

BRUNA OLIVEIRA PIGATTO AZEVEDO

**Clonagem, expressão e caracterização inicial do módulo VapBC-4
de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

SÃO PAULO
2020

BRUNA OLIVEIRA PIGATTO AZEVEDO

**Clonagem, expressão e caracterização inicial do módulo
VapBC-4 de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Paulo Yague
Lopes

Versão original.

SÃO PAULO
2020

RESUMO

AZEVEDO, B.O.P. **Clonagem, expressão e caracterização inicial do módulo VapBC-4 de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni**. 2020. 124f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A leptospirose é uma zoonose causada pela bactéria espiroqueta aeróbia do gênero *Leptospira*, sendo a *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni uma das maiores responsáveis pelos casos em seres humanos da doença no Brasil. Os sistemas Toxina-Antitoxina (TA) são amplamente distribuídos entre as espécies bacterianas. Este sistema é composto por uma toxina estável e uma antitoxina instável. Sob condições de estresse ocorre a ruptura do equilíbrio deste sistema e as toxinas são liberadas em maior quantidade, impactando moléculas chave em vários processos essenciais como a suspensão reversível do crescimento celular. Os módulos TA são classificados em tipos e famílias sendo que as VapBCs constituem a principal família TA, agrupada devido à homologia de um domínio PIN da toxina que atua como endoribonuclease. O banco de dados TADB mostra que a *L. interrogans* sorovar Copenhageni linhagem Fiocruz L1-130 possui quatro loci vapBCs, todos no cromossomo I. Em trabalho anterior, o módulo VapBC-3 foi caracterizado quanto aos seus aspectos bioquímicos e funcionais. Dando continuidade a estes estudos, este trabalho teve como principais objetivos avaliar a conservação dos módulos VapBC de *L. interrogans* sorovar Copenhageni em módulos homólogos a estes em genomas disponíveis de *Leptospira* spp e a clonagem, expressão, caracterização funcional do módulo de TA VapBC-4. Através dos estudos *in silico*, observamos que o gene codificador da toxina *vapC-4* estava presente em diferentes *Leptospira* spp, demonstrando estar bem distribuída entre estirpes de diferentes graus de patogenicidade. Os fragmentos dos genes *vapB-4*, *vapC-4*, e *vapBC-4* foram amplificados e clonados com sucesso. A expressão das proteínas recombinantes foi realizada em *E. coli* BL21 (DE3), observando-se a presença da maior parte do módulo VapBC-4 e da proteína VapB-4 na fração insolúvel e da VapC-4 na fração solúvel, sendo que a proteína VapC-4 foi obtida com baixo rendimento quando comparada a antitoxina VapB-4, provavelmente por se tratar de uma toxina. As proteínas foram purificadas por IMAC. O efeito tóxico da VapC-4 em *E. coli* foi avaliado pela cinética de crescimento, indicando que as

bactérias que expressam VapC-4 tiveram um crescimento lento quando comparadas às estirpes que expressam VapB-4 e o módulo VapBC-4, sugerindo que VapC-4 pode ter efeito tóxico em *E. coli*, corroborando com as características atribuídas aos sistemas TA na literatura. Os módulos TA de *Leptospira* permanecem, em sua maior parte, pouco estudados. Recentemente, trabalhos ao redor do mundo têm identificado como estas toxinas impactam em diversos processos metabólicos, principalmente na adaptação e defesa bacteriana, mas as condições em que isto ocorre e suas inter-relações são questões a serem esclarecidas. Os estudos funcionais de TA são úteis para entender a fisiologia e patologia bacteriana, destacando a necessidade de identificação e caracterização de novos TA.

Palavras-Chaves: Leptospira. VapBC. Toxina-Antitoxina.

ABSTRACT

AZEVEDO, B.O.P. **Cloning, expression and preliminary characterization of VapBC-4 Toxin-Antitoxin module from *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni**. 2020. 124f. Dissertation (Masters thesis in Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

The leptospirosis is a zoonosis caused by the aerobic spirochete bacteria of genus *Leptospira*, being *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni the major responsible for the illness in human beings in Brazil. The Toxin-Antitoxin (TA) system is largely distributed among the bacterial species. This system is composed by a stable toxin and an unstable antitoxin. The balance of the system breaks under stress and toxins are released in larger quantities, impacting key molecules to many essential processes such as cellular growth reversible cessation. The TA modules are classified in types and families and VapBCs are the main TA family, grouped due to the homology of the toxin's PIN domain which acts as endoribonuclease. TADB data base shows that *L. interrogans* serovar Copenhageni, Fiocruz L1-130 lineage possess four *loci vapBCs*, all in chromosome I. In a previous study, VapBC-3 module was characterized in its biochemical and functional aspects. Continuing such studies, this thesis had as its main purposes to evaluate the conservation of VapBC modules of *L. interrogans* serovar Copenhageni in equivalent modules and in available genomes of *Leptospira* spp and the cloning, expression, functional characterization of TA VapBC-4 module. Through *in silico* studies, it has been observed that the codifying gene of *vapC-4* gene was present in different types of *Leptospira* ssp, evincing its well distribution among strains of various pathogenic degrees. Fragments of *vapB-4*, *vapC-4*, e *vapBC-4* genes were successfully amplified and cloned. The expression of recombinating proteins was realized in *E. coli* BL21 (DE3). The presence of most part of VapBC-4 module and VapB-4 protein was noted in the insoluble fraction and of VapC-4 in soluble fraction. The VapC-4 protein was obtained in low outputs if compared to the VapB-4 antitoxin, probably because it is a toxin. The proteins were purified by IMAC. The toxic effect of VapC-4 in *E. coli* was evaluated by the growth kinetics, indicating that bacteria which express VapC-4 has a slow growth when compared to the strains which express VapB-4 module, this suggests VapC-4 may have a

toxic effect in *E. coli*, which corroborated to TA system's characteristics attributed by the literature. *Leptospira* TA modules remain mainly unstudied. Recently, studies around the globe have identified how such toxins affect various metabolic processes, especially in bacterial defense and adaptation, however the conditions in which this occurs and its inter relations are yet to be clarified. The functional TA studies are useful to understand the bacterial pathology and physiology, clarifying the necessity of identification and characterization of new TA.

Key Words: *Leptospira*. VapBC. Toxin-Antitoxin.

INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença infecciosa emergente considerada a zoonose mais difundida no mundo e apresenta impactos importantes na saúde humana e animal (LEHMANN; MATTHIAS; VINETZ; FOUTS, 2014; LEVETT, 2001). Ela afeta significativamente populações mais vulneráveis, há aproximadamente um milhão de casos e 60.000 mortes estimados anualmente, portanto, o ônus da leptospirose é comparável ou superior ao de outras importantes doenças tropicais graves negligenciadas, como dengue (COSTA; HAGAN; CALCAGNO; KANE *et al.*, 2015; PICARDEAU, 2017).

A incidência da leptospirose é mais alta em países tropicais e em desenvolvimento, como na Ásia, África, América Latina e no Caribe. Em locais endêmicos há uma incidência estimada de mais de 10 casos por 100.000 habitantes por ano, porém estima-se que em locais epidêmicos, em grupos de alto risco, a incidência seja de 100 casos ou mais por 100.000 habitantes. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que estes números podem ser ainda maiores, devido ao fato de que muitas vezes há falta de vigilância e notificação da doença, além do que a leptospirose pode ser confundida com facilidade com outras patologias como a dengue, a febre amarela e muitas outras, dificultando o diagnóstico (COSTA; HAGAN; CALCAGNO; KANE *et al.*, 2015; EPSTEIN, 2005; PAPPAS; PAPADIMITRIOU; SIOZOPOULOU; CHRISTOU *et al.*, 2008; WHO; CDS; WSH, 2001; WORLD HEALTH ORGANIZATION; COMMUNICABLE DISEASES; WATER, 2001).

A leptospirose está comumente ligada às áreas rurais e urbanas, sendo nas regiões urbanas as comunidades com baixas condições de saneamento básico as mais afetadas. A leptospirose também é considerada uma doença ocupacional, pois acaba por atingir profissionais como os agricultores, soldados, caçadores, pescadores, mineradores, veterinários e pessoas que trabalham em laboratórios de diagnóstico e pesquisa (BHARTI; NALLY; RICALDI; MATTHIAS *et al.*, 2003; LEHMANN; MATTHIAS; VINETZ; FOUTS, 2014; MS, 2019; WHO, 2003).

A globalização e as viagens internacionais levaram a um aparente aumento da incidência nos países desenvolvidos, geralmente, mas não exclusivamente, associados a atividades de recreação ligadas a água, como natação, canoagem, pesca, rafting e atividades esportivas ao ar livre (BHARTI; NALLY; RICALDI; MATTHIAS *et al.*, 2003; BOLAND; SAYERS; COLEMAN; BERGIN *et al.*, 2004; LEHMANN; MATTHIAS; VINETZ; FOUTS, 2014; MORGAN; BORNSTEIN; KARPATI; BRUCE *et al.*, 2002; WHO, 2003).

A incidência da patologia é sazonal, com maior incidência no verão, em climas temperados e durante a estação chuvosa em áreas tropicais, refletindo a capacidade da bactéria de sobreviver no ambiente externo, principalmente em locais de condições climáticas quentes e úmidas (LEVETT, 2001). Além disso, as mudanças das condições climáticas não só desencadeiam calamidades naturais, mas também impactam no surgimento de doenças como a leptospirose ao redor do mundo. Em particular, chuvas e inundações extraordinariamente altas em algumas regiões dão origem a epidemias graves de leptospirose (EPSTEIN, 2005).

No Brasil, a leptospirose é uma doença de notificação compulsória, sendo considerada endêmica, mas tornando-se epidêmica em períodos chuvosos, principalmente nas capitais e áreas metropolitanas, devido às enchentes associadas à aglomeração populacional de baixa renda, às condições inadequadas de saneamento e à alta infestação de roedores infectados, estas condições acabam por expor a população à urina dos animais contaminada com as bactérias *Leptospira* ssp (MS, 2009)

Existem registros de leptospirose em todas as unidades da federação no Brasil. De acordo com o sistema de informação de agravos de notificação (SINAN), do período de 2009 a 2019 houve 40.450 casos confirmados de leptospirose no Brasil (Tabela 1), com o maior número de casos nas regiões sul e sudeste. A doença apresenta uma letalidade média de 9%. Entre os casos confirmados, indivíduos do sexo masculino com faixa etária entre 20 e 49 anos estão entre os mais atingidos, embora não exista uma predisposição de gênero ou de idade para contrair a infecção. Quanto às características do local provável de infecção, a maioria ocorre em área urbana, e em ambientes domiciliares, entre pessoas que habitam ou trabalham em locais com infraestrutura sanitária inadequada e expostas à urina de roedores (MS, 2019).

