



Universidad Nacional Autónoma de
México

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

“ESTUDIO DEL LOCUS *gsp* DEL SISTEMA
DE TRANSPORTE TIPO II DE
Leptospira interrogans SEROVARIEDAD
Icterohaemorrhagiae”

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN
CIENCIAS

PRESENTA

ERIKA ODILIA FLORES POPOCA

TUTOR: DR. ALEJANDRO DE LA PEÑA MOCTEZUMA

COMITÉ TUTORAL: DR. ALFREDO SAHAGÚN RUÍZ

DR. JORGE I. TORRES BARRANCA

MÉXICO, D.F

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

II. AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por permitirme lograr un sueño más de mi vida profesional, a mis padres y mi hermano por todo su apoyo que siempre me han brindado y por confiar en mi, GRACIAS familia ésto es para ustedes.

Se agradecen las facilidades y atenciones otorgadas por el Laboratorio del Grupo de Investigación en *Leptospira* y Leptospirosis del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A mi tutor principal el Dr Alejandro de la Peña Moctezuma por su apoyo moral y profesional desde que llegue al laboratorio y entre a la maestría.

A mi comité tutorial el Dr Alfredo Sahagún Ruiz y el Dr Jorge I. Torres Barranca y mis sinodales el Dr Lemuel León Lara y el Dr Rogelio Alonso Morales, por su tiempo y dedicación para la realización de esta tesis.

Gracias al Dr Rigoberto Hernández Castro y el Dr Daniel Atilano López por su gran apoyo en los días más difíciles, Gracias; sin ustedes esta tesis no se hubiera logrado.

En memoria al Dr Alfredo Fragoso Hernández, Gracias por apoyarme desde que lo conocí en la carrera y considerarme como su hija, ya no pudo ver que terminé Doctor, pero espero que donde se encuentre este orgulloso de mi, gracias por su ayuda y sus palabras que siempre me dieron la fortaleza para seguir adelante, Descanse en Paz mi querido profesor.

I. INDICE GENERAL

I. Índice General.....	I
II. Agradecimientos.....	II
III. Índice de Figuras.....	III
IV. Índice de cuadros.....	IV
V. Índice de abreviaturas.....	V
VI. Resumen.....	VI
VII. Abstract.....	VII
VIII. Introducción.....	1
Leptospirosis, la enfermedad.....	1
<i>Leptospira</i> , el agente etiológico.....	6
Sistemas de Secreción.....	8
Vía General de Secreción (GSP).....	8
Sistema de Secreción tipo II.....	9
IX. Hipótesis.....	17
X. Objetivo General.....	17
XI. Objetivos específicos.....	17
XII. Materiales y Métodos.....	18
XIII. Resultados.....	27
XIV. Discusión y Conclusiones.....	33
XV. Referencias Bibliográficas.....	36

III. INDICE DE FIGURAS

1. Paso de proteínas del citoplasma hacia el periplasma, exportación.....	10
2. Translocación de las proteínas hacía el medio extracelular, secreción.....	15
3. El <i>locus gsp</i> de <i>Leptospira interrogans</i> serovariedad Copenhageni cepa Fiocruz.....	21
4. Ubicación de los iniciadores con respecto a los genes del <i>locus gsp</i>	23
5. Observación de la extracción de ADN.....	27
6. Fragmentos A, B y C amplificados mediante PCR con ADN de <i>Leptospira interrogans</i> serovariedad Icterohaemorrhagiae cepa RGA.....	28
7. Fragmentos D, E y F amplificados mediante PCR con ADN de <i>Leptospira interrogans</i> serovariedad Icterohaemorrhagiae cepa RGA.....	29
8. Fragmentos G, H, I y J amplificados mediante PCR con ADN de <i>Leptospira interrogans</i> serovariedad Icterohaemorrhagiae cepa RGA.....	30
9. Fragmento del <i>locus gsp</i> de <i>Leptospira interrogans</i> serovariedad Icterohaemorrhagiae cepa RGA secuenciado.....	32

IV. INDICE DE CUADROS

1. Distribución y localización subcelular de los componentes del Sistema de Secreción Tipo II (SSTII).....	16
2. Proteínas del locus gsp de <i>Leptospira interrogans</i> serovariedad Copenhageni cepa Fiocruz.....	20
3. Iniciadores utilizados para secuenciar el locus gsp de <i>Leptospira interrogans</i> serovariedad Icterohaemorrhagiae cepa RGA mediante PCR...	22
4. Nuevos iniciadores para terminar de secuenciar el locus gsp de <i>Leptospira interrogans</i> serovariedad Icterohaemorrhagiae cepa RGA.....	26
5. Porcentaje de identidad y similitud de nucleótido y aminoácidos. Comparación de <i>Leptospira interrogans</i> serovariedad Icterohaemorrhagiae cepa RGA con <i>Leptospira interrogans</i> serovariedad Copenhageni cepa Fiocruz y <i>Leptospira biflexa</i> serovariedad Patoc.....	31

V. INDICE DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
CTAB	N-cetil Trimetil Bromuro de Amonio
C'	Dominio carboxilo
EMJH	Ellinghausen – McCullough modificado por Johnson y Harris
GSP	Vía General de Secreción
<i>gsp</i>	Genes del SST - II
Gsp	Proteínas del SST – II
H'	Dominio hidroxilo
Kb	Kilobases
MAL	Marco Abierto de Lectura
MC	Membrana Citoplasmática
ME	Membrana Externa
MI	Membrana Interna
N'	Dominio amino
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
Ph	Proteína hipotética
PME	Proteínas de la Membrana Externa
SST – II	Sistema de Secreción Tipo – II
SVs	Serovariedades
Tm	Temperatura de fusión (temperature melting)
µl	Microlitros

