



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

GENÔMICA DE *LEPTOSPIRA* SSP. E O SEU ESTADO DA ARTE: UMA REVISÃO DE LITERATURA

JULIANA DA PAIXÃO DALTRO

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Biologia da
Universidade Federal da Bahia como
exigência para obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof Dr. Rodrigo Dias de
Oliveira Carvalho.

Coorientador: Prof Dr. Sandeep Tiwari.

Salvador, Bahia

2023

Data da defesa: 19 de julho de 2023.

Banca examinadora

Prof. Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho

Instituto de Biologia – Universidade Federal da Bahia

Prof. Luis Gustavo Carvalho Pacheco

Instituto de Ciências da Saúde – Universidade Federal da Bahia

Prof^a Paula Carvalhal Lage von Buettner Ristow

Instituto de Biologia – Universidade Federal da Bahia

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Carlos e Jandira, por me concederem a vida e a oportunidade de buscar um futuro melhor através dos estudos. Sou imensamente grata por seu amor e apoio constantes.

À memória da minha avó Iraci, por sua dedicação a minha criação e cuidado incondicionais ao longo da minha infância e adolescência.

A Prof^a Liana, por ter me presenteado com o meu primeiro livro, que marcou o início do meu amor pela leitura e pelos estudos. Sua generosidade e incentivo foram essenciais para o meu crescimento intelectual e pessoal. Muito obrigada por abrir as portas de um mundo de conhecimento em minha vida.

Às minhas amigas de infância, cujo companheirismo e união foram verdadeiros presentes em minha vida. Desde os primeiros passos nessa jornada, compartilhamos risadas, desafios e sonhos, fortalecendo nossa amizade ao longo dos anos. Obrigada por estarem sempre presentes e por serem uma fonte inesgotável de apoio e inspiração.

Aos meus amigos do IFBA, por serem pilares de suporte e motivação, tornando essa caminhada mais leve e divertida. Obrigada por estarem sempre ao meu lado, compartilhando sorrisos e incentivando meu crescimento.

Aos professores Rodrigo e Sandeep, por aceitarem me acompanhar nessa reta final e pela contribuição valiosa para minha formação acadêmica. Sua orientação e conhecimento foram fundamentais para meu desenvolvimento.

"Podemos fazer muita coisa para influenciar os constantes processos de mudança. Podemos direcioná-los, alterar sua velocidade ou impacto. Em geral, podemos moldar a mudança, mas não podemos impedi-la, a nenhum custo. Por todo universo, a realidade constante é a mudança.

Octavia E. Butler

RESUMO

Leptospira refere-se a um gênero de bactérias espiroquetas, com algumas espécies sendo ambientais e outras patogênicas, responsáveis pela leptospirose, uma doença zoonótica globalmente importante. A compreensão dos mecanismos moleculares tem sido essencial para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes de prevenção e tratamento dessa doença. Nesse sentido, a pesquisa científica continua avançando na era pós-genômica, visando uma melhor compreensão da patogênese da leptospirose e a identificação de alvos terapêuticos potenciais. A genômica, que investiga o conjunto completo de genes de um organismo, tem sido particularmente útil para o gênero *Leptospira*, permitindo caracterizar a organização estrutural do genoma, identificar novos mecanismos envolvidos, como elementos genéticos móveis e plasticidade genômica na adaptação ao ambiente e na patogenicidade. Além disso, a abordagem filogenômica multilocus tem proporcionado a reclassificação e a identificação mais assertiva de novas linhagens, bem como a reconstrução mais detalhada das relações evolutivas entre as espécies, revelando novos padrões de divergência e eventos de especiação. No entanto, ainda há uma limitação relacionada à quantidade limitada de genomas completos sequenciados. Recomendamos direcionar esforços a estudos filogenômicos mais abrangentes, identificando *loci* gênicos específicos, como os perfis alélicos Multi-locus Sequence Typing, que poderiam ser utilizados no desenvolvimento de testes de diagnóstico molecular mais sensíveis e específicos para leptospirose. Esses estudos forneceriam informações cruciais para a saúde pública e para a implementação de estratégias de controle e prevenção dessa doença.

Palavras-chave: genômica de *Leptospira*; diversidade genética em *Leptospira*; *loci* gênicos, filogenômica bacteriana.

ABSTRACT

Leptospira refers to a genus of spirochete bacteria, with some species being environmental while others are pathogenic, responsible for the globally significant zoonotic disease leptospirosis. Understanding the molecular mechanisms has been crucial in developing more effective prevention and treatment strategies against this disease. Therefore, scientific research continues to advance in the post-genomic era, aiming for a better understanding of leptospirosis pathogenesis and the identification of potential therapeutic targets. Genomics, which investigates the complete set of genes in an organism, has proven particularly useful for the genus *Leptospira*, enabling the characterization of genome structural organization and identifying novel mechanisms such as mobile genetic elements and genomic plasticity in adaptation to the environment and pathogenicity. Furthermore, the multilocus filogenomics approach has allowed for more accurate reclassification and identification of new lineages, as well as more detailed reconstruction of evolutionary relationships between species, revealing new divergence patterns and speciation events. However, a limitation still exists regarding the limited number of fully sequenced genomes. We recommend directing efforts towards more comprehensive filogenomic studies, identifying specific gene loci, such as Multi-locus Sequence Typing allelic profiles, which could be used in the development of more sensitive and specific molecular diagnostic tests for leptospirosis. These studies would provide crucial information for public health and the implementation of control and prevention strategies for this disease.

Keywords: *Leptospira* genomics; genetic diversity in *Leptospira*; gene loci, bacterial phylogenomics.

LISTA DE ABREVIATURAS

AAI – Average Amino Acid Identity (Identidade Média de Aminoácidos)

ANI – Average Nucleotide Identity (Identidade Média de Nucleotídeos)

CAAT – Técnica de Aglutinação e Absorção Cruzada

cgMLST – Multi Locus Sequence Typing (Tipagem de Sequência de Multilocus) baseado em Cluster de Genes

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

Domínios PFAM – Protein Families Database (Banco de Dados de Famílias de Proteínas)

EPS – Substâncias Poliméricas Extracelulares

IGs – Ilhas Genômicas

ISs – Sequências de Inserção

LPS – Lipopolissacarídeo

MAT – Microscopic Agglutination Test (Teste de Microaglutinação)

NCBI – National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia)

NGS – Next-Generation Sequencing (Sequenciamento de Nova Geração)

POCP – Percentage of Conserved Proteins (Porcentagem de Proteínas Conservadas)

RNA – Ácido Ribonucleico

SCIELO – Scientific Eletronic Library Online

Sistema CRISPR – Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
(Sistema de Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente
Interespaçadas)

THG – Transferência Horizontal de Genes

WGS – Whole Genome Sequence (Sequenciamento de Genoma Completo)

SUMÁRIO

1. Introdução	14
1.1. Gênero <i>Leptospira</i>	14
1.1.1. Morfologia e fisiologia	14
1.1.2. Leptospirose e sorovariedades	15
1.2. Genômica	19
1.2.1. Os principais campos da genômica e aplicações	20
2. Objetivo	28
3. Metodologia	29
4. Revisão da literatura	30
4.1. Genômica do gênero <i>Leptospira</i>	30
4.1.1. Organização do Genoma de <i>Leptospira</i>	30
4.1.2. Diversidade genética e filogenômica	31
4.1.3. Pangenômica do gênero <i>Leptospira</i>	35
4.1.4. <i>Loci</i> gênicos relevantes em <i>Leptospira ssp.</i>	36
5. Considerações finais	44
6. Recomendações	45
7. Referências bibliográficas	47

1. Introdução

1.1. Gênero *Leptospira*

1.1.1. Morfologia e fisiologia

O nome do gênero *Leptospira* foi proposto pela primeira vez por Hideyo Noguchi, em 1918, com o objetivo de diferenciar a bactéria causadora da síndrome de Weil, uma importante zoonose estudada, das demais espiroquetas conhecidas na época (ADLER, 2015).

Pertencentes a família Leptospiraceae, as bactérias do gênero *Leptospira* são classificadas como Gram-negativas (TRABULSI E ALTERTHUM, 2015; KUNJANTARACHOT *et al.*, 2022; OLIVEIRA *et al.*, 2021). Todavia, a sua morfologia somada a alta motricidade dificulta a observação de *Leptospira* nos microscópios ópticos comuns, o que torna a microscopia de campo escuro a principal forma de análise do gênero (TRABULSI E ALTERTHUM, 2015). Quando em cortes histológicos, podem ser visualizadas através de técnicas de impregnação pela prata e imuno-histoquímica (ZÜCKERT *et al.*, 2019; KUNJANTARACHOT *et al.*, 2022).

As espécies de *Leptospira* possuem estrutura de aparência fina, alongada e helicoidal, com extremidades retas ou em ganchos (AHMED *et al.*, 2012). O gênero mede por volta de 0,1 μm de largura por 10-20 μm de comprimento (; PICARDEAU, 2017). Sua outra característica notável é a presença de endoflagelos em sua estrutura (PICARDEAU, 2017; FULE *et al.*, 2021; HOLZAPFEL *et al.*, 2022).

Os endoflagelos ou filamentos axiais são estruturas distintas dos flagelos comuns das bactérias, em razão de estarem completamente contidos dentro da célula (MADIGAN *et al.*, 2016; PICARDEAU, 2017). São compostos por um eixo central que é cercado por uma bainha proteica, composta principalmente por flagelina (ALBERTS *et al.*, 2017; SAN MARTIN *et al.*, 2022). A principal função dos endoflagelos é mover a célula através de movimentos rotatórios, permitindo

que as espiroquetas consigam transitar em ambientes viscosos ou líquidos (PICARDEAU, 2017).

Cada célula dispõe de dois tipos de endoflagelos no seu periplasma (ADLER, 2015). Com base nas descrições feitas por San Martin *et al.* (2022), o primeiro realiza movimento de translação, deslocando-se rapidamente em arcos ou linha reta. Já o segundo endoflagelo realiza movimento de rotação ao longo do seu próprio eixo (PICARDEAU, 2017; SAN MARTIN *et al.*, 2022). Os endoflagelos se fixam nos polos da bactéria e se movimentam de maneira semelhante aos flagelos bacterianos externos (PICARDEAU, 2017).

As leptospiras são sensíveis a variação ambiental, efeito característico do grupo de espiroquetas (PICARDEAU, 2020). O seu crescimento e desenvolvimento acontece a temperatura ótima de 28 a 30°C e em pH de 7,2 a 7,6, (PICARDEAU, 2017; PICARDEAU, 2020). Sua morfologia pode se alterar por problemas no cultivo, mostrando-se incomumente longas, com padrão de gaivota e com a mobilidade reduzida (TRABULSI e ALTERTHUM, 2015).

Na natureza, o gênero pode ser encontrado em ambientes como solo, poças e lama, rios, açudes, lagos e outros espaços de água doce (DAROS *et al.*, 2021; PICARDEAU, 2017; UNDER *et al.*, 2023). Leptospiras tem uma capacidade natural de se aglutinarem, pela sua membrana externa rica em lipoproteínas e pela morfologia helicoidal (PICARDEAU, 2020; PHILIP *et al.*, 2018). Além dessa adesão célula-célula, essa bactéria também é capaz de formar biofilmes, populações ou comunidade de organismos aderidos a uma superfície (PICARDEAU, 2020; MEGANATHAN *et al.*, 2022).

A matriz que forma o biofilme é autoproduzida e feita de substâncias poliméricas extracelulares (SANTOS *et al.*, 2021; ACKERMANN *et al.*, 2021). Esses EPS contêm polissacarídeos, ácidos nucleicos, proteínas, lipídios, outros carboidratos e qualquer elemento pertencente ao meio ambiente onde a bactéria está inserida (CARVALHO *et al.*, 2023; MEGANATHAN *et al.*, 2022; SANTOS *et al.*, 2021).

1.1.2. Leptospirose e sorovariedades

A leptospirose é uma doença infecciosa causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* (MORENO *et al.*, 2016; PICARDEAU, 2017; SURDEL *et al.*, 2022). É uma zoonose de ampla ocorrência e pode variar de uma colonização assintomática até infecções com alto índice de mortalidade em regiões tropicais e subtropicais do mundo, especialmente em áreas com condições sanitárias precárias (BALAMURUGAN *et al.*, 2013; PUI *et al.*, 2017). Dada a sua abrangência médica e veterinária, a leptospirose é uma patologia amplamente estudada em todo planeta (COSTA *et al.*, 2015; ANDRE-FONTAINE *et al.*, 2015; PUI *et al.*, 2017).