Tabela 1: Casos confirmados de Leptospirose no Brasil, notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação, no período de 2009 a 2019.

Casos de Leptospirose confirmados por região de notificação						
Ano	Região de notificação					Total
	Norte	Nordeste	Sudeste	Sul	Centro-Oeste	
2019	213	242	611	921	40	2027
2018	487	461	1024	1028	69	3069
2017	524	464	929	1068	54	3039
2016	484	323	986	1213	74	3080
2015	1312	424	948	1573	80	4337
2014	1718	573	1328	1076	62	4757
2013	931	521	1502	1110	66	4130
2012	529	414	1314	909	55	3221
2011	494	930	1836	1725	24	5009
2010	258	717	1538	1225	47	3785
2009	365	929	1532	1121	49	3996
2009 a 2019	7315	5998	13548	12969	620	40450

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net (MS, 2019).

A leptospirose foi originalmente descrita por (STIMSON, 1907), que demonstrou pela coloração com prata a presença de aglomerados de espiroquetas nos túbulos renais de um paciente que morreu de febre amarela. Stimson relatou que as espiroquetas tinham pontas fechadas, e as chamou de *Spirochaeta interrogans* por causa de sua semelhança com um ponto de interrogação (FAINE; STALLMAN, 1982; JOHNSON; FAINE, 1984; LEVETT, 2001).

A leptospirose é causada pela bactéria espiroqueta aeróbia obrigatória pertencente ao gênero *Leptospira*, da família *Leptospiraceae* e da ordem *Spirochaetales* (BHARTI; NALLY; RICALDI; MATTHIAS *et al.*, 2003; PLANK; DEAN, 2000). As leptospiras são organismos helicoidais finos e moveis, medem de 6 a 20 µm de comprimento por 0,1 µm de diâmetro e diferenciam-se das outras espiroquetas por possuírem a célula terminada em gancho e dois flagelos periplasmáticos (Figura 1) (FAINE; ADLER; BOLIN; PEROLAT, 1999; LEVETT, 2001).

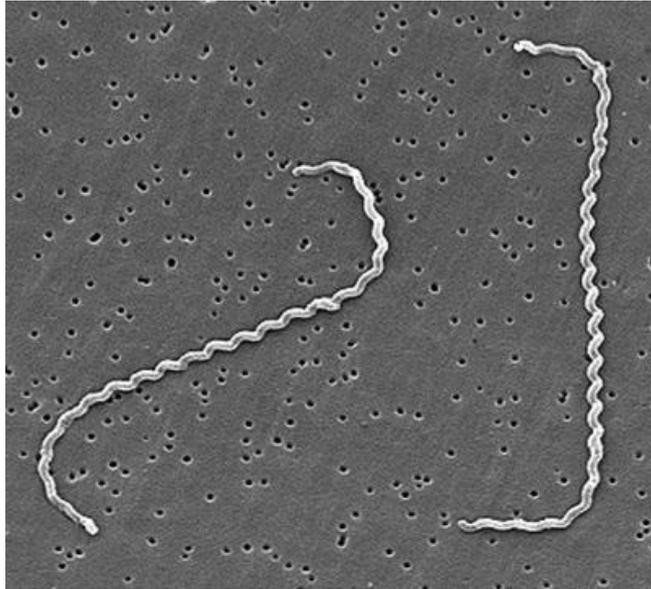


Figura 1: Microscopia eletrônica de varredura da estirpe *L. interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae.

Fonte: (LEVETT, 2001).

As leptospiros possuem um envelope celular do tipo Gram-negativo, no qual a membrana interna e a parede celular de peptidoglicano são estreitamente associados e cobertos por uma membrana externa, que contém lipoproteínas expostas à superfície e lipopolissacarídeo (LPS) (Figura 2) (HAAKE; MATSUNAGA, 2010; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009).

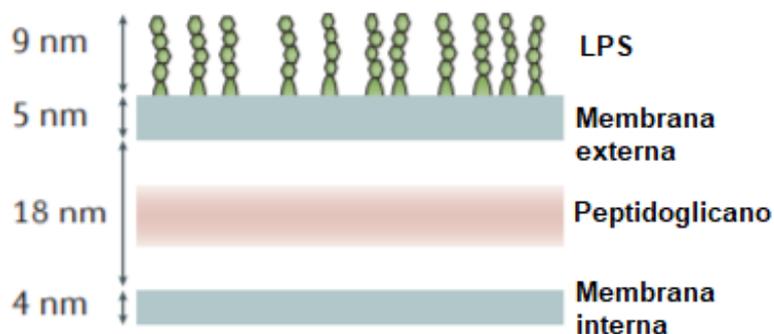


Figura 2: Diagrama da parede celular bacteriana do tipo Gram-negativo baseado em estudos de tomografia crio-eletrônica em *Leptospira* spp.

Fonte: Adaptado de (PICARDEAU, 2017).

A atribuição dos microrganismos ao gênero *Leptospira* foi inicialmente baseado em observações dos fatores morfológicos, o gênero foi dividido em bactérias saprófitas (não patogênicas) compreendido pela *Leptospira biflexa* e patogênicas por *Leptospira interrogans* (FAINE, 1994; LEVETT, 2001;

PICARDEAU, 2017). Posteriormente, o gênero *Leptospira* foi dividido em mais de 300 sorovares, compreendendo 22 espécies, com base na expressão de LPS (BHARTI; NALLY; RICARDI; MATTHIAS *et al.*, 2003; LEVETT, 2001; PICARDEAU, 2017; XU; ZHU; WANG; CHANG *et al.*, 2016).

Baseando-se em análises filogenéticas dos genes 16S RNAr, análises de hibridização do DNA, patogenicidade, virulência e características de crescimento *in vitro*, foi demonstrado que o gênero *Leptospira* possui suas espécies distribuídas em três grupos: espécies patogênicas, espécies intermediárias patogênicas e espécies não-patogênico ou saprófitas (Figura 3) (FOOTS; MATTHIAS; ADHIKARLA; ADLER *et al.*, 2016; LEHMANN; MATTHIAS; VINETZ; FOOTS, 2014; PICARDEAU, 2017).

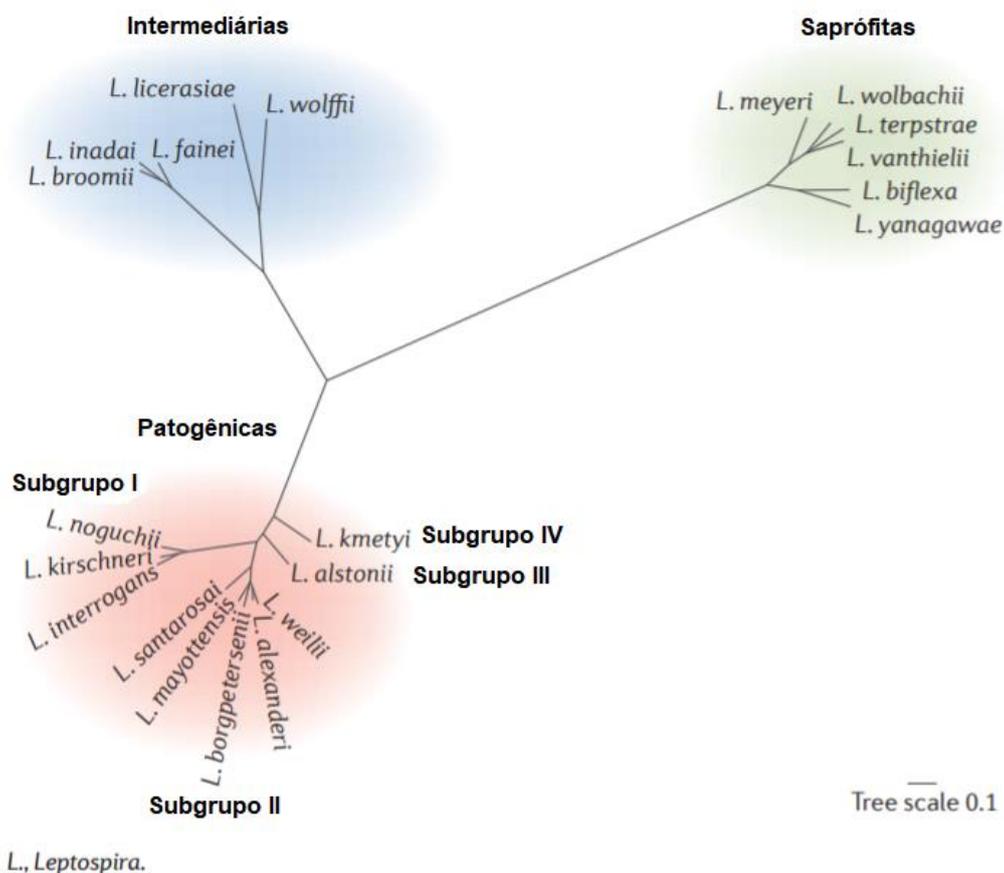


Figura 3: A figura evidência três clados do gênero *Leptospira*, que foram determinados a partir da árvore filogenética de probabilidade máxima, baseada na concatenação de uma seleção de 491 genes principais.

Fonte: (PICARDEAU, 2017).

Na figura 3, um clado é composto pelas espécies patogênicas de *Leptospira* spp., evidenciando 10 patógenos que podem infectar e causar doenças em humanos e animais, estes patógenos podem ainda ser divididos em quatro subgrupos (subgrupos I-IV) (XU; ZHU; WANG; CHANG *et al.*, 2016). Sete destas espécies: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. weilli*, *L. kirschneri* e *L. alexanderi* são os principais agentes da leptospirose, além disso geralmente os sorovares patogênicos apresentam preferências por hospedeiros, por exemplo o sorovar Hardjo infecta principalmente o gado, sorovar Canicola os cães e os sorovares Icterohaemorrhagiae e Copenhageni os ratos, mas estas associações não são absolutas e as bases moleculares para essa especificidade do hospedeiro é desconhecida (ANDRE-FONTAINE; AVIAT; THORIN, 2015; BRENNER; KAUFMANN; SULZER; STEIGERWALT *et al.*, 1999; MATTHIAS; RICARDI; CESPEDES; DIAZ *et al.*, 2008; PICARDEAU, 2017).