VI. RESUMEN

La leptospirosis es una enfermedad ocasionada por espiroquetas del género *Leptospira*. Dentro de los principales reservorios de las serovariedades patógenas se encuentran ratas, ratones, perros, vacas, cerdos, caballos y zorros. Es una enfermedad de distribución mundial en la cual muchos animales permanecen como portadores del agente etiológico. Las Proteínas de la Membrana Externa (PMEs) de *Leptospira* son actualmente objeto de estudio con la finalidad de encontrar un antígeno protector común contra la leptospirosis. Un grupo de proteínas que conforman el Sistema de Secreción Tipo II (SST-II) incluye aquellas PMEs con funciones de translocación de proteínas al exterior de la célula bacteriana. El objetivo de este trabajo fue secuenciar parcialmente el *locus gsp* que incluye genes del SST-II en *Leptospira interrogans* serovariedad *Icterohaemorrhagiae* cepa RGA. Se extrajo ADN utilizando N-cetil trimetil bromuro de amonio (CTAB) y con base en la secuencia del genoma de *Leptospira interrogans* serovariedad Copenhageni cepa Fiocruz (Nascimento *et al.*, 2004), se diseñaron los iniciadores para amplificar 10 fragmentos de ADN con tamaños desde 1.4 hasta 2.5 Kb, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los fragmentos de ADN fueron secuenciados y las secuencias fueron alineadas. Comparando con las bases de datos, nueve genes: *gspD* (LIC11570), *gspE* (LIC11571), *gspF* (LIC11572), *gspG* (LIC11573); Proteína hipotética (Ph) (LIC11574), Ph (LIC11575), Ph (LIC11576), *etpK* (LIC11577) y *ftsA* (LIC11578); fueron identificados en un fragmento de 10,387 pb mostrando un 100 % de identidad con los homólogos en el genoma de la serovariedad Copenhageni cepa Fiocruz.

Palabras claves: *Leptospira interrogans*, *Icterohaemorrhagiae*, Copenhageni, Sistema de Secreción Tipo II (SST-II), *gspD*, *gspE*, *gspF* y *gspG*.

VII. ABSTRACT

Leptospirosis is a disease caused by spirochetes of the genus *Leptospira*. The main reservoirs for the pathogenic serovars are rats, mice, dogs, cows, pigs, horses and foxes. It is a worldwide distributed disease in which many animals remain as carriers of the etiologic agent. Currently, the Outer Membrane Proteins (OMP's) of *Leptospira* are the object of study with the purpose of finding a common protective antigen against leptospirosis. A group of proteins that compose the Type II Secretion System (SST – II) includes those OMPs with functions of translocation of other proteins to the exterior of the bacterial cell. The objective of this work was to sequence the *gsp* locus that includes genes of the SST – II in *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae strain RGA. Genomic DNA was extracted with N-cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB). Primers were designed based on the sequence of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni genome. The primers amplified 10 DNA fragments from 1.4 through to 2.5 Kb by polymerase chain reaction (PCR). The DNA fragments were sequenced and aligned, nine genes: *gspD* (LIC11570), *gspE* (LIC11571), *gspF* (LIC11572), *gspG* (LIC11573); hypothetical protein (Ph) (LIC11574), Ph (LIC11575), Ph (LIC11576), *etpK* (LIC11577) and *ftsA* (LIC11578), were identified by comparison with the databases, in a 10,387 bp DNA fragment showing 100% identity with those of the genome of serovar Copenhageni strain Fiocruz.

Key words: *Leptospira interrogans*, Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, type II secretion system (SST – II), *gspD*, *gspE*, *gspF* and *gspG*.

VII. INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad febril, infecciosa y contagiosa de los animales domésticos, en particular de los perros, vacas y cerdos, caracterizada por producir signos asociados con disfunción hepática y renal (ictericia, vómito, diarrea, hemorragias) así como abortos, infertilidad y nacimiento de crías débiles que mueren al poco tiempo después del parto. La etiología de esta enfermedad es alguna de las diferentes serovariedades (SVs) patógenas del género *Leptospira* el cual, está conformado por 9 especies patógenas que incluyen más de 250 SVs, comprendidas en 23 serogrupos y 3 especies saprófitas con aproximadamente 60 SVs en 8 serogrupos. Dentro de los principales reservorios de las SVs patógenas se encuentran a las ratas, ratones y otros roedores. Los perros, vacas, cerdos, caballos y zorros pueden permanecer como portadores asintomáticos por periodos prolongados. La leptospirosis tiene una distribución mundial y es particularmente común en áreas geográficas con climas húmedos, cálidos o templados. El control de la enfermedad es difícil debido a la amplia distribución de leptospirosis patógenas en el ambiente. La vacunación en animales, tradicionalmente ha sido realizada mediante la inoculación de cultivos inactivados de *Leptospira*, sin embargo, su eficacia para evitar la infección y el estado de portador ha resultado inconsistente. Siendo el lipopolisacárido (LPS) del organismo, el principal antígeno relacionado con la producción de anticuerpos específicos de SVs y habiendo sido reconocidas más de 250 SVs patógenas, con el inicio del nuevo siglo se ha propuesto la alternativa de que un antígeno común a las SVs patógenas de *Leptospira*, como las proteínas de la membrana externa (PMEs), pudieran representar un mejor candidato para inducir inmunidad cruzada contra la leptospirosis (Erosa, 2001; Adler and De la Peña, 2004).

Leptospirosis, la enfermedad

Adolf Weil en 1886, describió por primera vez esta enfermedad en humanos, como una condición febril, hemorrágica e icterica (Lee and Cumley, 1984). En 1914 fue descubierto el agente causal por Inada e Ido quienes lo reportaron

como una espiroqueta a la que denominaron "*Spirochaeta icterohemorrhagiae*" y encontraron que la rata es un reservorio común de esta espiroqueta. Posteriormente, en 1918, Hideyo Noguchi en el puerto de Guayaquil, Ecuador, investigando fiebre amarilla, descubrió en la sangre de los enfermos una espiroqueta a la que llamó "*Leptospira icteroides*". En diciembre de 1919, se trasladó a Mérida y describió el primer caso de leptospirosis en México (Erosa, 2001). Desde entonces, con el correr de las investigaciones, se han identificado nuevas SVs patógenas que afectan tanto a los animales silvestres y domésticos como al hombre, comprometiendo no sólo la salud sino la economía de las regiones afectadas (Braselli, 2002).

Con respecto a su distribución geográfica, se puede clasificar a los países afectados como endémicos y epidémicos; así, algunos de los países endémicos son: Estados Unidos de América, España, Barbados, Holanda, Francia, Perú, Argentina, Chile, Canadá, Eslovaquia, Escocia, Pakistán, Tailandia, Nigeria, Costa Rica, México, Alemania, Dinamarca, Italia, Cuba, Australia, Zaire, Yugoslavia, Irlanda del Norte, Bangla Desh, Japón y Venezuela; y como países epidémicos: Brasil, Nicaragua, China, India y Puerto Rico (Colin *et al.*; 2004).

