

ASPECTOS EVOLUTIVOS DE DOIS SOROVARES DE LEPTOSPIRA INTERROGANS ATRAVÉS DA ANÁLISE DE ILHAS GENÔMICAS

PLAÇA, Jessica Rodrigues¹; FAGUNDES, Michel Quevedo¹; DINIZ, Juliana Alcoforado¹; SEIXAS NETO, Amilton Clair¹; DELLAGOSTIN, Odir Antônio¹; SILVA, Éverton Fagonde¹.

¹Laboratório de Biologia Molecular – Centro de Biotecnologia – UFPel;
Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900. jessicaplaca@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

O filo das espiroquetas possui uma linhagem profundamente ramificada e numerosos estudos têm mostrado que este grupo difere em aspectos da morfologia, estrutura, bioquímica e genética das bem estudadas bactérias Gram negativas e Gram positivas. As espiroquetas são os agentes causadores de diversas doenças humanas importantes como a sífilis, a doença de Lime e a leptospirose (LEVETT, 2001).

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial, que é endêmica em regiões tropicais. Com a ocorrência de grandes surtos na década passada em áreas que incluem a Nicarágua, o Brasil e a Índia, a leptospirose é reconhecida atualmente como uma importante doença infecciosa. Em países industrializados, a chance de contrair leptospirose pode aumentar de acordo com a exposição recreacional ou ocupacional. É estimado que mais de 500.000 casos de leptospirose severa ocorram anualmente no mundo, com uma taxa de mortalidade de até 23%. A transmissão em humanos ocorre através do contato direto ou indireto com a urina de animais infectados, principalmente pequenos roedores (KO *et al*, 2009).

Leptospira interrogans é o agente mais frequentemente relatado como causador de leptospirose, sendo que *L. interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae representa mais da metade das leptospirosas encontradas em infecções humanas. Nos últimos anos, as sequências genômicas de *L. interrogans* sorovar Lai e *L. interrogans* sorovar Copenhageni, ambas pertencentes ao sorogrupo Icterohaemorrhagiae foi disponibilizada. Os sorovares Lai e Copenhageni foram isolados de pacientes com leptospirose severa na China e no Brasil, respectivamente. Enquanto o hospedeiro reservatório regular de Lai é o rato-do-campo (*Apodemus agrarius*), para o sorovar Copenhageni é o rato doméstico (*Rattus norvegicus*). O genoma de *L. interrogans* consiste em um cromossomo grande e circular de 4.33 Mb e um pequeno de 350 kb. A maioria das sequências codificadoras preditas do genoma de *L. interrogans* falhou em exibir similaridade das proteínas de função conhecida em outros organismos. O genoma é altamente conservado entre Lai e Copenhageni, exibindo 95% de similaridade no nível de nucleotídeos (XUE *et al*, 2009).

Genomas bacterianos contêm agrupamentos de genes que foram adquiridos através de transferência genética horizontal (HGT), chamadas de ilhas genômicas (GI). Estas GIs são frequentemente associadas com adaptações microbiológicas de interesse médico ou ambiental e estudos sugerem que elas têm um impacto substancial na evolução bacteriana. Portanto, tem havido um aumento no interesse em identificar GIs nos novos genomas sequenciados (LANGILLE *et al*, 2010). Foi encontrada uma ilha genômica de 54 kb presente em

L. interrogans Lai que pode se excisar do genoma e existir como um plasmídeo circular (BOURHY *et al*, 2007), além da existência de agrupamentos tipo prófago ativamente expressos em cepas virulentas e avirulentas de *L. interrogans* Lai (QIN *et al*, 2008). Estes trabalhos mostram que *Leptospira interrogans* possui os dois principais mecanismos de transferência genética horizontal, mas ainda não se sabe a extensão e o impacto deste evento no gênero. Neste estudo, nosso objetivo foi identificar através de métodos computacionais todos os agrupamentos gênicos resultantes de transferência genética horizontal em *L. interrogans*, contribuindo para aumentar o entendimento destes mecanismos na dinâmica da evolução deste patógeno.

