases C3 e C5, que mais tarde irão desencadear a formação do complexo de ataque de membrana, que por sua vez culminará na lise do microorganismo. Também, a opsonização de microorganismos com C3b e C4b torna mais eficiente a internalização destes por neutrófilos, monocitos e macrófagos (FRAGA; ISAAC; BARBOSA, 2016). Com isso, o elemento C3 é considerado a molécula central da via alternativa (RICKLIN et al., 2010), além de um componente chave do sistema complemento de vertebrados (ARMSTRONG, 2006).

Principalmente por uma limitação metodológica, os mecanismos de virulência em leptospiros são pouco conhecidos, já que por muito tempo houve uma falta de ferramentas para manipulação genética eficientes para leptospiros patogênicos (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009). Também o crescimento lento e a falta de um plasmídeo de ocorrência natural em leptospiros patogênicos dificultou o desenvolvimento deste tipo de ferramenta (EVANGELISTA; COBURN, 2010). Pappas, Benaroudj e Picardeau (2015) facilitaram a manipulação genética de leptospiros patogênicos através da criação do vetor plasmidial pMaORI, capaz de replicar-se em leptospiros saprófitas, intermediárias e patogênicos, expandindo o horizonte de possibilidades de estudos utilizando manipulação genética de leptospiros.

Picardeau *et al.* (2008), ao fazer comparações do genoma de leptospiros patogênicos e saprófitas, identificou 1431 genes presentes em pelo menos uma leptospiro patogênica e ausente em leptospiros saprófitas, ou seja, genes que possivelmente codificam fatores de virulência. Dentro destes genes, aqueles que codificam termolisinas, e a HtpG, que é homólogo à chaperona Hsp90 de eucariotos

(KING et al., 2013) e cuja atividade promove pequenas mudanças conformacionais em seus substratos proteicos de modo que estes possam manter suas atividades (PEARL; PRODROMOU, 2006). Também foram encontradas chaperonas DnaK, GrpE, GroEL e ClpB, que estão associadas com resistência a estresse térmico e virulência (LO et al., 2009; LOURDAULT et al., 2011).

Caimano et al. (2014) comparou a expressão gênica de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni *in vitro* e adaptada ao hospedeiro, identificando 110 genes que possuem regulação positiva apenas *in vivo* e que podem, portanto, configurarem-se como fatores de virulência.

Porém alguns desses fatores de virulência não são compartilhados por todos os sorovares de *L. interrogans*. Sendo possível então, analisar estas diferenças através de análises do pangenoma e de ortologia.

1.5 ORTOLOGIA E BIOINFORMÁTICA

Genes homólogos são genes que descenderam, usualmente por divergência, de um ancestral comum, sendo ortologia um tipo de homologia. (FITCH, 2000) A definição de ortologia, por sua vez, envolve dois genes de espécies diferentes que derivam de um único gene em um último ancestral comum dessas espécies (SONNHAMMER; KOONIN, 2002; FITCH, 2000). De modo similar, o conceito de grupos ortólogos refere-se a um conjunto de genes homólogos que evolui de um único gene ancestral após um determinado evento de especiação (GABALDÓN; KOONIN, 2013).

Os eventos do passado, em especial especiação e duplicação gênica, não são possíveis de serem observados diretamente, porém há possibilidade de inferi-los através do uso de métodos algorítmicos e estatísticos, utilizando-se para isso os dados genômicos disponíveis atualmente (KRISTENSEN et al., 2011).

A inferência de genes ortólogos é a fundação de trabalhos de genômica comparativa, sendo ainda importante para a anotação funcional de novos genomas (KRISTENSEN et al., 2011). O sucesso de estudos envolvendo proteômica depende de anotações corretas do genoma (ARYAL et al., 2014).

Devido a possibilidade de uma dada cepa de bactéria possuir genes únicos a ela, podendo novos genes serem descobertos com cada nova cepa, utiliza-se o termo pangenoma para descrever o conjunto de genes possíveis a uma dada espécie de bactéria (MEDINI *et al.*, 2005; D'AURIA *et al.*, 2010). O pangenoma é então composto pelo chamado genoma central, que contém genes comuns a todas as cepas desta espécie, e pelo genoma dispensável ou acessório que contém genes presentes em uma ou mais cepas, assim como genes únicos de cada cepa (MEDINI *et al.*, 2005; D'AURIA *et al.*, 2010).

Em geral o genoma central é composto por genes responsáveis por aspectos básicos da biologia e do fenótipo da bactéria, enquanto o genoma acessório pode conter adaptações a colonização de diferentes hospedeiros, resistência a antibióticos e fatores de virulência (MEDINI *et al.*, 2005).

A leptospirose é uma doença com distribuição ampla e de suma importância, principalmente no estado de Santa Catarina. Estudar sobre fatores de virulência é essencial para entender a patogênese, assim como identificar alvos para desenhar novas vacinas (WU; WANG; JENNINGS, 2008). Esse estudo ainda possui um enfoque em ortologia, o que outros estudos sobre leptospirosas não abordam, permitindo inferir a função de genes de outras cepas não anotados através da comparação com a função de seus ortólogos anotados. Assim como a predição de genes de virulência é capaz de auxiliar na separação dos diferentes sorovares e cepas.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo Geral

Caracterizar o pangenoma de *L. interrogans* com ênfase em genes de virulência.

1.6.2 Objetivos Específicos

- Analisar a relação de proteínas ortólogas entre os sv. de *L. interrogans*;

- Analisar a presença e ausência de genes ortólogos de fatores de virulência;
- Analisar a sintenia dos cromossomos de sv. de *L. interrogans*.

2 METODOLOGIA

2.1 SELEÇÃO DOS GENOMAS DE SOROVARES DE *Leptospira* sp.

Utilizando o banco de dados *GenBank* do NCBI (BENSON et al., 2012), averiguou-se quais sorovares e cepas estavam depositados no banco de dados e selecionou-se as cepas que possuíam seu genoma completamente sequenciado depositado. Foram encontradas 16 cepas completamente sequenciadas, como é possível ver no Quadro 1.

Quadro 1. Cepas selecionadas para as análises com código de acesso, origem (local e hospedeiro) e grupo de publicação.

Sorovar/Cepa	Código de Acesso	Origem (Local)	Origem (Hospedeiro)	Descrito Por
Sv. Bataviae str. 1489	NZ_CP0438 93	Malásia	Humano	Leibniz Institute DSMZ
Sv. Bataviae str. 1548	NZ_CP0438 80	Malásia	Humano	Leibniz Institute DSMZ
Sv. Bratislava str. PigK151	NZ_CP01141 0	Iowa, EUA	Porco Doméstico	ALT et al., 2015
Sv. Canicola str. LJ178	NZ_CP0445 09	JiangXi, China	Cão	Chinese National Human Genome Center
Sv. Canicola str. 611	NZ_CP0445 13	JiangXi, China	Humano	Chinese National Human

				Genome Cente
Sv. Canicola str. 782	NZ_CP0438 84	Malásia	Humano	Leibniz Institute DSMZ
Sv. Copenhageni str. FDA-ARGOS 203	NZ_CP0204 14	EUA	Humano	SICHTIG et al., 2019
Sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130	NC_005823	Salvador, Brasil	Humano	NASCIMENTO et al., 2004
Sv. Copenhageni str. SK1	NZ_CP0488 30	São Cristóvão e Névis	Cão	LLANES et al., 2020
Str. FMAS_AW1	NZ_CP0392 83	Awissawella, Sri Lanka	Humano	SENEVIRATHN A et al., 2020
Str. FMAS_KW1	NZ_CP0392 58	Karawanalla, Sri Lanka	Humano	SENEVIRATHN A et al., 2020
Str. FMAS_KW2	NZ_CP0392 56	Karawanalla, Sri Lanka	Humano	SENEVIRATHN A et al., 2020
Sv. Hardjo str. L53	NZ_CP0430 41	Paraná, Brasil	Gado	CHIDEROLI et al., 2017
Sv. Hardjo str. Norma	NZ_CP0126 03	Minas Gerais, Brasil	Gado	COSATE et al., 2015
Sv. Icterohaemorrhagiae str. Langkawi	NZ_CP0438 76	Holanda	Humano	Leibniz Institute DSMZ
Sv. Icterohaemorrhagiae	NZ_CP0438 91	Malásia	Humano	Leibniz Institute DSMZ

str. 898				
Sv. Lai str. 56601	NC_004342	Pequin, China	Humano	REN et al., 2003
Sv. Lai str. IPAV	NC_017551	China	Humano	ZHONG et al., 2011
Sv. Linhai str. 56609	NZ_CP0067 23	Linhai, China	Humano	ZHU et al., 2015
Sv. Manilae str. UP-MMC-NIID HP	NZ_CP01193 4	Filipinas	Humano	SATOU et al., 2015
Sv. Manilae str. UP-MMC-NIID LP	NZ_CP01193 1	Filipinas	Humano	SATOU et al., 2015

Fonte: Genbank.

2.2 IDENTIFICAÇÃO DE GRUPOS ORTÓLOGOS DE SOROVARES DE *L. interrogans*

Os produtos putativos anotados nos genomas das 16 cepas escolhidas foram agrupados em grupos ortólogos utilizando-se para isto o programa OrthoFinder (EMMS; KELLY, 2019).

2.3 REANOTAÇÃO DO GENOMA DE *L. interrogans* sv. Copenhageni str. FIOCRUZ L1-130

Foi utilizada a AnnotaPipeline (MAIA, 2019) para a anotação de proteínas hipotéticas no genoma de *L. interrogans* sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130, utilizando os bancos de dados do UniProtKB (Swissprot e TrEMBL). Para isso, converteu-se o arquivo fasta com o proteoma da cepa em arquivo onliner, e selecionou-se apenas as proteínas hipotéticas. Rodando a pipeline num servidor utilizando como *input* esse novo

arquivo onliner só com proteínas hipotéticas, com parâmetro padrão (MAIA, 2019).

2.4 MONTAGEM DOS *HEATMAPS*

Para gerar os *heatmaps* foram utilizados os dados de proteínas provenientes da reanotação do genoma de sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130, juntando-as às proteínas que já possuíam anotação dessa cepa. Com isso, fez-se uma busca nos arquivos Orthogroups.tsv (contendo os ortogrupos) e Orthogroups.GeneCount.tsv (contendo a frequência de cada cepa por ortogrupo) pelos ortogrupos onde str. Fiocruz L1-130 estivesse presente e que possuíam anotações. Dos grupos onde str. Fiocruz L1-130 não estava presente, buscou-se no proteoma das outras 19 cepas aquelas que possuíam anotação e usou-se essas anotações para os ortogrupos sem str. Fiocruz L1-130. Com isso, conseguiu-se um arquivo com os ortogrupos com anotação e um arquivo com os ortogrupos apenas com proteínas hipotéticas. Desses arquivos foram então retirados os chamados de *singletons*, ortogrupos que tivessem a frequência de um gene para cada cepa, mantendo então apenas aqueles ortogrupos onde houvesse uma diferença de frequência entre as cepas. Com esses arquivos, utilizando o R (R Core Team, 2020), foram feitos os *heatmaps*.

2.5 ÁRVORE FILOGENÉTICA

Com intuito de fazer uma comparação entre as cepas, utilizou-se os genomas inteiros de cada cepa, submetidos ao CSIPhylogeny (KASS et al., 2014) com configurações padrão. A árvore foi visualizada no *software* FigTree (RAMBAUT, 2009).

2.6 ANÁLISE DE PANGENOMA

Os genomas em arquivo fasta foram submetidos ao *software* Prokka (SEEMAN, 2014) de modo a gerar arquivos do tipo gff3 para cada genoma. Esses arquivos gff3 foram por sua vez submetidos ao Roary (PAGE et al., 2015) com configurações padrão. Foi utilizado o script em python roary_plots.py para a visualização dos gráficos.

2.7 ANÁLISE DE SINTENIA

Afim de verificar os rearranjos da arquitetura genômica, foi feita a análise de sintenia, utilizando a extensão NUCmer da ferramenta MUMmer (KURTZ, 2004). Primeiramente, o NUCmer gera um mapa com a posição de cada contig dentro dos arquivos multi-fasta, sendo então concatenados em dois arquivos separados. É utilizado o MUMmer para encontrar as correspondências exatas entre os dois genomas, sendo então executado um algoritmo de agrupamento. O sistema então executa um algoritmo de alinhamento (DELCHER, 2002).

Também, para o cromossomo 2, foi utilizado o geneCo (JUNG; KIM; YI, 2019).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ORTOGRUPOS

Como apresentado anteriormente, ortogrupos são grupos de genes ortólogos. Metodologias como as utilizadas neste estudo são importantes para a caracterização do pangenoma. Sendo assim, foram encontrados um número total de 80.442 genes (Tabela 1), com 79.734 genes estando em ortogrupos. Foram encontrados um total de 5.155 ortogrupos, com 39 deles sendo cepa-específicos e 3.095 ortogrupos com todas as cepas presentes.

Tabela 1. Dados dos ortogrupos.

Número de genes	80.442
Número de genes em ortogrupos	79.734
Número de ortogrupos	5.155
Número de ortogrupos cepa-específicos	39
Número de genes em ortogrupos cepa-específicos (exclusivos)	93
Número de ortogrupos compartilhados por todas as cepas	3.095

Há 3.095 ortogrupos (60%) com todas as cepas presentes e que, portanto, fariam parte do genoma central de *L. interrogans*. O restante dos 2.060 ortogrupos (40%; Tabela 2), que não possuem todas as cepas, seriam parte do genoma acessório.

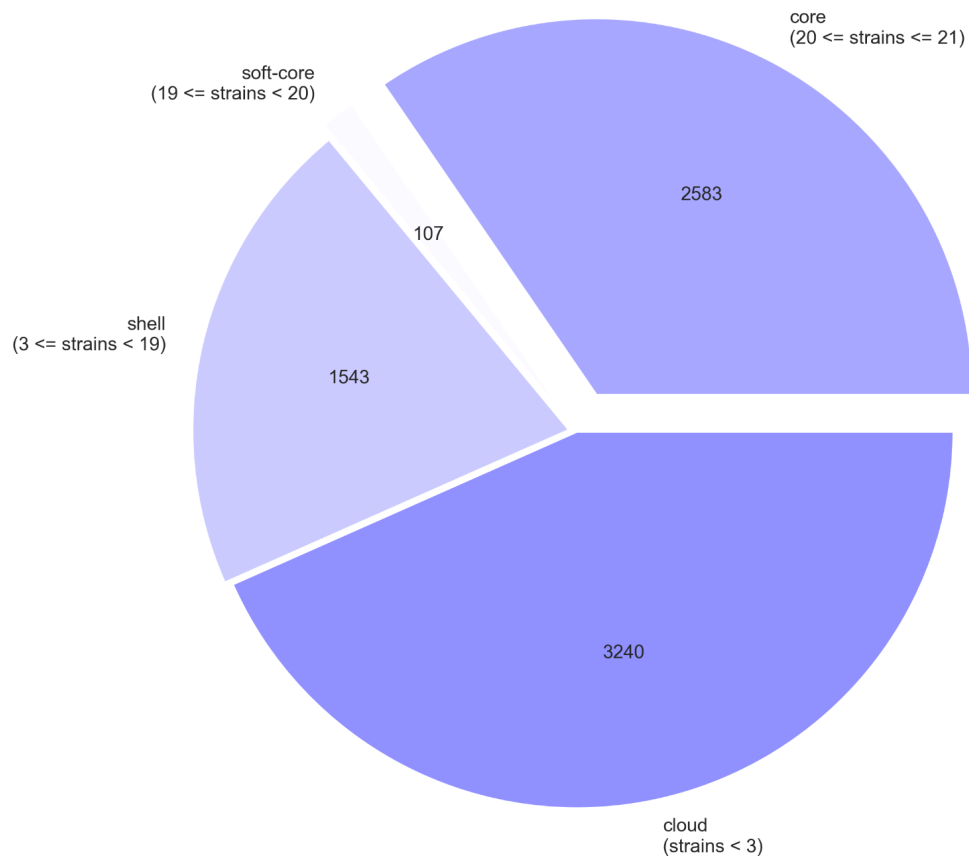
Tabela 2. Número de cepas por ortogrupo.

Número de cepas por ortogrupo	Número de ortogrupos
1	39
2	573
3	200
4	193
5	125
6	86
7	100
8	106
9	59
10	56
11	42
12	28
13	39
14	25
15	48
16	51
17	50
18	98
19	142
20	3095

De acordo com dados do *software* Roary (Fig. 3), há 2.583 genes (34,56%) que fazem parte do genoma central, ou seja, genes que estão presentes em todas as cepas. No caso do *software* Roary, ele considera também como parte do genoma central genes presentes em 95% das cepas, o que ajuda a mitigar o efeito de um

sequenciamento de pouca qualidade que possa estar presente nas cepas. Há 107 genes (1,43%) do *soft-core*. Há 3.240 genes (43,36%) exclusivos, ou seja, genes presentes em apenas três cepas ou menos (genoma *cloud*). Há 1.543 genes (20,65%) no restante do genoma acessório (genoma *shell*).

Figura 3. Análise do pangenoma de *Leptospira interrogans*.



Fonte: Roary. A figura demonstra as divisões do pangenoma: Genoma central, *shell* e *cloud*. Indicando entre parênteses o número de cepas que um dado gene tem que estar presente para fazer parte de cada fatia do genoma.

Ao analisar a presença de genes em ortogrupos, no *heatmap* formaram-se quatro grupos quanto à presença ou ausência de genes em ortogrupos (Fig. 4). O primeiro grupo inclui str. FMAS_AW1, sv. Bataviae str. 1489, sv. Canicola str. 782.

Figura 4. *Heatmap* dos grupos ortólogos por sorovar.



Fonte: Compilação da autora¹. O cinza representa ausência de genes no determinado ortogrupo, com os tons de azul representando a quantidade de genes presentes no ortogrupo, quanto mais escuro, maior o número de genes. Na base, em azul escuro estão as cepas isoladas nas Filipinas, em roxo cepas isoladas em Sri Lanka, em vermelho isoladas na China, em Laranja isoladas nos EUA, em Amarelo isoladas no Brasil, em rosa isolada em São Cristóvão e Névis, em azul claro isoladas na Malásia, e em verde isolada na Holanda. A silhueta representa o hospedeiro de origem da cepa.

O segundo grupo inclui sv. Lai str. IPAV, sv. Lai str. 56601 e sv. Bratislava str. PigK151. De acordo com Zhong e colaboradores (2011), que fez uma análise comparativa entre os genomas inteiros de sv. Lai str. IPAV e sv. Lai str. 56601, concluiu que essas cepas são de fato similares.

O terceiro grupo inclui sv. Hardjo str. Norma, sv. Hardjo str. L53, sv. Linhai str. 56609, sv. Canicola str. 611, sv. Canicola str. LJ178, sv. Copenhageni str. FDAARGOS_203, sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130, e sv. Copenhageni str. SK1. As duas cepas com sorovar Canicola formam um subgrupo, assim como as três cepas do sorovar Copenhageni. Nesse grupo, é evidente o agrupamento por sorovar em seus subgrupos. Outro estudo comparando sv. Canicola str. LJ178 e sv. Canicola str. 611 identificou-as como similares (ZHANG, 2020).

Por último, o quarto grupo inclui str. FMAS_KW1, str. FMAS_KW2, sv. Manilae str. UP-MMC-NIID HP e sv. Manilae str. UP-MMC-NIID LP. As cepas v. Manilae str. UP-MMC-NIID HP e sv. Manilae str. UP-MMC-NIID LP são duas cepas vindas da mesma cepa com str. UP-MMC-NIID HP tendo várias passagens em meio de cultura, perdendo sua virulência (SATOU et al., 2015). Enquanto str. UP-MMC-NIID LP teve poucas passagens e manteve sua virulência. Str. FMAS_KW2 é proveniente de um caso de doença febril, enquanto sv. Manilae str. UP-MMC-NIIDLP é considerada uma cepa virulenta, portanto, não houve um agrupamento evidente por virulência ao analisar o agrupamento gerado pelos dados de todos os ortogrupos com os dados de virulência disponíveis (SENEVIRATHNA et al., 2020; SATOU et al., 2015). Porém, só há dados de virulência de poucos hospedeiros, podendo estes não serem um bom demonstrativo da virulência da cepa. Como há um agrupamento geral por sorovar, é possível que a str.

¹ Montagem a partir de imagens coletadas no site canva.com e imagens de OrthoMCL.

FMAS_KW2, que não teve seu sorovar ou sorogrupo identificados (SENEVIRATHNA et al., 2020), seja do sorovar Manilae, já que se agrupou com este.

É importante frisar que não há um agrupamento por hospedeiros ou localização em geral, com apenas sv. Hardjo str. Norma e sv. Hardjo str. L53 estando no mesmo grupo e dividindo o mesmo hospedeiro principal (bovinos). Porém, levando em consideração os outros grupos, seu agrupamento parece ser por conta de seu sorovar e não seu hospedeiro principal.

Dentre os genes amplamente duplicados, estão genes que codificam transposases, principalmente da família IS110, IS3 e IS982. Sequências de inserção (IS) são pequenos elementos transponíveis, presentes em cromossomos bacterianos e plasmídeos, que codificam transposases que promovem sua transposição, sendo que em geral, elas codificam apenas produtos relacionados com sua mobilidade (CHOI; OHTA; OHTSUBO, 2003; MAHILLON; CHANDLER, 1998).

Além disso, observou-se apenas diferença relacionada à presença ou ausência de termolisinas nas cepas, relacionada à termolisina LIC13322 (Tabela 4). Sabemos que essas proteínas são importantes para os mecanismos de patogênese e evasão do sistema imune. *L. interrogans*, assim como outras leptospiros patogênicas, são capazes de inibir algumas vias associadas ao sistema imune de seres humanos, em especial a via alternativa, através de metaloproteases, chamadas termolisinas, que clivam componentes do sistema complemento, como o elemento C3, possibilitando assim que a bactéria evada o sistema imune (AMAMURA et al., 2017; FRAGA; ISAAC; BARBOSA, 2016). Uma importante classe de fatores de virulência é a das proteases, da qual as termolisinas fazem parte, que pode agir auxiliando na evasão do sistema imune, nutrição e reprodução do patógeno (ARMSTRONG, 2006). A família das termolisinas é exclusiva de leptospiros patogênicas, sendo essas proteínas codificadas por diversos genes independentes (FRAGA et al., 2013). Por tanto, esperava-se um grande nível de conservação dessas proteínas nas cepas avaliadas. Porém, nas cepas FMAS_KW2, sv. Canicola str. 611, sv. Lai str. 56601, sv. Lai str. IPAV, e sv. Canicola str. LJ178 foi observada a ausência da termolisina LIC13322, podendo haver uma compensação com maior expressão das outras termolisinas. No entanto, ainda não se sabe se as outras termolisinas possuem algum papel redundante ou aditivo a LIC13322 na evasão imune

de leptospiras (BARBOSA; ISAAC, 2020). Fouts e colaboradores (2016), ao analisar o pangenoma do gênero *Leptospira*, constatou a presença de quatro termolisinas em *L. interrogans*, porém por analisar apenas uma cepa (sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130) não constatou a variação encontrada neste presente estudo.