En México, los primeros trabajos sobre leptospirosis fueron realizados por Noguchi en Yucatán en el año de 1920 (Noguchi and Kheger, 1920) y a partir de entonces, diferentes grupos de investigadores han reportado trabajos epidemiológicos de individuos seropositivos en diversos Estados del País. En 1984, se realizó un estudio en la población del estado de Yucatán, encontrándose una seropositividad del 8% en una zona urbana (Gavaldón *et al.*, 1997). En México, el porcentaje de seropositivos reportado en zonas rurales es del 14% (Zavala *et al.*, 1984). Con relación al sexo y a la edad, la mayor frecuencia ha sido reportada en hombres entre 18 y 35 años de edad (Gavaldón *et al.*, 1997).

La leptospirosis es más frecuente en los países tropicales (Thiermann, 1984), zonas rurales y urbanas de países donde existe precipitación pluvial abundante, así como la presencia de reservorios (alta población de roedores),

lo que favorece la supervivencia de leptospiras patógenas. Las SVs más comunes de distribución mundial son: Pomona, Icterohaemorrhagiae, Canicola y Grippotyphosa (Prescott, 1992). En los países de clima templado tiende a ser un problema de salud para granjeros, mineros, médicos veterinarios, así como para bañistas, deportistas y personas que tienen contacto con aguas y lodos contaminados (Benenson, 1997). Las áreas con lagunas, riachuelos (bebederos en general) donde se juntan un gran número de animales, son las que más frecuentemente están implicadas con esta enfermedad (Ellis, 1994).

El estudio de la leptospirosis ha despertado gran interés entre los investigadores en las últimas décadas, sobre todo por los problemas de salud pública, sanidad animal y las pérdidas económicas que ocasiona (Zepeda y Sánchez, 1987).

Esta enfermedad, afecta una gran variedad de animales, tanto silvestres como domésticos (Matsunaga *et al.*, 2003). En la ganadería, causa mortinatos, abortos y nacimientos de animales débiles e infertilidad (Ellis, 1994). Las especies de importancia económica más afectados son: bovinos, equinos, cerdos, ovejas y cabras; también afecta perros, venados, zorrillos, mapaches, zurigüeyas, musarañas, canguros, murciélagos, reptiles, ranas, conejos, zorros, erizos, chacales, ratas y ratones entre otros (Blood *et al.*, 1982).

En los bovinos, se caracteriza por la aparición repentina de fiebre, hemoglobinuria, ictericia, disnea por congestión pulmonar, anorexia, altos niveles de urea en la sangre y de albúmina en orina, lo que por lo general, acaba con la muerte del animal en 3-5 días, siendo los terneros los más afectados. En las hembras preñadas provoca aborto por la pirexia y prácticamente la desaparición de la producción láctea (síndrome de la caída de la leche). Los terneros presentan anorexia, fiebre, hemoglobinuria, anemia, ictericia, septicemia y hemorragias petequiales en las membranas mucosas. Se puede presentar diarrea y en algunos casos heces sanguinolentas o amarillentas con olor fétido, pero después puede haber estreñimiento. En los becerros puede ser mortal y casi siempre está relacionado con la SV Hardjo y en algunos casos Pomona (Blood *et al.*, 1982).

En el caso particular de los porcinos, puede ser benigna mostrando sólo inapetencia y ligera fiebre, o bien, puede presentarse en forma grave manifestándose anorexia, desequilibrio hídrico, ictericia, hemoglobinuria, convulsiones, trastornos gastrointestinales, parálisis progresiva, disminución de peso y de la producción láctea, aborto, nacimiento de crías débiles, infertilidad y por lo general es provocado por la SV Pomona (Jiménez *et al.*, 1986; Blood *et al.*, 1982).

En ovinos y caprinos se presenta fiebre, anorexia, disnea, hemoglobinuria, palidez de las mucosas, infertilidad, nacimiento de crías débiles, mortinatos y aborto, esta parece ser una manifestación exclusivamente asociada a la forma aguda de la infección por las SVs Pomona y Hardjo (Blood *et al.*, 1982).

En el perro, los signos son fiebre de 3-4 días seguida por rigidez y mialgia en miembros posteriores, hemorragia en la cavidad bucal con tendencia a necrosis y faringitis. En una etapa posterior, puede haber gastroenteritis hemorrágica y nefritis aguda, se desarrolla vómito, inapetencia, postración y anemia debida al fallo renal progresivo. Se reconocen tres síndromes: hemorrágico agudo, icterico y urémico también conocido como enfermedad de Stuttgart (Chamizo, 1998).

En el equino, los signos son variables y en la mayoría de los casos la enfermedad cursa de modo asintomático aunque puede producirse fiebre, ictericia, hemoglobinuria, necrosis de la piel y los labios, conjuntivitis con edema en los párpados, lagrimeo, hepatitis y nefritis, y pueden presentarse abortos en el último tercio de la gestación. La infección tiende a hacerse crónica con la manifestación de iridociclitis recurrente (Blood *et al.*, 1982).

Las ratas y los ratones son los reservorios primarios de leptospiras patógenas produciéndose en ellos una infección renal crónica, con excreción de grandes cantidades de bacterias en la orina (Mims *et al.*, 1993).

Las leptospiras, generalmente mueren al estar expuestas al calor, la luz, detergentes o desinfectantes, pero pueden permanecer viables en aguas alcalinas y suelos húmedos. Como el hombre tiene una orina relativamente ácida para esta bacteria, se considera un mal transmisor pero puede llegar a

infectarse por consumo o exposición a las aguas y alimentos contaminados, ya que en condiciones favorables, esta bacteria puede sobrevivir en el agua hasta por 183 días (Mims *et al.*, 1993), En el hombre, los síntomas varían desde un simple resfrío hasta el cuadro más severo, que se conoce como enfermedad de Weil, la cual consiste en un fallo hepático y renal agudos y severas hemorragias. Se considera que solamente un 5-10% de las personas con leptospirosis padecen de estos síntomas graves (enfermedad de Weil), el período de incubación en general es entre 7 a 13 días (Smith *et al.*,1995).