2. METODOLOGIA

Sequências genômicas: As sequências genômicas de *L. interrogans* sorovar Lai e sorovar Copenhageni, além do fago LE1 foram obtidas através do GeneBank, onde foram convertidas para o formato FASTA para posterior análise.

Identificação das ilhas genômicas: As sequências genômicas foram então submetidas a três métodos de identificação de ilhas genômicas em procariotos. O IslandPick utiliza a composição das sequências e análise comparativa dos resultados positivos e negativos com outros genomas. O SIGI-HMM utiliza modelo oculto de cadeia de Markov para identificar as preferências de códon das sequências e comparar com outros genomas. O IslandPath-DIMOB identifica composições anormais de sequências e a presença de genes funcionalmente relacionados a elementos móveis. Todos estes três métodos foram utilizados de maneira agrupada no endereço eletrônico da ferramenta IslandViewer que integra estes três métodos (LANGUILLE *et al*, 2009).

Identificação das funções dos genes presentes nas ilhas genômicas: Foi utilizada a ferramenta de análise BLAST2GO para a comparação de similaridade e anotação dos agrupamentos gênicos obtidos pelo IslandViewer. O valor utilizado de BLAST foi de 1.0E-10. Os resultados obtidos foram analisados através de gráficos combinados no próprio BLAST2GO.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

No total, foram encontradas 17 regiões identificadas como ilhas genômicas no genoma *L. interrogans* Lai, 10 regiões em *L. interrogans* Copenhageni e nenhuma no genoma do fago LE1. Em Lai, estas regiões estavam distribuídas entre 15 no cromossomo I e duas no cromossomo II, enquanto que em Copenhageni todas as ilhas genômicas foram encontradas no cromossomo I. O número de ilhas encontradas foi diferente, o número de genes nestas ilhas foi diferente em todas as ilhas analisadas e a posição no genoma também é diferente, sugerindo que a aquisição destes genes está relacionada com as pressões ambientais exercidas, não só pelos diferentes ambientes encontrado nos hospedeiro, mas como pela disponibilidade gênica de outros organismos para aquisição de genes serem diferentes. Estes achados sugerem que estes eventos de transferência são recentes na evolução destes dois sorovares. Isto corrobora a hipótese de que a espécie *Leptospira interrogans* está em pleno processo de expansão genômica (XUE *et al*, 2009) e, além disto, no início de um processo de especialização de hospedeiro, como já ocorre claramente na espécie *L.*

borgpetersenii (BULACH *et al*, 2006). Já no prófago LE1, nenhuma ilha foi encontrada provavelmente porque este vírus foi cultivado repetidas vezes *in vitro*, e como a taxa de aquisição ou perda de genes é muito rápida neste organismo, os genes não necessários *in vitro* e que poderiam estar relacionados com transferência em leptospiros foram perdidos. Todos os genes variavam entre 180 e 3600 pares de base, não havendo nenhuma relação aparente entre tamanho. Todas as regiões analisadas possuíam uma porcentagem de GC variando entre 42 e 45% enquanto que o genoma de *L. interrogans* é de 35%.

Quanto á função dos genes encontrados, importantes diferenças foram evidenciadas. Em todas as regiões de ilhas genômicas analisadas foi observada a presença de pelo menos um gene da categoria de ontologia P, relacionada com transposição e integração ao DNA. Isto sugere que o principal mecanismo pelo qual estas transferências genéticas estariam ocorrendo seria através de transposição e recombinação com elementos de inserção, transposons e fagos. Entretanto, no sorovar Lai, na ilha genômica IV do cromossomo I foi encontrada, além de uma integrase com região catalítica, três ATPases envolvidas na replicação do DNA e com atividade de helicase *four-way junction*. Bourhy (2007) descreve uma região do cromossomo I de *L. interrogans* Lai de 53 kb que pode se excisar do cromossomo e agir como um plasmídeo circular, mas não identifica os mecanismos envolvidos. Nós sugerimos que esta integrase juntamente com as três helicases devem estar envolvidas nesse processo de excisão e integração desta região no genoma, pois estas enzimas possuem atividades de clivagem e de topoisomeração de DNA, sendo capazes de realizar um evento de recombinação mediada por plasmídeo, mas outros estudos devem ser realizados.