Tabela 4. Presença de fatores de virulência nas cepas.

Gene	1489	1548	cani611	cani782	copfda	copl1130	fmasaw1	fmaskw1	fmaskw2	hardjol53	hardjonorma	icterol	lai56601	lalipav	linhai	lj178	manilaeuph	manilaeupl	pigk151	sk1
LIC10715	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
LIC13320	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
LIC13321	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
LIC13322	2	2	0	2	1	1	2	2	0	1	1	2	0	0	2	0	1	1	1	1
Hemolisina LIC11040	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Hemolisina LIC13143	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
SphH LIC10657	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
LenA LIC10009	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
LenC WP_001983274	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
LenD WP_000836871	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
LenE WP_000282726	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
LenF WP_000696002	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1
LigA	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	2	1	0	0	1	1	1	1	1	1
LipL32 LIC11352	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
LigB	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
LipL45	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Hemolisina LIC12632	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Oxidoreductase LIC_RS0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
LfhA WP_001049971	3	2	2	2	1	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1
Citromo C peroxidase W	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OmpL1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OmpA LIC13479	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OmpA LIC10191	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Citromo C peroxidase W	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Citromo C peroxidase W	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Citromo C peroxidase W	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Fonte: Autora. Em verde está a cepa referência, sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130. Os números representam a quantidade de proteínas presentes de cada cepa em cada ortogrupo, com 0 significando ausência; 1, um exemplar e assim por diante.

A ação hemolítica de hemolisinas afeta diversas células de hospedeiros mamíferos, sendo importante para a patogênese das leptospiras (LEE, 2002), muitas delas agem por meio da degradação ocasionada pela esfingomielinase sobre eritrócitos (TROWBRIDGE et al., 1981; KASAROV, 1970). Hemolisinas, especialmente a hemolisina codificada por *sphH*, possuem ação hemolítica, sendo que a hemólise causada por ela está associada à formação de poros na membrana da célula-alvo, sendo que SphH também possui homologia com uma hemolisina de *L. borgpetersenii* (LEE et al., 2000). A criação de poros por hemolisinas permite a passagem de moléculas para dentro da célula afetada, então a alta concentração de macromoléculas

dentro da célula gera uma pressão osmótica que vai causar a entrada de água na célula e, conseqüentemente, a lise desta célula (LEE, 2002). Hemolisinas são citotóxicas para células endoteliais, linfócitos e macrófagos (NARAYANAVARI; KISHORE; SRITHARAN, 2012; FLORES-DÍAZ et al., 2016), e elas, especialmente a esfingomielinases, são implicadas nas complicações hemorrágicas associadas à leptospirose (NARAYANAVARI; KISHORE; SRITHARAN, 2012;).

Na China, a hemorragia pulmonar associada à leptospirose tem sido uma complicação mais proeminente (NALLY et al., 2004; HU et al., 2014). A similaridade no padrão da quantidade de hemolisinas em sv. Lai str. 56601, sv. Lai str. IPAV e sv. Linhai str. 56609 pode estar associada a isto, já que hemolisinas parecem estar envolvidas com esse tipo de sintoma e estas três cepas foram isoladas de casos de leptospirose na China. É possível também que uma maior quantidade de hemolisinas nas cepas esteja associada com uma maior prevalência de sintomas hemorrágicos no hospedeiro, porém, é necessário um maior número de dados clínicos para comprovar esta associação.

Os fatores de virulência LigA e LigB são de extrema importância para interações entre patógeno e hospedeiro (MCBRIDE et al., 2009), sendo capazes de ligarem-se com diversas proteínas da matriz extracelular do hospedeiro, incluindo entre elas fibronectina, colágenos, laminina e elastina, assim como também possivelmente participam de diversos estágios da infecção (CHOY et al., 2007). Essas proteínas podem também estar associadas à evasão do sistema imune, assim como à especificidade dos sorovares a seus hospedeiros principais (KOIZUMI; WATANABE, 2004). LigA e LigB também demonstraram homologia a proteínas de ligação celular de outras bactérias, especialmente *Yersinia* spp. e *Clostridium* spp. (PALANIAPPAN et al., 2006). Sendo que a proteína de ligação celular de *Yersinia* spp. já demonstrou possuir a capacidade de clivar o componente C3 do sistema complemento (SODEINDE et al., 1992).

Tanto LigA quanto LigB são possíveis candidatos a antígenos para vacinas contra leptospirosas patogênicas (KOIZUMI; WATANABE, 2004; PALANIAPPAN et al., 2006; CHOY et al., 2007). O fragmento LigANI de LigA (os seis únicos domínios de repetição semelhante a Ig carboxi-terminais de LigA) conferiu imunoproteção contra

mortalidade (67-100%) em hamsters que receberam um inóculo letal de *L. interrogans*, porém, imunização com este fragmento não gerou imunidade esterilizante (SILVA et al., 2007).

A presença de ortólogos a LigA e LigB não é comum a todas as cepas. Contudo aquelas cepas que não possuem ortólogos de LigA (sv. Canicola str. 611, sv. Lai str. IPAV, sv. Lai str. 56601 e str. FMAS_KW1) possuem ortólogos de LigB, e a única cepa que não possui um ortólogo a LigB (sv. Hardjo str. Norma) possui um ortólogo à LigA. Dados na literatura associam a não-expressão de LigA e LigB com a perda da capacidade de induzir uma infecção letal em hamsters, demonstrando assim a importância de possuir pelo menos uma das proteínas, LigA ou LigB, para manutenção da patogenicidade (MATSUNAGA et al., 2003).

Uma eventual redundância de função de LigA e LigB possivelmente permitiria o desaparecimento de uma delas sem impedir a virulência da cepa. Não é possível assumir que a presença de ambas as proteínas gere uma maior virulência para a cepa, já que pode haver uma compensação de expressão naquelas cepas sem uma das proteínas. Enquanto Fouts e colaboradores (2016) encontrou ortólogos a LigB em todas as espécies patogênicas de *Leptospira*, e LigA em apenas quatro destas espécies patogênicas, não foram avaliadas mais de uma cepa de cada espécie, sendo possível que outras espécies também possuam cepas sem ortólogos a LigA ou LigB, comprometendo a eficácia de uma vacina usando LigA ou LigB.

O sistema complemento de seres humanos, assim como de outros mamíferos, possui o fator H, uma proteína que funciona como cofator da proteína I, que por sua vez é capaz de clivar o componente C3b do sistema complemento em sua forma inativa (ZIPFEL et al., 2002; VERMA, 2006). A proteína de superfície LenA de *L. interrogans* é capaz de ligar-se ao fator H, usando-o para proteger-se dos efeitos destrutivos da ativação do sistema complemento (VERMA, 2006). Uma maior expressão desta proteína, ocasionada pela presença de mais de um gene codificante para esta proteína no genoma, poderia ajudar na evasão do sistema imune, aumentando a virulência destas cepas. Porém é pouco provável que este seja o caso, levando em consideração que sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130 e sv. Manilae str. UP-MMC-NIID LP foram isolados de casos graves de leptospirose e não apresentam dois genes que codificam

LenA.

LenA é uma proteína de superfície com múltiplas funções, além de estar envolvida com a evasão imune, também está envolvida na adesão e invasão de tecidos do hospedeiro (VERMA et al., 2010; FRASER; BROWN, 2017). É preciso que a leptospira seja capaz de ultrapassar as barreiras impostas pelo tecido, para que ela possa disseminar-se para diversos órgãos ao infectar um hospedeiro, deste modo, essa proteína, que é capaz de se ligar ao plasminogênio do hospedeiro e ativá-lo, pode utilizá-lo para degradar estas barreiras no tecido, principalmente a fibronectina (VERMA et al., 2010). LenA também já se mostrou ser mais expressa à 37°C, uma condição similar a temperatura encontrada na infecção de um hospedeiro humano (FRASER; BROWN, 2017).

O processo de interação de proteína de superfície de bactérias com a matriz extracelular do hospedeiro, mediado por adesinas, é um passo crucial para a colonização de tecidos do hospedeiro (LJUNGH, 1996; BARBOSA, 2006). Lsa27 (do inglês, *Leptospiral surface adhesin 27* kDa - adesina leptospiral de superfície de 27 kDa) adere-se de forma forte à laminina, uma glicoproteína da matriz extracelular e da lâmina basal (BARBOSA, 2006; LONGHI, 2009), sendo importante para a colonização do hospedeiro.

L. interrogans possui 3 genes que codificam a proteína citocromo c peroxidase, que reduz peróxido de hidrogênio à água, podendo essa via contribuir para a detoxificação de peróxido (NASCIMENTO et al., 2004). Esses 3 genes estão presentes em todos os sorovares, indicando uma pressão seletiva para que eles se conservassem. Parte da resposta imune inata de hospedeiros envolve espécies reativas de oxigênio, que causam estresse oxidativo para a bactéria (ZAVALA-ALVARADO et al., 2020), sendo que este tipo de resposta do hospedeiro já foi observada em infecção por leptospiros (ARAÚJO et al., 2014), demonstrando a importância de haver citocromo c peroxidase em leptospiros patogênicos. É possível que uma maior quantidade de proteínas citocromo c peroxidase aumentem o *fitness* da bactéria, justificando a presença de 3 proteínas redundantes, que estão presentes em todas as cepas analisadas. Também, há outras enzimas de detoxificação de espécies reativas de oxigênio nestes genomas, como a oxidorreductase LIC_RS01015, presente em todos os

genomas analisados.

Estruturas expostas na superfície da bactéria são presumivelmente os fatores que mediam a adesão da leptospira às células do hospedeiro, sendo que, assim como outras espiroquetas, leptospiras possuem diversas lipoproteínas, que podem estar envolvidas na mediação das interações com a célula hospedeira (MATSUNAGA et al., 2003). A matriz extracelular do hospedeiro inclui colágeno, laminina, fibronectina e fibrinogênio, e pode servir como substrato tanto para adesão do patógeno às células do hospedeiro como também para a fixação dos microrganismos colonizadores (PATTI et al., 1994). Tanto adesão quanto colonização do tecido do hospedeiro pelo patógeno são eventos de suma importância e que ocorrem cedo no processo de infecção (BARBOSA et al., 2006). Proteínas expostas à superfície celular são também alvos potenciais para a indução de resposta imune durante a infecção. OmpL1 é uma adesina que interage com laminina e fibronectina (FERNANDES et al., 2012).

Neste estudo, foi possível constatar que as proteínas integrais de membrana externa, LipL32 e LipL45 estão presentes em todas as cepas na mesma proporção (1 gene por cepa). É possível que LipL32 sofra de um processamento pós-transcricional, apesar de isto ser raro em proteínas de superfície de bactérias, resultando em mais de uma proteína codificada por um único gene. Também, LipL32 já demonstrou facilitar a hemólise mediada pela esfingomielinase codificada por *sphH* (CULLEN, 2002).

A proteína de superfície LipL45, somente é expressa em cepas com poucas passagens (ZENG et al., 2015). Esta proteína é considerada uma porina (GUERREIRO et al., 2001). Além disso, também é considerada uma forte candidata a antígeno para vacinas contra leptospiras patogênicas (VIJAYACHARI et al., 2015), corroborando assim o resultado de alta conservação entre as cepas patogênicas da espécie observados neste estudo.

As proteínas da família OmpA (LIC13479 e LIC10191), a proteína de membrana LIC10825, OmpL1, LipL32, e LipL45 estão presentes em todas as cepas e podem ser bons candidatos a antígenos para vacinas. OmpL1, LipL32 e LipL45 já foram testados em diversos experimentos. A eficácia de LipL32 em construtos de DNA, BCG ou adenovírus é baixa, e vacinas com subunidade não apresentaram proteção significativa. Frações de membrana contendo LipL41 e OmpL1 induziram uma resposta protetiva de

71% de sobrevivência, mas não foram comercializadas vacinas com essa combinação (DELLAGOSTIN et al., 2011). LIC13479, LIC10191, LIC10825 codificam proteínas de membrana que ainda não foram testadas e podem ser boas candidatas a antígenos para vacinas, sendo necessário verificar sua conservação proteica entre as cepas e realizar outros experimentos para verificar sua eficácia.

Foram identificadas 24 proteínas presentes em sv. Lai str. 56601, uma cepa virulenta, e ausentes em sv. Lai str. IPAV, uma cepa avirulenta e considerada próxima de sv. Lai str. 56601. Destas, 24 são hipotéticas (LA_RS11190, LA_RS16765, LA_RS04795, LA_RS19335, LA_RS16260, LA_RS13930, LA_RS16500, LA_RS09570, LA_RS04835, LA_RS19480, LA_RS14560, LA_RS19345, LA_RS04875, LA_RS19260, LA_RS19355, LA_RS19400, LA_RS15840, LA_RS19300, LA_RS03975, LA_RS19325, LA_RS19375, LA_RS19420, LA_RS19425, LA_RS19505), sem anotação, e, portanto, sem informações sobre sua possível função. Porém, LA_RS04795, LA_RS09570, LA_RS14560, LA_RS19355, LA_RS19300, LA_RS19375, LA_RS19505 possuem domínios transmembrana, podendo ser possivelmente alvos interessantes para vacina, sendo necessário mais estudos sobre elas.

LIC_RS23005 codifica uma proteína com motivo SLEI, um motivo altamente conservado e encontrado em diversas proteínas hipotéticas pequenas (LU et al., 2020). LIC_RS23205 codifica uma proteína contendo um domínio de repetição rica em leucina, um motivo de ligação versátil e otimizado para interações proteína-proteína, encontrada em proteínas envolvidas em processos de adesão celular, especialmente em eucariotos (KOBÉ; KAJAVA, 2001). Uma proteína com repetição rica em leucina com função de adesão, chamada YopM, é um fator de virulência de *Yersinia pestis*, cuja ausência diminui a virulência desta bactéria (HINES et al. 2001).

LIC_RS23100 codifica uma proteína com repetição de tetra-trico-peptídeo, um motivo pouco conservado de interações proteína-proteína (CERVENY et al., 2013). Diversas proteínas com esse tipo de repetição em bactérias estão associadas à virulência, como LcrH do gênero *Yersinia*, uma proteína associada com a inibição da resposta do sistema imune do hospedeiro (NAVARRO; ALTO; DIXON, 2005), e PcrH de *Pseudomonas aeruginosa* (FRITZH-LINDSTEN, 1997). LIC_RS22930 e LIMLP_RS22875 codificam transposases.

Foram identificadas 4 proteínas presentes em sv. Manilae str. UP-MMC-NIID LP, uma cepa virulenta, e ausentes em sv. Manilae str. UP-MMC-NIID HP, proveniente da mesma cepa porém com múltiplas passagem *in vitro* que a tornaram avirulenta. Destas, 2 codificam proteínas hipotéticas (F8B19_RS04095 e LIMLP_RS23150), sem anotação, e, portanto, sem informações sobre sua possível função. F8B19_RS07025 codifica uma transposase da família IS110. Já LIC_RS07600 codifica uma proteína contendo domínio DUF342, que é um domínio associado a bactofilinas, proteínas do citoesqueleto (KÜHN et al., 2010). Sendo que a perda de bactofilinas está associada a perda de motilidade (JACKSON et al., 2018). Todos esses genes parecem ter sofrido mutações pontuais que interromperam a fase aberta de leitura em sv. Manilae str. UP-MMC-NIID HP.

Essas proteínas presentes em cepas virulências e ausentes em cepas avirulenta são potenciais fatores de virulência, tendo em vista que as mutações que levaram à perda da expressão desses genes, e consequentemente seus produtos putativos, surgiram com as múltiplas passagens *in vitro*, estando também associadas a um quadro de avirulência. Apesar das vantagens de análises de genômica comparativa, a dificuldade de atribuir função para produtos putativos de genes não caracterizados, como fatores de virulência, ainda é uma importante limitação (RASKO et al., 2008). Sendo necessários mais estudos para a melhor caracterização desses genes e seus produtos, que podem ser importantes fatores de virulência.

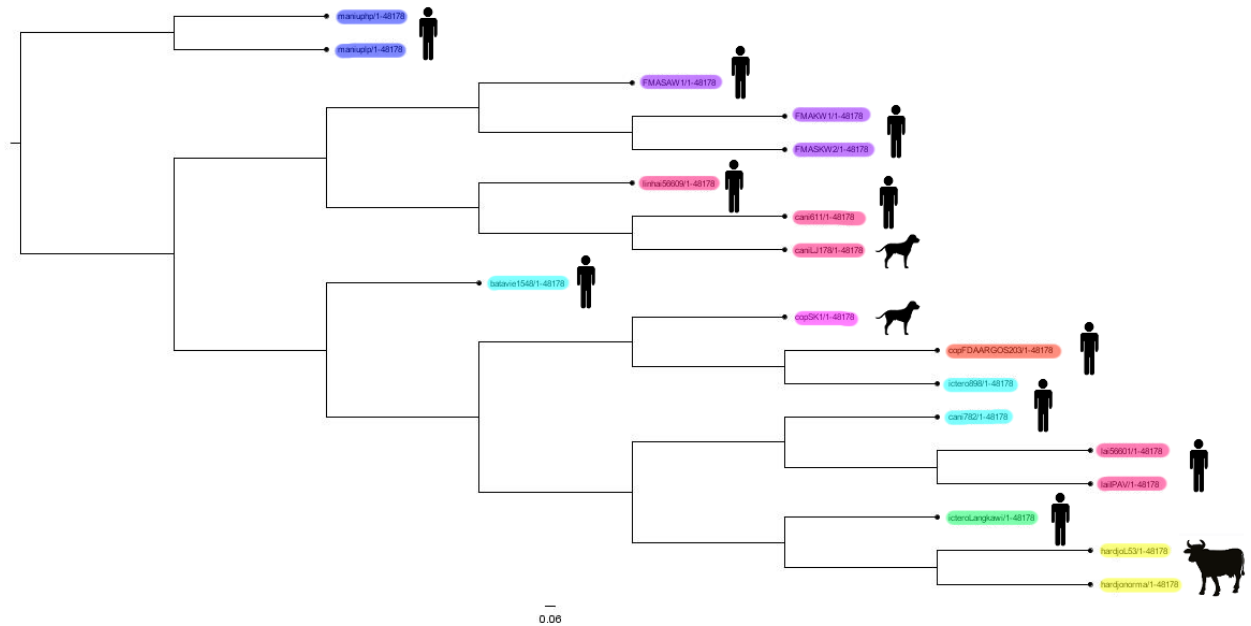
3.2 ÁRVORE FILOGENÉTICA

A árvore filogenética demonstrada na Figura 5 foi feita utilizando o genoma inteiro das cepas. Houve um agrupamento apenas por sorovar, não havendo agrupamento por país de origem do isolado. Era esperado que as cepas do sorovar Copenhageni formassem um grupo dentro da filogenia, já que o sorogrupo Icterohaemorrhagiae, do qual o sorovar Copenhageni faz parte, é considerado como tendo sua cepas muito similares entre si no mundo todo (JAEGER et al., 2018). Estudos anteriores caracterizaram sv. Lai str. IPAV e sv. Lai str. 56601 como muito parecidas entre si (HUANG et al., 2014), corroborando a árvore filogenética deste estudo.

Todavia não foram analisadas as características dos SNPs (Polimorfismos de

base única, do inglês *Single Nucleotide Polymorphisms*) ou se haviam SNPs característicos de cada sorovar.

Figura 5. Árvore filogenética com genoma total, colorida por país de isolamento.



Fonte: Compilação da autora². Em azul estão as cepas isoladas nas Filipinas, em roxo cepas isoladas em Sri Lanka, em vermelho isoladas na China, em Laranja isoladas nos EUA, em Amarelo isoladas no Brasil, e em rosa isolada em São Cristóvão e Névis. A silhueta representa o hospedeiro de origem da cepa (suíno, ser humano, cão ou gado). A árvore utiliza maximum likelihood. A barra de escala representa a substituição nucleotídica por sítio dividida pelo tamanho da sequência.

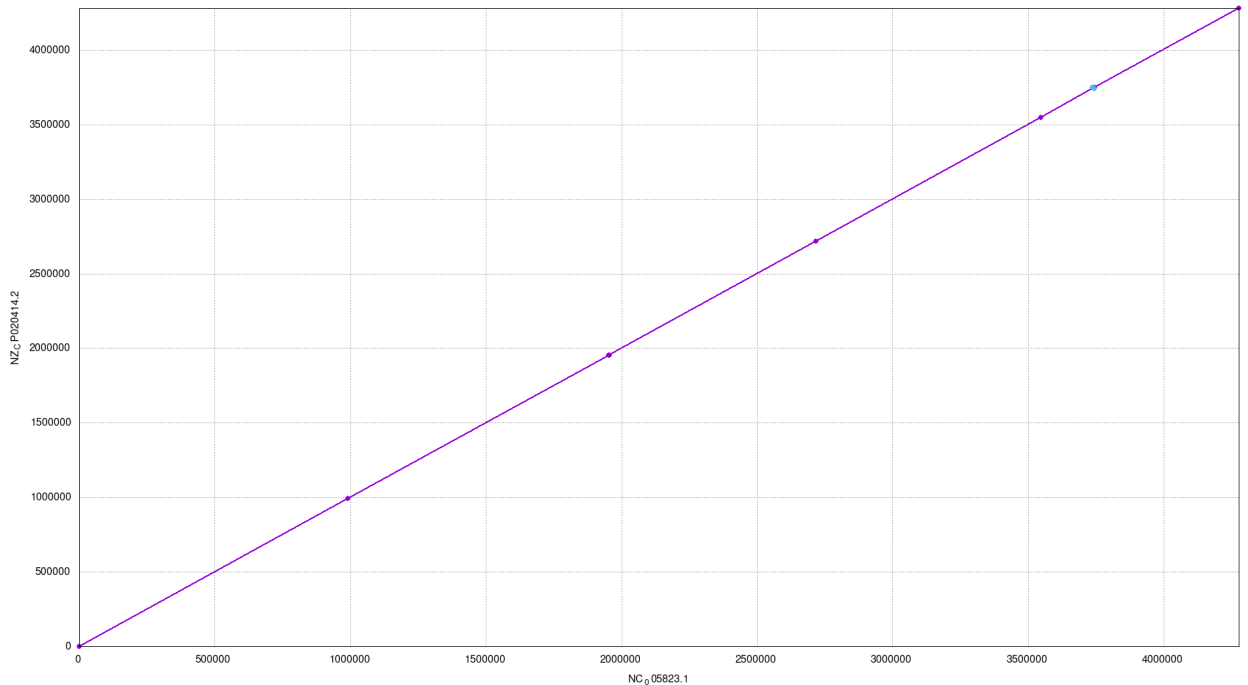
3.3 SINTENIA

Ao fazer a análise de sintenia, comparando-se sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130 com as outras cepas, percebe-se uma semelhança grande entre a cepa referência e sv. Copenhageni str. FDAARGOS_203 (Fig. 6), sv. Copenhageni str. SK1

² Montagem a partir de imagens coletadas no site canva.com e FigTree.