Dentro de la epidemiología existen 2 aspectos que hacen muy difícil el control efectivo de esta enfermedad:

1) La presencia de reservorios, donde la bacteria persiste por largo tiempo en los túbulos renales sin producir la enfermedad ni cambios en el riñón; sin embargo, si hay excreción de leptospiras en la orina que contaminan el ambiente y,

2) los animales enfermos que infectan a otros animales y que comúnmente se convierten en portadores asintomáticos, que igualmente excretan leptospiras en la orina por periodos prolongados.

En la patogénesis, la bacteria, ayudada por su movilidad entra al organismo a través de heridas, abrasiones o mucosas y llega a la sangre. En ausencia de anticuerpos el microorganismo se replica en sangre (leptospiremia) para después de un periodo de 1 a 2 semanas causar signos clínicos, invadir tejido renal y ser eliminado por orina (leptospiruria).

Debido a la alta diversidad de signos clínicos, la falta de un signo patognomónico o la presentación asintomática en las especies hospedadoras, se hace difícil el diagnóstico clínico de esta enfermedad (Zepeda y Sánchez, 1987).

Para su diagnóstico, se utilizan principalmente dos tipos de técnicas:

1. Las que evidencian al agente, tales como la observación al microscopio de campo oscuro, la inmunofluorescencia indirecta, las tinciones de plata en

tejidos fijos o frotis directos, la hibridación *in situ*, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el aislamiento, y

2. Las que ponen en evidencia los anticuerpos producidos: ELISA, la prueba de aglutinación microscópica (MAT) y macroscópica y recientemente, el Lepto-Dipstick (inmuno ensayo–enzimático) para el diagnóstico en humanos (Faine *et al.*, 1999; Myers, 1985).

La amplificación del ADN usando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha convertido en una promisorio técnica de diagnóstico, debido a la rapidez del resultado y a su alta sensibilidad (Tepstra *et al.*, 1998).

Diferentes protocolos de PCR han sido propuestos sin embargo, se prefiere el uso de la combinación de los iniciadores designados como G1 y G2 y B64 I – B64 II (Seijo *et al.*, 2002). Sin embargo, el procesamiento de muestras frescas sigue siendo un factor determinante para el éxito de ésta prueba.

Leptospira, el agente etiológico

Clasificación. El género *Leptospira* pertenece al orden *Spirochaetales* a la familia *Leptospiraceae*. En 1962, la subcomisión de leptospirosis de la Organización Mundial de la Salud, acordó dividir a estas bacterias en 2 especies: *L. interrogans*, patógena en los animales y el hombre y *L. biflexa*, que es de vida libre. Sin embargo en 1986, se describió también una reclasificación conforme a hibridación de DNA y actualmente se consideran nueve especies patógenas: *Leptospira alexanderii*, *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. fainei*, *L. noguchii*, *L. santarosai* y *L. weilii* y tres especies saprófitas que son *L. biflexa*, *L. meyeri* y *L. wolbachii* (Faine *et al.*, 1999).

Esta espiroqueta, mide de 6 a 20 μm de largo y 0.1 a 0.2 μm de diámetro, es flexible, helicoidal y tiene sus extremos en forma de gancho, es móvil, aerobia estricta y se cultiva en medios como el EMJH (Ellinghausen – McCullough modificado por Johnson y Harris), Stuart, Cox o Fletcher. Puede sobrevivir largo tiempo en el agua o en un ambiente húmedo, con un pH neutro o ligeramente alcalino y puede sobrevivir hasta 100 días a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Myers, 1985).

Leptospira interrogans contiene dos copias de los genes RNA ribosómicos (rRNA) 23S (*rrl*) y 16S (*rrs*) y sólo una copia del gen 5S (*rrn*). El gen es altamente conservado entre las leptospiros patógenas (Fukunaga *et al.*, 1991).

Leptospira interrogans serovariedad Icterohaemorrhagiae contiene 2 cromosomas, El CI tiene un tamaño de 4.36 – megabases y el CII de 359 kb, con un total de 4,768 genes (Faine *et al.*, 1999). Todos los genes de rRNA y tRNA se encuentran en el CI, así como los genes requeridos para el desarrollo y viabilidad, también se encuentran en el CI. Algunos genes esenciales yacen en el CII, los genes *metF* el gen que codifica para 5,10–Metileno–tetrahidrofolato reductasa, esta enzima es la primera en la formación de N–metil tetrahidrofolato supliendo el grupo metil de metionina (Belfaiza *et al.*, 1987) y *asd* (aspártico semialdehído deshidrogenada) el primer gen de la ruta biosintética de treonina y lisina (Cuadrado *et al.*, 2002), los cuales son reconocidos por el gen *ndh* que codifica para NADH deshidrogenasa usada durante la respiración aerobia y nitrato (Jackson *et al.*, 2004) y los grupos de genes que envuelven una completa vía temprana para la biosíntesis de novo (Ren *et al.*, 2003). Los replicones son considerados cromosomales debido a que el gen esencial *asd*, está localizado en el CII (Faine *et al.*, 1999). En el caso de Copenhageni el CI tiene un tamaño de 4,277,185 pb y el CII mide 350,181 pb (Nascimento *et al.*, 2004) con respecto a la SV Lai, el CI mide 4,332,241 pb y el CII 358,943 pb (Ren *et al.*, 2003).

Existen evidencias serológicas de la infección en muchos países con las serovariedades de *Leptospira interrogans* Icterohaemorrhagiae y Copenhageni, pero se han reportado pocos aislamientos. Ambas SVs están serológica y genéticamente relacionadas y se encuentran comúnmente alojadas en las ratas marrón (*Rattus norvegicus*), las cuales contaminan el ambiente con su orina infectada (Ellis, 1994).

En cuanto a su metabolismo, esta bacteria obtiene su energía de la oxidación de los ácidos grasos de cadena larga y no pueden utilizar aminoácidos o carbohidratos como fuentes energéticas importantes. (Bonifaz, 1982).

Sistemas de Secreción

En bacterias Gram positivas, la proteína secretada necesita ser translocada sólo a través de una membrana (la membrana citoplasmática); mientras que en Gram negativas la membrana citoplasmática (MC) o membrana interna (MI) y la membrana externa (ME) tienen que ser atravesadas, para lo cual es requerido el sistema Sec y en algunos casos, proteínas de algún sistema de secreción (Desvaux *et al.*, 2004).