Dentro do gênero *Leptospira*, o sorovar é uma classificação subespecífica e é definido pela técnica de aglutinação e absorção cruzada (CAAT), através de um soro homólogo específico de coelho (CAIMI e RUYBAL, 2020; PUI *et al.*, 2017). Neste processo são analisadas as variabilidades de LPS na membrana externa da bactéria. Existem mais de 300 sorovares de leptospira identificados até o momento (CAIMI e RUYBAL, 2020). O aprendizado acerca desses sorovares auxiliam na compreensão e fornece informações valiosas sobre uma das zoonoses mais importantes para a saúde pública no mundo, a leptospirose (GALVÃO *et al.*, 2020; PUI *et al.*, 2017).

O teste de microaglutinação (Microscopic Agglutination Test), ou MAT, é um exame sorológico amplamente utilizado no diagnóstico da leptospirose (DREYFUS *et al.*, 2022; JAYASUNDARA *et al.*, 2021). Ele é considerado o padrão ouro para identificar a presença de anticorpos específicos contra *Leptospira* no soro do paciente (STRUTZBERG-MINDER *et al.*, 2022; DREYFUS *et al.*, 2022). O MAT permite a detecção de anticorpos específicos contra diferentes sorovares de *Leptospira*. Ele pode ajudar a identificar o sorogrupo da bactéria envolvida na infecção e auxiliar no monitoramento sorológico ao longo do tempo (JAYASUNDARA *et al.*, 2021).

É importante ressaltar que a realização correta do teste de microaglutinação requer técnicas de laboratório adequadas, incluindo o uso de controles positivos e negativos para garantir a confiabilidade dos resultados (GUEDES *et al.*, 2021). O soro do paciente é diluído e adicionado a uma placa

de microtitulação contendo os antígenos específicos da *Leptospira* e após a incubação, a presença ou ausência de aglutinação é observada no microscópio (STRUTZBERG-MINDER *et al.*, 2022; DREYFUS *et al.*, 2022; RAMIN *et al.*, 2023). O título de anticorpos é determinado pela diluição mais alta do soro que ainda apresenta aglutinação e a interpretação do resultado considera o título dos anticorpos, padrões de reatividade e a correlação clínica do paciente (; RAMIN *et al.*, 2023; GUEDES *et al.*, 2021).

Na bovinocultura, a presença da leptospirose no rebanho, pode haver atraso na concepção e/ou abortos (MONTES e MONTI, 2021; SURDEL *et al.*, 2022; BARBOSA *et al.*, 2023), devido a alterações histológicas no sistema reprodutor das fêmeas (TRABULSI e ALTERTHUM, 2015; BALAMURUGAN *et al.*, 2013; MENY *et al.*, 2017). Montes e Monti (2021) também cita que a leptospirose bovina pode levar ao nascimento de bezerros imunodeficientes, o que culmina na diminuição temporária da produção leiteira.

A *Leptospira borgpetersenii* é uma espécie patogênica comum que infectam humanos e animais. Essas bactérias têm uma distribuição geográfica ampla e são frequentemente associadas a casos de leptospirose em áreas rurais (MENY *et al.*, 2017). Algumas cepas de *L. borgpetersenii* são particularmente patogênicas para bovinos e outros animais de criação (BALAMURUGAN *et al.*, 2013; MENY *et al.*, 2017).

As formas graves de leptospirose em humanos incluem a Síndrome de Weil, que é caracterizada por icterícia, insuficiência renal e hepática, hemorragias e comprometimento do sistema nervoso central (BRITO *et al.*, 2021; ZAMBRANO-URBANO *et al.*, 2020); e a Febre Hemorrágica da Leptospirose, que pode levar a um choque séptico e falecimento em poucos dias (TRABULSI e ALTERTHUM, 2015).

A síndrome pulmonar severa causada por infecção por *Leptospira* é uma manifestação clínica grave da leptospirose (SILVA *et al.*, 2017; LUDWIG *et al.*, 2017). Embora a forma pulmonar seja menos comum em comparação com outras apresentações da leptospirose, ela pode ser grave e potencialmente fatal (SCHULLER *et al.*, 2015; SCHULZE *et al.*, 2014; LUDWIG *et al.*, 2017). É caracterizada por uma resposta inflamatória intensa nos pulmões, levando à

lesão pulmonar aguda e insuficiência respiratória (SILVA *et al.*, 2017; NICODEMO *et al.*, 2021; SCHULZE *et al.*, 2014).

A infecção de humanos se dá através da exposição a água, ao solo ou a urina de animais infectados (ADLER, 2015; SURDEL *et al.*, 2022; NALLY *et al.*, 2016). A vacinação desses animais, além da implementação de medidas de controle de roedores, pode ajudar a reduzir a transmissão da leptospira em ambientes urbanos e rurais (PICARDEAU, 2017; SURDEL *et al.*, 2022).

A leptospirose envolve complexos mecanismos moleculares. A infecção se inicia com a adesão das leptospiras às células do hospedeiro, seguida pela invasão e sobrevivência intracelular (CAMPOS, 2020; BARBOSA *et al.*, 2022). Essas bactérias são capazes de invadir o sistema imunológico do hospedeiro através de modificações em suas proteínas de superfície e produção de toxinas (CHEN *et al.*, 2020; ATAIDES *et al.*, 2023). A disseminação das leptospiras pelo organismo permite sua colonização em diversos órgãos e tecidos, resultando na ampla variedade de sintomas observados na leptospirose (CAMPOS, 2020; BARBOSA *et al.*, 2022; CILIA *et al.*, 2021).

Os mecanismos moleculares da leptospirose envolvem a ativação de diversos genes importantes para a adesão, invasão, sobrevivência intracelular e evasão do sistema imunológico pelas leptospiras (DENEKE *et al.*, 2020; referências). Entre os principais marcadores moleculares estão os genes *ligB* e *ligA*, envolvidos na adesão e invasão das bactérias (HSU e YANG, 2022; SARAULLO, 2020; SARAULLO *et al.*, 2021;); os genes *sph2* e *sphA*, relacionados à sobrevivência intracelular (ASHIBA *et al.*, 2022; ATAIDES *et al.*, 2023); e os genes envolvidos na síntese do lipopolissacarídeo (LPS), componente da parede celular bacteriana (HSU e YANG, 2022; CHEN *et al.*, 2020).

Além disso, toxinas como a hemolisina SphH e a leptolisina O também desempenham um papel na patogenicidade da infecção (ASHIBA *et al.*, 2022; ATAIDES *et al.*, 2023). Reguladores de virulência, como os reguladores de dois componentes, influenciam a expressão gênica e a virulência dentro do gênero *Leptospira* (HSU e YANG, 2022;).

A compreensão desses mecanismos moleculares é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e tratamento mais eficazes contra essa doença. A pesquisa científica continua a avançar nesse campo, em busca de uma melhor compreensão da patogênese da leptospirose e da identificação de alvos terapêuticos potenciais.

1.2. Genômica

Os seres vivos têm como característica fundamental a presença de um conjunto de genes, que contemplam sequências de DNA reguladoras e codificantes. (GRIFFITHS *et al.*,2013). Esse conjunto chama-se genoma (SEEHAUSEN *et al.*, 2014; SNUSTAD e SIMMONS, 2017). A área de estudo que abrange o mapeamento, sequenciamento, comparação e análise de genomas é conhecida como genômica (GRIFFITHS *et al.*,2013; SEEHAUSEN *et al.*, 2014).

A genômica é importante para a descoberta e estudo de novos genes, segmentos de DNA responsáveis pela codificação de proteínas, síntese de RNA e pelo armazenamento de informações genéticas que serão ser transmitidas para as gerações seguintes (PIERCE, 2020). Para além disso, a genômica também oferece informações relevantes sobre a história evolutiva dos organismos, sendo, deste modo, uma ferramenta filogenética essencial nas pesquisas genéticas atuais (SNUSTAD e SIMMONS, 2017; GRIFFITHS *et al.*,2013).

Diferentemente das pesquisas tradicionais de expressão gênica, onde apenas um gene era o foco do estudo, a genômica examina a sequência inteira do genoma, muitas vezes em um único experimento (GRIFFITHS *et al.*,2013; PIERCE, 2020; SNUSTAD e SIMMONS, 2017). Melhorias nos processos autômatos do sequenciamento de DNA e proteínas, e, nos métodos computacionais, são os atuais desafios existentes para aumentar a velocidade e reduzir os custos das análises genômicas (SNUSTAD e SIMMONS, 2017).

1.2.1. Os principais campos da genômica e aplicações

A genômica comparativa é uma abordagem de pesquisa dedica-se à comparação de genomas de diferentes organismos (PIERCE, 2020; JUN et al., 2015; MASSEY, 2016). Esta possui uma ampla aplicabilidade na biologia podendo destacar outros ramos ou subdivisões tais como a Genômica estrutural e Funcional, a Filogenômica e a Pan-genômica.

De maneira geral, estas abordagens permitem entender melhor a evolução dos organismos, descrever a variabilidade genética, papel ecológico a função dos genes e as relações entre espécies através da comparação de sequências de DNA, genes, estruturas genômicas e elementos regulatórios (MAKAROVA et al., 2019; BERGER *et al.*, 2018; PIERCE, 2020). Portanto a genômica é uma ferramenta essencial para a descoberta de novas espécies bacterianas, visto que permite a identificação de sequências de DNA únicas e a análise comparativa de genomas completos (SNUSTAD e SIMMONS, 2017; SEEMANN, 2014), tornando-se uma ferramenta poderosa para estudar a diversidade e a evolução bacteriana (GRIFFITHS *et al.*, 2013).

Além disso, a genômica bacteriana possui aplicações práticas significativas, como a identificação de bactérias patogênicas, a descoberta de novos antibióticos e o estudo da interação entre bactérias e seus hospedeiros (PIERCE, 2016; GRIFFITHS et al., 2013). Essas investigações permitiram a identificação de novos alvos moleculares relacionados à patogenicidade bacteriana e o desenvolvimento de estratégias inovadoras para o controle e tratamento de doenças infecciosas (LAND et al., 2015; MANI et al., 2023).

1.4.1.1 Filogenômica

Nos últimos anos, os avanços na análise filogenética têm permitido uma classificação mais precisa das espécies microbianas (CHURCH et al., 2020; ZANG et al., 2021). Um dos genes amplamente utilizados nesse contexto é o gene 16S rRNA, que desempenha um papel fundamental na taxonomia microbiana moderna. No entanto, seu uso pode ser limitado para inferências

filogenéticas no nível da espécie, devido à sua alta conservação e falta de variabilidade (BOSE e MOORE, 2023; FIDA et al., 2021).

A introdução do sequenciamento de DNA de alto rendimento trouxe uma revolução para a taxonomia bacteriana. O NGS é uma tecnologia de alto rendimento que permite a geração rápida e eficiente de grandes volumes de dados genômicos a partir do sequenciamento de ácidos nucleicos (CAIMI et al., 2017; VAN GOETHEM et al., 2019).

No contexto da identificação de espécies, essa técnica molecular utiliza a análise de sequências de DNA ou RNA para identificar organismos, sejam eles novos ou já conhecidos, por meio da comparação de regiões específicas do genoma (ABDULLAH et al., 2021; CAIMI et al., 2017). Para esse propósito, as sequências são comparadas a bancos de dados de referência que contêm sequências conhecidas de diferentes espécies. Com base na similaridade das sequências, é possível determinar a espécie à qual o organismo pertence (SIGUIER et al., 2014; MOSELE et al., 2020; VAN GOETHEM et al., 2019).

O uso de comparações genoma-a-genoma *in silico* utilizando métricas de índices globais de similaridade nucleotídica como Identidade Média de Nucleotídeos (ANI) (FERNÁNDEZ-BRAVO et al., 2020; ZHOU et al., 2022; MEEHAN et al., 2021), Identidade Média de Aminoácidos (AAI) (MEEHAN et al., 2021; ZHANG et al., 2022) e Porcentagem de Proteínas Conservadas (POCP) tem se mostrado eficaz na classificação taxonômica precisa das bactérias em seu contexto geral (ZHANG et al., 2022).