Já em relação à patogenicidade e adaptação ambiental, importantes diferenças foram notadas. Em Lai foram encontrados 20 genes relacionados com funções de motilidade, sendo dois deles diretamente associados ao flagelo, enquanto que em Copenhageni, somente um gene de flagelo foi encontrado. Em Copenhageni, 20% dos genes anotados estão ligados a atividade de ligação ao DNA, 40% a fatores de controle da transcrição e tradução e quatro genes (5%) ligados ao transporte e metabolismo de tetraciclina. Já em Lai, a maioria dos genes encontrados também foi de ligação ao DNA (45%) e fatores de controle da transcrição e tradução (25%). Entretanto, nenhum gene de resistência a antibiótico foi encontrado, mas dez genes relacionados à aquisição de metais, especialmente o ferro do grupamento heme foi encontrado. Estes dados sugerem que estes dois organismos estão sofrendo pressões ambientais bem diferentes, evidenciados pelo alto número de fatores de transcrição e virulência que teriam sido adquiridos de outros organismos por HGT e que estariam envolvidos na adaptação ambiental aos hospedeiros e aos ambientes diferentes. No ciclo de vida de *Leptospira interrogans*, há uma fase no organismo e outra no meio ambiente. O hospedeiro do sorovar Lai é um mamífero silvestre, que não tem contato com moléculas como antibióticos, a qual o hospedeiro de Copenhageni tem contato por ser um animal urbano. Estas pressões ambientais diferentes devem estar direcionando a seleção de organismos com supostos fatores de virulência diferentes dentro da mesma espécie.

4. CONCLUSÕES

Este trabalho possibilitou a identificação de ilhas genômicas através de métodos computacionais nos dois sorovares com genomas disponíveis da espécie *L. interrogans*, a espécie de maior importância epidemiológica de leptospirose. Dentre os genes encontrados nestas ilhas genômicas, provavelmente provenientes de transferência genética lateral, houve diferenças no número, posição e função, sugerindo que estes eventos ocorreram após a divergência do gênero. Outros trabalhos na literatura demonstraram que enquanto a espécie *L. borgpetersenii* está sofrendo redução genômica, *L. interrogans* está em pleno processo de expansão genômica. Nosso trabalho sugere que esta expansão se dá em direção às diferentes pressões ambientais que esse patógeno sofre nos diferentes ambientes que ele se encontra.

5. REFERÊNCIAS

- BOURHY, P.; SALAUN, L.; LAJUS, A.; MÉDIGUE, C.; BOURSAUX-EUDE, C.; PICARDEAU, M. A genomic island of the pathogen *Leptospira interrogans* serovar Lai can excise from its chromosome. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 2, p. 677-683, 2007.
- BULACH, D. M.; ZUERNER, R.; WILSON, P.; SEEMAN, T.; McGrath A.; CULLEN, P.; DAVIS, J.; ALT, D. V.; ROOD, J.; ADLER, B. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. **PNAS**, v. 103, n. 39, p. 14560-14565, 2006.
- KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Review Microbiology**, v. 7, n. 7, p. 736-747, 2009.
- LANGUILLE, M. G. I.; BRINKMAN, F. S. L. IslandViewer: an integrated interface for computational and visualization of genomic islands. **Bioinformatics**, v. 25, n. 5, p. 664-665, 2009.
- LANGUILLE, M. G. I.; HSIAO, W. W. L.; BRINKMAN, F. S. L. Detecting genomic islands using bioinformatics approaches. **Nature Review Microbiology**, v. 8, n. 5, p. 373-382, 2010.
- LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Review**, v. 14, n. 6, p. 296-326, 2001.
- QIN, J.; ZHANG, Q.; ZHANG, Z.; ZHONG, Y.; YANG, Y.; HU, B.; ZHAO, G.; GUO, X. Identification of a novel prophage-like gene cluster actively expressed in both virulent and avirulent strains of *Leptospira interrogans* serovar Lai. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 6, p. 2411-2419, 2008.
- XUE, F.; YAN, J.; PICARDEAU, M. Evolution and pathogenesis of *Leptospira* spp.: Lessons learned from the genomes. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 3, p. 328-333, 2008.