Outro clado é composto por cinco patógenos caracterizados como intermediários, que foram isolados de seres humanos e animais (PICARDEAU, 2017). As espécies intermediárias compartilham um ancestral quase comum com as espécies patogênicas, exibindo uma patogenicidade moderada e manifestações clínicas leves da leptospirose em humanos e animais (ANDRE-FONTAINE; AVIAT; THORIN, 2015; CASANOVAS-MASSANA; PEDRA; WUNDER; DIGGLE *et al.*, 2018).

No terceiro clado, há sete leptospiros saprófitas, que são microrganismos de vida livre e incapazes de causar doença (AHMED; DEVI; VALVERDE; VIJAYACHARI *et al.*, 2006; BRENNER; KAUFMANN; SULZER; STEIGERWALT *et al.*, 1999; LEHMANN; MATTHIAS; VINETZ; FOUTS, 2014; SCHMID; STEERE; KORNBLATT; KAUFMANN *et al.*, 1986).

Recentemente, Vincent e colaboradores (2019) apresentaram uma nova classificação filogenética para as espécies de *Leptospira*. O grupo sequenciou 90 amostras de genomas de estirpes de *Leptospira* coletadas no solo e na água de 18 locais diferentes em quatro continentes. A relação do genoma entre esses isolados ambientais e as estirpes representativas de cada uma das espécies conhecidas de *Leptospira* permitiu identificação de 30 novas espécies. Os pesquisadores propuseram reclassificar as espécies do gênero *Leptospira* em 4 subclados, denominados P1, P2, S1 e S2 (Figura 4), ao em vez dos aglomerados historicamente conhecidos como saprófitas (S1 e S2), intermediárias (P2) e

patogênicas (P1). Além disso o estudo identificou um total de 64 espécies com quatro novas espécies no subclado P1, dez novas espécies no subclado P2 e dezesseis novas espécies de *Leptospira* isoladas do ambiente natural que pertenceram aos subclados S1 e S2 (VINCENT; SCHIETTEKATTE; GOARANT; NEELA *et al.*, 2019).

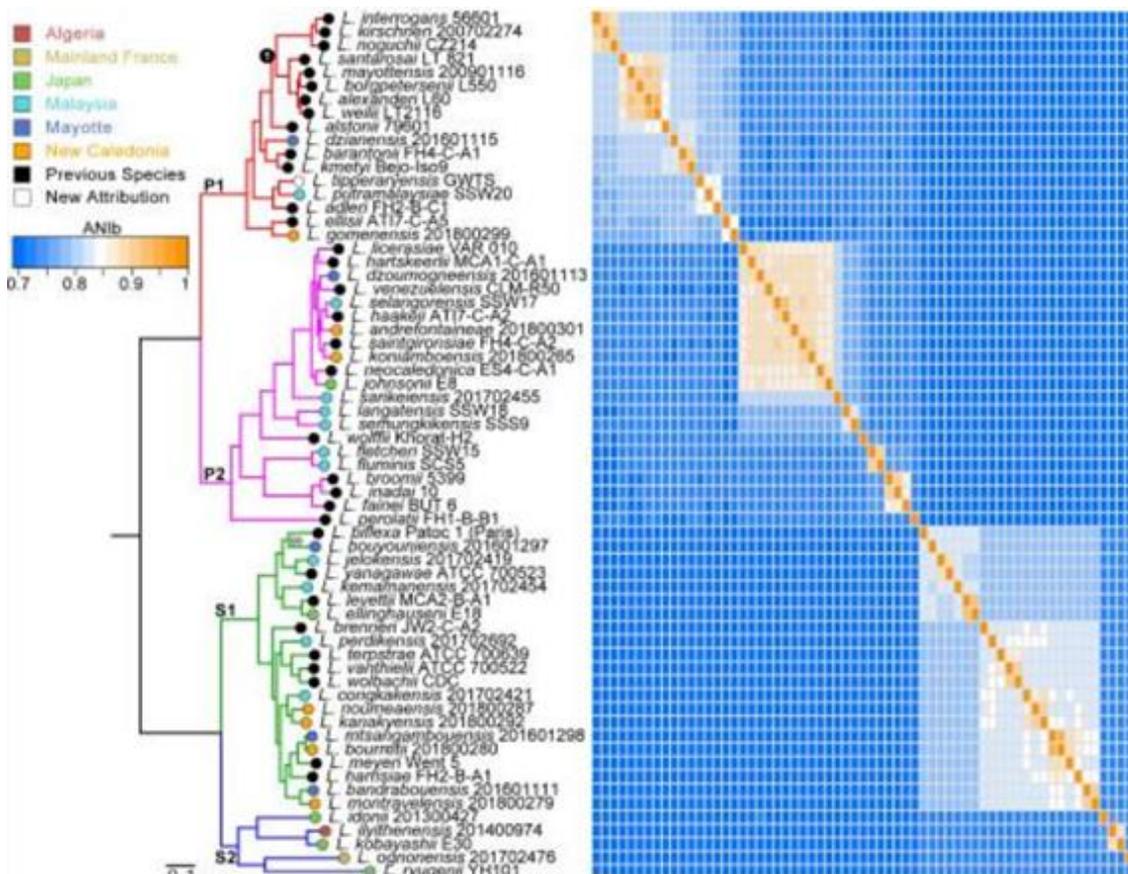


Figura 4: Árvore filogenética baseada nas sequências de 1371 genes de *Leptospira* inferidos como ortólogos, com os 4 subclados, denominados P1, P2, S1 e S2.

Fonte: (VINCENT; SCHIETTEKATTE; GOARANT; NEELA *et al.*, 2019).

Os humanos são hospedeiros acidentais, sendo comumente infectados por estirpes patogênicas de *Leptospira* por meio do contato direto com a urina de animais infectados ou indiretamente através da água ou do solo contaminado. Quase todos os mamíferos podem servir como portadores de leptospiros, abrigando a espiroqueta nos túbulos renais. Os ratos atuam como os principais transportadores das bactérias, pois excretam altas concentrações de leptospiros ao urinarem, além disso não apresentam sintomas clínicos da doença (Figura 5) (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; BHARTI; NALLY; RICARDI;

MATTHIAS *et al.*, 2003; EVANGELISTA; COBURN, 2010; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009).

A bactéria penetra no corpo através de cortes ou abrasões na pele ou através das mucosas dos olhos, nariz ou garganta. O início da doença em humanos é variável, podendo ocorrer de um dia a quatro semanas após a exposição e, nos sobreviventes, a infecção pode durar meses (EVANGELISTA; COBURN, 2010; PLANK; DEAN, 2000).

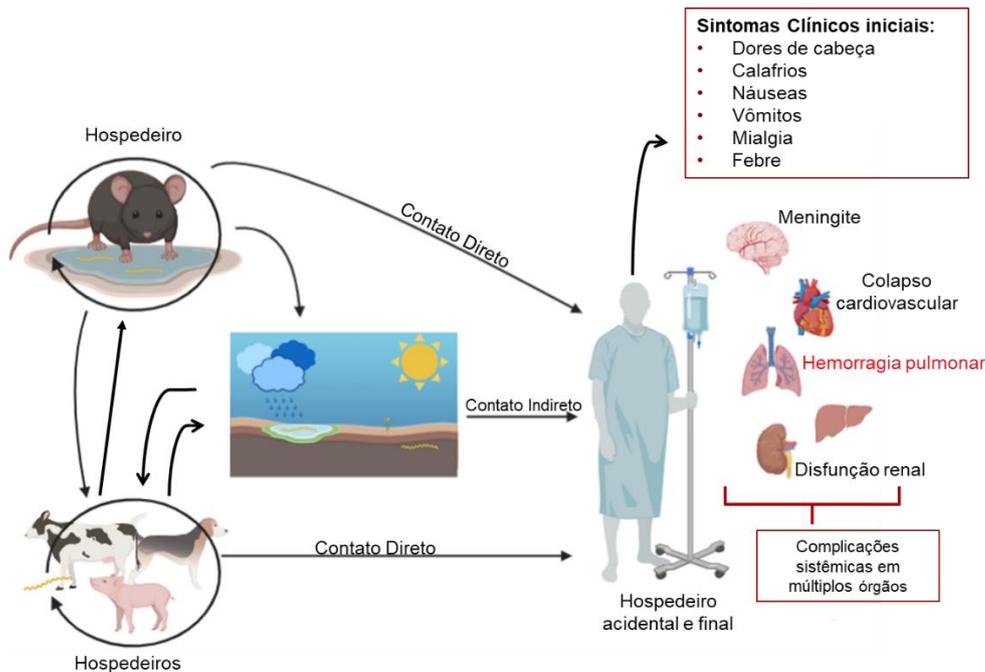


Figura 5: Ciclo de transmissão da leptospirose, sintomas clínicos e complicações sistêmicas em múltiplos órgãos.

A leptospirose apresenta manifestações clínicas semelhantes à de muitas outras doenças. Os sintomas clínicos apresentam ampla variedade indo desde dores de cabeça, calafrios, náuseas e vômitos, mialgia e, menos comumente, erupções cutânea, podendo ser caracterizada por uma doença febril aguda indiferenciada, indo até uma doença grave (EVANGELISTA; COBURN, 2010; LEHMANN; MATTHIAS; VINETZ; FOUTS, 2014). A manifestação clássica da leptospirose grave é a síndrome de Weil, caracterizada por complicações sistêmicas em múltiplos órgãos, incluindo icterícia, meningite, hemorragia pulmonar, disfunção hepática e renal e colapso cardiovascular. Lesão vascular e lesões endoteliais também são observadas em todos os órgãos afetados. A forma mais grave da doença é a síndrome hemorrágica pulmonar caracterizada

por lesão pulmonar aguda e sangramento pulmonar maciço e vem sendo cada vez mais reconhecida no Brasil como uma manifestação distinta e importante da leptospirose na fase tardia. Enquanto a letalidade média para os casos de leptospirose confirmados no Brasil é de 9%, a letalidade para os pacientes que desenvolvem hemorragia pulmonar é maior que 50% (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; EVANGELISTA; COBURN, 2010; KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009; LEVETT, 2001; MS, 2019).

Devido à vasta sintomatologia da leptospirose, muitas vezes o diagnóstico se torna difícil, por isto existe uma variedade de ensaios de laboratoriais, como detecção de anticorpos específicos por teste de aglutinação microscópica (MAT), ou por ensaio de hemaglutinação, ou por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). As leptospirosas ou seus componentes também podem ser detectados na urina ou tecidos por cultura, microscopia de campo escuro, imunocoloração ou PCR (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; BHARTI; NALLY; RICALDI; MATTHIAS *et al.*, 2003; FAINE; ADLER; BOLIN; PEROLAT, 1999; LEVETT, 2001).