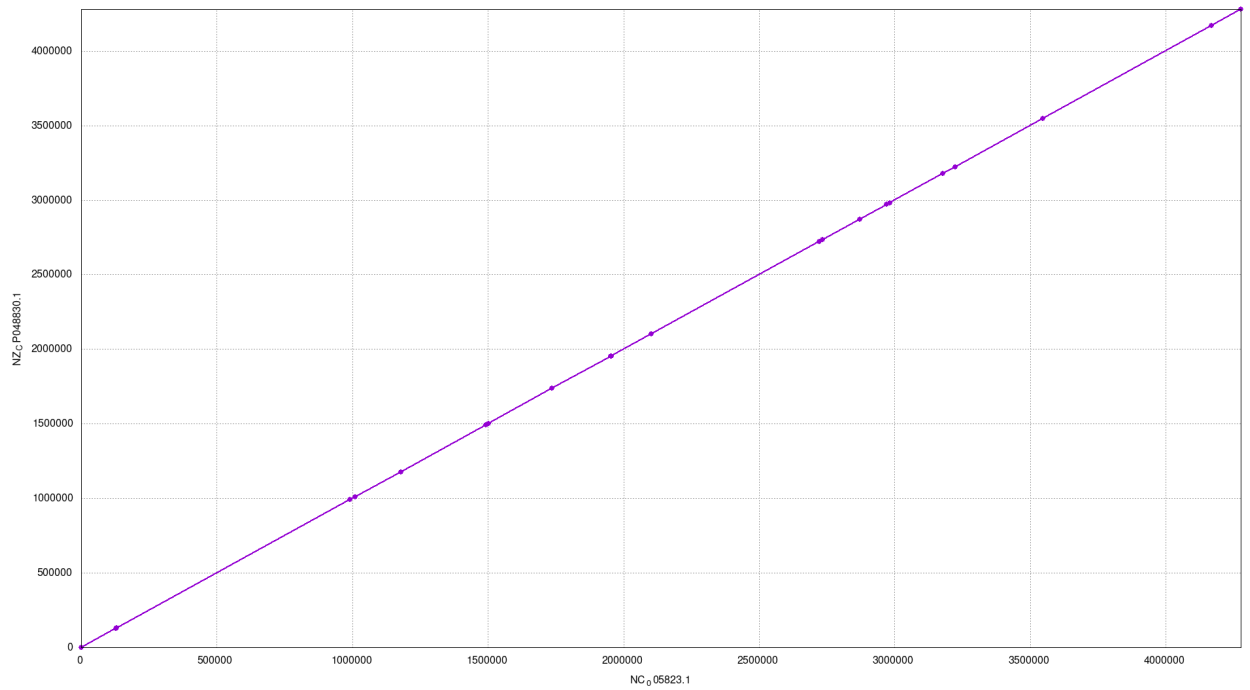
(Fig.7), sv. *Icterohaemorrhagiae* str. Langkawi (Fig.8), e sv. *Icterohaemorrhagiae* str. 898 (Fig.9), onde as estruturas dos cromossomos são muito similares. Há um pequeno ponto de inversão na comparação entre a cepa referência e sv. Copenhageni str. FDAARGOS_203, uma sequência sem anotação gênica.

Figura 6. Análise de sintonia entre os cromossomos 1 da cepa referência e sv. Copenhageni str. FDAARGOS 203.



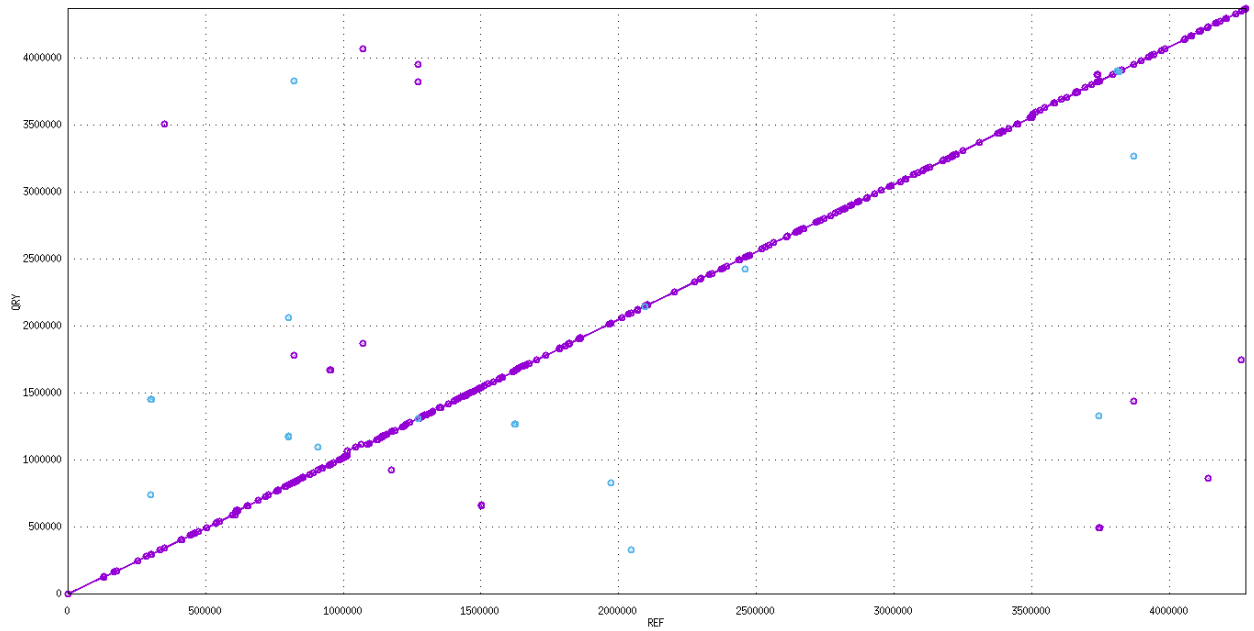
Eixo x representa o genoma de sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130. Eixo y representa o genoma de sv. Copenhageni str. FDAARGOS 203. Traços e pontos em roxo representam sequências na mesma direção, traços e pontos em azul representam inversões.

Figura 7. Análise de sintenia entre os cromossomos 1 da cepa referência e sv. Copenhageni str. SK1.



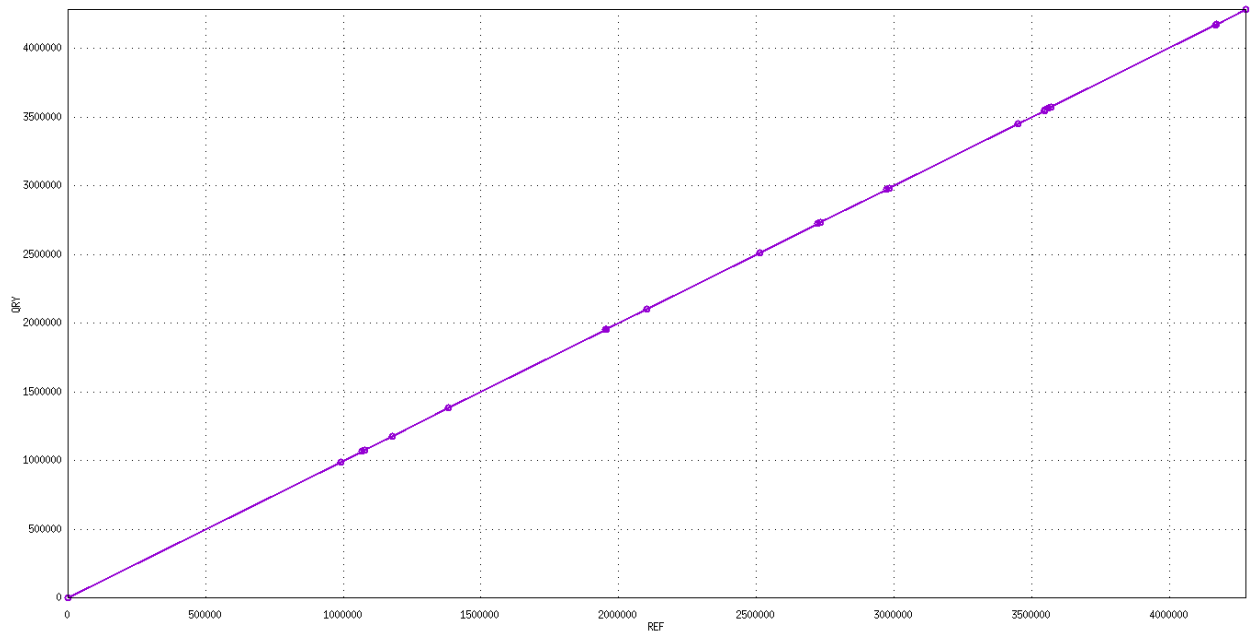
Eixo x representa o genoma de sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130. Eixo y representa o genoma de sv. Copenhageni str. SK1. Traços e pontos em roxo representam sequências na mesma direção, traços e pontos em azul representam inversões.

Figura 8. Análise de sintenia entre os cromossomos 1 da cepa referência e sv. *Icterohaemorrhagiae* str. Langkawi.



Eixo x representa o genoma de sv. *Copenhageni* str. Fiocruz L1-130. Eixo y representa o genoma de sv. *Icterohaemorrhagiae* str. Langkawi. Traços e pontos em roxo representam sequências na mesma direção, traços e pontos em azul representam inversões.

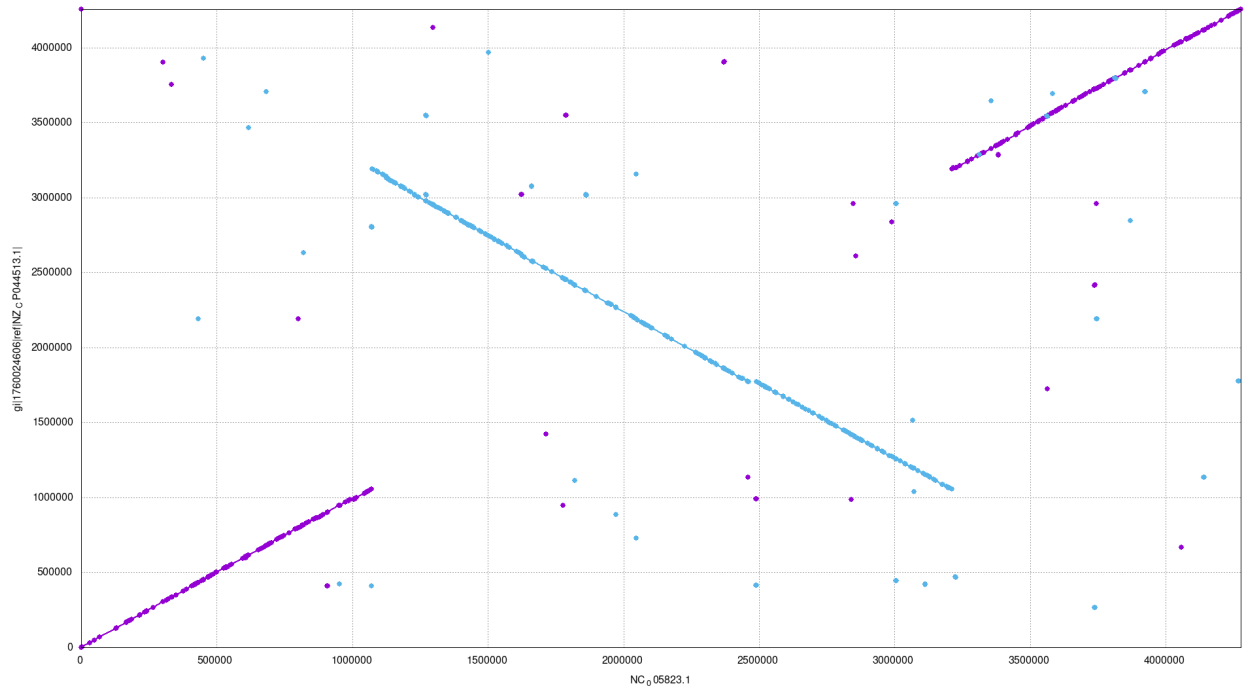
Figura 9. Análise de sintenia entre os cromossomos 1 da cepa referência e sv. *Icterohaemorrhagiae* str. 898.



Eixo x representa o genoma de sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130. Eixo y representa o genoma de sv. *Icterohaemorrhagiae* str. 898. Traços e pontos em roxo representam seqüências na mesma direção, traços e pontos em azul representam inversões.

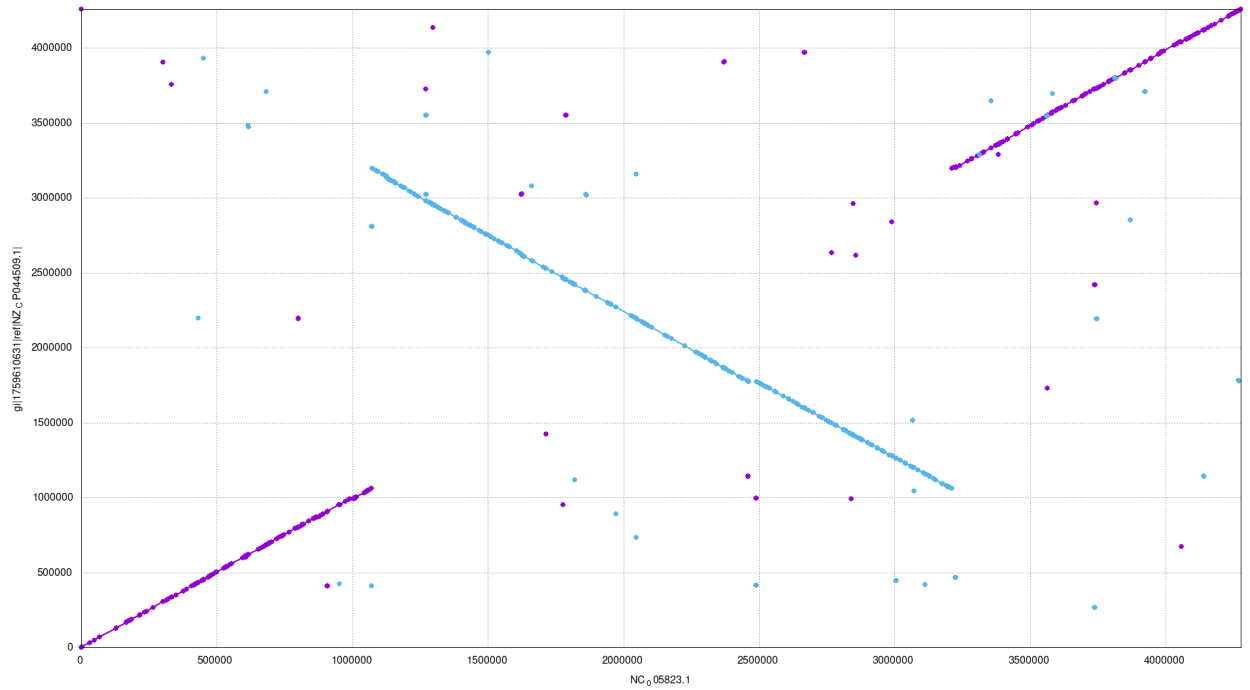
Já as cepas 611 (Fig. 10) e LJ178 (Fig. 11), ambas do sorovar Canicola, possuem estruturas semelhantes, com uma grande inversão na parte central do cromossomo. Porém, a cepa 782 (Fig. 12), do mesmo sorovar, apresenta duas inversões menores, não sendo tão similar. Entretanto, o padrão de similaridade entre as cepas do mesmo sorovar se repete dentro dos outros sorovares. As cepas FMAS_KW1 (Fig. 13) e FMAS_AW1 (Fig. 14), que são parte do mesmo sorogrupo, possuem também uma grande inversão com o mesmo padrão entre as duas cepas.

Figura 10. Análise de sintonia entre os cromossomos 1 da cepa referência e sv. *Canicola* str. 611.



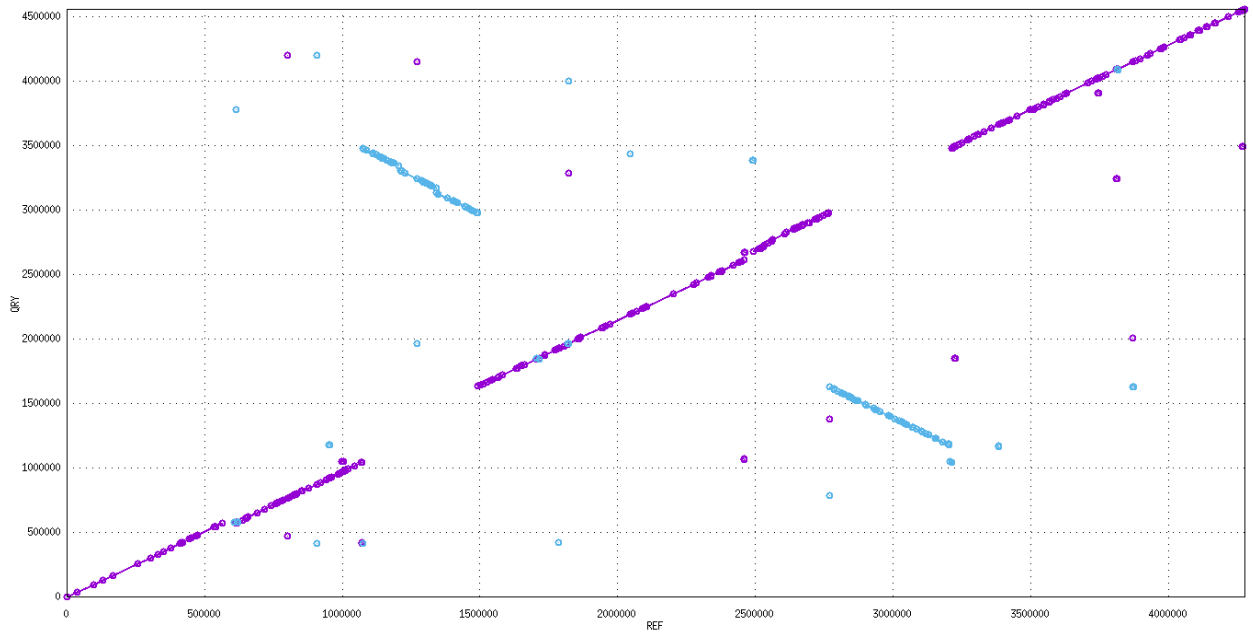
Eixo x representa o genoma de sv. *Copenhageni* str. Fiocruz L1-130. Eixo y representa o genoma de sv. *Canicola* str. 611. Traços e pontos em roxo representam seqüências na mesma direção, traços e pontos em azul representam inversões.

Figura 11. Análise de sintonia entre os cromossomos 1 da cepa referência e sv. *Canicola* str. LJ178.



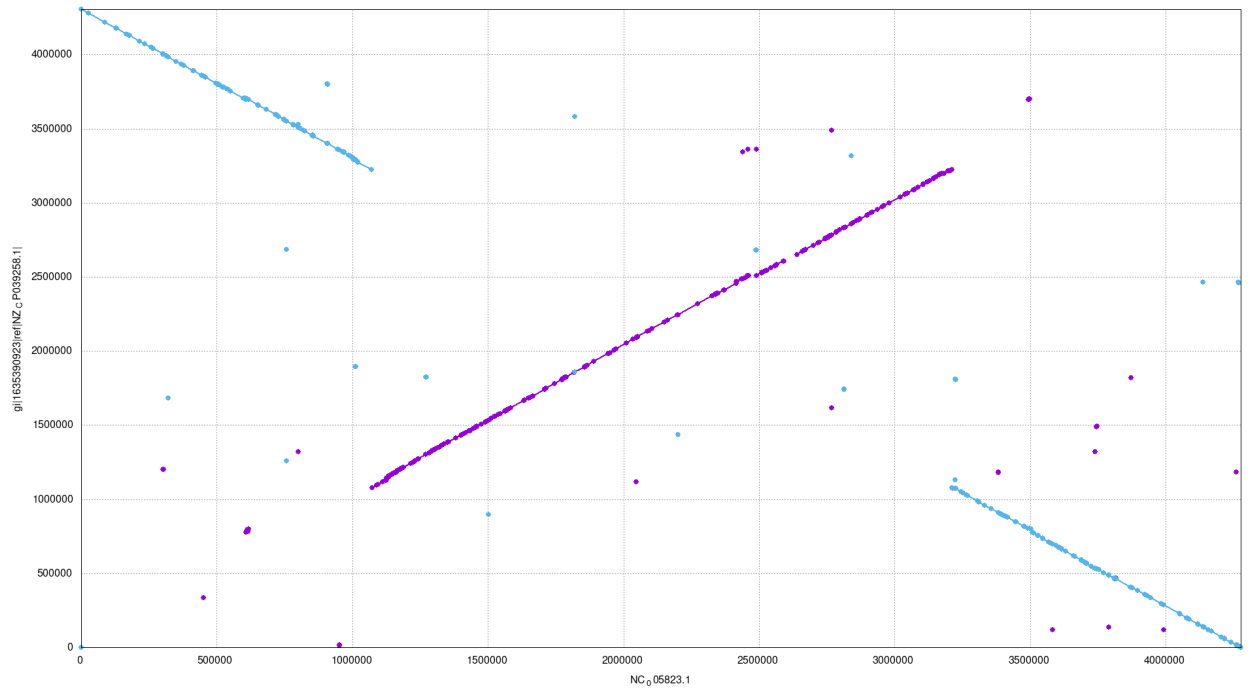
Eixo x representa o genoma de sv. *Copenhageni* str. Fiocruz L1-130. Eixo y representa o genoma de sv. *Canicola* str. LJ178. Traços e pontos em roxo representam sequências na mesma direção, traços e pontos em azul representam inversões.