Esses métodos de comparação genômica têm apresentado resultados consistentes com estudos filogenéticos tradicionais, como a hibridização DNA-DNA (MEEHAN et al., 2021; FERNÁNDEZ-BRAVO et al., 2020). O sequenciamento de genomas de novas espécies e o cálculo de ANI podem ser úteis para evitar erros na identificação de espécies e até mesmo descobrir novas espécies (ZHANG et al., 2022; VINCENT et al., 2019).

A filogenômica, também conhecida como filogenia de múltiplos *loci*, é um campo da genética e da biologia evolutiva que estuda as relações evolutivas entre organismos por meio da análise de múltiplos *loci* genéticos (JALIU et al., 2022; AKASE et al., 2019). Em vez de se basear em um único gene ou região

do genoma, a filogenômica combina informações de vários *loci* independentes para construir uma árvore filogenética mais abrangente e precisa, refletindo as relações evolutivas entre as espécies de forma mais completa (MOSELEY *et al.*, 2020; JALIU *et al.*, 2022;).

A abordagem da filogenômica permite avaliar diferentes regiões do genoma de uma espécie para obter informações mais robustas sobre suas relações evolutivas, pois diferentes *loci* podem evoluir de maneira independente, refletindo diferentes eventos evolutivos ao longo do tempo (VINCENT *et al.*, 2019; BERTASIO *et al.*, 2020; MAZZOTA *et al.*, 2023). Isso ajuda a superar algumas limitações da filogenia baseada em um único gene, como eventos de transferência horizontal de genes ou taxas variáveis de evolução em diferentes regiões do genoma (VINCENT *et al.*, 2019; FOUTS *et al.*, 2016).

1.4.1.2. Genômica estrutural

A genômica estrutural é um campo da genética que se concentra na análise e estudo da estrutura e organização do genoma de um organismo (MICHALSKA e JOACHIMIÁK, 2021; GRABOWSKI *et al.*, 2016). Segundo Pierce (2020), a estrutura do genoma refere-se à organização espacial das sequências de DNA. Tradicionalmente, os estudos de genômica estrutural estavam preocupados em desvendar a sequência de bases DNA, que é a ordem linear dos nucleotídeos dos genes que compõem o material genético de um dado organismo, e como os genes de diferentes categorias estão distribuídos ao longo da molécula de DNA (GRIFFITHS *et al.*, 2013; PIERCE, 2020).

Recentemente a genômica estrutural também tem tentado entender como o DNA está organizado tridimensionalmente dentro do compartimento intracelular (MICHALSKA & JOACHIMIÁK, 2021). Essas estruturas tridimensionais podem afetar a expressão gênica, controlando quais genes estão ativos ou inativos em um determinado momento, principalmente em seres eucariotos. Além disso, a genômica estrutural também está envolvida na investigação de variações estruturais do genoma (PIERCE, 2020; MICHALSKA & JOACHIMIÁK, 2021; GRABOWSKI *et al.*, 2016). Isso inclui estudos sobre

deleções, duplicações, inversões e rearranjos de grandes segmentos de DNA (PIERCE, 2020).

A genômica funcional é um ramo da genômica que se concentra no estudo das funções e interações dos genes em um genoma (PIERCE, 2020; GRIFFITHS *et al.*, 2013). Ela busca compreender como os genes são expressos, regulados e desempenham funções específicas em um organismo (BERGER *et al.*, 2018; SNUSTAD e SIMMONS, 2017). Enquanto a genômica estrutural se preocupa com a organização e estrutura do genoma, a genômica funcional busca entender como esses genes estão envolvidos em processos biológicos e contribuem para as características de um organismo (ALMEIDA *et al.*, 2019; BARH *et al.*, 2020). Várias abordagens e técnicas podem ser utilizadas na genômica funcional (GRIFFITHS *et al.*, 2013; GALPERIN *et al.*, 2017; SHALEM *et al.*, 2015).

A predição da função de genes homólogos pode ser estimada ao comparar a sequência de DNA de novos isolados com as de genes conhecidos depositados em repositórios públicos como o NCBI. Além disso, podem ser citadas as análises de expressão gênica, como a transcriptômica que avaliam os níveis de transcritos de genes em diferentes condições fisiológicas e estágios de desenvolvimento; e, determinam as funções dos genes e como eles contribuem para processos biológicos específicos, respectivamente (PIERCE, 2020; GRIFFITHS *et al.*, 2013; BERGER *et al.*, 2018). Técnicas de análise de interação gênica e análise de variantes genéticas também podem ser aplicadas (PIERCE, 2020; SNUSTAD e SIMMONS, 2017).

Estudos recentes, como o trabalho conduzido por Mani *et al.* (2023), enfatizam o papel da genômica como uma ferramenta poderosa para a compreensão da ecologia bacteriana. Essas análises têm contribuído tanto para a identificação de espécies bacterianas em ambientes específicos quanto para a compreensão de suas funções (LAND *et al.*, 2015; MANI *et al.*, 2023), bem como suas respostas e interações ecológicas com outras espécies bacterianas em comunidades microbiológicas (SNUSTAD e SIMMONS, 2017; PIERCE, 2016). Esses estudos nos permitem compreender como as bactérias cooperam ou competem entre si para sobreviver em ambientes particulares (MANI *et al.*, 2023) e como estão envolvidas na produção de compostos antimicrobianos ou

no processo de degradação de poluentes (GRIFFITHS *et al.*, 2013; PIERCE, 2016).

Pierce (2016) menciona que a análise genômica de novas espécies bacterianas possibilita a identificação de genes únicos ou sequências genéticas distintas. Essas informações podem fornecer insights sobre os genes envolvidos em processos metabólicos específicos em nichos particulares e a estabilidade do genoma de uma espécie em relação à perda ou aquisição de genes (LAND *et al.*, 2015; SEEMANN, 2014), incluindo a presença de elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons (PIERCE, 2016; SNUSTAD e SIMMONS, 2017).

1.4.1.3 Pan-genômica

A pan-genômica é um campo da genômica que se concentra na análise comparativa de genomas de uma mesma espécie, obtido por meio do sequenciamento de diferentes subespécies ou cepas (BARH *et al.*, 2020; CONTRERAS-MOREIRA e VINUESA, 2013). Esse conceito difere da genômica comparativa convencional, e leva em consideração a diversidade genômica existente em uma população para o estudo do conjunto completo de genes de uma espécie (BARH *et al.*, 2020). O pan-genoma é composto pelo genoma central, cujos genes são compartilhados por todas as populações; o genoma compartilhado, cujos genes estão presentes em algumas, mas não em todas as populações; e genes únicos, específicos de cada população (ROULI *et al.*, 2015; SHERMAN e SALZBERG, 2020). Isso permite identificar diferenças genéticas e adaptabilidade a novos ambientes (ROULI *et al.*, 2015).

O termo "pan-genoma fechado" refere-se a um conjunto de genes completo e estável, em que todas as possíveis variantes genéticas de uma espécie estão representadas (ROULI *et al.*, 2015; DIENE *et al.*, 2013). Nesse caso, apenas alguns genes adicionais podem ser encontrados se mais genomas forem sequenciados, o que pode indicar que a diversidade genética da espécie

já foi amplamente explorada ou que esta é altamente especializada (ROULI *et al.*, 2015). Por outro lado, o termo "pan-genoma aberto" é usado quando o conjunto de genes de uma espécie ainda não está completamente representado (BARH *et al.*, 2020). Nesse caso, o sequenciamento de novos genomas adicionará muitos genes às análises, uma vez que existem variações genéticas significativas entre as cepas da espécie (ROULI *et al.*, 2015).

A distinção entre pan-genomas fechados e abertos está relacionada à capacidade de uma espécie de adquirir novos genes e se adaptar a diferentes ambientes ou desafios (CAPUTO *et al.*, 2019; GRENINGER e NACCACHE, 2019). Um pan-genoma fechado sugere que a espécie já alcançou uma estabilidade genômica, enquanto um pan-genoma aberto costuma indicar que a espécie ainda está em evolução e pode apresentar maior plasticidade genômica (HORESH *et al.*, 2021; BAHR *et al.*, 2020). Todavia, essa definição é controversa, visto que a incorporação de ilhas genômicas¹ pode alterar drasticamente a composição do pan-genoma, mesmo naqueles considerados fechados, levando-o a trocar de categoria (BARH *et al.*, 2020;).

A plasticidade genômica refere-se à capacidade de um genoma sofrer alterações estruturais, como aquisição de genes novos, perda de genes existentes e rearranjos genômicos, ao longo do tempo (SHERMAN e SALZBERG, 2020). Isso desempenha um papel fundamental na formação e evolução do pan-genoma (BARH *et al.*, 2020). As variações genômicas resultantes da plasticidade genômica são responsáveis pela diversidade genética observada entre diferentes cepas de uma espécie (GRENINGER e NACCACHE, 2019; SHERMAN e SALZBERG, 2020).

No caso da patogenicidade, a plasticidade genômica desempenha um papel crucial na evolução dos patógenos (SHERMAN e SALZBERG, 2020; BARH *et al.*, 2020). Os genes de virulência, responsáveis pelas características

¹ São regiões do genoma bacteriano que diferem em composição e estrutura do restante do genoma. Geralmente contêm genes associados a características específicas, como virulência, resistência a antibióticos, metabolismo especializado ou interações simbióticas. Essas ilhas desempenham um papel importante na adaptação dos organismos às condições ambientais, evolução bacteriana e na determinação de sua patogenicidade.

que permitem aos patógenos causar doenças, também podem ser adquiridos ou perdidos por meio de rearranjos genômicos (GRENINGER e NACCACHE, 2019; SHERMAN e SALZBERG, 2020). Essas mudanças no pan-genoma podem levar ao surgimento de novas cepas patogênicas ou à evolução de cepas existentes (BARH *et al.*, 2020), permitindo que os patógenos evitem a resposta imunológica do hospedeiro ou adquiram resistência a antibióticos (BARH *et al.*, 2020).

Através da análise do pan-genoma, é possível identificar os genes que compõem o genoma central e os genes variáveis que contribuem para a plasticidade genômica (CONTRERAS-MOREIRA e VINUESA, 2013). Através da aquisição de genes novos por meio de transferência horizontal, por exemplo, as espécies podem adquirir novas capacidades metabólicas, como a capacidade de degradar compostos tóxicos ou utilizar fontes de nutrientes alternativas (GRENINGER e NACCACHE, 2019; SHERMAN e SALZBERG, 2020). Essas mudanças genômicas podem permitir que os organismos se adaptem a diferentes nichos ecológicos, maximizando sua capacidade de sobrevivência e reprodução (BARH *et al.*, 2020).

Diante dos avanços promissores que a abordagem de genômica tem proporcionado para os estudos dos microrganismos, uma revisão de literatura abrangente sobre genômica de *Leptospira* pode fornecer uma visão crítica dos avanços e descobertas recentes nesse campo de pesquisa, e identificar lacunas no conhecimento existente. Tais fatores contribuem para a identificação de áreas de pesquisa promissoras ou que ainda precisam ser exploradas oferecendo um ponto de partida sólido para estudos futuros sobre o gênero.

Sob este aspecto, uma revisão dessa natureza pode revelar informações sobre a diversidade genômica das espécies de *Leptospira*, os genes associados à patogenicidade, aos nichos ecológicos que impactam na saúde ambiental e humana, a interação com diferentes hospedeiros, e a resistência/susceptibilidade a antimicrobianos. Essas informações podem guiar pesquisas futuras na seleção de genes-alvo para estudos funcionais, o desenvolvimento de estratégias de diagnóstico e o aprimoramento de abordagens terapêuticas para o controle da leptospirose.

2. Objetivo

O objetivo deste trabalho de conclusão de curso é realizar uma análise abrangente do estado da arte da genômica no gênero *Leptospira*, através do levantamento das informações disponíveis sobre a estrutura genômica das diferentes espécies sobre a diversidade genética, a organização, estrutura e estabilidade evolutiva do genoma e seu papel na patogenicidade e adaptação ao ambiente.

3. Metodologia

O vigente estudo descritivo foi realizado a partir de uma revisão bibliográfica a respeito da genômica de *Leptospira ssp.*, das suas características dentro dos principais grupos filogenéticos atuais, P1, P2, S1 e S2. A busca por artigos foi realizada em bibliotecas científicas online, tais como SCIELO (Scientific Electronic Library Online), Science Direct, Scopus e NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando os bancos de dados PubMed e PubMed Health, e Scholar Google.