Após o diagnóstico positivo, o tratamento da leptospirose continua sendo um grande desafio pois sua patogênese ainda não foi bem elucidada e ainda há a dificuldade da identificação da infecção em estágios iniciais, porém normalmente o tratamento é realizado com base em antimicrobianos e tratamento sintomático (KARPAGAM; GANESH, 2020; RAJAPAKSE; RODRIGO; HANDUNNETTI; FERNANDO, 2015). Atualmente regimes e dosagens recomendados são baseados na gravidade da doença. O grupo penicilina é administrado como medicamento de escolha e recomendado pela OMS, mas geralmente são administrados antibióticos mais fortes. Cefalosporinas, doxiciclina e cloranfenicol também têm sido usados para tratar a leptospirose (KARPAGAM; GANESH, 2020). A doxiciclina é recomendada para profilaxia e doença leve (GUIDUGLI; CASTRO; ATALLAH, 2000), a ampicilina e amoxicilina também são recomendados em doenças leves, enquanto a penicilina G e ampicilina são indicadas para doenças graves (BHARTI; NALLY; RICALDI; MATTHIAS *et al.*, 2003). Embora muitas terapias estejam disponíveis para o tratamento, são sempre melhores medidas preventivas para controlar a disseminação de infecção e possível reemergência, a fim de diminuir a taxa de mortalidade (BRETT-MAJOR; COLDREN, 2012; BRETT-MAJOR; LIPNICK,

2009; CHARAN; SAXENA; MULLA; YADAV, 2013; KARPAGAM; GANESH, 2020).

A vacinação é a estratégia mais viável para o controle da leptospirose (TEIXEIRA; FERNANDES; CAVENAGUE; TAKAHASHI *et al.*, 2019). O desenvolvimento de uma vacina contra a leptospirose é um grande desafio desde a sua descoberta em 1886 até hoje, pois existe um grande número de sorovares, o que dificulta a produção de uma vacina universalmente eficaz (KARPAGAM; GANESH, 2020; VIJAYACHARI; SUGUNAN; SHRIRAM, 2008). Atualmente não há uma vacina disponível contra leptospirose para uso humano em todo o mundo. Apenas em alguns países como França, Cuba e Japão aprovaram vacinas de leptospirosas inativadas para populações de risco (LAURICHESSE; GOURDON; SMITS; ABDOE *et al.*, 2007; MARTÍNEZ; PÉREZ; QUIÑONES; CRUZ *et al.*, 2004; YANAGIHARA; VILLANUEVA; YOSHIDA; OKAMOTO *et al.*, 2007). A maioria das vacinas disponíveis no mercado são rotineiramente usadas para a imunização de animais (TEIXEIRA; FERNANDES; CAVENAGUE; TAKAHASHI *et al.*, 2019). Porém, pesquisas empregando diversas tecnologias estão ocorrendo em todo o mundo na tentativa de encontrar um candidato vacinal ideal (KARPAGAM; GANESH, 2020).

A *Leptospira interrogans* é a maior causadora da leptospirose em humanos, sendo que no Brasil sorovar de maior importância epidemiológica é o Copenhageni. A *L. interrogans* sorovar Copenhageni tem como reservatório principal o rato domésticos *Rattus* e *R. norvegicus* o que facilita a disseminação da doença nos grandes centros urbanos (JAEGER; PESTANA; CARVALHO-COSTA; MEDEIROS *et al.*, 2018; KO; GALVÃO REIS; RIBEIRO DOURADO; JOHNSON *et al.*, 1999; MIRAGLIA; MATSUO; MORAIS; DELLAGOSTIN *et al.*, 2013).

A compreensão dos mecanismos envolvidos na infecção por *L. interrogans* tem sido alvo de estudos devido à importância que tem para a prevenção e tratamento da doença. A maioria dos estudos sobre o genoma de espécies de *Leptospira* concentrou-se principalmente na pesquisa de antígenos expostos à superfície ou proteínas importantes para as rotas metabólicas (ADLER; LO; SEEMANN; MURRAY, 2011; GAMBERINI; GÓMEZ; ATZINGEN; MARTINS *et al.*, 2005; LOPES; AZEVEDO; EMÍDIO; DAMIANO *et al.*, 2019;

NASCIMENTO; VERJOVSKI-ALMEIDA; VAN SLUYS; MONTEIRO-VITORELLO *et al.*, 2004; REN; FU; JIANG; ZENG *et al.*, 2003). Recentemente, os sistemas toxina-antitoxina (TA) alcançaram mais destaque, por terem sido relacionados a diversas bactérias patogênicas durante o processo de infecção (LOPES; AZEVEDO; EMÍDIO; DAMIANO *et al.*, 2019).

Originalmente, os módulos de TA foram descritos como "módulos de dependência" permitindo a manutenção do plasmídeo após a divisão celular por um processo denominado morte pós-segregacional. As células filhas que perdem o plasmídeo morrem ou sofrem cessamento do crescimento, uma vez que a antitoxina precisa ser produzida continuamente a partir do plasmídeo para evitar intoxicação pela toxina (GERDES; BECH; JØRGENSEN; LØBNER-OLESEN *et al.*, 1986; GERDES; RASMUSSEN; MOLIN, 1986; OGURA; HIRAGA, 1983). Desde o descobrimento dos *loci* TA, estes sistemas tem sido comumente identificados em inúmeros cromossomos bacterianos, mas sua distribuição varia consideravelmente, mesmo entre espécies bacterianas intimamente relacionadas (CORAY; WHEELER; HEINEMANN; GARDNER, 2017; FOZO; MAKAROVA; SHABALINA; YUTIN *et al.*, 2010; GOEDERS; CHAI; CHEN; DAY *et al.*, 2016; LEPLAE; GEERAERTS; HALLEZ; GUGLIELMINI *et al.*, 2011; PANDEY; GERDES, 2005).

O desenvolvimento de ferramentas específicas de bioinformática para análises de dados e o sequenciamento do genoma da *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni [dois cromossomos circulares com 4,6 Mpb que codificam cerca de 3700 genes (NASCIMENTO; KO; MARTINS; MONTEIRO-VITORELLO *et al.*, 2004)], corroboraram para identificação de três módulos de TA, um VapBC (LOPES; LOPES; FRAGA; CHURA-CHAMBI *et al.*, 2014; ZHANG; LI; GUO; WU *et al.*, 2004), um ChpIK e um MazEF (KOMI; GE; XIN; OJCIUS *et al.*, 2015; PICARDEAU; LE DANTEC; RICHARD; SAINT GIRON, 2003) e podem ser considerados elementos *bona fide*, todos os outros precisam ser confirmados.

Os sistemas TA são organizados no cromossomo bacteriano em operons e se caracterizam por codificarem um par de proteínas, constituído por uma toxina estável e uma antitoxina instável. As toxinas são proteínas que possuem como alvo moléculas chave em vários processos essenciais, incluindo a replicação do DNA (YUAN; STERCKX; MITCHENALL; MAXWELL *et al.*, 2010), a estabilidade do RNAm (DAINES; WU; YUAN, 2007), inibição seletiva ou geral

da síntese de proteínas (VESPER; AMITAI; BELITSKY; BYRGAZOV *et al.*, 2011), parede celular e síntese de ATP (CORREIA; D'ONOFRIO; REJTAR; LI *et al.*, 2006), polimerização das proteínas do citoesqueleto e divisão celular (TAN; AWANO; INOUE, 2011). A antitoxina atua como um regulador antagônico que impede a toxina de exercer sua atividade tóxica, direta ou indiretamente, exceto quando algumas condições ambientais, como falta de nutrientes ou pressão antibiótica, determinam uma diminuição na concentração da antitoxina, expondo a célula a seus efeitos tóxicos, levando a uma interrupção reversível do crescimento (GERDES; CHRISTENSEN; LØBNER-OLESEN, 2005; YAMAGUCHI; PARK; INOUE, 2011).

Os módulos TA estão envolvidos em eventos potencialmente importantes para as células procarióticas, que incluem manutenção do plasmídeo (OGURA; HIRAGA, 1983), formação de biofilme (KIM; WANG; MA; ZHANG *et al.*, 2009; REN; BEDZYK; THOMAS; YE *et al.*, 2004), persistência (GERMAIN; CASTRO-ROA; ZENKIN; GERDES, 2013; MAISONNEUVE; CASTRO-CAMARGO; GERDES, 2013) e resposta geral ao estresse (HU; BENEDIK; WOOD, 2012; WANG; LORD; CHENG; OSBOURNE *et al.*, 2012). Em alguns patógenos, como *L. interrogans* (KOMI; GE; XIN; OJCIUS *et al.*, 2015), *Mycobacterium tuberculosis* (FERNÁNDEZ-GARCÍA; BLASCO; LOPEZ; BOU *et al.*, 2016; RAMAGE; CONNOLLY; COX, 2009), *Escherichia coli* (NORTON; MULVEY, 2012), *Haemophilus influenzae* (REN; WALKER; DAINES, 2012) e *Salmonella enterica* (DE LA CRUZ; ZHAO; FARENC; GIMENEZ *et al.*, 2013), tem sido sugerido que eles participem da fisiologia bacteriana durante a infecção.

Dentre os eventos citados acima, um deles tem merecido interesse especial, o fenômeno conhecido como persistência bacteriana. Esse fenômeno possibilita que, enquanto a maior parte de uma população bacteriana seja morta após exposição a antibióticos, uma fração exiba transitoriamente um fenótipo tolerante (cessamento do crescimento) a múltiplas drogas e a bactéria escape da morte por antibióticos. Presume-se que a persistência seja, pelo menos em parte, responsável pela recalcitrância de muitas infecções bacterianas. Por este motivo, entender os mecanismos que permitem a ocorrência deste fenômeno representa um passo essencial para erradicar essas subpopulações persistentes. Os sistemas TA são propostos como candidatos perfeitos para controlar esse fenômeno, uma vez que esses elementos aparecem

frequentemente mutados em cenários de alta persistência e a superexpressão dessas toxinas geralmente aumenta a frequência da persistência em uma população definida (RONNEAU; HELAINE, 2019).