Figura 12. Análise de sintonia entre os cromossomos 1 da cepa referência e sv. *Canicola* str. 782.



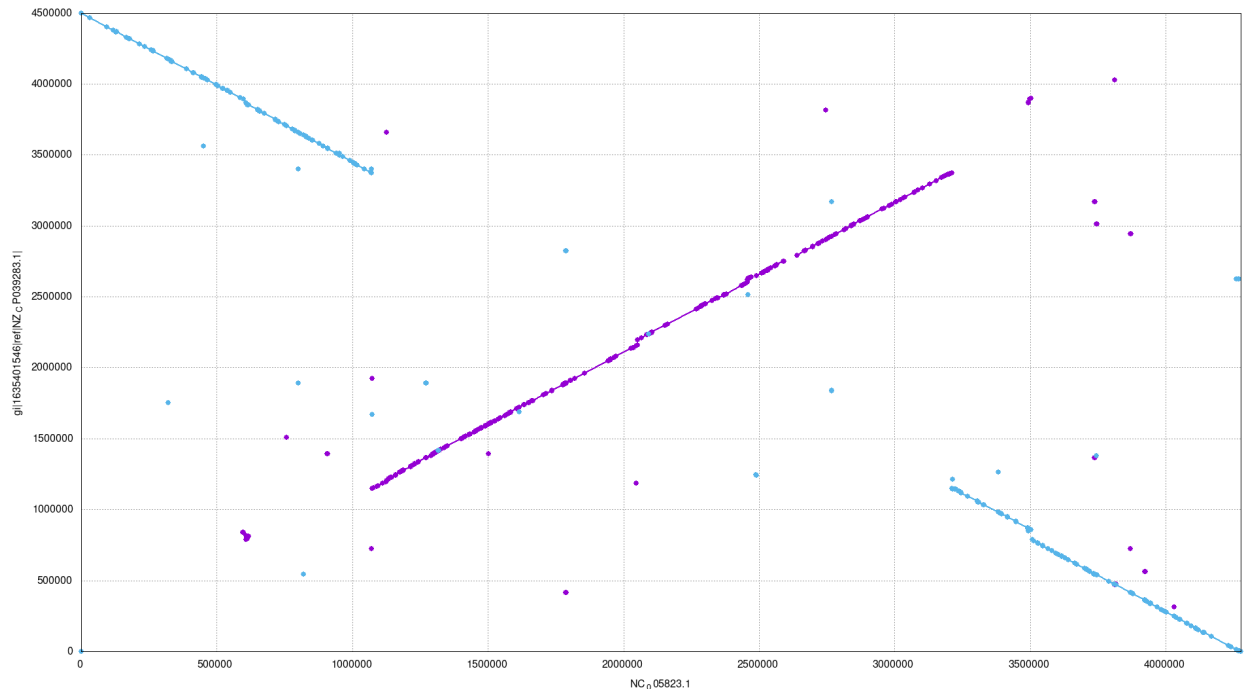
Eixo x representa o genoma de sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130. Eixo y representa o genoma de sv. *Canicola* str. 782. Traços e pontos em roxo representam seqüências na mesma direção, traços e pontos em azul representam inversões.

Figura 13. Análise de sintonia entre os cromossomos 1 da cepa referência e str. FMAS_KW1.



Eixo x representa o genoma de sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130. Eixo y representa o genoma de str. FMAS_KW1. Traços e pontos em roxo representam sequências na mesma direção, traços e pontos em azul representam inversões.

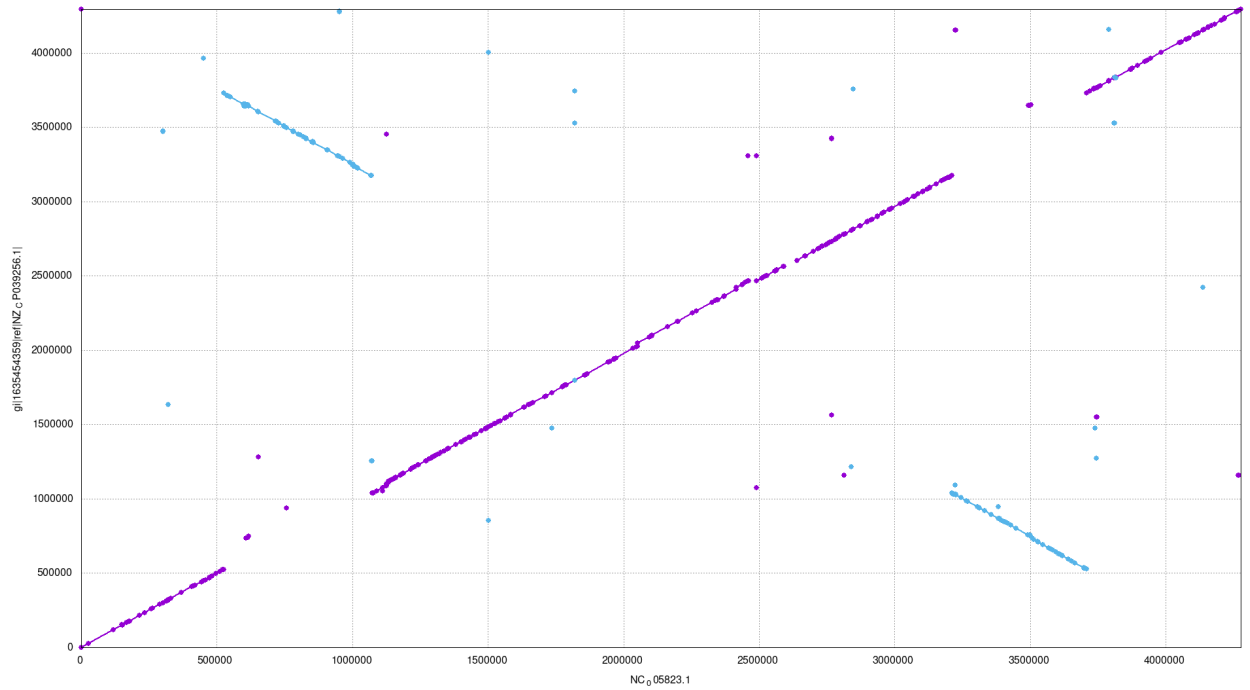
Figura 14. Análise de sintonia entre os cromossomos 1 da cepa referência e str. FMAS_AW1.



Eixo x representa o genoma de sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130. Eixo y representa o genoma de str. FMAS_AW1. Traços e pontos em roxo representam sequências na mesma direção, traços e pontos em azul representam inversões.

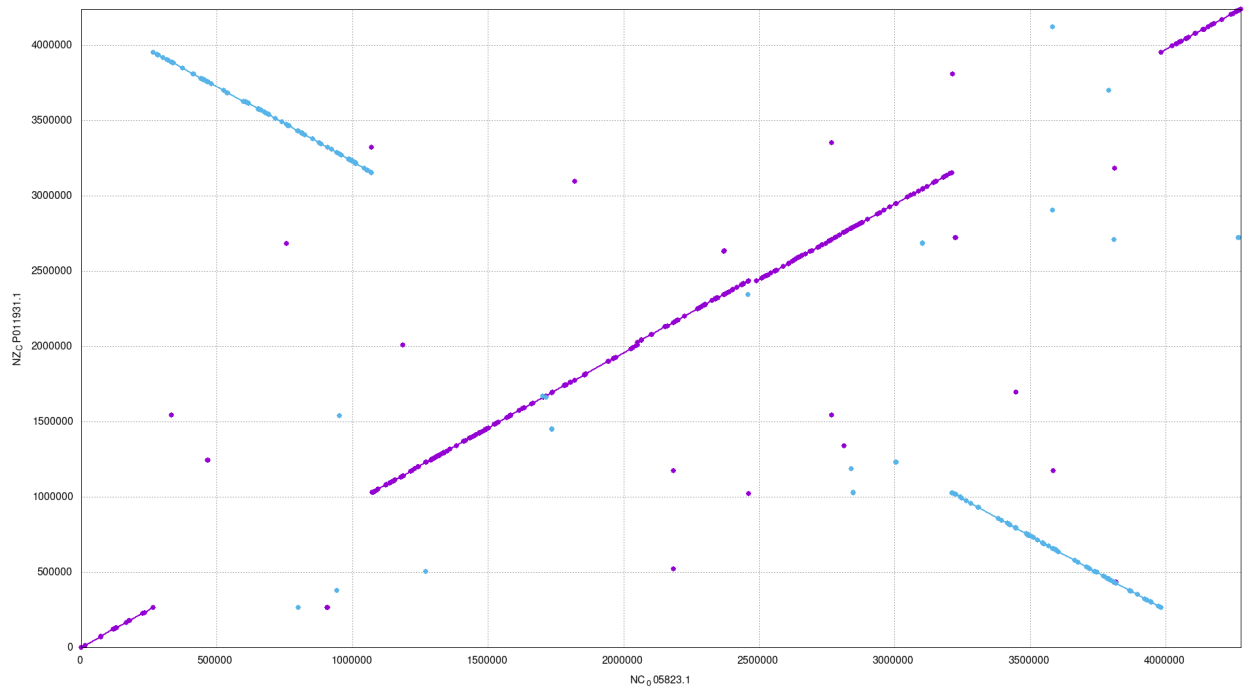
Str. FMAS_KW2 (Fig. 15) apresenta duas inversões, um padrão similar aos sv. Manilae str. UP-MMC-NIID LP (Fig. 16) e sv. Manilae str. UP-MMC-NIID HP (Fig. 17), sendo que estes dois últimos possuem inversões de tamanho maior. Essa similaridade reforça a possibilidade de que str. FMAS_KW2 seja parte do sorovar Manilae. Enquanto sv. Bataviae str. 1489 (Fig. 18) e sv. Bataviae str. 1548 (Fig. 19) possuem um padrão similar de inversão.

Figura 15. Análise de sintenia entre os cromossomos 1 da cepa referência e str. FMAS_KW2.



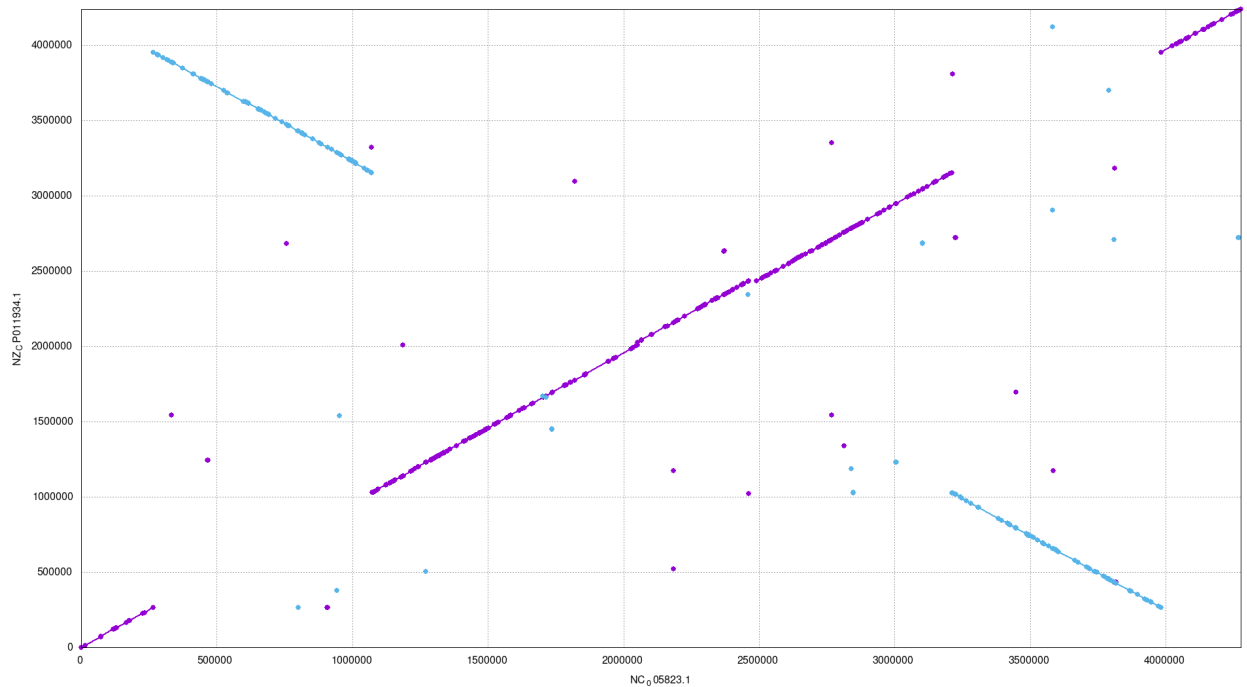
Eixo x representa o genoma de sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130. Eixo y representa o genoma de str. FMAS_KW2. Traços e pontos em roxo representam sequências na mesma direção, traços e pontos em azul representam inversões.

Figura 16. Análise de sintonia entre os cromossomos 1 da cepa referência e sv. Manilae str. UP-MMC-NIID LP.



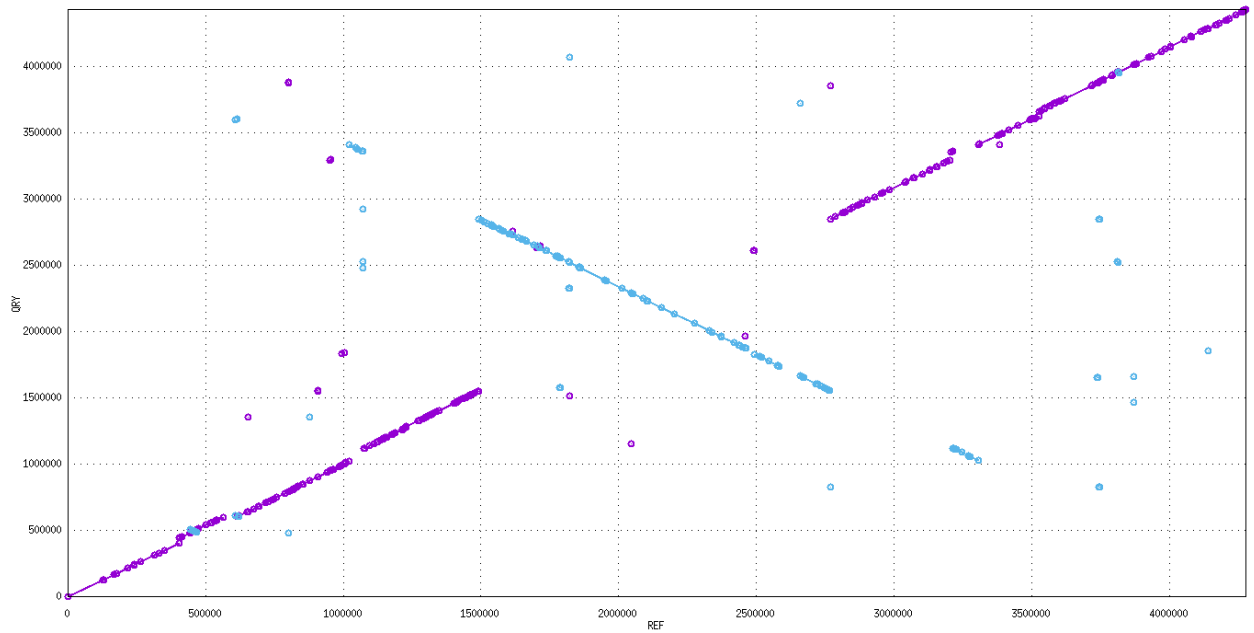
Eixo x representa o genoma de sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130. Eixo y representa o genoma de sv. Manilae str. UP-MMC-NIID LP. Traços e pontos em roxo representam seqüências na mesma direção, traços e pontos em azul representam inversões.

Figura 17. Análise de sintonia entre os cromossomos 1 da cepa referência e sv. Manilae str. UP-MMC-NIID HP.



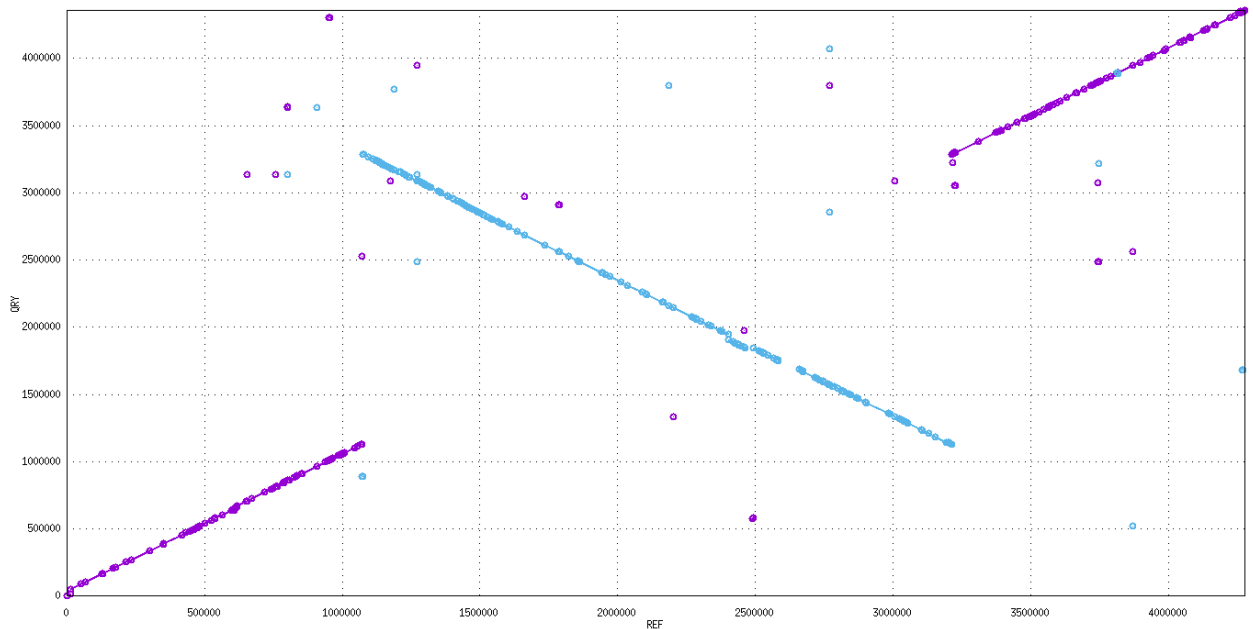
Eixo x representa o genoma de sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130. Eixo y representa o genoma de sv. Manilae str. UP-MMC-NIID HP. Traços e pontos em roxo representam seqüências na mesma direção, traços e pontos em azul representam inversões.

Figura 18. Análise de sintonia entre os cromossomos 1 da cepa referência e sv. Bataviae str. 1489.



Eixo x representa o genoma de sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130. Eixo y representa o genoma de sv. Bataviae str. 1489. Traços e pontos em roxo representam seqüências na mesma direção, traços e pontos em azul representam inversões.

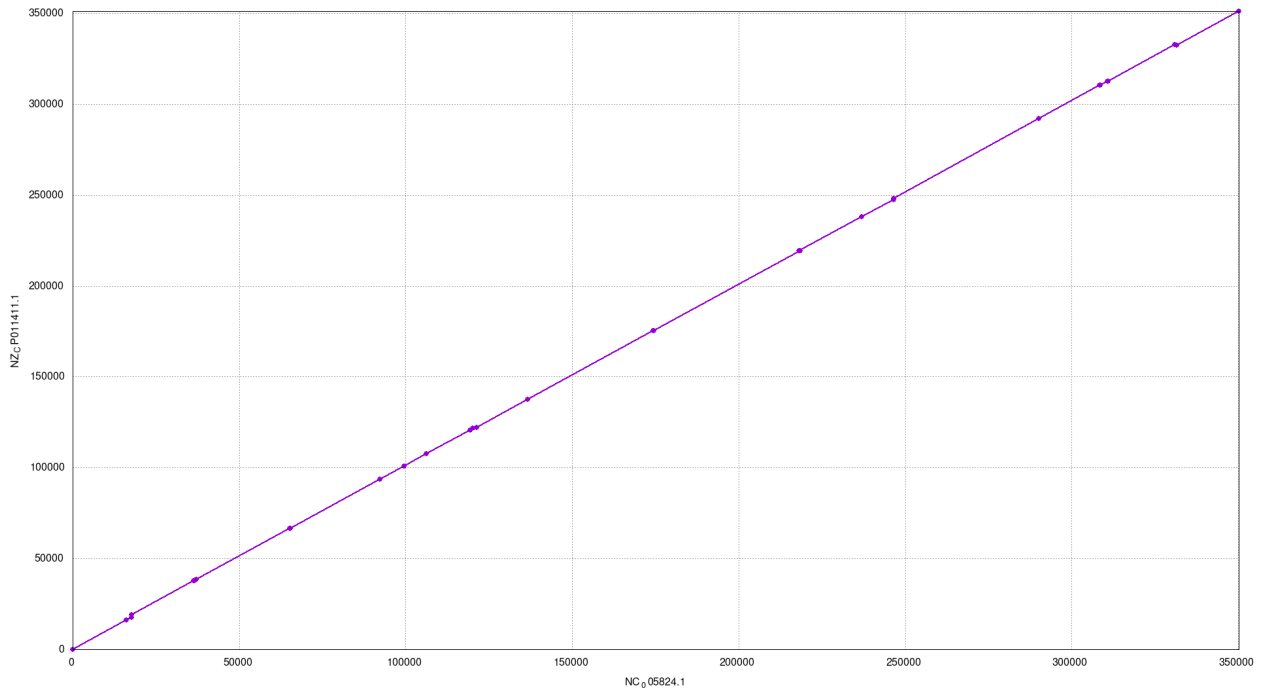
Figura 19. Análise de sintonia entre os cromossomos 1 da cepa referência e sv. Bataviae str. 1548.



Eixo x representa o genoma de sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130. Eixo y representa o genoma de sv. Bataviae str. 1548. Traços e pontos em roxo representam sequências na mesma direção, traços e pontos em azul representam inversões.