A pesquisa e a construção do texto foram realizadas no período de fevereiro a junho de 2023. Apenas trabalhos acadêmicos entre 2009 e 2023 foram escolhidos para compor esse estudo. Tantos termos em português quanto em inglês foram empregados como palavras-chaves para a pesquisa dos dados. Os termos utilizados na busca foram: *bacterial genome*, *Leptospira species*, *Leptospira and genomic*, *Leptospira genome*, *genome and leptospirosis*, *gene Loci and Leptospira*, *Genetic diversity and Leptospira*.

A seleção dos artigos de interesse foi em conformidade com o assunto proposto, sendo descartados os estudos que, apesar de aparecerem nos resultados de busca da pesquisa, não estavam diretamente relacionados com o tema desta revisão bibliográfica.

4. Revisão da literatura

4.1. Genômica do gênero *Leptospira*

A genômica tem desempenhado um papel essencial nos estudos evolutivos e filogenéticos do gênero *Leptospira* (VINCENT *et al.*, 2019; ARENT *et al.*, 2022). A análise comparativa de genomas completos tem possibilitado a identificação de variações genéticas significativas entre diferentes cepas, o que pode indicar a presença de novas espécies (NALLY *et al.*, 2016; ARENT *et al.*, 2022). Essa abordagem genômica também tem sido particularmente valiosa na descoberta de espécies que podem ter sido subestimadas ou não reconhecidas previamente devido à sua semelhança fenotípica (VINCENT *et al.*, 2019).

Os estudos genômicos também têm permitido a identificação de fatores específicos de virulência, como genes relacionados à produção de proteínas de superfície, enzimas, fatores de adesão e toxinas (VINCENT *et al.*, 2019; THIBEAUX *et al.*, 2018). Essas descobertas têm contribuído para uma melhor compreensão dos mecanismos de patogenicidade e interação com o hospedeiro (THIBEAUX *et al.*, 2018) e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e vacinas mais eficazes (THIBEAUX *et al.*, 2018; FERNANDES *et al.*, 2022; KURILUNG *et al.*, 2021).

4.1.1. Organização do Genoma de *Leptospira*

Os genomas de *Leptospira* variam de 3,73 a 4,99 Mb e consistem em dois cromossomos circulares (VINCENT *et al.*, 2019; FOUTS *et al.*, 2016). No estudo de Vincent *et al.* (2019), foram sequenciadas 90 cepas de *Leptospira*, revelando um tamanho médio de aproximadamente $4.128.000 \pm 221.345$ pares de base, e o conteúdo de GC variou entre 37,06% e 47,70%. A montagem média do genoma consistiu em cerca de 49 ± 50 contigs.

O sequenciamento completo do genoma de *Leptospira* foi realizado pela primeira vez em três das espécies mais comuns: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* e *L. biflexa*. Entretanto, esse cenário tem mudado significativamente devido ao rápido aumento no número de sequências disponíveis de genomas de *Leptospira*, impulsionado pelo acesso dos pesquisadores a novas técnicas de sequenciamento, como o Next-Generation Sequencing (NGS). Atualmente, existem 706 genomas de *Leptospira* disponíveis no banco de dados genômicos, enriquecendo ainda mais o conhecimento sobre a diversidade e características genômicas dessa bactéria.

Além disso, os estudos têm apontado para a presença de plasmídeos e sequências de inserção (ISs) em alguns genomas de *Leptospira* (HUSSAIN *et al.*, 2023; KURILUNG *et al.*, 2021; NAKAO *et al.*, 2021). Os plasmídeos têm sido alvo de investigações para compreender seu papel na virulência e patogenicidade das bactérias (KURILUNG *et al.*, 2021; FERNANDES *et al.*, 2021). Essas estruturas genéticas têm sido identificadas em diferentes espécies de *Leptospira*, fornecendo informações valiosas sobre a diversidade genética e a evolução das cepas bacterianas (NAKAO *et al.*, 2021; RAMLI *et al.*, 2021). É importante ressaltar, no entanto, que nem todas as espécies de *Leptospira* possuem plasmídeos, e a presença dessas estruturas pode variar entre as diferentes cepas e isolados bacterianos (RAMLI *et al.*, 2021; FERNANDES *et al.*, 2022).

4.1.2. Diversidade genética e filogenômica

A classificação das bactérias do gênero *Leptospira* costumava ser realizada utilizando critérios fenotípicos, tais como coloração de Gram, requisitos de crescimento e testes bioquímicos. Contudo, devido à escassa diversidade fenotípica dentro desse gênero, torna-se desafiador diferenciar as espécies com base nessas características (FOUTS *et al.*, 2016; VINCENT *et al.*, 2019). A filogenia baseada no 16s RNA também não tem oferecido informações suficientes para uma inferência filogenética consistente em nível de espécie,

devido a fatores como taxas de mutação diferentes, eventos de recombinação genética e seleção natural específica (RAMLI et al., 2021).

Ao incorporar múltiplos loci em uma análise filogenética, é possível levar em conta essa diversidade evolutiva, fornecendo uma imagem mais completa da história evolutiva das espécies estudadas (FOUTS et al., 2016; GUGLIELMINI et al., 2020). O uso de um único gene para inferir a filogenia pode ser limitado na detecção e correção de distorções causadas por transferência horizontal de genes (THGs). Ao analisar múltiplos loci, é possível identificar quais genes estão consistentes com a história evolutiva vertical das espécies de *Leptospira* e quais podem ter sofrido eventos de THGs (VINCENT et al., 2019).

Estudos recentes de sequenciamento de genoma completo e genômica comparativa classificaram as leptospiros em 68 espécies agrupadas em dois principais clados: saprófitas (S) e patogênicas (P). Esses clados são subdivididos em quatro subclados, de acordo com o grau de virulência: P1, P2, S1 e S2 (VINCENT et al., 2019). O aumento significativo no número de genomas disponíveis levou à identificação de 45 novas espécies, incluindo aquelas com características patogênicas e saprófitas (CASANOVAS-MASSANAS et al., 2020; CASANOVAS-MASSANA et al., 2021; KORBA et al., 2021; MASUZAWA et al., 2018).

A filogenômica também permitiu investigar variações genéticas dentro de populações de *Leptospira*, auxiliando na identificação de polimorfismos genéticos e compreendendo a diversidade genética distribuída entre indivíduos (THIBEAUX et al., 2018; GUGLIELMINI et al., 2020). Estudos detalhados revelaram grupos de clones (CGs) em diferentes regiões geográficas, destacando a ocorrência de CGs endêmicos em locais específicos. Mais pesquisas são necessárias para entender se essa distribuição reflete forte endemicidade ou limitações atuais na amostragem (GUGLIELMINI et al., 2020).

O sequenciamento completo do genoma (WGS) mostrou-se vantajoso em comparação com a análise da sequência de rRNA 16S, fornecendo uma visão mais abrangente da diversidade genética de *Leptospira* (HUGENHOLTZ et al., 2021). O uso de múltiplos loci também contribui para obter uma resolução mais precisa nas inferências filogenéticas (FOUTS et al., 2016; VINCENT et al., 2019).

Além disso, estudos genômicos continuam a revelar novas espécies e fornecer informações cruciais para compreender a evolução e distribuição dessas importantes bactérias (ARMED et al., 2015; RAMLI et al., 2021).

4.1.2.1 *Leptospiras* do clado filogenético S

Novas espécies de *Leptospira* identificadas através de sequenciamento genômico são pertencentes ao subclado S1 e S2 (ARENT et al., 2022; VINCENT et al., 2019). Essas espécies são consideradas cosmopolitas, uma vez que são encontradas em diversos ecossistemas (CASANOVAS-MASSANAS et al., 2020; CASANOVAS-MASSANA et al., 2021). Estudos recentes sugerem que, apesar da sua variedade de ambiente, os solos são um nicho importante para o gênero (KORBA et al., 2021; MASUZAWA et al., 2018; CASANOVAS-MASSANA et al., 2021).

O subclado S1 é atualmente descrito com 21 espécies, a incluir aquelas anteriormente descritas como o grupo saprófita (ARENT et al., 2022; CASANOVAS-MASSANAS et al., 2020; CASANOVAS-MASSANA et al., 2021). A primeira delas, a *L. biflexa* foi descrita em 1951, por Stimson e colaboradores, após o isolamento de células bacterianas de águas estagnadas na Flórida, Estados Unidos (AHMED et al., 2012; GOMES, 2015).

O subclado mais recentemente identificado, S2, abrange um conjunto de cinco espécies de *Leptospira*, incluindo a *L. idonii* (ARENT et al., 2022; VINCENT et al., 2019). O subclado S2 compartilha algumas características fenotípicas com as espécies saprófitas do subclado S1, o que é consistente com sua posição na árvore filogenética, mas também exibe algumas diferenças em termos de características fisiológicas (VINCENT et al., 2019; KORBA et al., 2021; MASUZAWA et al., 2018). Conforme mencionado por Vincent et al. (2019), em seus experimentos, as espécies do subclado S2 mostraram um bom crescimento a 14°C, mas não a 37°C, apresentando um padrão de crescimento semelhante ao observado para as espécies do subclado S1, enquanto as espécies do clado P demonstraram capacidade de crescimento a 37°C.

4.1.2.2 *Leptospiras* do clado filogenético P

Segundo estudos genômicos atuais, as *Leptospira* patogênicas dividiram-se em P1, grupo que engloba as espécies anteriormente descritas como patógenos; e P2, grupo referente as espécies antes descritas como grupo intermediário (ARENT *et al.*, 2022; VINCENT *et al.*, 2019).

As infecções causadas por *Leptospira* P2 podem variar em termos de sintomas e gravidade, mas geralmente são menos graves do que as infecções causadas por leptospiras do clado P1 (VINCENT *et al.*, 2019). A exemplo tem-se a *L. inadai*, uma espécie de bactéria espiroqueta que foi isolada a partir de roedores na América do Sul (MORENO *et al.*, 2018). Ela compartilha características e genes comuns com espécies P1 (ADLER, 2015; RAHMAN *et al.*, 2021). Ainda que não tenha sido documentada em um grande volume de infecções em humanos, a *L. inadai* foi relatada em dois casos fatais na Índia (MORENO *et al.*, 2018 *apud* GANGADHAR *et al.* 2008; RAHMAN *et al.*, 2021).

Apesar dos progressos recentes na investigação do genoma completo de espécies de *Leptospira*, assim como do gênero como um todo, é fundamental salientar que existem poucos estudos disponíveis nos últimos cinco anos nos bancos de dados públicos que apresentam informações atualizadas até a data desta pesquisa. A análise filogenômica é uma abordagem relativamente nova no estudo de bactérias, e sua aplicação para compreender a evolução de *Leptospira* ainda está em estágios iniciais (VINCENT *et al.*, 2019; FOUTS *et al.*, 2016).

Essa lacuna pode ser atribuída a diversos fatores, incluindo a complexidade temporal envolvida na realização de estudos filogenômicos abrangentes, que exigem uma ampla amostragem de espécies e a análise de grandes conjuntos de dados genômicos. Com o avanço rápido da tecnologia de sequenciamento de próxima geração e a crescente disponibilidade de sequências genômicas de *Leptospira*, é provável que estudos filogenômicos abrangentes sejam conduzidos no futuro, proporcionando uma compreensão mais completa da evolução desse importante gênero bacteriano.

4.1.3. Pangenômica do gênero *Leptospira*

Outros estudos genômicos relevantes consiste na avaliação do pangenoma entre e dentro dos subclados de *Leptospira* identificados, como P1, P2, S1 e S2 (RAMLI *et al.*, 2021; THIBEAUX *et al.*, 2018). Os estudos indicaram que os subclados são distintos entre si, sendo o subclado P1 aquele com o pangenoma mais aberto (VINCENT *et al.*, 2019). Essa característica sugere uma grande diversidade no conjunto de genes específicos desse subclado (FOUTS *et al.*, 2016; VINCENT *et al.*, 2019). Todos os grupos apresentam aproximadamente o mesmo número de agrupamentos de genes no genoma central (FOUTS *et al.*, 2016; VINCENT *et al.*, 2019), no entanto, o subclado P1 possui um maior número de agrupamentos de genes exclusivos em comparação com os demais subclados (VINCENT *et al.*, 2019).