El término de translocación se refiere al transporte de la proteína a través de la membrana biológica, mientras que el término secreción se refiere al transporte de la proteína desde el interior al exterior de la célula, y el término exporte o exportación, se define como el transporte de una proteína desde el citoplasma al espacio periplásmico en bacterias Gram negativas (Desvaux *et al.*, 2004).

En las bacterias Gram negativas, se encuentra una vía llamada Sec que concede a las proteínas cruzar la membrana citoplasmática. Esta vía se extiende en una o más ramas terminales que permiten la secreción extracelular y el ensamblaje de los organelos de superficie. Una rama terminal semejante es la vía general de secreción (GSP) que es un secretón o maquinaria de secreción tipo II (SST-II), que específicamente reconoce las proteínas en estado plegado y facilita la extrusión a través de un supuesto poro en la ME (Francetic *et al.*, 2000).

Vía General de Secreción (GSP)

El sistema general de secreción (GSP) es usado para secretar diversas proteínas como factores de virulencia, adhesinas, invasinas, y proteasas (Stathopoulos *et al.*, 2000). Las vías de secreción han sido clasificadas en cinco grupos principales: tipo I, II, III, IV y los autotransportadores o tipo V. Las vías Sec-dependientes, que utilizan el sistema de secreción denominado Sec, en el que las proteínas a secretarse presentan una secuencia señal o péptido líder en el extremo amino terminal, son el SST-II y los autotransportadores o tipo V. Las Sec-independientes, en las que los sustratos se pueden translocar directamente desde el citosol hasta el exterior celular sin que haya ninguna secuencia señal, estos son SST-I, III y IV (Thanassi and Hultgren, 2000).

Sistema de Secreción Tipo II

El sistema de secreción o de transporte tipo II (SST – II) es uno de los sistemas Sec – dependientes que participan en el paso de proteínas a través de las dos membranas con la ayuda de un péptido señal y es considerada la principal vía de secreción de proteínas bacterianas (Thanassi y Hultgren, 2000). El SST – II ha sido descrito en un grupo de bacterias entre las que se incluyen algunas como *Klebsiella oxytoca* (*pul*), *Erwinia chrysanthemi* y *E. carotovora* (*out*), *Xanthomonas campestris* (*xps*), *Pseudomonas aeruginosa* (*xcp*), *Aeromonas hydrophila* (*exe*) y *Vibrio cholerae* (*eps*) (Cuadro 1). El SST –II es altamente específico (Russel, 1998) y es capaz de distinguir proteínas secretadas de las proteínas residentes periplasmáticas (Sandkvist, 2001).

Primeramente, para que las proteínas del citosol salgan al medio extracelular, estas son translocadas del citosol al periplásma. En *E. coli* la proteína se transporta a través de la MI gracias a la acción de tres proteínas SecB, SecA y SecYEG. Por un lado, la proteína precursora con el péptido señal se mantiene desplegada por la unión con la proteína chaperona SecB, quien la dirige a SecA (Stathopoulos *et al.*, 2000). La proteína SecA, es una ATPasa cuya actividad de hidrólisis provee de la energía necesaria para la translocación a través de la MI. El complejo binario de la preproteína con SecB, se dirige a SecYEG (una translocasa), unido a SecA; o bien, primero se asocia con SecA en el citosol a través de una interacción de baja afinidad, hasta que los sitios de translocación en la membrana estén disponibles (Figura 1).

Para interactuar con la translocasa se requiere de la unión con alta afinidad entre SecB y SecA, lo cual es seguido de la unión del péptido señal en SecA, que a su vez estabiliza la unión SecA – SecB. El final de este primer paso es transferir la preproteína de SecB a SecA, se libera SecB de la membrana y se inicia la translocación. La energía de la hidrólisis de ATP se utiliza para la transferencia de la preproteína de SecA hacia SecYEG. Una vez que los polipéptidos se translocan, actúa una peptidasa que procesa el péptido señal para finalmente liberar la preproteína ya como una proteína madura al espacio periplásmico (Sandkvist, 2001).