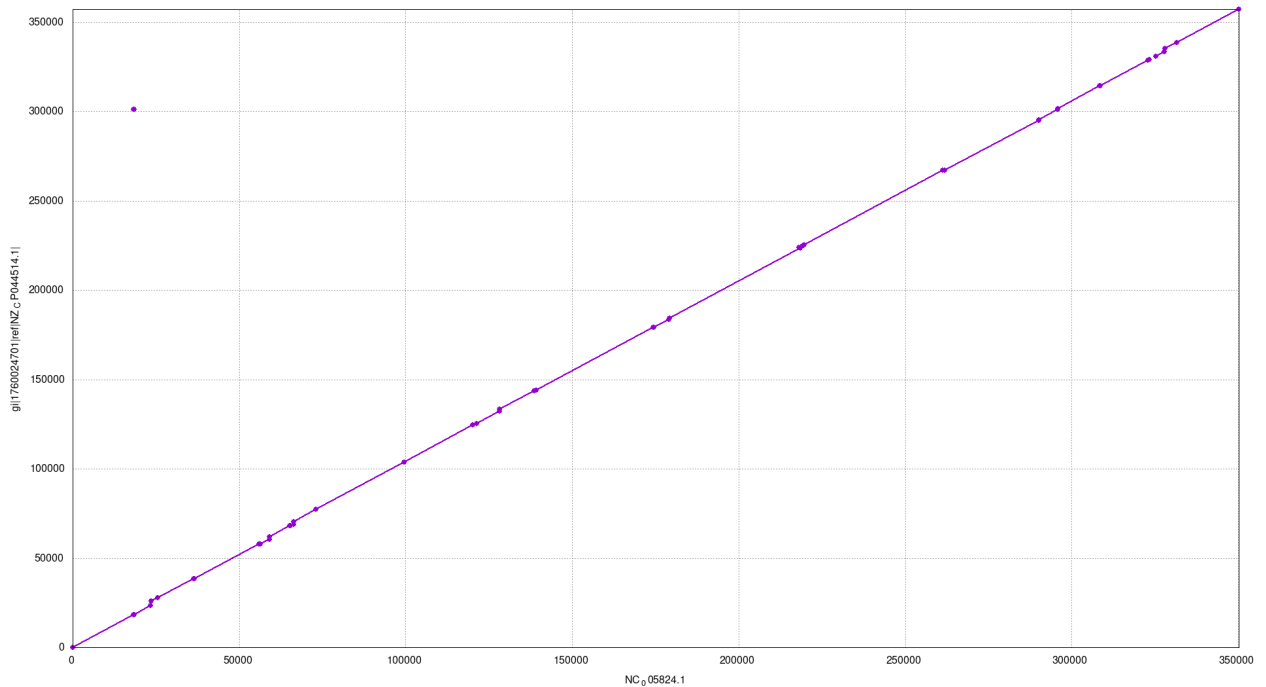
Quanto ao cromossomo 2, a maioria dos sorovares possui uma arquitetura genômica similar (fig 20 a 36). Str. FMAS_AW1 (Fig. 29), str. FMAS_KW1 (Fig. 30), str. FMAS_KW2 (Fig. 31), sv. Lai str. 56601 (Fig. 32), e sv. Lai str. IPAV (Fig. 33) apresentam uma pequena sequência de inversão. Em str. FMAS_AW1 corresponde a uma proteína da família da transferase/hidrolase acetil-CoA. Em str. FMAS_KW1 corresponde a uma proteína de ligação ao substrato transportador ABC. Em str. FMAS_KW2 corresponde a 7 genes com anotação, incluindo citocromo oxidase, proteína da família DUF883, 4a-hydroxytetrahydrobiopterin dehidratase, fator de transcrição de regulador de resposta, proteína contendo domínio DUF4279, EF-P lisina aminoacilase GenX, e proteína da família OmpA. O restante das cepas não possui genes anotados nas sequências invertidas.

Figura 20. Análise de sintonia entre os cromossomos 2 da cepa referência e sv. Bratislava str. PigK151.



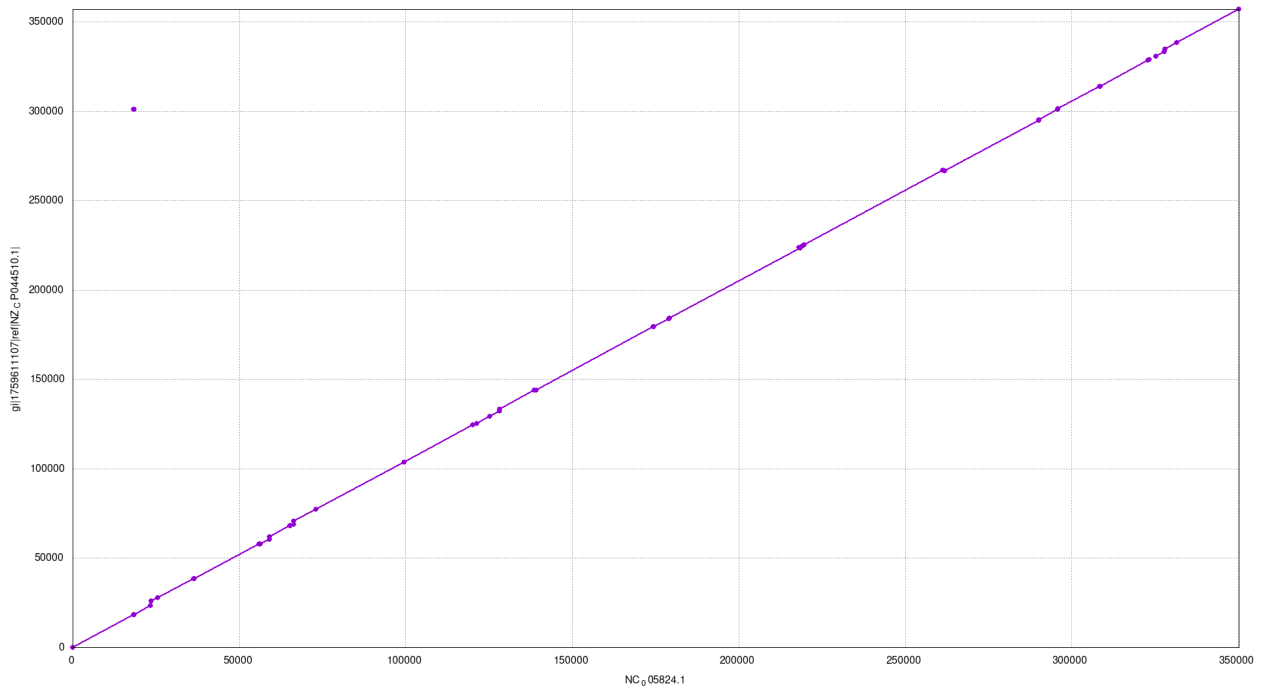
Eixo x representa o genoma de sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130. Eixo y representa o genoma de sv. Bratislava str. PigK151. Traços e pontos em roxo representam sequências na mesma direção, traços e pontos em azul representam inversões.

Figura 21. Análise de sintonia entre os cromossomos 2 da cepa referência e sv. Canicola str. 611.



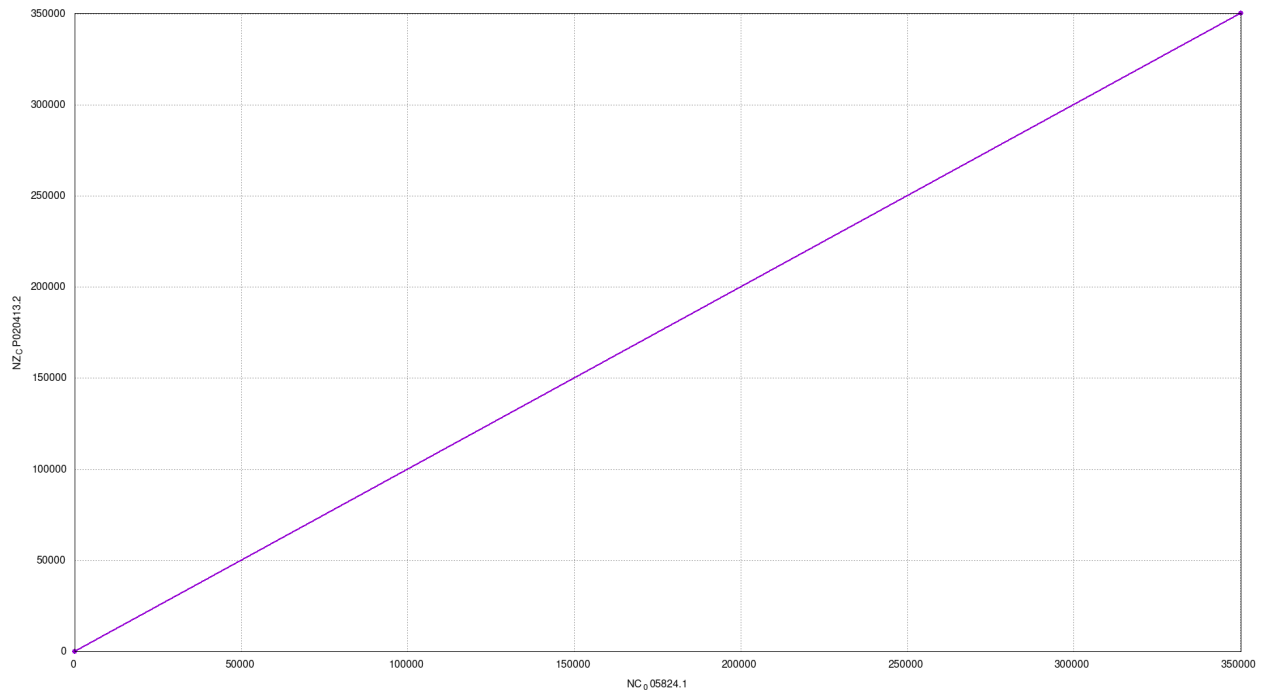
Eixo x representa o genoma de sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130. Eixo y representa o genoma de sv. Canicola str. 611. Traços e pontos em roxo representam sequências na mesma direção, traços e pontos em azul representam inversões.

Figura 22. Análise de sintonia entre os cromossomos 2 da cepa referência e sv. *Canicola* str. LJ178.



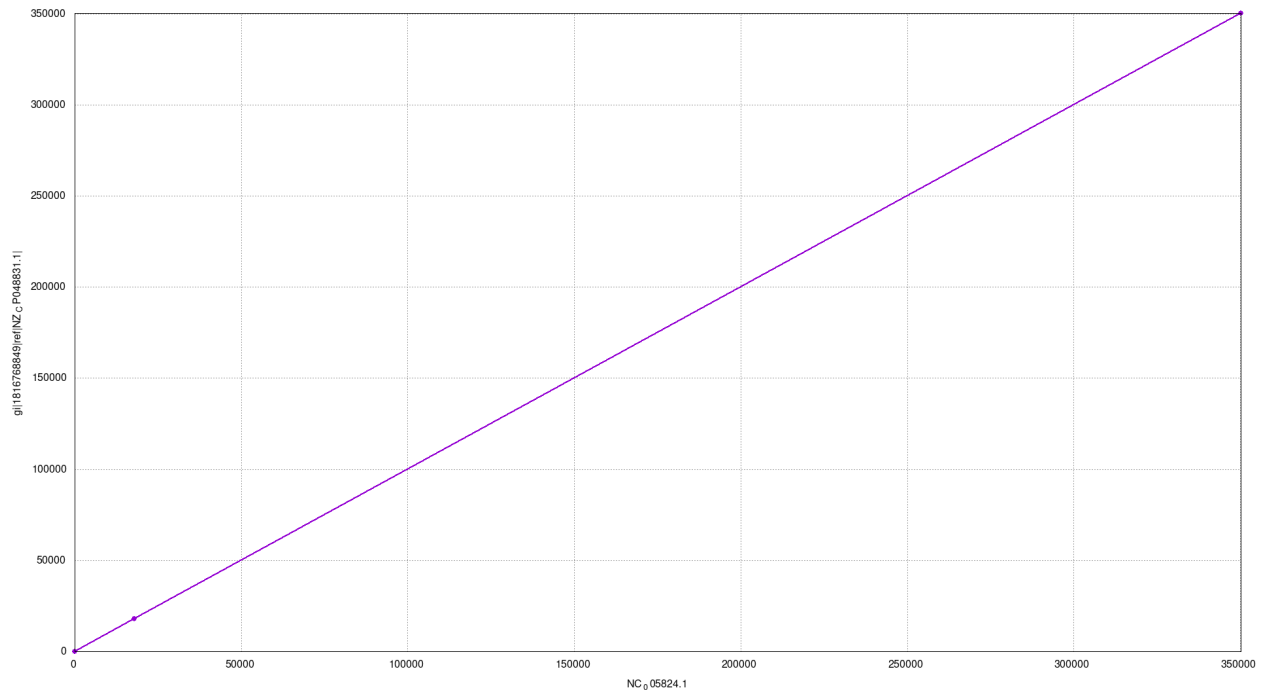
Eixo x representa o genoma de sv. *Copenhageni* str. Fiocruz L1-130. Eixo y representa o genoma de sv. *Canicola* str. LJ178. Traços e pontos em roxo representam sequências na mesma direção, traços e pontos em azul representam inversões.

Figura 23. Análise de sintonia entre os cromossomos 2 da cepa referência e sv. Copenhageni str. FDAARGOS 203.



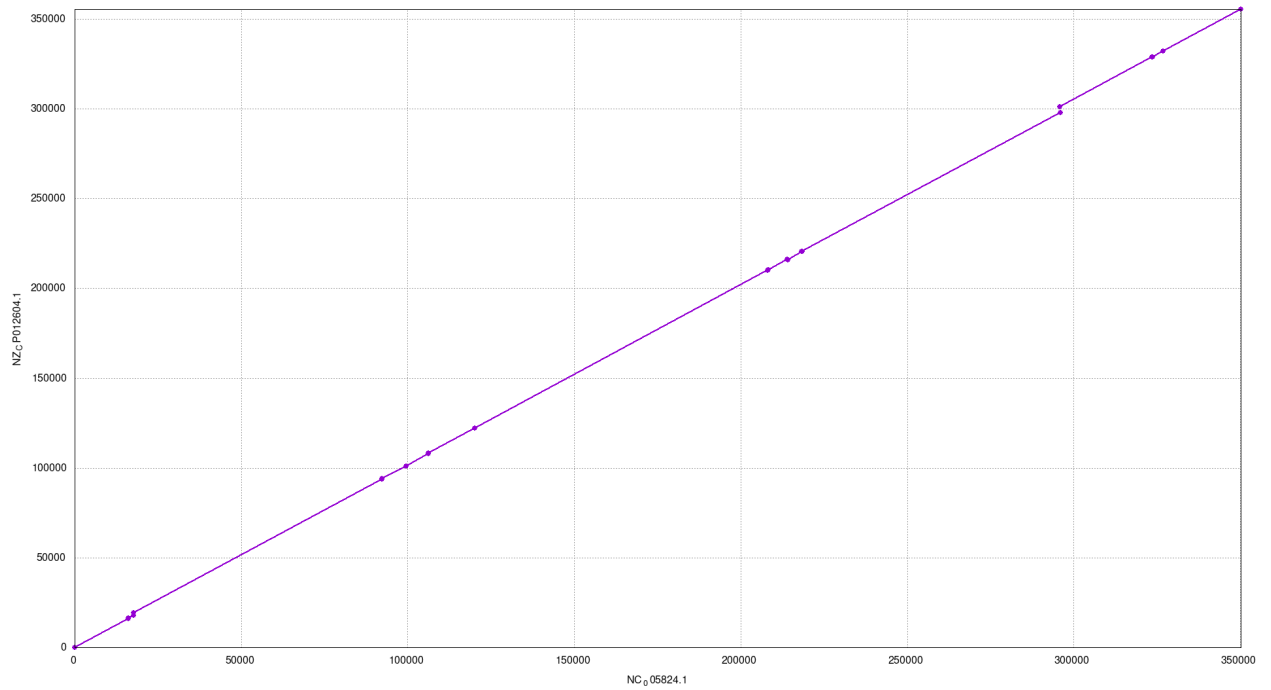
Eixo x representa o genoma de sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130. Eixo y representa o genoma de sv. Copenhageni str. FDAARGOS 203. Traços e pontos em roxo representam sequências na mesma direção, traços e pontos em azul representam inversões.

Figura 24. Análise de sintonia entre os cromossomos 2 da cepa referência e sv. Copenhageni str. SK1.



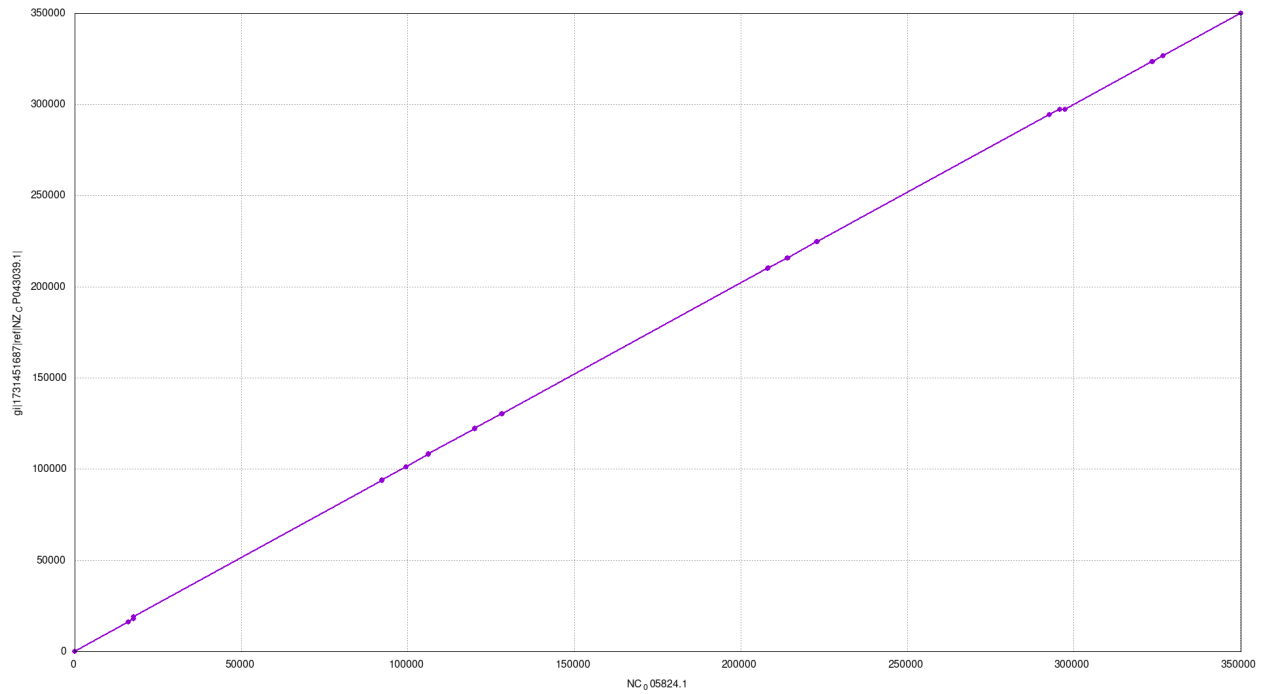
Eixo x representa o genoma de sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130. Eixo y representa o genoma de sv. Copenhageni str. SK1. Traços e pontos em roxo representam sequências na mesma direção, traços e pontos em azul representam inversões.

Figura 25. Análise de sintenia entre os cromossomos 2 da cepa referência e sv. Hardjo str. Norma.



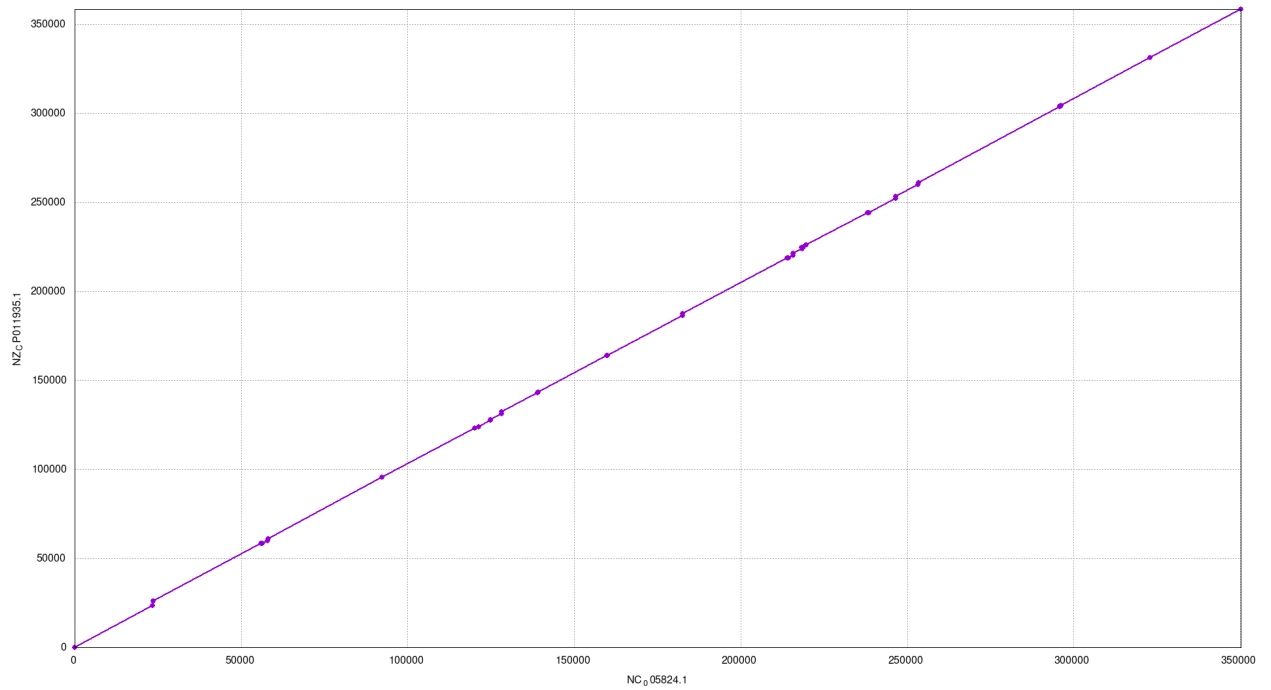
Eixo x representa o genoma de sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130. Eixo y representa o genoma de sv. Hardjo str. Norma. Traços e pontos em roxo representam sequências na mesma direção, traços e pontos em azul representam inversões.

Figura 26. Análise de sintonia entre os cromossomos 2 da cepa referência e sv. Hardjo str. L53.