No contexto do estudo de Fouts *et al* (2016), o diagrama de Venn foi utilizado para ilustrar a distribuição de grupos de proteínas que representam famílias de genes entre os grupos patogênicos, intermediários e saprofíticos de *Leptospira*. É importante salientar que o trabalho citado foi realizado antes da nova classificação do gênero em filogrupos P e S, mas que os seus dados trazem informações substanciais sobre o tema em questão até os dias atuais.

As áreas de sobreposição nos círculos representam genes compartilhados entre os diferentes grupos, o que permite uma visualização rápida das semelhanças e diferenças entre as espécies estudadas. Com base nos critérios de maioria, observou-se que os grupos patogênicos e intermediários possuíam números semelhantes de genes específicos para cada grupo, com 416 e 424 genes, respectivamente, e o maior número de genes compartilhados (369) entre os dois grupos. Quando comparado os patogênicos e intermediários com as cepas saprofíticas, foram encontrados apenas 52 e 78 genes compartilhados, respectivamente.

Ao analisar os genes específicos de cada espécie, foi observado que as leptospiros patogênicas tinham, em média, mais genes específicos (637 ± 129) do que as intermediárias (418 ± 126) ou saprofíticas (321 ± 90) (FOUTS *et al.*, 2016).

A cepa *L. noguchii* sv. Panamá str. CZ 214T apresentou o maior número de genes específicos entre as espécies analisadas neste estudo. Para compreender melhor a função dos genes compartilhados entre as leptospiros infecciosas e não infecciosas, foi examinada a distribuição de funções proteicas desses clusters compartilhados (FOUTS *et al.*, 2016). Foi observado que a categoria funcional predominante nas leptospiros patogênicas era a "elementos móveis e extracromossômicos" (FOUTS *et al.*, 2016).

Ainda de acordo com Fouts *et al.* (2016), entre os genes compartilhados entre patogênicos e intermediários, as categorias funcionais mais destacadas foram "biossíntese de cofatores, grupos prostéticos e carreadores" e "metabolismo de ácidos graxos e fosfolípidios". Os genes específicos das saprofíticas dominaram 10 das 16 categorias funcionais, muitos dos quais estavam envolvidos no metabolismo intermediário e energético central, regulação gênica, transdução de sinal, destino de proteínas, envelope celular e funções de transporte (FOUTS *et al.*, 2016).

4.1.4. **Loci gênicos relevantes em *Leptospira ssp.***

Diversos *Loci* gênicos² específicos foram identificados no subclado P1, os quais são comumente utilizados para diagnóstico molecular visando a identificação e caracterização de diferentes cepas ou espécies de *Leptospira* por meio de suas sequências genéticas (ARENT *et al.*, 2022; GUGLIELMINI *et al.*, 2020). Esses *loci* gênicos específicos são denominados perfis alélicos cgMLST, que correspondem à técnica de "cg (core genome) Multilocus Sequence Typing". Essa técnica envolve a análise de múltiplos loci gênicos do genoma central (core genome) de uma espécie para obter um perfil genético característico (GUGLIELMINI *et al.*, 2020; VANI *et al.*, 2014).

No caso do subclado P1, os perfis alélicos cgMLST diferem dos demais membros do grupo em até 40 incompatibilidades alélicas (XU *et al.*, 2016; GUGLIELMINI *et al.*, 2020). Uma incompatibilidade alélica ocorre quando há diferenças nas sequências genéticas de alelos específicos entre diferentes

² Locais específicos em um cromossomo onde um gene particular está localizado.

amostras (GUGLIELMINI *et al.*, 2020). De acordo com esses resultados, essa definição de até 40 incompatibilidades alélicas permitiu a identificação de 237 grupos distintos de perfis alélicos dentro do subclado P1.

Cada grupo de perfis alélicos representa um conjunto de amostras de *Leptospira* que apresentam variações específicas nos *loci* gênicos analisados (GUGLIELMINI *et al.*, 2020). Esses grupos de perfis alélicos são valiosos para fins de diagnóstico molecular, pois auxiliam na identificação e distinção de diferentes cepas ou espécies de *Leptospira* dentro do subclado P1 com base em suas características genéticas específicas (XU *et al.*, 2016; GUGLIELMINI *et al.*, 2020).

O lipopolissacarídeo (LPS) tem sido um tema de grande interesse na microbiologia leptospiral, não apenas devido às suas atividades endotoxigênicas de baixa potência, mas também porque o LPS leptospiral serve como base para a identificação de sorovares e o desenvolvimento de vacinas (FOUTS *et al.*, 2016; WILKINSON *et al.*, 2021). Em relação a investigação sobre o número de lipoproteínas e a distribuição de fatores de virulência conhecidos no gênero, os resultados do estudo de Vincent *et al.* (2019) mostraram que o subclado P1 possui menos genes que codificam lipoproteínas em comparação com os outros subclados.

Esse padrão é especialmente verdadeiro para as espécies que divergiram após o primeiro nó dentro do subclado P1, as quais são consideradas mais virulentas (ARENT *et al.*, 2022; VINCENT *et al.*, 2019). Entre essas espécies, Vincent *et al.* (2019) incluem *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. mayottensis*, *L. borgpetersenii*, *L. alexandre* e *L. weilii*.

Os *loci* *rfb* desempenham um papel essencial na biossíntese do antígeno O e na estruturação do lipopolissacarídeo (LPS) em *Leptospira*. Esses *loci* foram identificados em três regiões genômicas distintas e exibem variações em tamanho e localização no genoma (KURILUNG *et al.*, 2021; LLANES *et al.*, 2016; RAMLI *et al.*, 2021). Nas espécies P2 de *Leptospira*, assim como em algumas P1, os *loci* *rfb* estão posicionados entre uma proteína de ligação ao cobre e a proteína ribossômica S6 (RAMLI *et al.*, 2021; FOUTS *et al.*, 2016). Já nas *Leptospiras* do clado S, esses *loci* estão localizados após o gene que codifica a

proteína ribossômica S6, sendo menores em tamanho e não possuindo um gene chamado DASS, presente nos *loci rfb* das espécies patogênicas (RAMLI *et al.*, 2021; FOUTS *et al.*, 2016).

Estudos mostram que diferentes sorovares de *Leptospira* possuem *loci rfb* semelhantes, sugerindo relações genéticas próximas (HSU e YANG, 2022; RAMLI *et al.*, 2021). Por exemplo, os sorovares Manhao 3, Javanica e Pingchang apresentam uma certa semelhança nos *loci rfb* (FOUTS *et al.*, 2016). Além disso, *L. broomii* e *L. fainei* compartilham agrupamentos de genes *rfb* quase idênticos, indicando uma relação genética entre elas (FOUTS *et al.*, 2016). Essas descobertas contribuem para a compreensão da evolução e classificação das cepas de *Leptospira*, além da caracterização sorológica desses patógenos. A diversidade dos *loci rfb*, em termos de localização genômica e tamanho, evidencia a variabilidade desses elementos genéticos na espécie (RAMLI *et al.*, 2021; FOUTS *et al.*, 2016).

4.1.4.1 Ilhas Genômicas

Ilhas genômicas (IGs) são regiões do genoma bacteriano que apresentam um conjunto de genes com uma origem genética distinta em relação ao restante do genoma (BERTELLI *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2022). Essas regiões são frequentemente adquiridas por meio de eventos como a transferência horizontal entre diferentes espécies bacterianas ou a aquisição de genes de elementos genéticos móveis, como plasmídeos e bacteriófagos (SHEN *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2022). As ilhas genômicas desempenham um papel importante na evolução bacteriana, uma vez que contribuem para a adaptação ao meio ambiente, resistência antimicrobiana e virulência (LI *et al.*, 2022).

Por exemplo, ilhas genômicas contendo genes de resistência a antibióticos podem conferir às bactérias a capacidade de sobreviver e proliferar em ambientes onde esses agentes antimicrobianos estão presentes. Esses genes podem codificar enzimas de modificação ou degradação de antibióticos, sistemas de efluxo que removem os antibióticos das células bacterianas, ou até mesmo alterações nas proteínas-alvo dos antibióticos (CUMMINS *et al.*, 2020;

BERTELLI *et al.*, 2022). Além da resistência antimicrobiana, as ilhas genômicas também podem abrigar genes de virulência, que são responsáveis pela capacidade das bactérias de causar doenças (BERTELLI *et al.*, 2022; LI *et al.*, 2022). Esses genes codificam fatores de virulência, como toxinas, adesinas, sistemas de secreção e proteínas de invasão, que desempenham papéis cruciais na capacidade das bactérias de colonizar, invadir e causar danos ao hospedeiro (CUMMINS *et al.*, 2020).

Em relação à adaptação ao meio ambiente, as ilhas genômicas podem conter genes que conferem às bactérias a capacidade de utilizar nutrientes específicos, tolerar condições adversas, como altas temperaturas ou concentrações tóxicas de metais pesados, ou mesmo permitir a colonização de nichos ecológicos específicos (SHEN *et al.*, 2018; CUMMINS *et al.*, 2020). Em estudos genômicos comparativos anteriores, foram identificadas novas IGs em cepas de *L. interrogans* do sorovar Lai (YOUN *et al.*, 2014). Essas regiões estão associadas a genes relacionados à virulência e à regulação da expressão gênica, sugerindo seu possível papel na patogenicidade dessas bactérias (BERIWAL *et al.*, 2018; YOUN *et al.*, 2014).

Além disso, o banco de dados utilizado no estudo também revelou a presença de IGs em plasmídeos, bem como nos cromossomos, em diversas linhagens de *Leptospira* (BERIWAL *et al.*, 2018). Ainda no trabalho de YOUN *et al.* (2014) observou-se uma distribuição diferencial das IGs nos cromossomos das diferentes espécies. Notavelmente, o cromossomo I apresentou um maior número de IGs em comparação ao cromossomo II em todas as espécies estudadas. Especificamente, cepas patogênicas de *L. santarosai* serovares Shermani str. LT 821 exibiram uma maior quantidade de regiões IGs.

A linhagem sorovar Linhai str. 56 609 se destacou por apresentar IGs tanto em seu plasmídeo quanto em ambos os cromossomos, evidenciando a diversidade e a distribuição variável desses elementos genômicos nas leptospiros. A análise das regiões IGs revelou uma ampla variação no número de genes encontrados nas diferentes cepas analisadas (YOUN *et al.*, 2014). Nas cepas patogênicas, a maioria das regiões IGs continha genes hipotéticos, ou

seja, genes cujas funções ainda não foram totalmente caracterizadas BERIWAL *et al.*, 2018; YOUN *et al.*, 2014).

Esses achados indicam a possibilidade de encontrar novos genes relevantes para a patogenicidade das leptospiros. Apesar da relevância das ilhas genômicas no contexto da evolução, virulência e adaptação das bactérias, ainda são escassos os estudos sobre esses elementos genômicos no gênero (GUGLIELMINI *et al.*, 2020; FOUTS *et al.*, 2016). Poucos estudos têm investigado de maneira abrangente as IGs e seu impacto na diversidade genômica e na patogenicidade. Estudos adicionais sobre ilhas genômicas podem fornecer insights valiosos para o desenvolvimento de estratégias de controle e prevenção de infecções por *Leptospira*, além de contribuir para uma melhor compreensão da biologia e evolução desse importante gênero bacteriano.

4.1.4.2 Fatores de virulência

Existe uma variação no repertório de genes que codificam fatores de virulência entre os diferentes subclados de *Leptospira* (HSU e YANG, 2022; RAMLI *et al.*, 2021). Os subclados P1 e P2 possuem um maior número desses genes, enquanto os subclados S1 e S2 apresentam uma quantidade menor (FOUTS *et al.*, 2016; VINCENT *et al.*, 2019; RAMLI *et al.*, 2021).

Chama a atenção a diversidade na distribuição do gene responsável pela enzima catalase KatE (LA1859), um fator de virulência significativo em modelos animais, revelando-se mais ampla do que previamente considerado. Em seu estudo, Vincent *et al.* (2019) complementam essa descoberta ao observar a presença desse gene em alguns genomas dos subclados P2, S1 e S2, além do subclado P1. Esses achados indicam possíveis variações na presença e distribuição de genes relacionados à virulência entre os subclados de *Leptospira*.