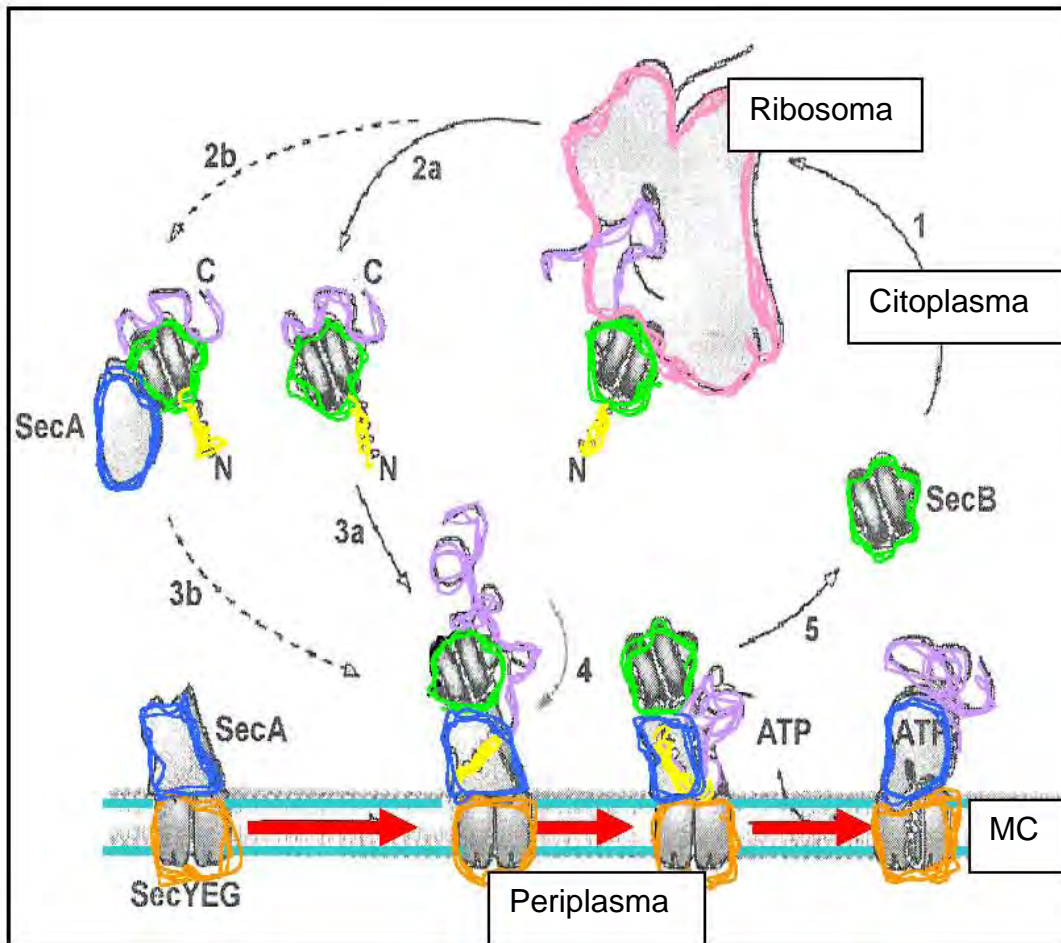


Figura 1. Paso de proteínas del citoplasma hacia el periplasma, exportación. Se indica con flechas rojas el transporte a través de la MI de la proteína precursora (morado) con el péptido señal (amarillo) que están en el ribosoma (rosa), y con ayuda de SecB (verde) que la transporta hacia SecA (azul) la cual es una ATPasa, que provee la energía para la translocación, SecB y SecA se unen a SecYEG (naranja) que es una translocasa y juntas, transportan la proteína hacia el periplasma cuando los sitios de translocación están disponibles (Sandkvist, 2001).

Con respecto al péptido señal, éste consiste de una secuencia que contiene aproximadamente de 18 a 30 amino ácidos y que está dividido en tres dominios: un dominio amino (N') con carga positiva que está asociado con la proteína presecretoria de la MI, el cual orienta correctamente la proteína para ser translocada; un dominio hidroxilo (H') conteniendo un centro hidrofóbico que inserta el péptido señal en la MI y un dominio carboxilo (C') que tiene un sitio reconocido de corte por una peptidasa señal (Stathopoulos *et al.*, 2000). Estos dominios son distinguidos por su secuencia y posición del sitio de corte y son procesados durante la translocación a través de la MI (Pugsley, 1993). Otra característica de estos dominios es su alta hidrofobicidad, carecen de amino ácidos básicos en el dominio N', y es más probable que tengan residuos de glicina y prolina en el dominio H' (Pugsley; 1993).

Otra proteína que actúa como una enzima en este transporte es la peptidasa señal, que funciona en la translocación a través de la MI y corta el péptido señal. Hay tres tipos de peptidasa señal: peptidasa señal I (LepB), que se encuentra en *E. coli*, es una proteína integral de la membrana, teniendo dos segmentos hélice transmembranales y un gran dominio periplasmático C' – terminal. Recientes datos sugieren que la Peptidasa Señal I constituye una nueva familia de proteasas de serina que no requieren residuo de histidina. La peptidasa señal II (LspA) es una proteína integral de la MI, conteniendo cuatro segmentos α hélice que cruzan la membrana y un segmento terminal que es localizado en el citoplasma. Esto sugiere que la peptidasa señal II pertenece a una nueva familia de proteasas del ácido aspártico que son activadas con un pH neutro. La tercer peptidasa se conoce como peptidasa prepilina (BipA), que se encuentra en el sistema del pili tipo IV (Stathopoulos *et al.*, 2000).

Cuando las proteínas están en el periplasma, actúan también chaperonas moleculares, las cuales previenen la degradación prematura de la proteína por las proteasas o interacciones inadecuadas que pudieran resultar en productos mal plegados (Pugsley, 1993). La formación del enlace disulfuro es vital para la estabilidad de estas proteínas en el periplasma para que puedan llegar a atravesar la ME (Stathopoulos *et al.*, 2000).

El segundo paso de este transporte es la secreción de las proteínas plegadas en el periplasma a través de la ME hacia el exterior, aquí actúa además la rama chaperona/presentador, requiriendo entre 12 a 16 proteínas accesorias dependiendo de la especie (Figura 2), el conjunto de estas es llamado secretón del SST-II (Sandkvist, 2001).

Dos de las proteínas del SST –II se encuentran ubicadas sobre la ME y son: GspD y GspS.

GspD pertenece a la familia de las secretinas y se inserta en la ME que por medio de su oligomerización, forma un anillo dodecamérico con un diámetro interno de entre 50 a 100 Å, lo suficientemente grande para permitir el transporte de los polipéptidos plegados al medio extracelular. Las secretinas son parecidas a las porinas de la ME, son muy estables y requieren de detergentes iónicos o de la adición del fenol para su disociación (Sandkvist, 2001). Tienen un dominio C' – terminal que es altamente conservado, mientras que el dominio N' – terminal es variable. El dominio C' – terminal es requerido para la inserción de la proteína en la ME y tiene la propiedad para formar los anillos oligoméricos; mientras que el dominio N' – terminal se extiende en el periplasma y facilita la interacción con otras proteínas (Filloux, 1998).

GspS, por otro lado, es una pequeña lipoproteína requerida en menor cantidad, actúa como un blanco de inserción para GspD en la ME (Thanassi and Hultgren, 2000) y además la protege contra la degradación proteolítica. La unión GspS – GspD es posible que prevenga la degradación de la proteína antes de la inserción en la membrana y puede acelerar el transporte de proteínas al exterior (Filloux, 2004).

GspB, aunque identificada en sólo unos pocos SST – II, es otro componente que interactúa con GspD, esta es una proteína secretoria que actúa como una chaperona específica ayudando a la preproteína en su translocación a través de la MI.

GspA que es una ATPasa conduce las proteínas a la MI para ser translocadas (Kihara and Ito, 1998), ésta junto con GspB regulan la secreción y juegan un papel vital en la repartición de energía para la translocación (Sandkvist, 2001).

GspC, se encuentra tanto en la MI como en la ME, es la proteína responsable de la energía para la transducción de GspD en la ME (Thanassi and Hultgren, 2000) y es posible que interactúe con GspL y M de la membrana citoplasmática, estas dos forman un complejo estable y protegen de la degradación proteolítica, sugiriendo que interactúan directamente, esta estabilización mutua se observa en *Ps. aeruginosa* y *Klebsiella oxytoca* (Sandkvist, 2001).