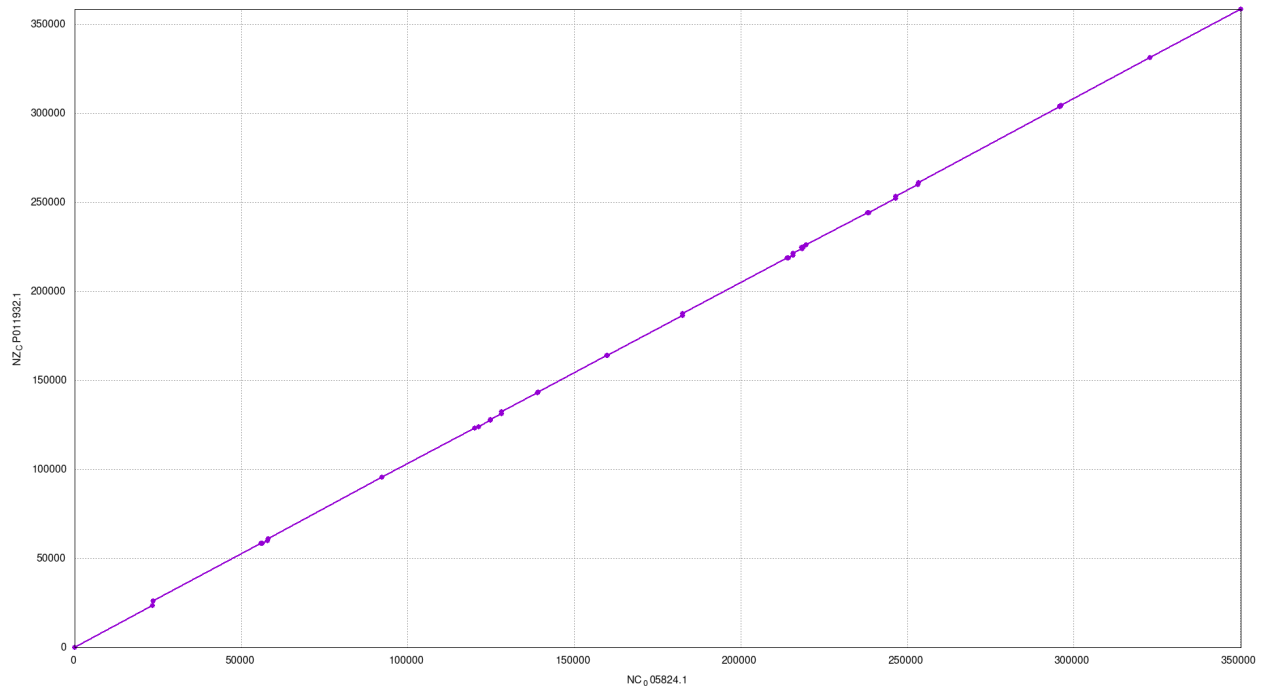
Eixo x representa o genoma de sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130. Eixo y representa o genoma de sv. Hardjo str. L53. Traços e pontos em roxo representam sequências na mesma direção, traços e pontos em azul representam inversões.

Figura 27. Análise de sintonia entre os cromossomos 2 da cepa referência e sv. Manilae str. UP-MMC-NIID HP



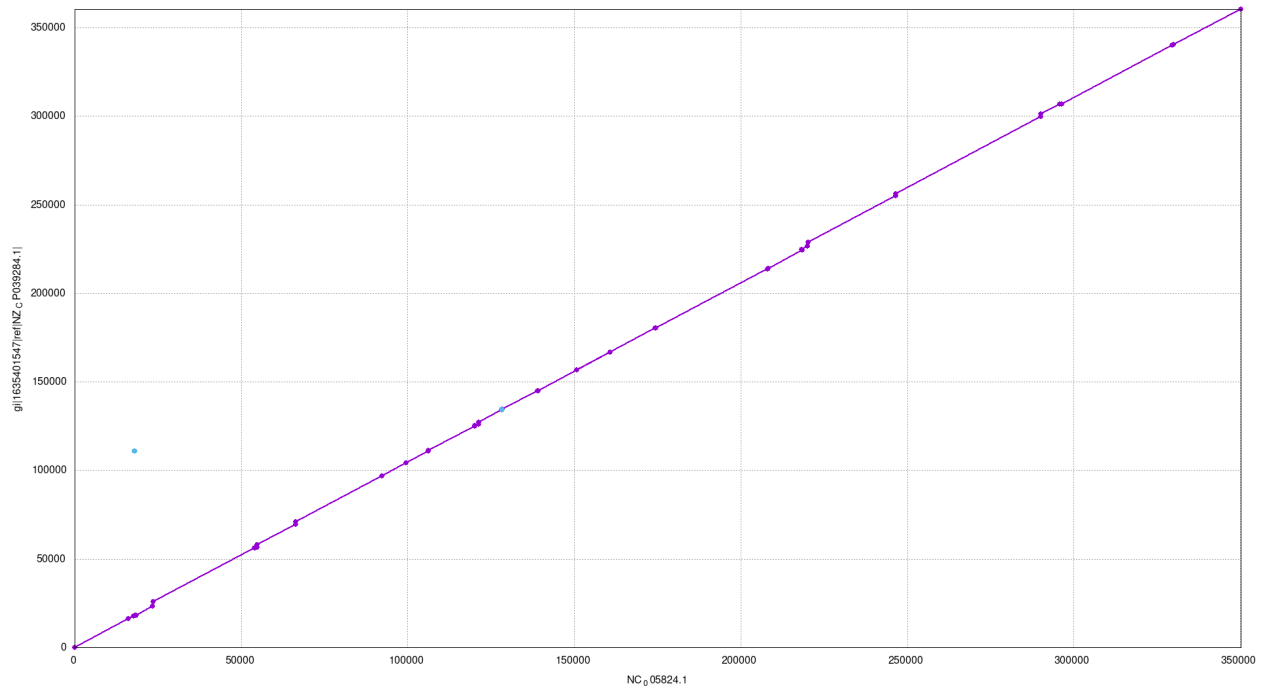
Eixo x representa o genoma de sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130. Eixo y representa o genoma de sv. Manilae str. UP-MMC-NIID HP. Traços e pontos em roxo representam sequências na mesma direção, traços e pontos em azul representam inversões.

Figura 28. Análise de sintonia entre os cromossomos 2 da cepa referência e sv. Manilae str. UP-MMC-NIID LP



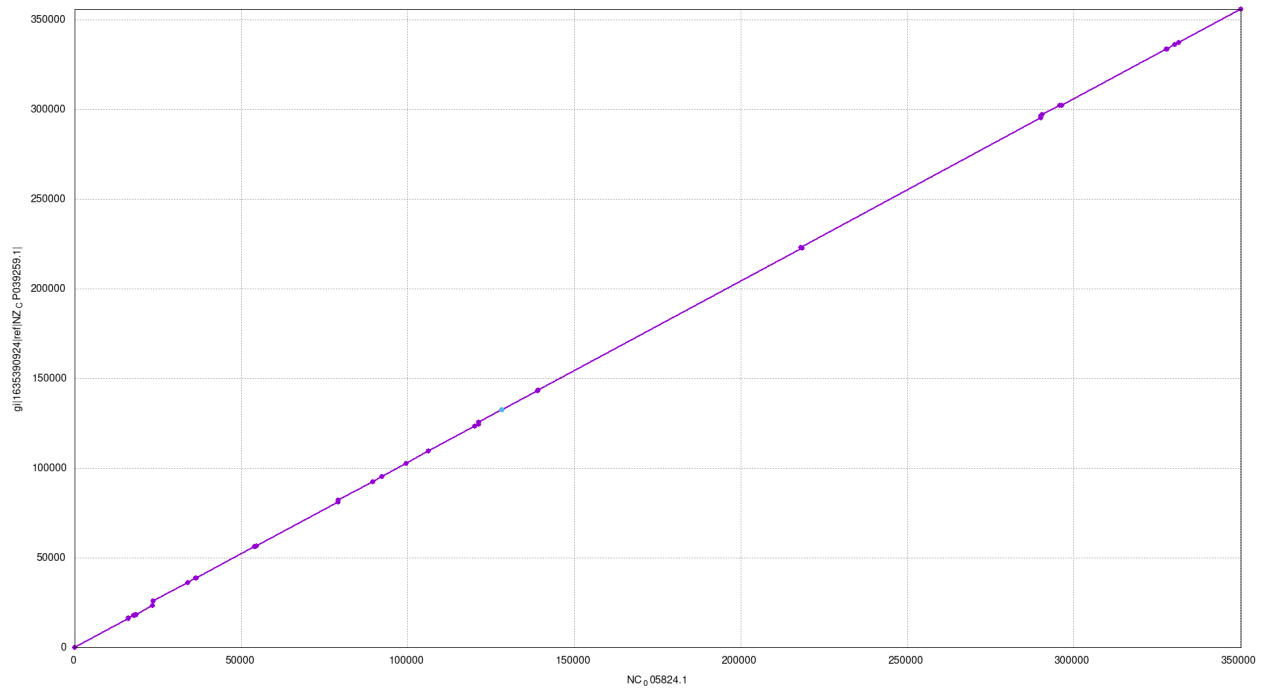
Eixo x representa o genoma de sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130. Eixo y representa o genoma de sv. Manilae str. UP-MMC-NIID LP. Traços e pontos em roxo representam sequências na mesma direção, traços e pontos em azul representam inversões.

Figura 29. Análise de sintonia entre os cromossomos 2 da cepa referência e str. FMAS_AW1.



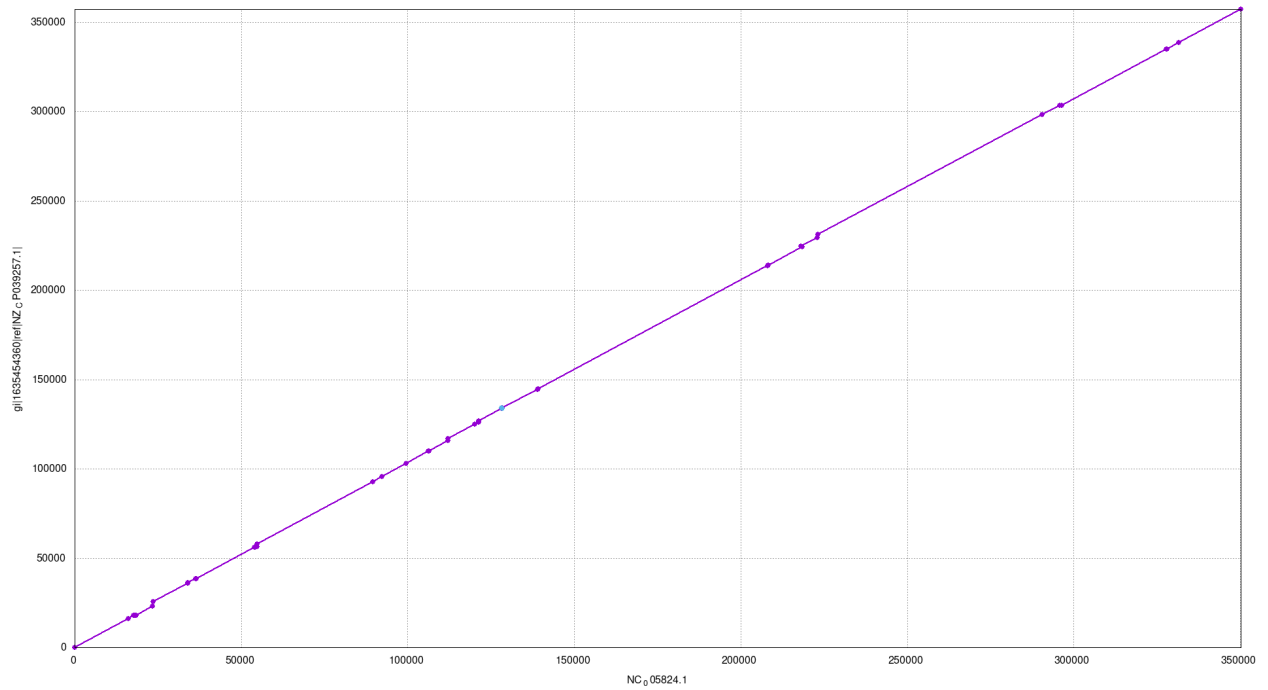
Eixo x representa o genoma de sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130. Eixo y representa o genoma de str. FMAS_AW1. Traços e pontos em roxo representam sequências na mesma direção, traços e pontos em azul representam inversões.

Figura 30. Análise de sintonia entre os cromossomos 2 da cepa referência e str. FMAS_KW1.



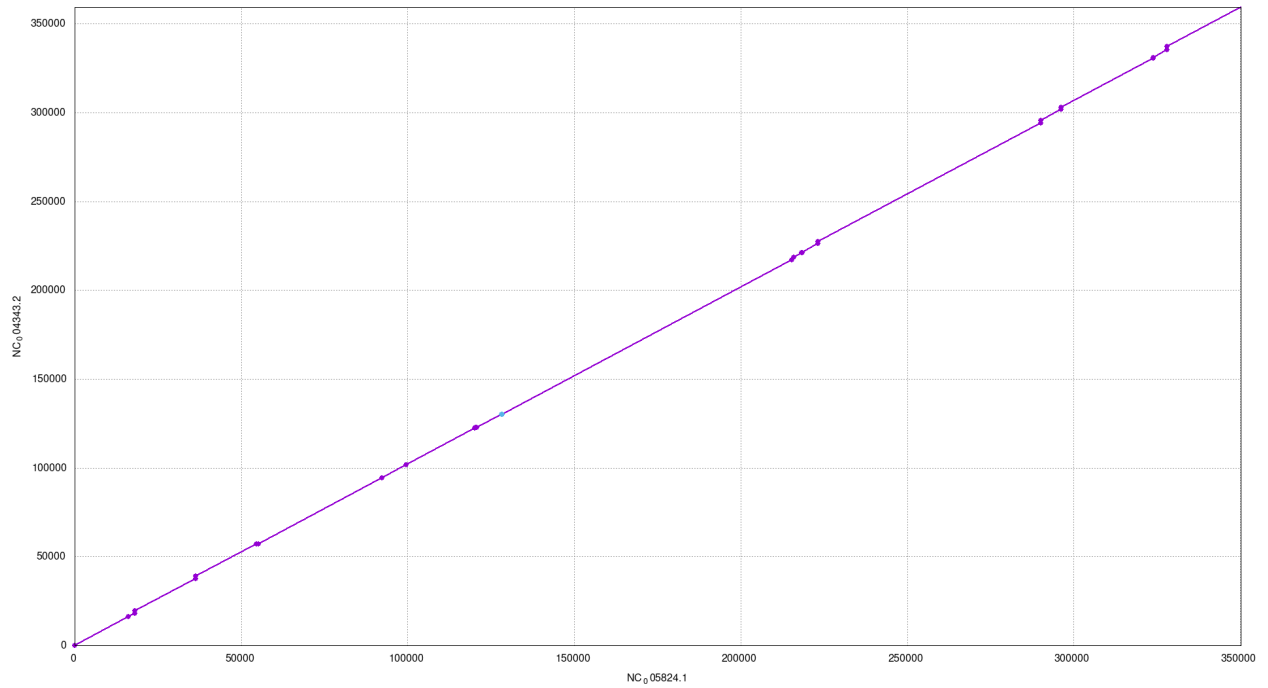
Eixo x representa o genoma de sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130. Eixo y representa o genoma de str. FMAS_KW1. Traços e pontos em roxo representam sequências na mesma direção, traços e pontos em azul representam inversões.

Figura 31. Análise de sintonia entre os cromossomos 2 da cepa referência e str. FMAS_KW2.



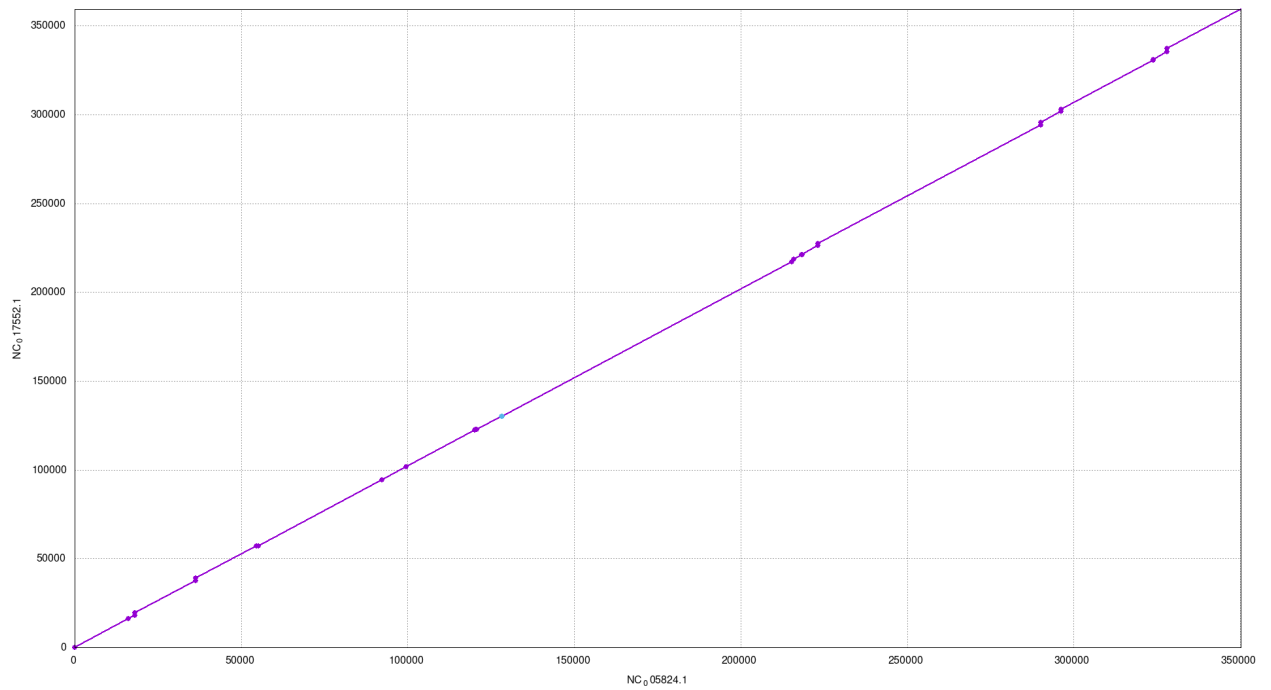
Eixo x representa o genoma de sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130. Eixo y representa o genoma de str. FMAS_KW2. Traços e pontos em roxo representam sequências na mesma direção, traços e pontos em azul representam inversões.

Figura 32. Análise de sintonia entre os cromossomos 2 da cepa referência e sv. Lai str. 56601.



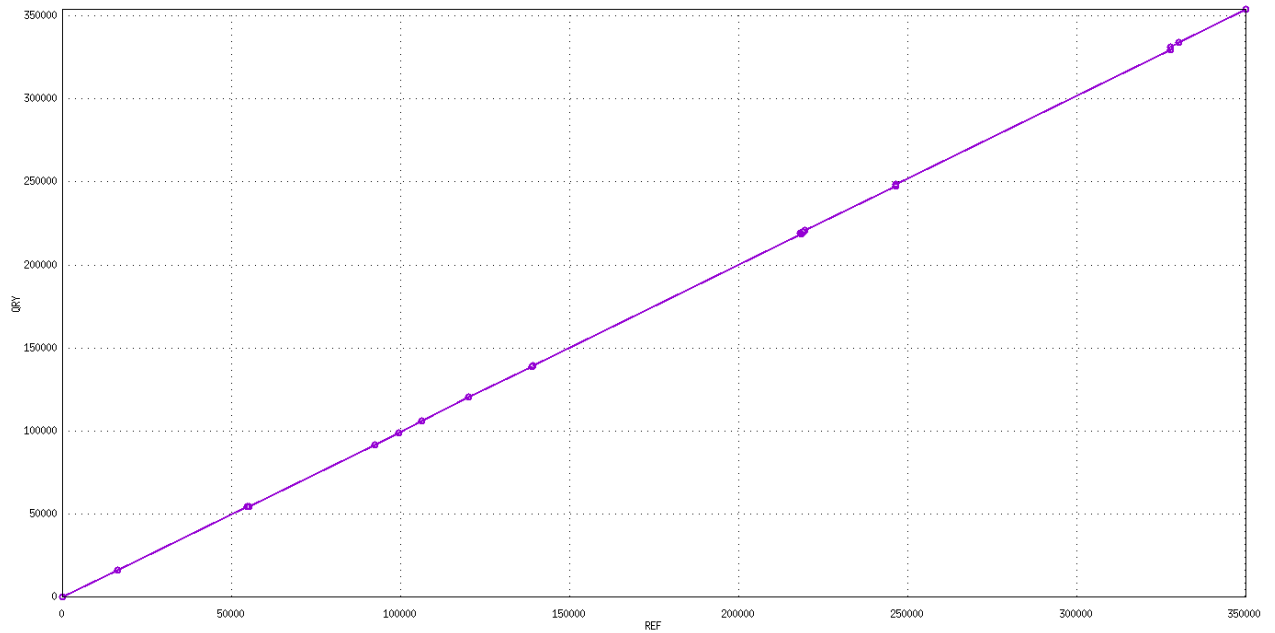
Eixo x representa o genoma de sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130. Eixo y representa o genoma de sv. Lai str. 56601. Traços e pontos em roxo representam sequências na mesma direção, traços e pontos em azul representam inversões.

Figura 33. Análise de sintonia entre os cromossomos 2 da cepa referência e sv. Lai str. IPAV.



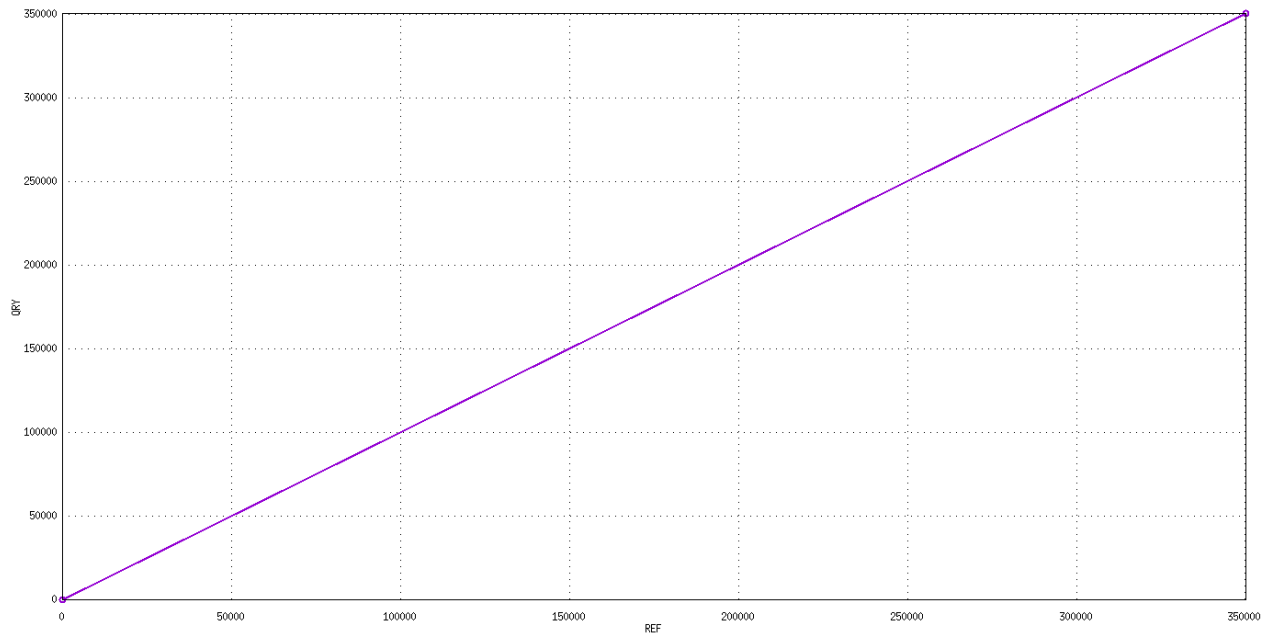
Eixo x representa o genoma de sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130. Eixo y representa o genoma de sv. Lai str. IPAV. Traços e pontos em roxo representam sequências na mesma direção, traços e pontos em azul representam inversões.