Paralelamente, observou-se a associação de vários domínios PFAM, que desempenham funções específicas em proteínas, com proteínas relacionadas à virulência de *Leptospira* (FOUTS *et al.*, 2016; VINCENT *et al.*, 2019). Esperava-se um maior número desses domínios nas espécies pertencentes ao subclado

P1, especialmente aquelas que apresentam alta patogenicidade em humanos e se diferenciam após o primeiro nó (ARENT *et al.*, 2022). Tais resultados fornecem informações sobre a diversidade na presença e distribuição de lipoproteínas, fatores de virulência e domínios PFAM entre os subclados de *Leptospira* (VINCENT *et al.*, 2019). Essas descobertas têm contribuído para a compreensão das características genéticas relacionadas à virulência e patogenicidade dessas bactérias.

4.1.4.3 Fagos e elementos transponíveis

Os fagos, também conhecidos como bacteriófagos, são vírus que infectam e se replicam dentro de bactérias (ZHAI *et al.*, 2021; IYER *et al.*, 2021; MADIGAN *et al.*, 2016). Eles são considerados parasitas intracelulares obrigatórios das bactérias. Os fagos possuem uma estrutura composta por uma cápsula de proteína que envolve seu material genético, que pode ser DNA ou RNA (FARLOW *et al.*, 2018; ZHAI *et al.*, 2021; ARNAU 2023). Após infectarem uma célula bacteriana, os fagos sequestram a maquinaria celular da bactéria hospedeira para se replicarem e produzirem novas partículas virais. Essas partículas podem causar a lise da célula, liberando os fagos recém-formados para infectar outras células bacterianas (ARNAU *et al.*, 2023; OLIVEIRA *et al.*, 2019; MADIGAN *et al.*, 2016).

Já os elementos transponíveis, também conhecidos como transposons ou sequências de DNA transponíveis, são segmentos de DNA que têm a capacidade de se mover dentro do genoma de um organismo (MADIGAN *et al.*, 2016; ALBERTS *et al.*, 2017). São elementos saltadores, com a capacidade de se mover para diferentes locais do DNA, inserindo-se em diferentes regiões do genoma, inclusive em algumas regiões regulatórias (PIERCE, 2020; CAIN *et al.* 2020). Esses elementos podem carregar genes adicionais durante sua transposição, o que pode ter consequências tanto para a estrutura genética quanto para a expressão gênica do organismo hospedeiro (ALBERTS *et al.*, 2017; CAIN *et al.* 2020).

No estudo de Senevirathna *et al.* (2020) os genomas de cepas de *L. interrogans* apresentaram a presença de fagos e sistemas CRISPR³. Embora os fagos encontrados não estivessem completos, eles indicam vestígios de infecções anteriores controladas pelos sistemas CRISPR funcionais presentes em todos os genomas. As matrizes CRISPR encontradas continham espaçadores, sendo o elemento espaçador mais comum originado de plasmídeos específicos do sorovar Linhai de *L. interrogans*.

Sequências de inserção (ISs) são elementos genéticos que compõem os menores e mais numerosos elementos transponíveis autônomos encontrados em genomas (SIGUIER *et al.*, 2014). Segulier *et al.* (2014) também afirma em seu trabalho que as ISs são caracterizadas por sua capacidade de se mover para diferentes locais do genoma, por meio de um processo conhecido como transposição. As leptospiros patogênicas, a título de exemplo, possuem mais de 20 tipos de IS em seu genoma (Tabela 2) (FOUTS *et al.*, 2016; VINCENT *et al.*, 2019; RAMLI *et al.*, 2021).

As sequências de inserção são consideradas uma das forças motrizes da evolução e diversificação do genoma leptospiral (KURILUNG *et al.*, 2021; FOUTS *et al.*, 2016), visto que sua atividade transponível pode interferir na estrutura e expressão dos genes desempenhando papel importante na diversidade genética e na adaptação de organismos a diferentes ambientes (SIGUIER *et al.*, 2014; VINCENT *et al.*, 2019).

Os genomas de *L. interrogans* revelaram uma combinação de sintonia compartilhada⁴ e rearranjos genômicos, o que reflete uma notável plasticidade genômica na espécie patogênica (SENEVIRATHNA *et al.*, 2020). No contexto desse trabalho, tal informação pode indicar preservação significativa na organização e no conteúdo dos genes em diferentes cepas de *L. interrogans*, o que sugere a existência de uma estrutura genômica comum que desempenha

³ Sistemas CRISPR são mecanismos de defesa imunológica encontrados em bactérias e arqueias, capazes de identificar e degradar material genético invasor por meio de sequências de DNA repetitivas (CRISPR) e sequências espaçadoras. Esses sistemas têm implicações importantes não apenas na imunidade bacteriana, mas também nas aplicações de edição genética.

⁴ Conservação da organização e arranjo de genes em genomas relacionados. Em termos simples, significa que certas regiões genômicas são mantidas de forma semelhante em diferentes espécies ou cepas. Quando há sintonia compartilhada, os genes estão posicionados de maneira semelhante e têm uma ordem conservada, ou preservada, nos genomas comparados.

funções essenciais compartilhadas, enquanto também permite a ocorrência de rearranjos e variações genômicas específicas de cada cepa. Ao passo que a organização e o conteúdo dos genes apresentaram considerável similaridade, também foram observados genomas acessórios específicos dos objetos do estudo (SENEVIRATHNA *et al.*, 2020).

Essas características genômicas citadas são fundamentais para o patógeno, já que contribuem para a manutenção de funções essenciais como persistência e transmissão, bem como a capacidade de se adaptar a pressões ambientais e imunológicas (BERIWAL *et al.*, 2018; YOUN *et al.*, 2014). Tal plasticidade genômica pode ser impulsionada pela presença de elementos móveis, a citar os plasmídeos, as sequências de inserção e os prófagos, presentes nas cepas analisadas pelo trabalho de Berawal *et al.* (2018), mesmo que em distribuição e quantidade variada. O estudo desses elementos é fundamental para compreender a evolução do gênero *Leptospira*, bem como para a pesquisa em biologia molecular e genômica das suas espécies.

5. Considerações finais

A análise comparativa dos genomas de *Leptospira* revela diferenças significativas entre os subclados P1, P2, S1 e S2, destacando o potencial da filogenômica para investigar as relações entre as espécies. A análise de múltiplos loci genéticos permite reconstruir árvores filogenéticas precisas, revelando padrões de divergência, eventos de especiação e a história evolutiva das linhagens de *Leptospira*. Essa abordagem contribui para uma taxonomia e classificação mais precisa dentro do gênero.

A identificação de *loci* gênicos específicos, como os perfis alélicos cgMLST, é útil no diagnóstico molecular e caracterização de diferentes cepas ou espécies de *Leptospira*. A análise das regiões IGs revela variação no número de genes, indicando a possibilidade de identificar novos genes relevantes para a patogenicidade das leptospiros. A plasticidade genômica no gênero permite a preservação de funções essenciais compartilhadas, enquanto ocorrem rearranjos e variações genômicas específicas de cada cepa e/ou espécie.

Embora haja uma lacuna na disponibilidade de estudos filogenômicos consistentes para *Leptospira* em bancos de dados públicos, a genômica está emergindo como uma área promissora de pesquisa nesse contexto. Com o avanço contínuo da tecnologia de sequenciamento de próxima geração e o aumento de dados genômicos disponíveis, espera-se que futuros estudos preencham essa lacuna e proporcionem uma compreensão mais abrangente da diversidade e evolução do gênero *Leptospira*.

Realizar estudos filogenômicos abrangentes é um desafio que requer amostragem extensiva de espécies e análise de grandes conjuntos de dados genômicos. No entanto, com o desenvolvimento de técnicas de sequenciamento mais rápidas e acessíveis, a colaboração entre pesquisadores e a disponibilidade de bancos de dados genômicos compartilhados, é provável que avanços significativos sejam alcançados em breve.

6. Recomendações

A filogenômica pode desempenhar um papel fundamental na investigação da variação genética dentro das populações de *Leptospira*. A identificação de polimorfismos genéticos e a compreensão de como a diversidade genética é distribuída entre diferentes indivíduos dentro de uma população são cruciais para entender processos como deriva genética, fluxo gênico e adaptação local. Esta seria uma poderosa ferramenta para explorar esses aspectos e desvendar os mecanismos subjacentes à evolução e à ecologia das leptospirosas, com o potencial de preencher essa lacuna e fornecer uma visão mais abrangente da diversidade, evolução e relacionamentos dentro do gênero.

Essas informações podem ser utilizadas no desenvolvimento de testes de diagnóstico moleculares mais sensíveis e específicos para leptospirose. Tais testes podem ajudar a detectar e caracterizar diferentes cepas ou espécies de *Leptospira* com base em suas sequências genéticas, o que permitiria um diagnóstico precoce e preciso da doença. Compreender os fatores genéticos que influenciam a virulência da bactéria é crucial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes e a escolha adequada de antimicrobianos para o tratamento da leptospirose.

Ao empregar-se da genômica para estudar a evolução do gênero *Leptospira*, é possível rastrear a disseminação geográfica das diferentes linhagens e cepas da bactéria. Isso é importante para monitorar o surgimento de variantes genéticas emergentes, identificar rotas de transmissão e entender como a leptospirose se espalha em diferentes regiões. Essas informações auxiliam na implementação de estratégias de controle e prevenção eficazes, como a vacinação direcionada e o manejo adequado de animais de risco.

A utilização de múltiplos *loci* genéticos tem o potencial de proporcionar uma visão mais precisa das relações evolutivas entre as espécies de *Leptospira*. Ao analisar diferentes regiões do genoma, é possível obter informações mais robustas sobre suas relações evolutivas e superar algumas limitações da filogenia baseada em um único gene. Com o avanço tecnológico e o aumento do

número de dados genômicos disponíveis, espera-se que futuros estudos filogenômicos contribuam significativamente para o conhecimento científico sobre as leptospiros, beneficiando tanto a pesquisa básica quanto as aplicações práticas na saúde pública e na implementação de estratégias de controle e prevenção de uma das principais zoonoses do planeta.

7. Referências bibliográficas

ABBAS, Abul *et al.* **Imunologia Celular e Molecular**. 9. ed. atual. Rio de Janeiro: Elsevier Ltda, 2019. ISBN 978-0-323-47978-3. Acesso em: 16 MAI. 2023

ABRANCHES, J *et al.* Biology of Oral Streptococci. **Microbiol Spectr**, v. 6, n. 5, 2018. DOI: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0042-2018. Acesso em: 05 ABR. 2023.

ACKERMANN, Kerstin *et al.* In Vivo Biofilm Formation of Pathogenic *Leptospira* spp. in the Vitreous Humor of Horses with Recurrent Uveitis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 9, p. e0009736, 2021. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009736. Acesso em: 25 maio 2023.

ADLER, Ben. **Leptospira and Leptospirosis: Current Topics in Microbiology and Immunology**. Clayton, Australia: Springer, 2015. 293 p. v. 387. ISBN 978-3-662-45059-8. DOI 10.1007/978-3-662-45059-8. Acesso em: 16 MAR. 2023.

AHMED, Ahmed *et al.* Molecular Approaches in the Detection and Characterization of *Leptospira*. **Bacteriology & Parasitology**, Holanda, v. 3, n. 1000133, ed. 2, p. 1-12, 2012. DOI <http://dx.DOI.org/10.4172/2155-9597.1000133>. Acesso em: 4 ABR. 2023.

AHMED, Ahmed *et al.* Multilocus sequence typing (MLST): markers for the traceability of pathogenic *Leptospira* strains. **Methods in Molecular Biology**, Totowa, v. 1247, p. 349-359, 2015. DOI: 10.1007/978-1-4939-2004-4_25. Acesso em: 18 JUN. 2023.

ALBERTS, Bruce *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. 6. ed. rev. Porto Alegre: Artmed, 2017. 1428 p. ISBN 978-08-1534-432-2. Acesso em: 30 MAR. 2023

ANDRE-FONTAINE, Genevieve *et al.* Waterborne Leptospirosis: Survival and Preservation of the Virulence of Pathogenic *Leptospira* spp. in Fresh Water. **Springer Science+Business Media: Current Microbiology**, Nantes, France, ed. 71, p. 136-142, 2015. DOI 10.1007/s00284-015-0836-4. Acesso em: 6 ABR. 2023.