Até o momento, os sistemas TA foram classificados em seis tipos bem estabelecidos, de acordo com os mecanismos de atuação das antitoxinas sobre a atividade das toxinas (BENDTSEN; BRODERSEN, 2017; PAGE; PETI, 2016). Nos sistemas do tipo I, a antitoxina é um RNA anti-sense ao RNAm que codifica a toxina, inibindo sua tradução (FOZO; HEMM; STORZ, 2008; GERDES; WAGNER, 2007). No tipo II, toxina e antitoxina são proteínas que interagem como enzima-inibidor (RAMISETTY; SANTHOSH, 2017). No tipo III, a antitoxina é um RNA que se liga diretamente à proteína tóxica (FINERAN; BLOWER; FOULDS; HUMPHREYS *et al.*, 2009). No tipo IV, antitoxina é uma proteína que não interfere na toxina, mas que suprime a toxicidade, funcionando como um antagonista ao se ligar diretamente no alvo, bloqueando a ligação da toxina (MASUDA; TAN; AWANO; WU *et al.*, 2012). No tipo V, a antitoxina é uma proteína que mascara a toxicidade da toxina, clivando seu RNAm (WANG; LORD; CHENG; OSBOURNE *et al.*, 2012). No tipo VI, antitoxina é uma proteína que neutraliza a toxina, atuando como um adaptador para degradação da toxina (AAKRE; PHUNG; HUANG; LAUB, 2013).

O sistema TA do tipo II é o mais bem caracterizado e seus membros são agrupados em diferentes famílias de acordo com a estrutura da toxina e similaridade à sequência proteica (GERDES; CHRISTENSEN; LØBNER-OLESEN, 2005; SHAO; HARRISON; BI; TAI *et al.*, 2011). Neste sistema as toxinas e as antitoxinas são proteínas que formam um complexo rígido em que a atividade da toxina é inibida diretamente durante o crescimento normal das bactérias (GERDES; CHRISTENSEN; LØBNER-OLESEN, 2005; LEPLAE; GEERAERTS; HALLEZ; GUGLIELMINI *et al.*, 2011).

Nos complexos TA, os genes são dispostos em operons bicistrônicos com a antitoxina precedendo a toxina, com sobreposições ou espaçamentos de bases entre as fases de leituras dos genes, refletindo um acoplamento traducional que, presumivelmente, ajuda a garantir a proporção estável de 1:1 da expressão das proteínas, assegurando a inibição eficiente da toxina (PANDEY; GERDES, 2005). A expressão do *locus* TA é autorregulada no nível transcricional através da ligação direta do complexo TA as sequências

palindrômicas na região promotora (GERDES; CHRISTENSEN; LØBNER-OLESEN, 2005). Sob condições de estresse, as antitoxinas são degradadas por enzimas como a protease Lon, induzindo a liberação das toxinas dos complexos TA, resultando em inibição do crescimento celular ou dormência e subsequente tolerância a antibióticos ou morte (Figura 6) (CHRISTENSEN; MAENHAUT-MICHEL; MINE; GOTTESMAN *et al.*, 2004; MAISONNEUVE; CASTRO-CAMARGO; GERDES, 2013; YAMAGUCHI; PARK; INOUYE, 2011).

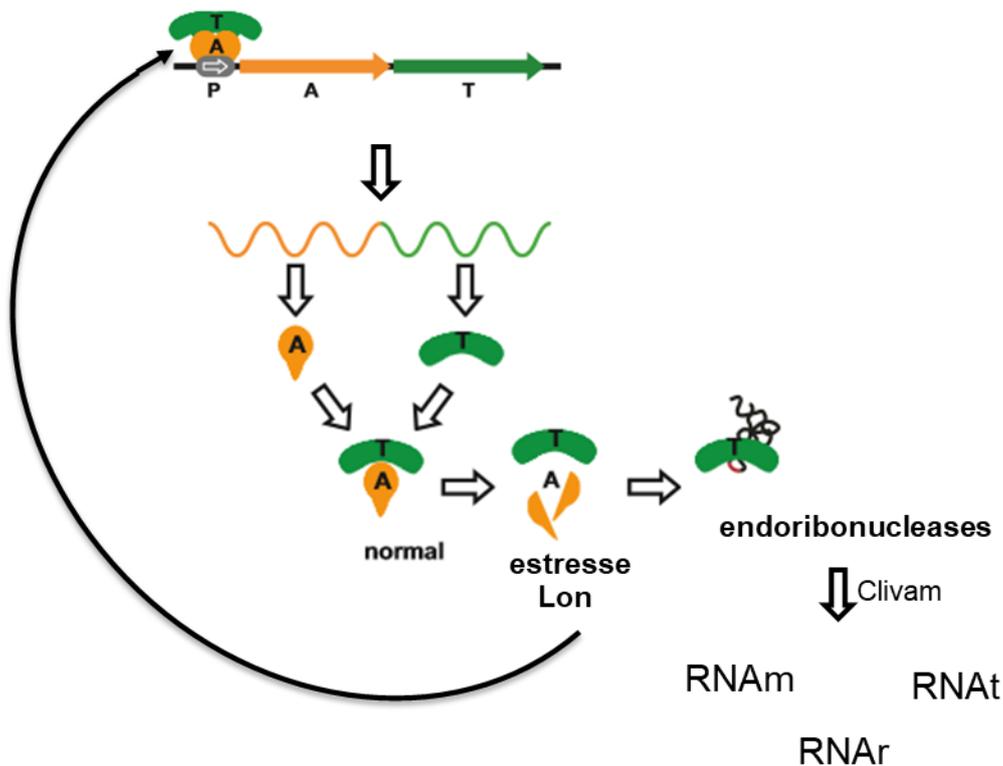


Figura 6: Esquema de regulação de um módulo TA do tipo II.

Fonte: Adaptado de (BENDTSEN; BRODERSEN, 2017).

VapBC ("virulence associated protein") é a principal família TA do tipo II, com cerca de 1900 módulos identificados em 960 genomas, correspondendo a 30-40% dos módulos TA conhecidos (URL: <http://bioinformml.sjtu.edu.cn/TADB/>) (XIE; WEI; SHEN; LI *et al.*, 2018). O módulo VapBC consiste em uma antitoxina VapB e uma toxina VapC. A toxina VapC é uma endoribonuclease do domínio PIN (PiIT N-terminus) que inibe a tradução através da clivagem dos RNAt ou RNAr (ARCUS; MCKENZIE; ROBSON; COOK, 2011; CRUZ; WOYCHIK, 2016).

O domínio PIN é descrito como um sanduíche $\alpha/\beta/\alpha$ contendo 5 cadeias de folha-beta pregueada no centro da estrutura, que reúne um conjunto de 3 ou 4 resíduos ácidos altamente conservados, além de um resíduo de serina ou treonina invariante, responsável por coordenar íons Mg^{+2} ou Mn^{+2} no sítio catalítico, permitindo a clivagem hidrolítica do RNA (ARCUS; MCKENZIE; ROBSON; COOK, 2011; LEVIN; SCHWARZENBACHER; PAGE; ABDUBEK *et al.*, 2004; WALLING; BUTLER, 2019).

Como as VapCs, as toxinas das famílias RelBE, MazEF e HicAB foram descritas como endoribonucleases, também chamados RNA de interferase (GERDES; MAISONNEUVE, 2012; ZHANG; ZHANG; HOEFLICH; IKURA *et al.*, 2003), que hidrolisam alvos de RNA diferentes e específicos. A toxina RelE cliva o RNAm no sítio ribossômico com alta especificidade de códon (PEDERSEN; ZAVIALOV; PAVLOV; ELF *et al.*, 2003). As toxinas HicA também clivam RNAm, mas independentemente do ribossomo (JØRGENSEN; PANDEY; JASKOLSKA; GERDES, 2009). Toxinas da família MazF foram caracterizadas por clivar RNAm (ZHANG; ZHANG; HOEFLICH; IKURA *et al.*, 2003), RNAr (SCHIFANO; EDIFOR; SHARP; OUYANG *et al.*, 2013) e também RNAt (SCHIFANO; CRUZ; VVEDENSKAYA; EDIFOR *et al.*, 2016). A maioria das toxinas VapC que já foram caracterizadas mostraram exercer suas atividades sobre o RNAt iniciador de uma maneira muito específica (LOPES; LOPES; FRAGA; CHURA-CHAMBI *et al.*, 2014). Até agora, o RNAt iniciador, formil-metionil RNAt (RNA_t^{fMet}), tem sido o alvo biológico específico encontrado no maior número de espécies bacterianas: *Leptospira interrogans* (LOPES; LOPES; FRAGA; CHURA-CHAMBI *et al.*, 2014), *Salmonella enterica* (WINTHER; GERDES, 2011), *Shigella flexneri* (WINTHER; GERDES, 2011) e *Haemophilus influenzae* (WALLING; BUTLER, 2018). Outros RNAts específicos, como $RNA_t^{Cys-GCA}$, $RNA_t^{Leu-CAG}$, $RNA_t^{Ser-TGA}$, $RNA_t^{Ser-CGA}$, e $RNA_t^{Trp-CCA}$, foram identificados como substratos de VapCs de *Mycobacterium tuberculosis* (WINTHER; TREE; TOLLERVEY; GERDES, 2016). Além disso, duas VapCs de *M. tuberculosis* clivam na alça Sarcin-Ricina (SRL) conservada do RNAr 23S (WINTHER; TREE; TOLLERVEY; GERDES, 2016; WINTHER; BRODERSEN; BROWN; GERDES, 2013).

Segundo levantamento feito pelo banco de dados TADB, a estirpe *L. interrogans* sorovar Copenhageni possui quatro *loci vapBC*. Tomando-se por base a ordem numérica dos genes no cromossomo I, somente o *locus vapBC-3*

(LIC12660-12659) foi caracterizado experimentalmente e pode ser considerado um elemento *bona fide* (LOPES; LOPES; FRAGA; CHURA-CHAMBI *et al.*, 2014). No presente estudo, investigamos a diversidade dos módulos VapBC dos sistemas TA do tipo II entre espécies de leptospiros. Para isso, procuramos e comparamos os supostos operons VapBC de *L. interrogans* em genomas sequenciados e de 20 *Leptospira* ssp., classificadas de acordo com a árvore filogenética de patogenicidade (FOUTS; MATTHIAS; ADHIKARLA; ADLER *et al.*, 2016). Esta extensa análise teve o intuito de estudar a conservação destes módulos TA e avaliar uma possível correlação de sua presença nos três fenótipos de patogenicidade.