Figura 34. Análise de sintonia entre os cromossomos 2 da cepa referênciada e sv. Bataviae str. 1489.



Eixo x representa o genoma de sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130. Eixo y representa o genoma de sv. Bataviae str. 1489. Traços e pontos em roxo representam sequências na mesma direção, traços e pontos em azul representam inversões.

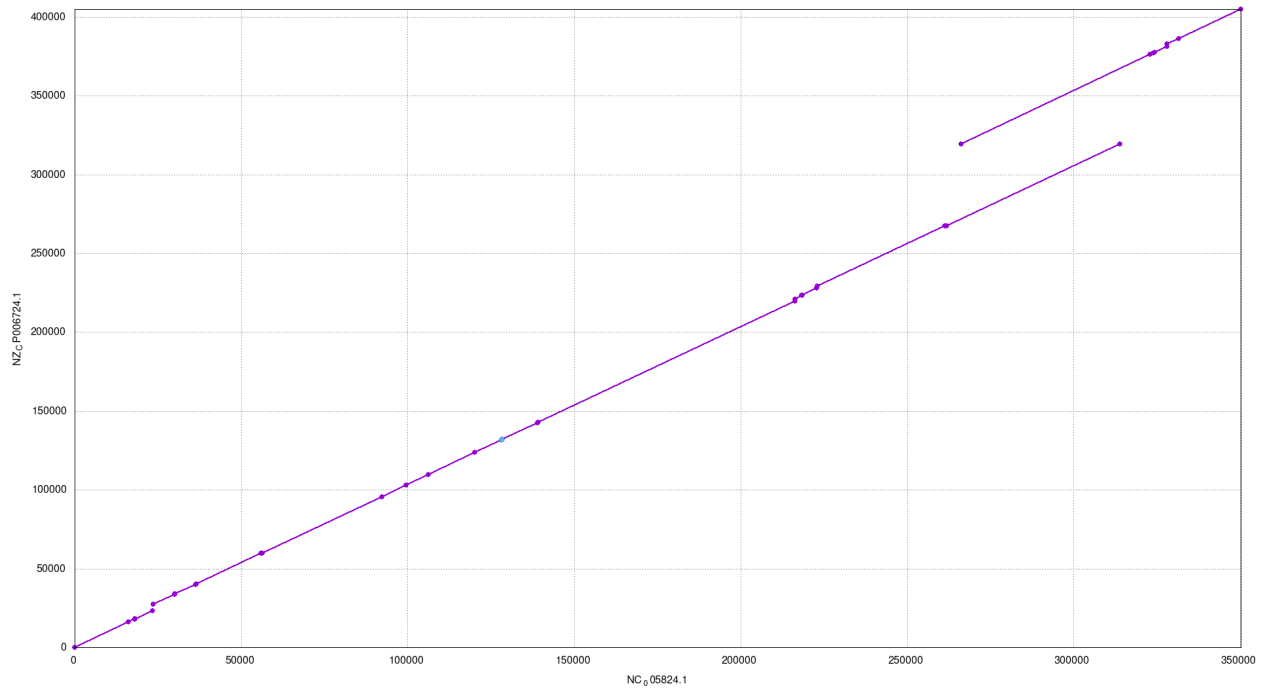
Figura 36. Análise de sintenia entre os cromossomos 2 da cepa referênciada e sv. *Icterohaemorrhagiae* str. 898.



Eixo x representa o genoma de sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130. Eixo y representa o genoma de sv. *Icterohaemorrhagiae* str. 898. Traços e pontos em roxo representam sequências na mesma direção, traços e pontos em azul representam inversões.

Sorovar Linhai str. 56609 tem uma duplicação de parte do cromossomo 2 (Fig. 34), que envolve, entre outras proteínas, uma oxirredutase (Fig. 35). Já sv. *Icterohaemorrhagiae* str. Langkawi possui uma deleção de uma pequena parte do cromossomo 2 (Fig. 36)

Figura 34. Análise de sintonia entre os cromossomos 2 da cepa referência e sv. Linhai str. 56609.



Eixo x representa o genoma de sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130. Eixo y representa o genoma de sv. Linhai str. 56609. Traços e pontos em roxo representam sequências na mesma direção, traços e pontos em azul representam inversões.

Figura 35. Proteínas anotadas na duplicação do cromossomo 2 de sv. Linhai str. 56609.

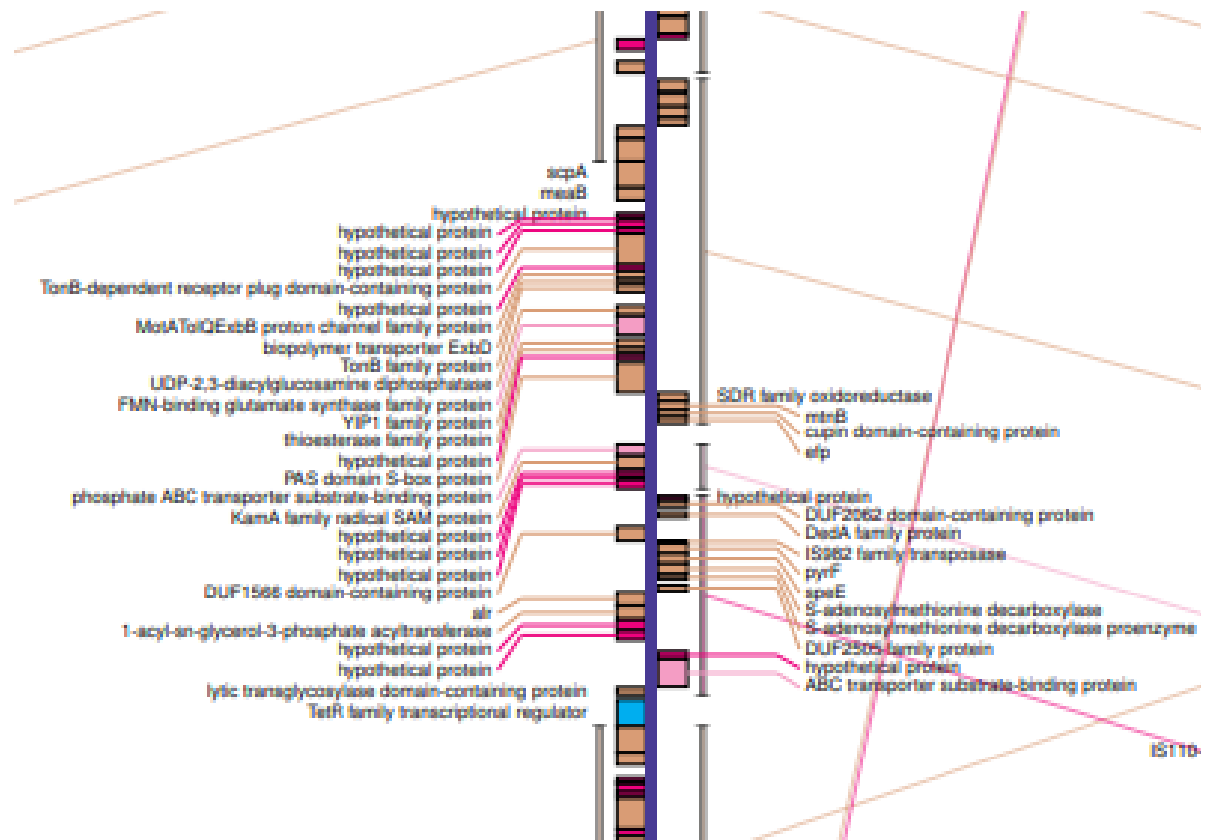
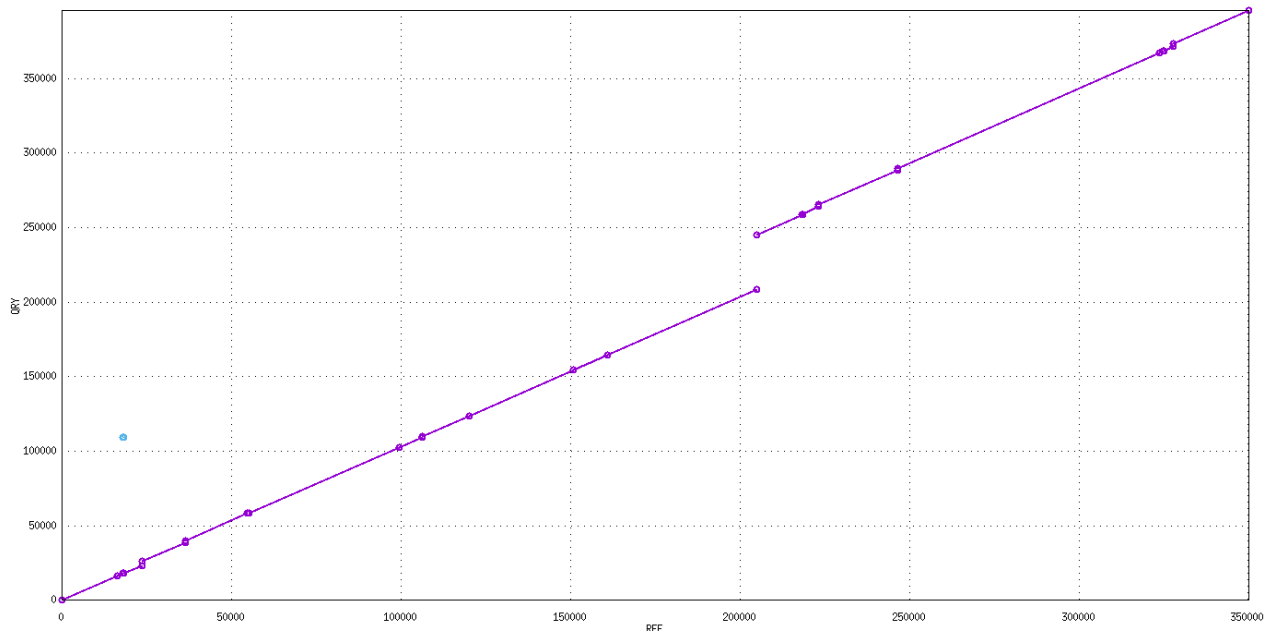


Figura 36. Análise de sintonia entre os cromossomos 2 da cepa referência e sv. *Icterohaemorrhagiae* str. Langkawi.



Eixo x representa o genoma de sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130. Eixo y representa o genoma de sv. *Icterohaemorrhagiae* str. Langkawi. Traços e pontos em roxo representam sequências na mesma direção, traços e pontos em azul representam inversões.

De fato há uma quantidade razoável de variação entre os sorovares de *L. interrogans*, o que era de se esperar, tendo em vista que já foi mostrado que há plasticidade genômica razoável dentro de *L. interrogans* (RICALDI et al., 2012). Porém há uma maior plasticidade no cromossomo 1 do que no cromossomo 2, sendo este último, no geral, bem conservado.

Para que se pudesse fazer maiores inferências entre a presença de proteínas ortólogas de fatores de virulência e a patogênese e o grau de virulência dos sv., seria necessário mais informações sobre os dados clínicos associados a cada sorovar. No entanto, é difícil ligar as cepas com suas formas clínicas de leptospirose, especialmente por haver poucos estudos relacionando sintomas específicos de leptospirose e sua gravidade com sorovares ou cepas, em geral parando-se a identificação da leptospira causadora de determinado quadro clínico em nível de espécie. Além disso, estudos epidemiológicos costumam ser tendenciosos quanto a sua amostra, em função da regionalidade, da época e da população (AZHARI et al., 2018), também uma cepa pode

apresentar diferentes formas clínicas dependendo do sistema imune e nutrição do hospedeiro (CUNNINGHAM-RUNDLES, 2005.). Além de que não existem muitos estudos com isolados de infecções assintomáticas, não permitindo assim estudos que possam definir um perfil de virulência realmente completo para as cepas (SANTOS, 2015). Também, o modo como a doença progride e com que severidade pode ter relação com a expressão diferencial de genes, no entanto, não há estudos que tenham analisado o transcriptoma da bactéria em diferentes manifestações clínicas (SANTOS, 2015)

O baixo número de genomas disponíveis (21 até o fim do presente estudo) é uma importante limitação deste trabalho. Também, as cepas foram sequenciadas por diferentes métodos (Quadro 2), e, por mais que todos os métodos gerem dados úteis, é importante estar atento às diferenças ao analisar métodos de sequenciamento diferentes.

Quadro 2. Métodos de sequenciamento de cada cepa escolhida com o ano de sequenciamento.

Cepas	Método de Sequenciamento	Ano
Sv. Bataviae str. 1489	PacBio RSII; Illumina MiSeq	2020
Sv. Bataviae str. 1548	PacBio RSII; Illumina MiSeq	2020
Sv. Bratislava str. PigK151	Roche gsFLX Titanium; Illumina; Sanger	2014
Sv. Canicola str. LJ178	PacBio RSII	2019
Sv. Canicola str. 611	PacBio RSII	2019
Sv. Canicola str. 782	PacBio RSII; Illumina MiSeq	2019
Sv. Copenhageni str. FDA-ARGOS 203	PacBio; Illumina	2016
Sv. Copenhageni str. Fiocruz L1-130	Cosmídeos + Shotgun + PCR seq (Sanger)	2004

Sv. Copenhageni str. SK1	Oxford Nanopore MinION; Illumina HiSeq	2020
Str. FMAS_AW1	PacBio RSII	2019
Str. FMAS_KW1	PacBio RSII	2019
Str. FMAS_KW2	PacBio RSII	2019
Sv. Hardjo str. L53	Illumina MiSeq	2019
Sv. Hardjo str. Norma	454	2015
Sv. Icterohaemorrhagiae str. Langkawi	PacBio RSII; Illumina MiSeq	2020
Sv. Icterohaemorrhagiae str. 898	PacBio RSII; PacBio Sequel	2020
Sv. Lai str. 56601	Shotgun	2003
Sv. Lai str. IPAV	Shotgun	2011
Sv. Linhai str. 56609	454 Life Sciences, Roche	2015
Sv. Manilae str. UP-MMC-NIID HP	PacBio	2015
Sv. Manilae str. UP-MMC-NIID LP	PacBio	2015

Fonte: NCBI.

Ao comparar os sequenciamentos Illumina MiSeq, 454 GS e Minlon, foi possível verificar que MiSeq possuiu o melhor rendimento por corrida e menor taxa de erros, porém é o instrumento que demorou mais tempo para entregar resultados (LOMAN, et al., 2012). Enquanto 454 teve o menor rendimento, e Minlon entregou os resultados mais rapidamente dentre os três (LOMAN, et al., 2012). Também o uso de mais de um

método de sequenciamento gera uma maior confiança.

4 CONCLUSÃO

O presente trabalho concluiu que houve um agrupamento de acordo com o sorovar ao analisar a presença de genes ortólogos nas cepas, assim como na árvore filogenética com o genoma inteiro, sendo as cepas do mesmo sorovar muito similares entre si. O que foi corroborado pelas análises de sintenia, onde há pouca variação da arquitetura genômica de ambos os cromossomos dentro dos sorovares.

Foi possível também identificar 28 proteínas, delas 14 hipotéticas, que estão ausentes em cepas avirulentas, indicando um possível envolvimento delas no processo de patogênese.

É possível que a ausência de determinados fatores de virulência em algumas cepas, assim como uma maior quantidade destes, esteja associada com uma virulência diferenciada, porém, seriam necessários mais estudos que demonstrassem a virulência das diferentes cepas para ser possível concluir algo mais concreto.

5 REFERÊNCIAS

ABELA-RIDDER, Bernadette; SIKKEMA, Reina; HARTSKEERL, Rudy A.. Estimating the burden of human leptospirosis. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, [s.l.], v. 36, p.5-7, nov. 2010. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.06.012>.

ADLER, Ben et al. Pathogenesis of leptospirosis: The influence of genomics. **Veterinary Microbiology**, [S. l.], v. 153, n. 1-2, p.73-81, nov. 2011. Elsevier BV.

ADLER, Ben; MOCTEZUMA, Alejandro de La Peña. Leptospira and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, [S. l.], v. 140, n. 3-4, p.287-296, jan. 2010. Elsevier BV.

AGAMPODI, S. B. et al. Outbreak of leptospirosis after white-water rafting: sign of a shift from rural to recreational leptospirosis in Sri Lanka?. **Epidemiology And Infection**, [s.l.], v. 142, n. 04, p.843-846, 26 jun. 2013. Cambridge University Press (CUP).
<http://dx.doi.org/10.1017/s0950268813001465>.

ALT, David P. *et al.* Complete Genome Sequence of *Leptospira interrogans* Serovar Bratislava, Strain PigK151. **Genome Announcements**, [S.L.], v. 3, n. 3, p. 1-5, 25 jun. 2015. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/genomea.00678-15>.

AMAMURA, Thais A. et al. Pathogenic *Leptospira* Secreted Proteases Target the Membrane Attack Complex: A Potential Role for Thermolysin in Complement Inhibition. **Frontiers In Microbiology**, [S. l.], v. 8, p.1-16, 30 maio 2017. Frontiers Media SA.

ARAÚJO, Alan M. et al. Oxidative stress markers correlate with renal dysfunction and thrombocytopenia in severe leptospirosis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 90, n. 4, p. 719-723, 2014.

ARYAL, Uma K. *et al.* Proteomic Profiles of Five Strains of Oxygenic Photosynthetic Cyanobacteria of the Genus *Cyanothece*. **Journal Of Proteome Research**, [S.L.], v. 13, n. 7, p. 3262-3276, 4 jun. 2014. American Chemical Society (ACS).
<http://dx.doi.org/10.1021/pr5000889>.

ARMSTRONG, Peter B.. Proteases and protease inhibitors: a balance of activities in host–pathogen interaction. **Immunobiology**, [s.l.], v. 211, n. 4, p.263-281, jun. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2006.01.002>.

AZHARI, Nurul Natasya et al. Molecular characterization of pathogenic *Leptospira* sp. in small mammals captured from the human leptospirosis suspected areas of Selangor state, Malaysia. **Acta Tropica**, [s.l.], v. 188, p.68-77, dez. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.08.020>.

BARBOSA, Angela Silva; ISAAC, Lourdes. Strategies used by *Leptospira* spirochetes to evade the host complement system. **FEBS letters**, v. 594, n. 16, p. 2633-2644, 2020.

BARBOSA, A. S. et al. A Newly Identified Leptospiral Adhesin Mediates Attachment to Laminin. **Infection And Immunity**, [s.l.], v. 74, n. 11, p.6356-6364, 5 set. 2006. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.00460-06>.

BENSON, Dennis A. et al. GenBank. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 41, n. 1, p.36-42, 26 nov. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks1195>.

BHARTI, Ajay R. et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases**, [s.l.], v. 3, n. 12, p.757-771, dez. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(03\)00830-2](http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(03)00830-2).

BLAZIUS, René D. et al. Ocorrência de cães errantes soropositivos para *Leptospira* spp. na Cidade de Itapema, Santa Catarina, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 6, p.1952-1956, 2005.

BOURHY, P. et al. *Leptospira mayottensis* sp. nov., a pathogenic species of the genus *Leptospira* isolated from humans. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S. l.], v. 64, n. 12, p.4061-4067, 23 set. 2014. Microbiology Society.

CAIMANO, Melissa J. et al. A Model System for Studying the Transcriptomic and Physiological Changes Associated with Mammalian Host Adaptation by *Leptospira interrogans* Serovar Copenhageni. **Plos Pathogens**, [S. l.], v. 10, n. 3, p.1-19, mar. 2014. Public Library of Science (PLoS).

CERVENY, Lukas et al. Tetratricopeptide repeat motifs in the world of bacterial pathogens: role in virulence mechanisms. **Infection and immunity**, v. 81, n. 3, p. 629-635, 2013.

CHOI, Sunju; OHTA, Shinya; OHTSUBO, Eiichi. A Novel IS Element, IS621, of the IS110/IS492 Family Transposes to a Specific Site in Repetitive Extragenic Palindromic Sequences in *Escherichia coli*. **Journal Of Bacteriology**, [S.L.], v. 185, n. 16, p. 4891-4900, 15 ago. 2003. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.185.16.4891-4900.2003>.

CHOY, H. A. et al. Physiological Osmotic Induction of *Leptospira interrogans* Adhesion: LigA and LigB Bind Extracellular Matrix Proteins and Fibrinogen. **Infection And Immunity**, [s.l.], v. 75, n. 5, p.2441-2450, 12 fev. 2007. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.01635-06>.

COSATE, Maria Raquel V. et al. Molecular typing of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo isolates from leptospirosis outbreaks in Brazilian livestock. **Bmc Veterinary Research**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.1-12, 15 jun. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12917-017-1081-9>.

COSTA, Federico et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 9, n. 9, p.1-19, 17 set. 2015. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898>.

CULLEN, P. A.. Global Analysis of Outer Membrane Proteins from *Leptospira interrogans* Serovar Lai. **Infection And Immunity**, [s.l.], v. 70, n. 5, p.2311-2318, 1 maio 2002. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.70.5.2311-2318.2002>.

CUNNINGHAM-RUNDLES, Susanna; MCNEELEY, David F.; MOON, Aeri. Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, n. 6, p. 1119-1128, 2005.

D'AURIA, Giuseppe *et al.* Legionella pneumophila pangenome reveals strain-specific virulence factors. **Bmc Genomics**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 181-194, 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-11-181>.

DAVIDSON, L. S. P. *et al.* Weil's Disease (Leptospirosis): A Clinical and Bacteriological Study of Nineteen Cases Occurring Chiefly Among Fish Workers. **British Medical Journal**, Londres, v. 3859, p.1137-1142, 22 dez. 1934.