ARENT, Z., PARDYAK, L., DUBNIEWICZ, K., PŁACHNO, B. J., & KOTULA-BALAK, M. *Leptospira* taxonomy: then and now. **Medycyna Weterynaryjna**, 78(10), 489-496, 2022. DOI: [dx.doi.org/10.21521/mw.6694](https://doi.org/10.21521/mw.6694). Acesso em 26 de ABR. 2023.

ARNAU, V. *et al.* Inference of the Life Cycle of Environmental Phages from Genomic Signature Distances to Their Hosts. **Viruses**, 15(5), p. 1196, 2023. DOI: 10.3390/v15051196. Acesso em: 21 JUN. 2023.

BALAMURUGAN, Vinayagamurthy *et al.* Characterization of *Leptospira* isolates from animals and humans phylogenetic analysis identifies the prevalence of intermediate species in India. **SpringerPlus**, Karnataka, Índia, v. 362, ed. 2, p. 1-9, 2013. DOI 10.1186/2193-1801-2-362. Acesso em: 19 ABR. 2023.

BERIWAL, S. *et al.* LeptoDB: an integrated database of genomics and proteomics resource of *Leptospira*. **Database**, 2018, bay057, 2018. DOI: 10.1093/database/bay057. Acesso em 17 de JUN. 2023.

BERTANI, Blake; RUIZ, Natividad. Function and Biogenesis of Lipopolysaccharides. **EcoSal Plus**, [S.l.], v. 8, n. 1, p. 10, AGO. 2018. DOI: 10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2018. Acesso em: 30 MAR. 2023.

BERTASIO, C. *et al.* Serological Survey and Molecular Typing Reveal New *Leptospira* Serogroup Pomona Strains among Pigs of Northern Italy. **Pathogens**, 9(5), p. 332, 2020. DOI: 10.3390/pathogens9050332. Acesso em: 22 JUN. 2023.

BLANCO, Roberta *et al.* Avaliação do teste de aglutinação microscópica utilizando-se como antígeno as *leptospiras* saprófitas para o diagnóstico da leptospirose humana. **Rev Inst Adolfo Lutz**. São Paulo, 2015;74(2):90-6.94. Acesso em: 30 MAR. 2023

BOONSILP, Siriphan *et al.* A single multilocus sequence typing (MLST) scheme for seven pathogenic *Leptospira* species. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 7, n. 1, p. e1954, 2013. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001954. Acesso em: 18 JUN. 2023.

CAIMI, Karina; RUYBAL, P. *Leptospira spp.*, a genus in the stage of diversity and genomic data expansion. **Elsevier Masson: Infection, Genetics and Evolution**, Buenos Aires, Argentina, v. 81, n. 104241, p. 1-17, 2020. DOI <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104241>. Acesso em: 7 ABR. 2023.

CAPUTO, A.; FOURNIER, P. E.; RAOULT, D. Genome and pan-genome analysis to classify emerging bacteria. **Biol Direct**, 14(1), p. 5, 2019. DOI: 10.1186/s13062-019-0234-0. Disponível em: DOI: 10.1186/s13062-019-0234-0. Acesso em: 22 JUN. 2023.

CAIN, A. K. *et al.* A decade of advances in transposon-insertion sequencing. **Nat Rev Genet**, 21(9), p. 526-540, 2020. DOI: 10.1038/s41576-020-0244-x. Acesso em: 21 JUN. 2023.

CARVALHO, Rodrigo Rezende Mires de *et al.* Biofilm formation in vitro by *Leptospira interrogans* strains isolated from naturally infected dogs and their role in antimicrobial resistance. **Heliyon**, v. 9, n. 3, p. e13802, MAR. 2023. DOI: 10.1016/j.heliyon. 2023.e13802. Acesso em: 25 maio 2023.

CASTIBLANCO-VALENCIA, Mónica M. *et al.* Acquisition of negative complement regulators by the saprophyte *Leptospira biflexa* expressing LigA or LigB confers enhanced survival in human serum. **Science: Immunol Lett**, São Paulo, v. 173, p. 61-68, 2016. DOI 10.1016/j.imlet.2016.03.005. Acesso em: 19 ABR. 2023.

CHIANI, Yosena *et al.* Isolation and clinical sample typing of human leptospirosis cases in Argentina. **Elsevier: Infection, Genetics and Evolution**, Buenos Aires, Argentina, v. 37, p. 245-251, 2016. DOI <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.11.033>. Acesso em: 1 maio 2023.

CHIANI, Yosena T *et al.* Presence of *Leptospira spp.* in a Mosaic of Wetlands Used for Livestock Raising under Differing Hydroclimatic Conditions. **Applied**

and Environmental Microbiology, maio 2023. DOI: 10.1128/aem.01971-22. Online ahead of print. Acesso em: 25 JUN. 2023.

CILIA, Giovanni; BERTELLONI, Fabrizio; CERRI, Domenico; FRATINI, Filippo. *Leptospira fainei* Detected in Testicles and Epididymis of Wild Boar (*Sus scrofa*). **Biology**, Basel, Suíça, v. 10, n. 193, p. 1-9, 2021. DOI <https://doi.org/10.3390/biology10030193>. Acesso em: 1 maio 2023.

CILIA, Giovanni; BERTELLONI, Fabrizio; CERRI, Domenico; FRATINI, Filippo; ANGELINI, Marta. *Leptospira* Survey in Wild Boar (*Sus scrofa*) Hunted in Tuscany, Central Italy. **Pathogens**, Pisa, Itália, v. 10, n. 9, ed. 377, p. 1-16, 2020. DOI <https://doi.org/10.3390/pathogens9050377>. Acesso em: 1 maio 2023.

COSTA, Frederico *et al.* Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **Public Library of Science (PLOS): Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 9, p. 1-19, 2015. DOI DOI:10.1371/journal.pntd.0003898. Acesso em: 6 ABR. 2023.

CUNHA, Carlos E. *et al.* Infection with *Leptospira kirschneri* Serovar Mozdok: First Report from the Southern Hemisphere. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Pelotas, Rio Grande do Sul, p. 1-9, 2016. DOI <http://ajtmh.org/cgi/doi/10.4269/ajtmh.15-0505>. Acesso em: 19 ABR. 2023.

DUTRA, Lucas da Costa. **Leptospirose em ruminantes e sua importância como zoonose / Lucas da Costa Dutra**. Orientador: Rodolfo José Cavalcanti Souto. 2018. 47 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Residência) (Medicina Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, 2018.

FIDA, M. *et al.* Detection of Pathogenic Bacteria From Septic Patients Using 16S Ribosomal RNA Gene-Targeted Metagenomic Sequencing. **Clin Infect Dis**, v. 73, n. 7, p. 1165-1172, 2021. DOI: 10.1093/cid/ciab349. Acesso em: 1 JUN. 2023.

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, e0004403, 18 fev. 2016. Acesso em: 1 JUN. 2023.

FULE, Lenka *et al.* Role of the major determinant of polar flagellation FlhG in the endoflagella-containing spirochete *Leptospira*. **Molecular Microbiology**, v. 116, n. 5, p. 1392-1406, 2021. DOI: 10.1111/mmi.14831. Acesso em: 28 ABR. 2023.

GALVÃO, Laura *et al.* Análise da distribuição geográfica e caracterização soropidemiológicas da leptospirose em bovinos abatidos em frigoríficos do Sudoeste Goiano, Brasil. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 9, ed. 7, p. 1-23, 2020. DOI <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i7.4235>. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/4235>. Acesso em: 1 ABR. 2023.

GOMES, Charles K.; GUEDES, Mariana; POTULA, Hari-Hara; DELLAGOSTIN, Odir A.; SOLECKI, Maria G. Sex Matters: Male Hamsters Are More Susceptible to Lethal Infection with Lower Doses of Pathogenic *Leptospira* than Female Hamsters. **Infection and Immunity: Bacterial infections**, California, EUA, v. 86, p. 1-7, 2018. DOI <https://doi.org/10.1128/IAI.00369-18>. Disponível em: <https://journals.asm.org>. Acesso em: 5 ABR. 2023.

GOMES, Marcos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. *In: Gênero **Leptospira spp.*** Rio Grande do Sul: FAVET, 2015. Resumo Online.

GRIFFITHS, Anthony *et al.* **Introdução à Genética**. 10. ed. rev. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 713 p. ISBN 978-85-277-2191-2.

GUGLIELMINI, J. *et al.* Correction: Multilocus sequence typing of the *Leptospira* core genome reveals strain taxonomy and global surveillance. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 14(8), e0008673, 2020. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008673. Acesso em: 21 JUN. 2023.

HOLZAPFEL, Marion *et al.* Corrigendum: Escape of TLR5 recognition by *Leptospira spp.*: A rationale for atypical endoflagella. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 932151, 2022. DOI: 10.3389/fimmu.2022.932151. Acesso em: 28 ABR. 2023.

HSU, Shen-Hsing and YANG, Chih-Wei. Insight into the Structure, Functions, and Dynamics of the *Leptospira* Outer Membrane Proteins with the Pathogenicity. **Environ Microbiol**, v. 12, n. 3, p. 300, 2022. DOI: 10.3390/membranes12030300. Acesso: em 08 de JUN. 2023.

IYER, L. M. *et al.* Jumbo Phages: A Comparative Genomic Overview of Core Functions and Adaptions for Biological Conflicts. **Viruses**, 13(1), p. 63, 2021. DOI: 10.3390/v13010063. Acesso em: 21 JUN. 2023.

IRAOLA, Gregorio *et al.* Transcriptome Sequencing Reveals Wide Expression Reprogramming of Basal and Unknown Genes in *Leptospira biflexa* Biofilms. **mSphere**, v. 1, n. 2, p. e00042-16, MAR.-ABR. 2016. DOI: 10.1128/mSphere.00042-16. Acesso em: 25 ABR. 2023.

JOHNSTON, Calum *et al.* Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 181-196, MAR. 2014. DOI: 10.1038/nrmicro3199. Acesso em: 8 de abril de 2023.

KOCHI, Leandro T.; FERNANDES, Luis Guilherme V.; NASCIMENTO, Ana Lucia T. O. Heterologous Expression of the Pathogen-Specific LIC11711 Gene in the Saprophyte *L. biflexa* Increases Bacterial Binding to Laminin and Plasminogen. **Pathogens**, Basel, Suíça, v. 9, p. 1-16, 2020. DOI 10.3390/pathogens9080599. Disponível em: <https://www.mdpi.com/journal/pathogens>. Acesso em: 28 MAR. 2023.

KUMAR, Kirubakaran Vinod *et al.* Can Subminimal Inhibitory Concentrations of Antibiotics Induce the Formation of Biofilm in *Leptospira*? **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 7, p. 1040-1042, 2018. DOI: 10.1089/mdr.2017.0409. Acesso em: 25 maio 2023.

KURILUNG, A. *et al.* Comparative Genomic Analysis and a Novel Set of Missense Mutation of the *Leptospira weilii* Serogroup Mini From the Urine of Asymptomatic Dogs in Thailand. **Frontiers in Microbiology**, 12, 731937, 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2021.731937. Acesso em 17 de JUN. 2023.

LAND, M. *et al.* Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. **Functional and Integrative Genomics**, v. 15, n. 2, p. 141-161, 2015.