O estudo do módulo VapBC-4 pretende contribuir para a compreensão dos sistemas TA em aspectos intrínsecos de cada módulo, como especificidades de substratos das toxinas e em aspectos gerais destes sistemas em microrganismos, como avaliar se todos são elementos funcionais. Além da caracterização inicial do novo módulo VapBC, este estudo deve possibilitar um avanço na compreensão da função destes módulos na fisiologia do estresse bacteriano. A determinação da expressão destas proteínas em modelos de estresse poderia indicar um papel na patogênese da *L. interrogans*.

CONCLUSÃO

Os sistemas TA estão envolvidos em aspectos potencialmente prejudiciais de uma infecção, como resistência antimicrobiana, persistência e formação de biofilme, e, portanto, têm sido objeto de intensos esforços para elucidar efeitos bioquímicos e funcionais, além de seu papel na fisiologia da infecção. No entanto, devido ao alto número de tipos, famílias e alta divergência entre eles, todos esses esforços na elucidação de funções bioquímicas e biológicas ainda são incipientes e permanecem controversos.

As análises *in silico* da conservação de módulos TA homólogos nas espécies de *Leptospira* patogênicas, intermediária e saprofiticas, cujos genomas estão disponibilizados, sugerem que os módulos VapBC estejam envolvidos com fenótipos bacterianos em condições de vida livre e intra-hospedeiro, mas ainda faltam informações sobre seu papel na fisiologia da bactéria.

Este trabalho teve como objetivo central a caracterização bioquímica e funcional do operon *vapBC-4* hipotético de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Para alcançá-lo, o primeiro objetivo foi concluído com a clonagem dos genes *vapB-4*, *vapC-4* e do operon *vapBC-4* e com a expressão das construções plasmídeais pET *vapB-4*, pET *vapC-4* e pET *vapBC-4*. Porém a síntese proteica e as purificações das proteínas recombinantes VapB-4, VapC-4 e do módulo VapBC-4 em conjunto ainda precisam ser melhoradas, pois as proteínas são produzidas em baixa concentração, o que ainda não permitiu uma dosagem fidedigna e a obtenção de quantidades suficientes para a caracterização das mesmas.

O teste de “pull-down” do módulo VapBC-4 e o teste de cinética de crescimento de *E. coli* sugerem que o este sistema TA é funcionalmente ativo na *L. interrogans* sorovar Copenhageni, podendo assim ser considerado um módulo *bona fide*.

A grande variabilidade nos números e a baixa conservação de sequência entre as VapCs mostradas aqui enfatizam a forte necessidade de identificar e caracterizar novos TA, pois em sua maior parte ainda são desconhecidos. Entretanto, trabalhos recentes ao redor do mundo têm identificado como estas toxinas impactam em diversos processos metabólicos, principalmente na

adaptação e defesa bacteriana, mas as condições em que isto ocorre e suas inter-relações são questões a serem esclarecidas. Os estudos funcionais de TA são úteis não apenas para entender a fisiologia bacteriana, mas também para desenvolver novos tratamentos antimicrobianos, destacando a necessidade de identificação e caracterização de novos TA.

REFERÊNCIAS*

AAKRE, C.; PHUNG, T.; HUANG, D.; LAUB, M. A Bacterial Toxin Inhibits DNA Replication Elongation Through a Direct Interaction with the β Sliding Clamp. *Mol Cell*. 52: 617–628 p. 2013.

ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. Leptospira and leptospirosis. *Vet Microbiol*, 140, n. 3-4, p. 287-296, Jan 2010.

ADLER, B.; LO, M.; SEEMANN, T.; MURRAY, G. L. Pathogenesis of leptospirosis: the influence of genomics. *Vet Microbiol*, 153, n. 1-2, p. 73-81, Nov 2011.

AHMED, N.; DEVI, S. M.; VALVERDE, M. E. L.; VIJAYACHARI, P. *et al.* Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic Leptospira species. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 5, p. 28, Nov 2006.

AIZENMAN, E.; ENGELBERG-KULKA, H.; GLASER, G. An Escherichia coli chromosomal "addiction module" regulated by guanosine [corrected] 3',5'-bispyrophosphate: a model for programmed bacterial cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, n. 12, p. 6059-6063, Jun 1996.

ANDRE-FONTAINE, G.; AVIAT, F.; THORIN, C. Waterborne Leptospirosis: Survival and Preservation of the Virulence of Pathogenic Leptospira spp. in Fresh Water. *Curr Microbiol*, 71, n. 1, p. 136-142, Jul 2015.

ARCUS, V. L.; MCKENZIE, J. L.; ROBSON, J.; COOK, G. M. The PIN-domain ribonucleases and the prokaryotic VapBC toxin-antitoxin array. *Protein Eng Des Sel*, 24, n. 1-2, p. 33-40, Jan 2011.

BENDTSEN, K. L.; BRODERSEN, D. E. Higher-Order Structure in Bacterial VapBC Toxin-Antitoxin Complexes. *Subcell Biochem*, 83, p. 381-412, 2017 2017.

BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICALDI, J. N.; MATTHIAS, M. A. *et al.* Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis*, 3, n. 12, p. 757-771, Dec 2003.

BOLAND, M.; SAYERS, G.; COLEMAN, T.; BERGIN, C. *et al.* A cluster of leptospirosis cases in canoeists following a competition on the River Liffey. *Epidemiol Infect*, 132, n. 2, p. 195-200, Apr 2004.

BRENNER, D. J.; KAUFMANN, A. F.; SULZER, K. R.; STEIGERWALT, A. G. *et al.* Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for Leptospira alexanderi sp. nov. and four new Leptospira genomospecies. *Int J Syst Bacteriol*, 49 Pt 2, p. 839-858, Apr 1999.

*De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

BRETT-MAJOR, D. M.; COLDREN, R. Antibiotics for leptospirosis. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 2, p. CD008264, Feb 2012.

BRETT-MAJOR, D. M.; LIPNICK, R. J. Antibiotic prophylaxis for leptospirosis. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 3, p. CD007342, Jul 2009.

CASANOVAS-MASSANA, A.; PEDRA, G. G.; WUNDER, E. A.; DIGGLE, P. J. *et al.* Quantification of *Leptospira interrogans* Survival in Soil and Water Microcosms. **Appl Environ Microbiol**, 84, n. 13, 07 2018.

CHARAN, J.; SAXENA, D.; MULLA, S.; YADAV, P. Antibiotics for the treatment of leptospirosis: systematic review and meta-analysis of controlled trials. **Int J Prev Med**, 4, n. 5, p. 501-510, May 2013.

CHRISTENSEN, S. K.; MAENHAUT-MICHEL, G.; MINE, N.; GOTTESMAN, S. *et al.* Overproduction of the Lon protease triggers inhibition of translation in *Escherichia coli*: involvement of the yefM-yoeB toxin-antitoxin system. **Mol Microbiol**, 51, n. 6, p. 1705-1717, Mar 2004.

CORAY, D. S.; WHEELER, N. E.; HEINEMANN, J. A.; GARDNER, P. P. Why so narrow: Distribution of anti-sense regulated, type I toxin-antitoxin systems compared with type II and type III systems. **RNA Biol**, 14, n. 3, p. 275-280, 03 2017.

CORREIA, F. F.; D'ONOFRIO, A.; REJTAR, T.; LI, L. *et al.* Kinase activity of overexpressed HipA is required for growth arrest and multidrug tolerance in *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, 188, n. 24, p. 8360-8367, Dec 2006.

COSTA, F.; HAGAN, J. E.; CALCAGNO, J.; KANE, M. *et al.* Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. **PLoS Negl Trop Dis**, 9, n. 9, p. e0003898, 2015.

CRUZ, J. W.; WOYCHIK, N. A. tRNAs taking charge. **Pathog Dis**, 74, n. 2, Mar 2016.

DAINES, D. A.; WU, M. H.; YUAN, S. Y. VapC-1 of nontypeable *Haemophilus influenzae* is a ribonuclease. **J Bacteriol**, 189, n. 14, p. 5041-5048, Jul 2007.

DE LA CRUZ, M. A.; ZHAO, W.; FARENC, C.; GIMENEZ, G. *et al.* A toxin-antitoxin module of *Salmonella* promotes virulence in mice. **PLoS Pathog**, 9, n. 12, p. e1003827, 2013.

DUMON-SEIGNOVERT, L.; CARIOT, G.; VUILLARD, L. The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). **Protein Expr Purif**, 37, n. 1, p. 203-206, Sep 2004.

ENGELBERG-KULKA, H.; GLASER, G. Addiction modules and programmed cell death and antideath in bacterial cultures. **Annu Rev Microbiol**, 53, p. 43-70, 1999.

EPSTEIN, P. R. Climate change and human health. **N Engl J Med**, 353, n. 14, p. 1433-1436, Oct 2005.

EVANGELISTA, K. V.; COBURN, J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. **Future Microbiol**, 5, n. 9, p. 1413-1425, Sep 2010.

FAINE, S. *Leptospira* and leptospirosis.: Boca Raton, Fla: CRC Press; 1994.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. ***Leptospira and Leptospirosis***. 2° ed. ed. Melbourne: MedSci, 1999.

FAINE, S.; STALLMAN, N. D. Amended descriptions of the genus *Leptospira* Noguchi 1917 and the species *L.interrogans* (Stimson 1907) Wenyon 1926 and *L. biflexa* (Wolbach and Binger 1914) Noguchi 1918.: *Int J Syst Bacteriol.* . 32: 461–463 p. 1982.

FERNANDES, L. G. V. **Caracterização da interação de *Leptospira interrogans* com o sistema protrombina/trombina e possíveis implicações na virulência**. Orientador: NASCIMENTO, A. L. T. O. D. 2017. 1-170 f. (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, Biblioteca Digital USP - Teses e Dissertações.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, L.; BLASCO, L.; LOPEZ, M.; BOU, G. *et al.* Toxin-Antitoxin Systems in Clinical Pathogens. **Toxins (Basel)**, 8, n. 7, 07 2016.

FINERAN, P. C.; BLOWER, T. R.; FOULDS, I. J.; HUMPHREYS, D. P. *et al.* The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 106, n. 3, p. 894-899, Jan 2009.

FOUTS, D. E.; MATTHIAS, M. A.; ADHIKARLA, H.; ADLER, B. *et al.* What Makes a Bacterial Species Pathogenic?:Comparative Genomic Analysis of the Genus *Leptospira*. **PLoS Negl Trop Dis**, 10, n. 2, p. e0004403, Feb 2016.

FOZO, E. M.; HEMM, M. R.; STORZ, G. Small toxic proteins and the antisense RNAs that repress them. **Microbiol Mol Biol Rev**, 72, n. 4, p. 579-589, Table of Contents, Dec 2008.