GspG, H, I, J y K son similares a las subunidades estructurales de pilina tipo IV, y por esta razón se les ha dado el nombre de “pseudopilinas”. Estas se exportan con un péptido señal de prepilina, que es procesada por la proteína GspO de la MI. Se ha propuesto que estas proteínas se ensamblan en una estructura tipo pili que atraviesa el periplasma y que puede ayudar en el proceso de secreción (Thanassi and Hultgren, 2000).

GspE es una ATPasa y su función es suplir energía para abrir los poros de secreción y para que se reúnan las proteínas en la formación del aparato secretor, utilizando además la fuerza protón motriz de la MI (Sandkvist, 2001).

Una posibilidad es que GspE, pueda suplir energía y promover la translocación de la membrana citoplásmica y el ensamblaje de las subunidades G, H, I, J y K del pili, después de la división y la metilación de GspO (Sandkvist, 2001)

En la secreción a través de la ME, primero actúa la proteína citoplásmica GspE que contiene un sitio de unión al ATP y un dominio de tetracisteína que se re – ensambla con un dominio de unión al zinc para disponer de la energía de adenilato kinasa. GspE interactúa con GspL que es una proteína de la MI que cruza la membrana por medio de su dominio C’ – terminal; después las proteínas GspC, K, M y N son ancladas en la MI cruzando el segmento transmembranal C’ – terminal, el cual es seguido por un gran dominio periplásmico N’ – terminal. De esta manera, estas proteínas comienzan con la formación del aparato de secreción que es anclado en el lado periplásmico de la MI; mientras que GspC forma un puente entre la MI y la ME. Esta proteína es un transductor potencial de energía para la translocación de la proteína a través de la ME; las pseudopilinas que incluyen prepilina peptidasa y sitios de metilación, están localizadas en el periplasma por lo que ensamblan el pili a

través del periplasma (un tubo de secreción), facilitando el transporte de la proteína a través de la ME (Figura 2). Por último, en la ME GspD forma canales de translocación semejantes a un poro, con un tamaño de 5 a 10 nm de diámetro lo bastante grande para permitir la secreción de las proteínas plegadas y con la ayuda de GspS, la cual interactúa con el dominio C' y N' – terminal de GspD, en el cual el dominio N' – terminal es el responsable de reconocer el sustrato y de la unión con GspC para la secreción de la proteína a través de la ME (Stathopoulos *et al.*, 2000).

Los polipéptidos secretados son considerados como una serie de amino ácidos, los cuales son transportados en una simple cadena larga, tipo rosario. En cuanto a las proteínas presecretorias, se cree que forman estructuras con vueltas en la membrana citoplásmica, y quizás están ancladas en la membrana lipídica con el péptido señal, antes de entrar por el canal de la translocasa. Por otra parte, la secuencia señal no es procesada o degradada y mantiene unido al receptor para conservar el canal abierto, este se cierra o se colapsa únicamente detrás del último residuo de proteínas secretorias (Pugsley, 1993).

En lo que respecta a las pseudopilinas, sus dimensiones son similares a las del pili tipo IV. Las pseudopilinas y las proteínas secretadas no ocupan el poro de secreción al mismo tiempo, sin embargo, algunas pseudopilinas como GspG participan en la secreción actuando como un pistón que empuja las proteínas secretadas a través del poro de secreción (secretina GspD). Esto ocurre por la extensión y retracción de las pseudopilinas ancladas a la membrana citoplasmática. La polimerización y retracción de las pseudopilinas del aparato de secreción tipo II, empujan las proteínas secretadas a través del poro de secreción abriendo el poro y permitiendo la translocación de las proteínas a través de la ME (Pugsley, 1993; Soto, 1998). Aquí actúa GspE, que promueve la formación de las pseudopilinas y forma un poro a través del cual las pseudopilinas son transportadas y subsecuentemente ensambladas con un mecanismo que requiere un proceso repetitivo de la unión y la hidrólisis de ATP que promueve el crecimiento del filamento, permitiendo que se contraiga la MI hacia la ME. GspA funciona como una ATPasa que permite la retracción del mismo (Sandkvist, 2001).