- LEHMANN, Jason S. *et al.* *Leptospiral* Pathogenomics. **Journal Pathogens**, Basel, Suíça, v. 3, p. 280-308, 2014. DOI doi:10.3390/pathogens3020280. Disponível em: www.mdpi.com/journal/pathogens. Acesso em: 20 ABR. 2023.
- LI, B. *et al.* Genomic Island-Mediated Horizontal Transfer of the Erythromycin Resistance Gene *erm(X)* among Bifidobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, 88(10), e0041022, 2022. DOI: 10.1128/aem.00410-22. Acesso em 17 de JUN. 2023.
- LLANES, A. *et al.* Whole Genome Sequencing Allows Better Understanding of the Evolutionary History of *Leptospira interrogans* Serovar Hardjo. **PLoS One**, 11(7), e0159387, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0159387. Acesso em: 21 JUN. 2023.
- LUDWIG, Bernd *et al.* Lethal pulmonary hemorrhage syndrome due to *Leptospira* infection transmitted by pet rat. **IDCases**, v. 8, p. 84-86, ABR. 2017. DOI: 10.1016/j.idcr.2017.04.016. Acesso em: 20 MAI. 2023.
- MADIGAN, Michael *et al.* **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. 1006 p. v. 16. ISBN 978-85-8271-297-9.
- MANI, Indra *et al.* Microbial Genomic Islands in Adaptation and Pathogenicity. 1. ed. Nova Delhi, Índia: **Springer Nature**, 2023. ISBN ISBN978-981-19-9342-8. DOI 10.1007/978-981-19-9342-8. Acesso em: 21 ABR. 2023.
- MAZZOTTA, E. *et al.* Synanthropic and Wild Animals as Sentinels of Zoonotic Agents: A Study of *Leptospira* Genotypes Circulating in Northeastern Italy. **Int J Environ Res Public Health**, 20(5), p. 3783, 2023. DOI: 10.3390/ijerph20053783. Acesso em: 22 JUN. 2023.
- MCINNES, Ross S.; MCCALLUM, Gregory E.; LAMBERTE, Lisa E.; VAN SCHAİK, Willem. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in the human gut microbiome. *Current Opinion in Microbiology*, v. 53, p. 35-43, Feb 2020. DOI: 10.1016/j.mib.2020.02.002. Epub 2020 Mar 3. Acesso em: 10 ABR. 2023.
- MEGANATHAN, Yogesan *et al.* Biofilm formation and social interaction of *Leptospira* in natural and artificial environments. **Research in Microbiology**, v. 173, n. 8, p. 103981, 2022. DOI: 10.1016/j.resmic.2022.103981. Acesso em: 25 ABR. 2023.
- MENY, Paulina *et al.* Characterization of *Leptospira* isolates from humans and the environment in Uruguay. **Rev. do Inst. de Med. Tropical de S. Paulo**, São Paulo, v. 59, p. 1-9, 2017. DOI 10.1590/S1678-9946201759079. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5738764/>. Acesso em: 21 ABR. 2023.
- MILHOMEM, Kaline Milena Gomes. Pesquisa de anticorpos anti-*leptospira* em rebanho bovino leiteiro. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Medicina Veterinária, Faculdade Vale do Aço, Açailândia, 2021. 27 f.
- MONTES, Victor; MONTI, Gustavo. Pathogenic *Leptospira spp.* Seroprevalence and Herd-Level Risk Factors Associated with Chilean Dairy Cattle. **Animals**, Valdivia, Chile, ed. 11, p. 314-328, 2021. DOI: 10.3390/ani11113148. Acesso em: 6 ABR. 2023.

MORENO, Luisa Z. *et al.* Genomic characterisation of *Leptospira inadai* serogroup Lyme isolated from captured rat in Brazil and comparative analysis with human reference strain. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, [s. l.], n. 113, ed. 5, p. 1-4, 2018. DOI: 10.1590/0074-02760170444. Acesso em: 2 maio 2023.

MORENO, Luisa *et al.* Profiling of *Leptospira interrogans*, *L. santarosai*, *L. meyeri* and *L. borgpetersenii* by SE-AFLP, PFGE and susceptibility testing—a continuous attempt at species and serovar differentiation. **Nature: Emerging Microbes & Infections**, Rio de Janeiro, v. 1, ed. 5, p. 1-7, 2016. DOI <https://doi.org/10.1038/emi.2016.16>. Acesso em: 18 ABR. 2023.

MOSELEY, M. *et al.* Multi-locus sequence analyses reveal a clonal *L. borgpetersenii* genotype in a heterogeneous invasive *Rattus* spp. community across the City of Johannesburg, South Africa. **Parasit Vectors**, **13**(1), p. 570, 2020. DOI: 10.1186/s13071-020-04444-0. Acesso em: 22 JUN. 2023.

NAKAMURA, Shuichi *et al.* Spirochete Flagella and Motility. **Biomolecules**, v. 10, n. 4, p. 550. 2020. DOI: 10.3390/biom10040550. Acesso em: 05 ABR. 2023.

NAU, L. H.; OBIEGALA, A.; KRÒL, N.; MAYER-SCHOLLI, A.; PFEFFER, M. Survival time of *Leptospira kirschneri* serovar Grippotyphosa under different environmental conditions. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 15, p. 1-12, 2020. DOI <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236007> J. Acesso em: 28 ABR. 2023.

NICODEMO, Antonio C *et al.* Pathogenesis of Pulmonary Hemorrhagic Syndrome in Human Leptospirosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, n. 6, p. 1970-1972, ABR. 2021. DOI: 10.4269/ajtmh.20-1000. Acesso em: 20 MAI. 2023.

OLIVEIRA, Priscila N., *et al.* Inactivation of the antimicrobial peptide LL-37 by pathogenic *Leptospira*. **Microbial Pathogenesis**, v. 150, p. 104704, JAN. 2021. DOI: 10.1016/j.micpath.2020.104704. Epub 2020 Dec 24. Acesso em: 21 ABR. 2023.

PICARDEAU, Mathieu. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita?. **Nature reviews: Microbiology**, Paris, França, p. 1-11, 2017. DOI [doi:10.1038/nrmicro.2017.5](https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.5). Acesso em: 11 ABR. 2023.

PIERCE, Benjamin A. **Genética: um enfoque conceitual**. 5. ed. rev. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. ISBN 978-85-277-2932-1.

PIERCE, Benjamin A. **Genética: um enfoque conceitual**. 6. ed. rev. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2020. ISBN 978-85-277-2932-1.

PUI, Chai Fung *et al.* Diversity of *Leptospira* spp. in Rats and Environment from Urban Areas of Sarawak, Malaysia. **Hindawi: Journal of Tropical Medicine**, Sarawak, Malasia, p. 1-8, 2017. DOI. Acesso em: 18 ABR. 2023.

RAHMAN, Aina N. A.; HADI, Nurul H. H.; SUN, Zhong; THILAKAVATHY, Karupiah; JOSÉ, Narciso. Prevalência Regional de *Leptospira* spp. em humanos: uma meta-análise. **Pathogens**, [s. l.], v. 10, n. 8, p. 1-15, 2021. DOI: 10.3390/pathogens10080943. Acesso em: 26 ABR. 2023.

RAMLI, Siti Roszilawati *et al.* Complete genome sequencing of *Leptospira interrogans* isolates from Malaysia reveals massive genome rearrangement but

high conservation of virulence-associated genes. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 7, n. 1, p. e1954, 2021. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001954. Accessed on: 18th June 2023.

RIBEIRO, Priscyla Dos Santos *et al.* Environmental Biofilms from an Urban Community in Salvador, Brazil, Shelter Previously Uncharacterized Saprophytic *Leptospira*. **Microbial Ecology**, JUN. 2023. DOI: 10.1007/s00248-023-02253-3. Online ahead of print. Acesso em: 25 JUN. 2023.

SANTOS, Ana Amélia Nunes *et al.* *Leptospira interrogans* biofilm formation in *Rattus norvegicus* (Norway rats) natural reservoirs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 9, p. e0009736, 2021. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009736. Acesso em: 25 maio 2023.

SCHULLER, Simone *et al.* Immunohistochemical detection of IgM and IgG in lung tissue of dogs with leptospiral pulmonary haemorrhage syndrome (LPHS). **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 40, p. 47-53, JUN. 2015. DOI: 10.1016/j.cimid.2015.04.002. Acesso em: 20 MAI. 2023.

SCHULZE, Marco H *et al.* Severe *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae infection with hepato-renal-pulmonary involvement treated with corticosteroids. **Clinical Case Reports**, v. 2, n. 5, p. 191-196, OUT. 2014. DOI: 10.1002/ccr3.91. Acesso em: 20 MAI. 2023.

SEEHAUSEN, Ole *et al.* Genomics and the origin of species. **Nature reviews: Genetics**, Berna, Suíça, v. 15, p. 176-192, 2014. DOI doi:10.1038/nrg3644. Acesso em: 20 ABR. 2023.

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

SENEVIRATHNA, I. *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**, 8, 49-52, 2020. DOI: 10.7150/jgen.43953. Acesso em 17 de JUN. 2023.

SHERMAN, R. M.; SALZBERG, S. L. Pan-genomics in the human genome era. **Nat Rev Genet**, 21(4), p. 243-254, 2020. DOI: 10.1038/s41576-020-0210-7. DOI: 10.1038/s41576-020-0210-7. Acesso em: 22 JUN. 2023.

SILVA, Vinícius Bentivóglgio Costa *et al.* Síndrome hemorrágica pulmonar em cão associada à leptospirose. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 45, Suppl 1, p. 240, 2017. ISSN 1679-9216. Acesso em: 20 MAI. 2023.

SNUSTAD, Peter; SIMMONS, Michael. **Fundamentos de genética**. 7. ed. rev. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. ISBN 9788527731003.

SURDEL, Matthew *et al.* Hematogenous dissemination of pathogenic and non-pathogenic *Leptospira* in a short-term murine model of infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology: Molecular Bacterial Pathogenesis**, Milwaukee, Estados Unidos, p. 1-10, 2022. DOI 10.3389/fcimb.2022.917962. Acesso em: 6 ABR. 2023.

THIBEAUX, Roman et al. Deciphering the unexplored diversity of *Leptospira* in soils reveals genomic evolution towards virulence. *Logotipo da Genômica Microbiana*, Volume 4, Issue 1, p. 1-10, 2018. Available at: DOI: 10.1099/mgen.0.000144. Acesso em 18 de JUN. 2023.

THIBEAUX, Roman et al. The zoonotic pathogen *Leptospira interrogans* mitigates environmental stress through cyclic-di-GMP-controlled biofilm production. **NPJ Biofilms and Microbiomes**, v. 6, n. 1, p. 24, JUN. 2020. DOI: 10.1038/s41522-020-0134-1. Acesso em: 25 maio 2023.

TORTORA, Gerard et al. **Microbiologia**. 12. ed. atual. Porto Alegre: Artmed, 2017. 935 p. ISBN 978-85-8271-354-9.

TRABULSI, Luiz; ALTERTHUM, Flavio. **Microbiologia**. 6. ed. rev. e atual. São Paulo: Atheneu, 2015. 1428 p. ISBN 978-85-388-0677-6.

TSOU, A. M. et al. 16S rRNA sequencing analysis: the devil is in the details. **Gut Microbes**, v. 11, n. 5, p. 1139-1142, 2020. DOI: 10.1080/19490976.2020.1747336. Acesso em: 1 JUN. 2023.

VINCENT, Anthony et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. **Public Library of Science (PLOS): Neglected Tropical Diseases**, Paris, França, ed. 9, p. 1-25, 2019. DOI <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007270>. Acesso em: 11 ABR. 2023.

WILKINSON, David A. et al. Identification of pathogenic *Leptospira* species and serovars in New Zealand using metabarcoding. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 16, n. 9, p. e0257971, 2021. DOI: 10.1371/journal.pone.0257971. Acesso em 14 de JUN. 2023.

WOLLANKE, Bettina et al. Infectious Uveitis in Horses and New Insights in Its Leptospiral Biofilm-Related Pathogenesis. **Microorganisms**, v. 10, n. 2, p. 387, FEV. 2022. DOI: 10.3390/microorganisms10020387. Acesso em: 25 maio 2023.

XU, Y. et al. Whole genome sequencing revealed host adaptation-focused genomic plasticity of pathogenic *Leptospira*. *Sci Rep*, **6**, 20020, 2016. DOI: 10.1038/srep20020. Acesso em: 21 JUN. 2023.

YOUN, J. H. et al. Comparative genomic analysis of eight *Leptospira* strains from Japan and the Philippines revealing the existence of four putative novel genomic islands/islets in *L. interrogans* serovar Lai strain 56601. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, **37**, 191-199, 2014. DOI: 10.1016/j.cimid.2014.09.001. Acesso em 17 de JUN. 2023.

ZAMBRANO-URBANO, Jose L.; OCAMPO-CHAPARRO, José M.; MONTERO, Leonardo. Neuroleptospirosis con pericarditis y colestasis intrahepática (Síndrome de Weil). **Rev Cubana Med Gen Integr**, Ciudad de La Habana , v. 36, n. 2, e1162, JUN. 2020. Acesso em 4 de JUN. 2023.

ZÜCKERT, Wolfram R. Protein Secretion in Spirochetes. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 3, p. 10.1128/microbiolspec.PSIB-0026-2019, MAI. 2019. DOI: 10.1128/microbiolspec.PSIB-0026-2019. Acesso em: 21 ABR. 2023.