FOZO, E. M.; MAKAROVA, K. S.; SHABALINA, S. A.; YUTIN, N. *et al.* Abundance of type I toxin-antitoxin systems in bacteria: searches for new candidates and discovery of novel families. **Nucleic Acids Res**, 38, n. 11, p. 3743-3759, Jun 2010.

GAMBERINI, M.; GÓMEZ, R. M.; ATZINGEN, M. V.; MARTINS, E. A. *et al.* Whole-genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potential vaccine candidates against leptospirosis. **FEMS Microbiol Lett**, 244, n. 2, p. 305-313, Mar 2005.

GERDES, K. Toxin-antitoxin modules may regulate synthesis of macromolecules during nutritional stress. **J Bacteriol**, 182, n. 3, p. 561-572, Feb 2000.

GERDES, K.; BECH, F. W.; JØRGENSEN, S. T.; LØBNER-OLESEN, A. *et al.* Mechanism of postsegregational killing by the *hok* gene product of the *parB* system of plasmid R1 and its homology with the *relF* gene product of the *E. coli relB* operon. **EMBO J**, 5, n. 8, p. 2023-2029, Aug 1986.

GERDES, K.; CHRISTENSEN, S. K.; LØBNER-OLESEN, A. Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. **Nat Rev Microbiol**, 3, n. 5, p. 371-382, May 2005.

GERDES, K.; MAISONNEUVE, E. Bacterial persistence and toxin-antitoxin loci. **Annu Rev Microbiol**, 66, p. 103-123, 2012.

GERDES, K.; RASMUSSEN, P. B.; MOLIN, S. Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 83, n. 10, p. 3116-3120, May 1986.

GERDES, K.; WAGNER, E. G. RNA antitoxins. **Curr Opin Microbiol**, 10, n. 2, p. 117-124, Apr 2007.

GERMAIN, E.; CASTRO-ROA, D.; ZENKIN, N.; GERDES, K. Molecular mechanism of bacterial persistence by *HipA*. **Mol Cell**, 52, n. 2, p. 248-254, Oct 2013.

GOEDERS, N.; CHAI, R.; CHEN, B.; DAY, A. *et al.* Structure, Evolution, and Functions of Bacterial Type III Toxin-Antitoxin Systems. **Toxins (Basel)**, 8, n. 10, Sep 2016.

GOTFREDSEN, M.; GERDES, K. The *Escherichia coli relBE* genes belong to a new toxin-antitoxin gene family. **Mol Microbiol**, 29, n. 4, p. 1065-1076, Aug 1998.

GUIDUGLI, F.; CASTRO, A. A.; ATALLAH, A. N. Antibiotics for preventing leptospirosis. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 4, p. CD001305, 2000.

HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. *Leptospira*: a spirochaete with a hybrid outer membrane. **Mol Microbiol**, 77, n. 4, p. 805-814, Aug 2010.

HU, Y.; BENEDIK, M. J.; WOOD, T. K. Antitoxin *DinJ* influences the general stress response through transcript stabilizer *CspE*. **Environ Microbiol**, 14, n. 3, p. 669-679, Mar 2012.

INVITROGEN. BL21 Star™(DE3) One Shot®, BL21 Star™(DE3)pLysS One Shot®, Chemically Competent Cells. SCIENTIFIC, T.: 1-24 p. 2010.

JAEGER, L. H.; PESTANA, C. P.; CARVALHO-COSTA, F. A.; MEDEIROS, M. A. *et al.* Characterization of the clonal subpopulation Fiocruz L1-130 of *Leptospira interrogans* in rats and dogs from Brazil. **J Med Microbiol**, 67, n. 9, p. 1361-1367, Sep 2018.

JOHNSON, R. C.; FAINE, S. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Williams & Wilkins, 1984.

JØRGENSEN, M. G.; PANDEY, D. P.; JASKOLSKA, M.; GERDES, K. HicA of *Escherichia coli* defines a novel family of translation-independent mRNA interferases in bacteria and archaea. **J Bacteriol**, 191, n. 4, p. 1191-1199, Feb 2009.

KARPAGAM, K. B.; GANESH, B. Leptospirosis: a neglected tropical zoonotic infection of public health importance-an updated review. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, Jan 2020.

KIM, Y.; WANG, X.; MA, Q.; ZHANG, X. S. *et al.* Toxin-antitoxin systems in *Escherichia coli* influence biofilm formation through YjgK (TabA) and fimbriae. **J Bacteriol**, 191, n. 4, p. 1258-1267, Feb 2009.

KO, A. I.; GALVÃO REIS, M.; RIBEIRO DOURADO, C. M.; JOHNSON, W. D. *et al.* Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. **Lancet**, 354, n. 9181, p. 820-825, Sep 1999.

KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nat Rev Microbiol**, 7, n. 10, p. 736-747, Oct 2009.

KOMI, K. K.; GE, Y. M.; XIN, X. Y.; OJCIUS, D. M. *et al.* ChpK and MazF of the toxin-antitoxin modules are involved in the virulence of *Leptospira interrogans* during infection. **Microbes Infect**, 17, n. 1, p. 34-47, Jan 2015.

LAURICHESSE, H.; GOURDON, F.; SMITS, H. L.; ABDOE, T. H. *et al.* Safety and immunogenicity of subcutaneous or intramuscular administration of a monovalent inactivated vaccine against *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae in healthy volunteers. **Clin Microbiol Infect**, 13, n. 4, p. 395-403, Apr 2007.

LEHMANN, J. S.; MATTHIAS, M. A.; VINETZ, J. M.; FOUTS, D. E. Leptospiral pathogenomics. **Pathogens**, 3, n. 2, p. 280-308, Apr 2014.

LEPLAE, R.; GEERAERTS, D.; HALLEZ, R.; GUGLIELMINI, J. *et al.* Diversity of bacterial type II toxin-antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families. **Nucleic Acids Res**, 39, n. 13, p. 5513-5525, Jul 2011.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clin Microbiol Rev**, 14, n. 2, p. 296-326, Apr 2001.

LEVIN, I.; SCHWARZENBACHER, R.; PAGE, R.; ABDUBEK, P. *et al.* Crystal structure of a PIN (PILT N-terminus) domain (AF0591) from *Archaeoglobus fulgidus* at 1.90 Å resolution. **Proteins**, 56, n. 2, p. 404-408, Aug 2004.

LOPES, A. P.; LOPES, L. M.; FRAGA, T. R.; CHURA-CHAMBI, R. M. *et al.* VapC from the leptospiral VapBC toxin-antitoxin module displays ribonuclease activity on the initiator tRNA. **PLoS One**, 9, n. 7, p. e101678, 2014.

LOPES, A. P. Y.; AZEVEDO, B. O. P.; EMÍDIO, R. C.; DAMIANO, D. K. *et al.* Analysis of Genetic VapC Profiles from the Toxin-Antitoxin Type II VapBC Modules among Pathogenic, Intermediate, and Non-Pathogenic. **Microorganisms**, 7, n. 2, Feb 2019.

LOUCHE, A.; SALCEDO, S. P.; BIGOT, S. Protein-Protein Interactions: Pull-Down Assays. **Methods Mol Biol**, 1615, p. 247-255, 2017.

MAISONNEUVE, E.; CASTRO-CAMARGO, M.; GERDES, K. (p)ppGpp controls bacterial persistence by stochastic induction of toxin-antitoxin activity. **Cell**, 154, n. 5, p. 1140-1150, Aug 2013.

MALMSTRÖM, J.; BECK, M.; SCHMIDT, A.; LANGE, V. *et al.* Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen *Leptospira interrogans*. **Nature**, 460, n. 7256, p. 762-765, Aug 2009.

MARTÍNEZ, R.; PÉREZ, A.; QUIÑONES, M. E. C.; CRUZ, R. *et al.* [Efficacy and safety of a vaccine against human leptospirosis in Cuba]. **Rev Panam Salud Publica**, 15, n. 4, p. 249-255, Apr 2004.

MASUDA, H.; TAN, Q.; AWANO, N.; WU, K. P. *et al.* YeeU enhances the bundling of cytoskeletal polymers of MreB and FtsZ, antagonizing the CbtA (YeeV) toxicity in *Escherichia coli*. **Mol Microbiol**, 84, n. 5, p. 979-989, Jun 2012.

MASUDA, Y.; MIYAKAWA, K.; NISHIMURA, Y.; OHTSUBO, E. chpA and chpB, *Escherichia coli* chromosomal homologs of the pem locus responsible for stable maintenance of plasmid R100. **J Bacteriol**, 175, n. 21, p. 6850-6856, Nov 1993.

MATTHIAS, M. A.; RICARDI, J. N.; CESPEDES, M.; DIAZ, M. M. *et al.* Human leptospirosis caused by a new, antigenically unique *Leptospira* associated with a *Rattus* species reservoir in the Peruvian Amazon. **PLoS Negl Trop Dis**, 2, n. 4, p. e213, Apr 2008.

MIRAGLIA, F.; MATSUO, M.; MORAIS, Z. M.; DELLAGOSTIN, O. A. *et al.* Molecular characterization, serotyping, and antibiotic susceptibility profile of *Leptospira interrogans*

serovar Copenhageni isolates from Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis**, 77, n. 3, p. 195-199, Nov 2013.

MIROUX, B.; WALKER, J. E. Over-production of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. **J Mol Biol**, 260, n. 3, p. 289-298, Jul 1996.

MORGAN, J.; BORNSTEIN, S. L.; KARPATI, A. M.; BRUCE, M. *et al.* Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. **Clin Infect Dis**, 34, n. 12, p. 1593-1599, Jun 2002.

MS, M. D. S. Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília-DF, Brasil 2009.

MS, M. D. S. **Leptospirese: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnostico e prevenção**. 2019. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/leptospirese>. Acesso em: 09 de janeiro de 2020.

NASCIMENTO, A. L.; KO, A. I.; MARTINS, E. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B. *et al.* Comparative genomics of two Leptospira interrogans serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. **J Bacteriol**, 186, n. 7, p. 2164-2172, Apr 2004.

NASCIMENTO, A. L.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; VAN SLUYS, M. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B. *et al.* Genome features of Leptospira interrogans serovar Copenhageni. **Braz J Med Biol Res**, 37, n. 4, p. 459-477, Apr 2004.

NORTON, J. P.; MULVEY, M. A. Toxin-antitoxin systems are important for niche-specific colonization and stress resistance of uropathogenic Escherichia coli. **PLoS Pathog**, 8, n. 10, p. e1002954, 2012.