DATASUS. Ministério da Saúde: Departamento de Informática do SUS. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/leptobr.def>>. Acesso em: 2 ago. 2020.

DELLAGOSTIN, Odir A. *et al.* Recombinant vaccines against leptospirosis. **Human vaccines**, v. 7, n. 11, p. 1215-1224, 2011.

DELCHER, A. L.. Fast algorithms for large-scale genome alignment and comparison. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 30, n. 11, p. 2478-2483, 1 jun. 2002. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/30.11.2478>.

EMMS, David M.; KELLY, Steven. OrthoFinder: phylogenetic orthology inference for comparative genomics. **Genome Biology**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 1-12, 14 nov. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13059-019-1832-y>.

EVANGELISTA, Karen V; COBURN, Jenifer. Leptospiras an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. **Future Microbiology**, [s.l.], v. 5, n. 9, p.1413-1425, set. 2010. Future Medicine Ltd. <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.10.102>.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and Leptospirosis**. 2. Ed. Melbourne: MediSci,. p. 353, 1999

FERNANDES, Luis GV et al. OmpL1 is an extracellular matrix-and plasminogen-interacting protein of *Leptospira* spp. **Infection and immunity**, v. 80, n. 10, p. 3679-3692, 2012.

FITCH, Walter M. Homology: a personal view on some of the problems. **Trends in genetics**, v. 16, n. 5, p. 227-231, 2000.

FLORES-DÍAZ, Marietta et al. Bacterial sphingomyelinases and phospholipases as virulence factors. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 3, p. 597-628, 2016.

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**, [s.l.], v. 73, n. 5, p.408-419, 25 mar. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3083.2010.02505.x>.

FRAGA, Tatiana Rodrigues et al. Immune Evasion by Pathogenic *Leptospira* Strains: The Secretion of Proteases that Directly Cleave Complement Proteins. **The Journal Of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 209, n. 6, p.876-886, 26 out. 2013. Oxford University Press (OUP).

FRAGA, Tatiana Rodrigues; ISAAC, Lourdes; BARBOSA, Angela Silva. Complement Evasion by Pathogenic *Leptospira*. **Frontiers In Immunology**, [s.l.], v. 7, p.1-7, 21 dez. 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2016.00623>.

FRASER, Tricia; BROWN, Paul D.. Temperature and Oxidative Stress as Triggers for Virulence Gene Expression in Pathogenic *Leptospira* spp. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 8, p.1-13, 9 maio 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.00783>.

FRITZH-LINDSTEN, Elisabet et al. Intracellular targeting of exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* via type III-dependent translocation induces phagocytosis resistance, cytotoxicity and disruption of actin microfilaments. **Molecular microbiology**, v. 25, n. 6, p. 1125-1139, 1997.

FOUTS, Derrick E. et al. What makes a bacterial species pathogenic?: comparative genomic analysis of the genus *Leptospira*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 2, p. e0004403, 2016.

GABALDÓN, Toni; KOONIN, Eugene V. Functional and evolutionary implications of gene orthology. **Nature Reviews Genetics**, v. 14, n. 5, p. 360-366, 2013.

GENEVA. WORLD HEALTH ORGANIZATION. . **Diseases Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group (LERG)**. Disponível em: <<http://www.who.int/zoonoses/diseases/lerg/en/index2.html>>. Acesso em: 15 out. 2018.

GOUVEIA, Edilane L. et al. Leptospirosis-associated Severe Pulmonary Hemorrhagic Syndrome, Salvador, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, [s.l.], v. 14, n. 3, p.505-508, mar. 2008. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <http://dx.doi.org/10.3201/eid1403.071064>..

GUERREIRO, H. et al. Leptospiral Proteins Recognized during the Humoral Immune Response to Leptospirosis in Humans. **Infection And Immunity**, [s.l.], v. 69, n. 8, p.4958-4968, 1 ago. 2001. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.69.8.4958-4968.2001>.

GUPTA, Radhey S.; MAHMOOD, Sharmeen; ADEOLU, Mobolaji. A phylogenomic and molecular signature based approach for characterization of the phylum Spirochaetes and its major clades: proposal for a taxonomic revision of the phylum. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 4, p.1-18, 2013. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2013.00217>.

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

HARTSKEERL, R.a.; COLLARES-PEREIRA, M.; ELLIS, W.a.. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. **Clinical Microbiology And Infection**, [s.l.], v. 17, n. 4, p.494-501, abr. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03474.x>.

HINES, Judith et al. Structure–function analysis of *Yersinia pestis* YopM's interaction with α -thrombin to rule on its significance in systemic plague and to model YopM's mechanism of binding host proteins. **Microbial pathogenesis**, v. 30, n. 4, p. 193-209, 2001.

HU, Weilin et al. *Leptospira* and leptospirosis in China. **Current opinion in infectious diseases**, v. 27, n. 5, p. 432-436, 2014.

INADA, Ryokichi et al. The Etiology, Mode of Infection, and Specific Therapy of Weil's Disease (*Spirochaetosis icterohaemorrhagica*). **The Journal Of Experimental Medicine**. New York City, p. 377-402. 1 mar. 1916. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2125418/>>. Acesso em: 10 jan. 2018.

JACKSON, Katrina M. et al. A widely conserved bacterial cytoskeletal component influences unique helical shape and motility of the spirochete *Leptospira biflexa*. **Molecular microbiology**, v. 108, n. 1, p. 77-89, 2018.

JOHNSON, Russell C.. *Leptospira*. In: JOHNSON, Russell C.. **Medical Microbiology**. 4. ed. Texas, Usa: Galveston (tx), 1996. Cap. 35. p. 5-10. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8451/>>. Acesso em: 7 out. 2018.

JUNG, Jaehee; KIM, Jong Im; YI, Gangman. GeneCo: a visualized comparative genomic method to analyze multiple genome structures. **Bioinformatics**, [S.L.], v. 35, n. 24, p. 5303-5305, 27 jul. 2019. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btz596>.

KAAS, Rolf S. et al. Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. **PloS one**, v. 9, n. 8, p. e104984, 2014.

KASAROV, L. B. Degradation Of The Erythrocyte Phospholipids And Haemolysis Of The Erythrocytes Of Different Animal Species By *Leptospirae*. **Journal Of Medical Microbiology**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.29-37, 1 fev. 1970. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/00222615-3-1-29>.

KATZ, Alan R. et al. Leptospirosis in Hawaii, 1974-1998: epidemiologic analysis of 353 laboratory-confirmed cases. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, S.i., v. 66, n. 1, p.31-70, jan. 2002.

KING, Amy M. et al. High-Temperature Protein G Is an Essential Virulence Factor of *Leptospira interrogans*. **Infection And Immunity**, [s.l.], v. 82, n. 3, p.1123-1131, 23 dez. 2013. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.01546-13>.

KO, Albert I.; GOARANT, Cyrille; PICARDEAU, Mathieu. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 7, n. 10, p.736-747, out. 2009. Springer Nature.

KOBE, Bostjan; KAJAVA, Andrey V. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. **Current opinion in structural biology**, v. 11, n. 6, p. 725-732, 2001.

KOIZUMI, Nobuo; WATANABE, Haruo. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. **Vaccine**, [s.l.], v. 22, n. 11-12, p.1545-1552, mar. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2003.10.007>.

KRISTENSEN, David M. et al. Computational methods for Gene Orthology inference. **Briefings in bioinformatics**, v. 12, n. 5, p. 379-391, 2011.

KÜHN, Juliane et al. Bactofilins, a ubiquitous class of cytoskeletal proteins mediating polar localization of a cell wall synthase in *Caulobacter crescentus*. **The EMBO journal**, v. 29, n. 2, p. 327-339, 2010.

KURTZ, Stefan et al. Versatile and open software for comparing large genomes. **Genome biology**, v. 5, n. 2, p. R12, 2004.

LANGONI, HELIO. Leptospirose: aspectos de saúde animal e de saúde pública. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**. São Paulo, volume 2, fascículo 1, p. 52 - 58, 1999

LARSON, Christopher R. *et al.* Isolation and characterization of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni from a dog from Saint Kitts. **Jmm Case Reports**, [S.L.], v. 4, n.

10, p. 1-12, 16 out. 2017. Microbiology Society.
<http://dx.doi.org/10.1099/jmmcr.0.005120>.

LEE, S. H.. Cytotoxic Activities of *Leptospira interrogans* Hemolysin SphH as a Pore-Forming Protein on Mammalian Cells. **Infection And Immunity**, [s.l.], v. 70, n. 1, p.315-322, 1 jan. 2002. American Society for Microbiology.
<http://dx.doi.org/10.1128/iai.70.1.315-322.2002>.

LEE, Seoung Hoon et al. Identification and partial characterization of a novel hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar lai. **Gene**, [s.l.], v. 254, n. 1-2, p.19-28, ago. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1119\(00\)00293-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1119(00)00293-6).

LEHMANN, Jason et al. Leptospiral Pathogenomics. **Pathogens**, [s.l.], v. 3, n. 2, p.280-308, 10 abr. 2014. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens3020280>.

LEVETT, P. N. et al. Two Methods for Rapid Serological Diagnosis of Acute Leptospirosis. **Clinical And Vaccine Immunology**, [s.l.], v. 8, n. 2, p.349-351, 1 mar. 2001. American Society for Microbiology.
<http://dx.doi.org/10.1128/cdli.8.2.349-351.2001>.

LEVETT, P. N.. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 14, n. 2, p.296-326, 1 abr. 2001. American Society for Microbiology.
<http://dx.doi.org/10.1128/cmr.14.2.296-326.2001>.

LEVETT, Paul N.. Usefulness of Serologic Analysis as a Predictor of the Infecting Serovar in Patients with Severe Leptospirosis. **Clinical Infectious Diseases**, [S. l.], v. 36, n. 4, p.447-452, 15 fev. 2003. Oxford University Press (OUP).

LJUNGH, Åsa; WADSTRÖM, Torkel. Interactions of bacterial adhesins with the extracellular matrix. **Toward Anti-Adhesion Therapy for Microbial Diseases**, p. 129-140, 1996.

LO, Miranda et al. Comparative Transcriptional and Translational Analysis of Leptospiral Outer Membrane Protein Expression in Response to Temperature. **Plos Neglected**

Tropical Diseases, [s.l.], v. 3, n. 12, p.1-12, 8 dez. 2009. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000560>.

LOMAN, Nicholas J. et al. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. **Nature biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 434-439, 2012.

LONGHI, Mariana T. et al. A newly identified protein of *Leptospira interrogans* mediates binding to laminin. **Journal of medical microbiology**, v. 58, n. 10, p. 1275-1282, 2009.

LOURDAULT, Kristel et al. Inactivation of *clpB* in the Pathogen *Leptospira interrogans* Reduces Virulence and Resistance to Stress Conditions. **Infection And Immunity**, [s.l.], v. 79, n. 9, p.3711-3717, 5 jul. 2011. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.05168-11>.

LU, Shennan et al. CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020. **Nucleic acids research**, v. 48, n. D1, p. D265-D268, 2020.

MAIA, Guilherme Augusto. Ferramenta integrada para anotação de proteínas hipotéticas: estudo de caso utilizando análises proteogenômicas em *Trypanosoma rangeli*. 2019.

MAHILLON, Jacques; CHANDLER, Michael. Insertion Sequences. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, [S.L.], v. 62, n. 3, p. 725-774, 1 set. 1998. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/mnbr.62.3.725-774.1998>.

MATSUNAGA, James et al. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Molecular Microbiology**, [s.l.], v. 49, n. 4, p.929-946, 4 jul. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03619.x>.

MCBRIDE, Alan J.a. et al. Genetic diversity of the Leptospiral immunoglobulin-like (Lig) genes in pathogenic *Leptospira* spp. **Infection, Genetics And Evolution**, [s.l.], v. 9, n. 2, p.196-205, mar. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2008.10.012>.

MEDINI, Duccio *et al.* The microbial pan-genome. **Current Opinion In Genetics & Development**, [S.L.], v. 15, n. 6, p. 589-594, dez. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2005.09.006>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 204, de 17 de fevereiro de 2016. Define a Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional, nos termos do anexo, e dá outras providências.. **Saúde Legis - Sistema de Legislação da Saúde**. Distrito Federal, Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2016/prt0204_17_02_2016.html>. Acesso em: 15 out. 2020.

MORGAN, Juliette *et al.* Outbreak of Leptospirosis among Triathlon Participants and Community Residents in Springfield, Illinois, 1998. **Clinical Infectious Diseases**, [s.l.], v. 34, n. 12, p.1593-1599, 15 jun. 2002. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/340615>.

NALLY, Jarlath E. *et al.* Alveolar Septal Deposition of Immunoglobulin and Complement Parallels Pulmonary Hemorrhage in a Guinea Pig Model of Severe Pulmonary Leptospirosis. **The American Journal Of Pathology**, [s.l.], v. 164, n. 3, p.1115-1127, mar. 2004. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)63198-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9440(10)63198-7).

NARAYANAVARI, Suneel A.; KISHORE, Nanda M.; SRITHARAN, M. Structural analysis of the leptospiral sphingomyelinases: in silico and experimental evaluation of Sph2 as an Mg⁺⁺-dependent sphingomyelinase. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 24-34, 2012.

NASCIMENTO, A. L. T. O. *et al.* Comparative Genomics of Two *Leptospira interrogans* Serovars Reveals Novel Insights into Physiology and Pathogenesis. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 186, n. 7, p.2164-2172, 17 mar. 2004. American Society for Microbiology.

NAVARRO, Lorena; ALTO, Neal M.; DIXON, Jack E. Functions of the *Yersinia* effector proteins in inhibiting host immune responses. **Current opinion in microbiology**, v. 8, n. 1, p. 21-27, 2005.

OLIVEIRA, Marluce Aparecida Assunção et al. Human leptospirosis: occurrence of serovars of *Leptospira* spp. in the state of Minas Gerais, Brazil, from 2008 to 2012. **brazilian journal of microbiology**, v. 48, n. 3, p. 483-488, 2017.

PAGE, Andrew J. et al. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. **Bioinformatics**, v. 31, n. 22, p. 3691-3693, 2015.

PALANIAPPAN, Raghavan Um; RAMANUJAM, Subbupoongothai; CHANG, Yung-fu. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. **Current Opinion In Infectious Diseases**, [s.l.], v. 20, n. 3, p.284-292, jun. 2007. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/qco.0b013e32814a5729>.

PALANIAPPAN, R. U. M. et al. Immunoprotection of Recombinant Leptospiral Immunoglobulin-Like Protein A against *Leptospira interrogans* Serovar Pomona Infection. **Infection And Immunity**, [s.l.], v. 74, n. 3, p.1745-1750, 22 fev. 2006. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.74.3.1745-1750.2006>.

PASTER, Bruce J.; DEWHIRST, Floyd E.. Phylogenetic Foundation of Spirochetes. **JmmB Symposium On Spirochete Physiology**, [S. l.], v. 2, n. 4, p.341-344, out. 2000.

PASTER, Bruce J.. Spirochaetales. In: WHITMAN, William Barnaby et al. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. 2. ed. New Jersey, Usa: Hoboken, New Jersey, 2015. p. 1-3. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/9781118960608.obm00105>>. Acesso em: 14 nov. 2018.

PASTER, B. J. et al. Phylogenetic analysis of the spirochetes. **Journal Of Bacteriology**. Massachusetts, p. 6101-6109. out. 1991. Disponível em: <<http://jb.asm.org/content/173/19/6101.short>>. Acesso em: 10 jan. 2018.

PAPPAS, Christopher J.; BENAROUDJ, Nadia; PICARDEAU, Mathieu. A Replicative Plasmid Vector Allows Efficient Complementation of Pathogenic *Leptospira* Strains. **Applied And Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 81, n. 9, p.3176-3181, 27 fev. 2015. American Society for Microbiology.

PATTI, J M et al. MSCRAMM-Mediated Adherence of Microorganisms to Host Tissues. **Annual Review Of Microbiology**, [s.l.], v. 48, n. 1, p.585-617, out. 1994. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.mi.48.100194.003101>.

PEARL, Laurence H.; PRODROMOU, Chrisostomos. Structure and Mechanism of the Hsp90 Molecular Chaperone Machinery. **Annual Review Of Biochemistry**, [s.l.], v. 75, n. 1, p.271-294, jun. 2006. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142738>.

PICARDEAU, Mathieu et al. Genome Sequence of the Saprophyte *Leptospira biflexa* Provides Insights into the Evolution of *Leptospira* and the Pathogenesis of Leptospirosis. **Plos One**, [S. l.], v. 3, n. 2, p.1-9, 13 fev. 2008. Public Library of Science (PLoS).

PICARDEAU, Mathieu. *Leptospira*. **Bergey's Manual Of Systematics Of Archaea And Bacteria**, [s.l.], p.1-18, 15 dez. 2017. John Wiley & Sons, Ltd. <http://dx.doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01244.pub2>

PICARDEAU, Mathieu. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Médecine et maladies infectieuses**, v. 43, n. 1, p. 1-9, 2013.

R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>

RAMBAUT, Andrew. FigTree v1. 3.1. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>, 2009.

RASKO, David A. et al. The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. **Journal of bacteriology**, v. 190, n. 20, p. 6881-6893, 2008.

RICALDI, Jessica N. *et al.* Whole Genome Analysis of *Leptospira licerasiae* Provides Insight into Leptospiral Evolution and Pathogenicity. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 6, n. 10, p. 1-16, 25 out. 2012. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001853>.

RICKLIN, Daniel et al. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nature Immunology**, [s.l.], v. 11, n. 9, p.785-797, 19 ago. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1923>.

SANTOS, Luciane Amorim. LEPTOSPIRA INTERROGANS SOROVAR COPENHAGENI E ICTEROHAEMORRHAGIAE: RELAÇÃO EVOLUTIVA, DIFERENÇAS GENÉTICAS E ASSOCIAÇÃO COM DESFECHO CLÍNICO. 2015. 97 f. Tese (Doutorado) - Curso de Curso de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2015.

SATOU, Kazuhito et al. Complete Genome Sequences of Low-Passage Virulent and High-Passage Avirulent Variants of Pathogenic *Leptospira interrogans* Serovar Manilae Strain UP-MMC-NIID, Originally Isolated from a Patient with Severe Leptospirosis, Determined Using PacBio Single-Molecule Real-Time Technology: TABLE 1. **Genome Announcements**, [s.l.], v. 3, n. 4, p.1-2, 13 ago. 2015. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/genomea.00882-15>.

SCHULLER, Simone et al. European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. **Journal of Small Animal Practice**, v. 56, n. 3, p. 159-179, 2015.

SEEMANN, Torsten. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, v. 30, n. 14, p. 2068-2069, 2014.

SENEVIRATHA, Indika *et al.* Complete Genome Sequence of *Leptospira interrogans* Strains FMAS_KW1, FMAS_KW2 and FMAS_AW1 Isolated from Leptospirosis Patients from Karawanalla and Awissawella, Sri Lanka. **Journal Of Genomics**, [S.L.], v. 8, p. 49-52, 2020. Ivyspring International Publisher. <http://dx.doi.org/10.7150/jgen.43953>.

SHANG, Ellen S. et al. The rare outer membrane protein, OmpL1, of pathogenic *Leptospira* species is a heat-modifiable porin. **Infection and immunity**, v. 63, n. 8, p. 3174-3181, 1995.

SILVA, Ludmila Bezerra da. **Identificação de Proteases de Leptospiras Envolvidas na Degradação de Proteínas da Matriz Extracelular e do Plasma Humano**. 2017. 66 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação Epidemiologia

Experimental e Aplicada às Zoonoses, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

SODEINDE, O. et al. A surface protease and the invasive character of plague. **Science**, [s.l.], v. 258, n. 5084, p.1004-1007, 6 nov. 1992. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1439793>.

SONNHAMMER, Erik LL; KOONIN, Eugene V. Orthology, paralogy and proposed classification for paralog subtypes. **TRENDS in Genetics**, v. 18, n. 12, p. 619-620, 2002.

TROWBRIDGE, Arthur A. et al. Hemolytic Anemia Associated with Leptospirosis. Morphologic and Lipid Studies. **American Journal Of Clinical Pathology**, [s.l.], v. 76, n. 4, p.493-498, 1 out. 1981. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/ajcp/76.4.493>.

VERMA, Ashutosh et al. LfhA, a novel factor H-binding protein of *Leptospira interrogans*. **Infection and immunity**, v. 74, n. 5, p. 2659-2666, 2006.

VERMA, A. et al. Leptospiral Endostatin-Like Protein A Is a Bacterial Cell Surface Receptor for Human Plasminogen. **Infection And Immunity**, [s.l.], v. 78, n. 5, p.2053-2059, 16 fev. 2010. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.01282-09>.

VIJAYACHARI, P et al. Immunogenicity of a novel enhanced consensus DNA vaccine encoding the leptospiral protein LipL45. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, [s.l.], v. 11, n. 8, p.1945-1953, 28 maio 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/21645515.2015.1047117>.

VINCENT, Antony T. et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 5, p. e0007270, 2019.

WILSON, T. S.. Recent observations on leptospirosis in Northern Ireland and their bearing on current diagnostic methods. **Journal Of Clinical Pathology. Belfast**, p. 415-423. set. 1966. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC473342/>>. Acesso em: 10 jan. 2018.

WITCHELL, Timothy D. et al. Post-translational modification of LipL32 during *Leptospira interrogans* infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 10, p. e3280, 2014.

WU, Hsing-Ju; WANG, Andrew HJ; JENNINGS, Michael P. Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. **Current opinion in chemical biology**, v. 12, n. 1, p. 93-101, 2008.

ZAVALA-ALVARADO, Crispin et al. The transcriptional response of pathogenic *Leptospira* to peroxide reveals new defenses against infection-related oxidative stress. **PLoS pathogens**, v. 16, n. 10, p. e1008904, 2020.

ZENG, Ling-bing et al. Comparative subproteome analysis of three representative *Leptospira interrogans* vaccine strains reveals cross-reactive antigens and novel virulence determinants. **Journal Of Proteomics**, [s.l.], v. 112, p.27-37, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.08.015>.

ZHANG, Ruipeng et al. Comparative genomic analysis of Chinese human leptospirosis vaccine strain and circulating isolate. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, p. 1-9, 2020.

ZHONG, Yi et al. Comparative proteogenomic analysis of the *Leptospira interrogans* virulence-attenuated strain IPAV against the pathogenic strain 56601. **Cell Research**, [s.l.], v. 21, n. 8, p.1210-1229, 22 mar. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2011.46>.

ZIPFEL, Peter F. et al. Factor H family proteins: on complement, microbes and human diseases. 2002.