NOVAGEN. pET System Manual. 1-68 p. 2013.

OGURA, T.; HIRAGA, S. Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 80, n. 15, p. 4784-4788, Aug 1983.

OPPENHEIM, D. S.; YANOFSKY, C. Translational coupling during expression of the tryptophan operon of Escherichia coli. **Genetics**, 95, n. 4, p. 785-795, Aug 1980.

PAGE, R.; PETI, W. Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. **Nat Chem Biol**, 12, n. 4, p. 208-214, Apr 2016.

PANDEY, D. P.; GERDES, K. Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. **Nucleic Acids Res**, 33, n. 3, p. 966-976, 2005.

PAPPAS, G.; PAPADIMITRIOU, P.; SIOZOPOULOU, V.; CHRISTOU, L. *et al.* The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. **Int J Infect Dis**, 12, n. 4, p. 351-357, Jul 2008.

PEDERSEN, K.; ZAVIALOV, A. V.; PAVLOV, M. Y.; ELF, J. *et al.* The bacterial toxin RelE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site. **Cell**, 112, n. 1, p. 131-140, Jan 2003.

PICARDEAU, M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? **Nat Rev Microbiol**, 15, n. 5, p. 297-307, 05 2017.

PICARDEAU, M.; LE DANTEC, C.; RICHARD, G. F.; SAINT GIRONS, I. The spirochetal chpK-chromosomal toxin-antitoxin locus induces growth inhibition of yeast and mycobacteria. **FEMS Microbiol Lett**, 229, n. 2, p. 277-281, Dec 2003.

PICARDEAU, M.; REN, S.; SAINT GIRONS, I. Killing effect and antitoxic activity of the *Leptospira interrogans* toxin-antitoxin system in *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, 183, n. 21, p. 6494-6497, Nov 2001.

PLANK, R.; DEAN, D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. **Microbes Infect**, 2, n. 10, p. 1265-1276, Aug 2000.

PROMEGA. Manual Técnico pGEM[®]-T and pGEM[®]-T

Easy Vector Systems. USA: 1-28 p. 2018.

RAJAPAKSE, S.; RODRIGO, C.; HANDUNNETTI, S. M.; FERNANDO, S. D. Current immunological and molecular tools for leptospirosis: diagnostics, vaccine design, and biomarkers for predicting severity. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, 14, p. 2, Jan 2015.

RAMAGE, H. R.; CONNOLLY, L. E.; COX, J. S. Comprehensive functional analysis of *Mycobacterium tuberculosis* toxin-antitoxin systems: implications for pathogenesis, stress responses, and evolution. **PLoS Genet**, 5, n. 12, p. e1000767, Dec 2009.

RAMISETTY, B. C. M.; SANTHOSH, R. S. Endoribonuclease type II toxin-antitoxin systems: functional or selfish? **Microbiology**, 163, n. 7, p. 931-939, 07 2017.

REN, D.; BEDZYK, L. A.; THOMAS, S. M.; YE, R. W. *et al.* Gene expression in *Escherichia coli* biofilms. **Appl Microbiol Biotechnol**, 64, n. 4, p. 515-524, May 2004.

REN, D.; WALKER, A. N.; DAINES, D. A. Toxin-antitoxin loci vapBC-1 and vapXD contribute to survival and virulence in nontypeable *Haemophilus influenzae*. **BMC Microbiol**, 12, p. 263, Nov 2012.

REN, S. X.; FU, G.; JIANG, X. G.; ZENG, R. *et al.* Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. **Nature**, 422, n. 6934, p. 888-893, Apr 2003.

RONNEAU, S.; HELAINE, S. Clarifying the Link between Toxin-Antitoxin Modules and Bacterial Persistence. **J Mol Biol**, 431, n. 18, p. 3462-3471, Aug 2019.

SAMBROOK J, F. E., MANIATS T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 74, n. 12, p. 5463-5467, Dec 1977.

SCHEIN, C. Production of soluble recombinant proteins in bacteria. **BioTechnology**. 7: 1141–1148 p. 1989.

SCHIFANO, J. M.; CRUZ, J. W.; VVEDENSKAYA, I. O.; EDIFOR, R. *et al.* tRNA is a new target for cleavage by a MazF toxin. **Nucleic Acids Res**, 44, n. 3, p. 1256-1270, Feb 2016.

SCHIFANO, J. M.; EDIFOR, R.; SHARP, J. D.; OUYANG, M. *et al.* Mycobacterial toxin MazF-mt6 inhibits translation through cleavage of 23S rRNA at the ribosomal A site. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 110, n. 21, p. 8501-8506, May 2013.

SCHMID, G. P.; STEERE, A. C.; KORNBLATT, A. N.; KAUFMANN, A. F. *et al.* Newly recognized *Leptospira* species ("*Leptospira inadai*" serovar lyme) isolated from human skin. **J Clin Microbiol**, 24, n. 3, p. 484-486, Sep 1986.

SCIENTIFIC, T. F. BL21(DE3) Competent Cells. CORPORATION, L. T.: MAN0018595 Rev. A.0 **2019**.

SHAO, Y.; HARRISON, E. M.; BI, D.; TAI, C. *et al.* TADB: a web-based resource for Type 2 toxin-antitoxin loci in bacteria and archaea. **Nucleic Acids Res**, 39, n. Database issue, p. D606-611, Jan 2011.

SHARROCK, A.; RUTHE, A.; ANDREWS, E. S. V.; ARCUS, V. A. *et al.* VapC proteins from *Mycobacterium tuberculosis* share ribonuclease sequence specificity but differ in regulation and toxicity. **PLoS One**, 13, n. 8, p. e0203412, 2018.

SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal Biochem**, 150, n. 1, p. 76-85, Oct 1985.

STIMSON, A. Note on an organism found in yellow-fever tissue . Washington: Public Health Reports. 1907.

TAN, Q.; AWANO, N.; INOUE, M. YeeV is an Escherichia coli toxin that inhibits cell division by targeting the cytoskeleton proteins, FtsZ and MreB. **Mol Microbiol**, 79, n. 1, p. 109-118, Jan 2011.

TEIXEIRA, A. F.; FERNANDES, L. G. V.; CAVENAGUE, M. F.; TAKAHASHI, M. B. *et al.* Adjuvanted leptospiral vaccines: Challenges and future development of new leptospirosis vaccines. **Vaccine**, 37, n. 30, p. 3961-3973, Jul 2019.

VESPER, O.; AMITAI, S.; BELITSKY, M.; BYRGAZOV, K. *et al.* Selective translation of leaderless mRNAs by specialized ribosomes generated by MazF in Escherichia coli. **Cell**, 147, n. 1, p. 147-157, Sep 2011.

VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A. P.; SHRIRAM, A. N. Leptospirosis: an emerging global public health problem. **J Biosci**, 33, n. 4, p. 557-569, Nov 2008.

VINCENT, A. T.; SCHIETTEKATTE, O.; GOARANT, C.; NEELA, V. K. *et al.* Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus Leptospira through the prism of genomics. **PLoS Negl Trop Dis**, 13, n. 5, p. e0007270, 05 2019.

WALLING, L. R.; BUTLER, J. S. Homologous VapC Toxins Inhibit Translation and Cell Growth by Sequence-Specific Cleavage of tRNA. **J Bacteriol**, 200, n. 3, 02 2018.

WALLING, L. R.; BUTLER, J. S. Toxins targeting transfer RNAs: Translation inhibition by bacterial toxin-antitoxin systems. **Wiley Interdiscip Rev RNA**, 10, n. 1, p. e1506, 01 2019.

WANG, X.; LORD, D. M.; CHENG, H. Y.; OSBOURNE, D. O. *et al.* A new type V toxin-antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS. **Nat Chem Biol**, 8, n. 10, p. 855-861, Oct 2012.

WHO, I. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. Malta: World Health Organization 2003.

WHO, W. H. O.; CDS, C. D.; WSH, W., SANITATION AND HEALTH UNIT. *Water-related Diseases*. World Health Organization 2001.

WINTHER, K.; TREE, J. J.; TOLLERVEY, D.; GERDES, K. VapCs of Mycobacterium tuberculosis cleave RNAs essential for translation. **Nucleic Acids Res**, 44, n. 20, p. 9860-9871, Nov 2016.

WINTHER, K. S.; BRODERSEN, D. E.; BROWN, A. K.; GERDES, K. VapC20 of Mycobacterium tuberculosis cleaves the sarcin-ricin loop of 23S rRNA. **Nat Commun**, 4, p. 2796, 2013.

WINTHER, K. S.; GERDES, K. Enteric virulence associated protein VapC inhibits translation by cleavage of initiator tRNA. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 108, n. 18, p. 7403-7407, May 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, W.; COMMUNICABLE DISEASES, C.; WATER, S. A. H. U., WSH. *Water-related Diseases*. World Health Organization 2001.

XIE, Y.; WEI, Y.; SHEN, Y.; LI, X. *et al.* TADB 2.0: an updated database of bacterial type II toxin-antitoxin loci. **Nucleic Acids Res**, 46, n. D1, p. D749-D753, Jan 2018.

XU, Y.; ZHU, Y.; WANG, Y.; CHANG, Y. F. *et al.* Whole genome sequencing revealed host adaptation-focused genomic plasticity of pathogenic *Leptospira*. **Sci Rep**, 6, p. 20020, Feb 2016.

YAMAGUCHI, Y.; PARK, J. H.; INOUE, M. Toxin-antitoxin systems in bacteria and archaea. **Annu Rev Genet**, 45, p. 61-79, 2011.

YANAGIHARA, Y.; VILLANUEVA, S. Y.; YOSHIDA, S.; OKAMOTO, Y. *et al.* Current status of leptospirosis in Japan and Philippines. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, 30, n. 5-6, p. 399-413, Sep 2007.

YUAN, J.; STERCKX, Y.; MITCHENALL, L. A.; MAXWELL, A. *et al.* *Vibrio cholerae* ParE2 poisons DNA gyrase via a mechanism distinct from other gyrase inhibitors. **J Biol Chem**, 285, n. 51, p. 40397-40408, Dec 2010.

ZHANG, Y.; ZHANG, J.; HOEFLICH, K. P.; IKURA, M. *et al.* MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*. **Mol Cell**, 12, n. 4, p. 913-923, Oct 2003.

ZHANG, Y. X.; LI, J.; GUO, X. K.; WU, C. *et al.* Characterization of a novel toxin-antitoxin module, VapBC, encoded by *Leptospira interrogans* chromosome. **Cell Res**, 14, n. 3, p. 208-216, Jun 2004.