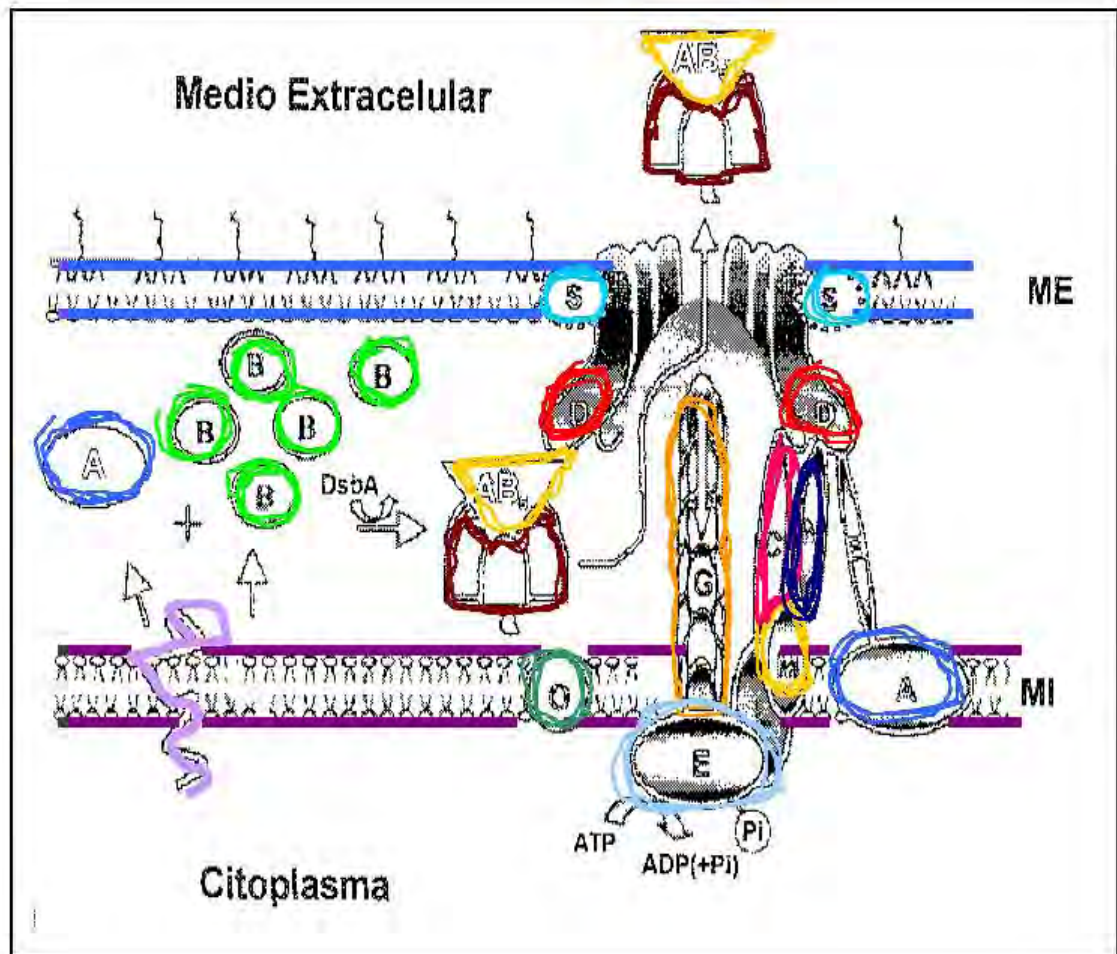


Figura 2. Translocación de las proteínas hacia el medio extracelular, secreción. Se indica el paso de la proteína (morado) del citoplasma al periplasma con ayuda del sistema Sec. SecA (azul) y SecB (verde), ayudan a la proteína previniendo la degradación en el periplasma con la formación del enlace disulfuro. Las proteínas GspG, H, I, J y K (naranja), son pseudopilinas que forman el pili para la secreción de la proteína hacia el exterior de la célula, GspE (azul claro) sule de energía para abrir el poro de secreción y para que se reúnan las proteínas para formar el aparato secretor. GspD (rojo) forma el anillo dodecamérico para permitir el paso de la proteína junto con GspS (azul turquesa) que actúa como blanco de inserción en la ME y la protege contra la degradación proteolítica (Sandkvist, 2001).

Cuadro 1. Distribución y localización subcelular de los componentes del Sistema de Secreción Tipo II (SST –II)

Especies	Productos de los genes del <i>locus gsp</i> del SST - II y su localización subcelular															
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	
<i>V. cholerae (eps)</i>		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	VcpDo
<i>A. hydrophila (exe)</i>		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	TapDo
<i>E. coli (gsp)</i>		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M		O
<i>K. oxytoca (pul)</i>	S		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
<i>E. chrysant (out)</i>	S		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M		O
<i>E. carotovora (out)</i>	S		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
<i>P. aeruginosa (xcp)</i>				Pc	QD	RE	SF	TG	UH	VI	WJ	XK	YL	ZM		Ao/PilD
<i>X.campestris (xcp)</i>					D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	PilDo
<i>L. interrogans</i>	Ph	Ph	Ph	Ph	D	E	F	G	Ph	Ph	Ph	e	f	Ph	Ph	Ph /Ph
Localización	ME	MI	MI	MI/ E	ME	C	MI	MI/ E	MI/ M	MI/ M	MI/ ME	MI/ E	MI	MI	MI	MI

(Sandkvist, 2001)

MI: Membrana Interna

ME: Membrana Externa

C: Citoplasma

Ph: Proteína hipotética

e: EtpK similar a GspK

f: FtsA proteína de filamento

VIII. HIPÓTESIS

Leptospira interrogans serovariedad Icterohaemorrhagiae cepa RGA posee un *locus gsp* similar al de *L. interrogans* serovariedad Copenhageni cepa Fiocruz.

IX. OBJETIVO GENERAL

Secuenciar parcialmente el *locus gsp* que codifica genes del Sistema de Transporte Tipo II en *Leptospira interrogans* serovariedad Icterohaemorrhagiae cepa RGA

X. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar y secuenciar el *locus gsp* en *Leptospira interrogans* serovariedad Icterohaemorrhagiae cepa RGA
- Comparar la organización genética del *locus gsp* de *L. interrogans* serovariedad Icterohaemorrhagiae con las bases de datos

XI. MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en el Laboratorio del Grupo de Investigación en *Leptospira* y Leptospirosis del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) comprendiendo el periodo de agosto del 2004 a Abril de 2006.

Condiciones de cultivo

Se utilizó la cepa RGA de *Leptospira interrogans* serovariedad Icterohaemorrhagiae donada por el Dr. Lee Smythe del WHO/FAO/OIE Collaborating Centre for Reference and Research on Leptospirosis, Australia and Western Pacific Region de Brisbane, Australia; y se procedió a cultivarla en 100 ml de medio Ellinghausen – McCullough modificado por Johnson y Harris (EMJH). La observación del desarrollo de esta serovariedad se realizó por medio del microscopio de CO (400x) y a partir de un cultivo con una cuenta de 1.6×10^7 lept/ml.

Extracción de ADN

Se utilizó el método descrito por Ausubel *et al.* (1997), con N-cetil trimetil bromuro de amonio (CTAB). Primero el cultivo de *Leptospira* se centrifugo en tubos de 30 ml a 16,000 rpm durante 40 minutos a 4 °C, Se decanto el medio y el pellet de leptospirosas se resuspendió en 4.2 ml de buffer tris-etilen-dinitrilo-tetracetato sódico (TE, Tris-EDTA), se agregaron 225 µl de solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% y 22.5 µl de Proteínasa K (20 mg/ml). Esta mezcla se incubo a 37 °C por 1½ hr, para posteriormente agregar 1 ml de solución de cloruro de sodio (NaCl) 5M y 680 µl de N-cetil trimetil bromuro de amonio (CTAB) al 10% precalentado a 65 °C. Se mezclan y se incuban a 65 °C durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, se agrega en tubos eppendorf de 1.5 ml un volumen igual de 1:1 cloroformo:alcohol isoamilico (24:1), se mezcla y se centrifugo a 13,000 rpm por 5 minutos, Después de la centrifugación se retiro el sobrenadante en un tubo nuevo y se repitió el mismo paso hasta que el sobrenadante se observo incoloro. El sobrenadante se

transfirió a un tubo con 60% de isopropanol y se agito para centrifugarlo a 13,000 rpm durante 15 minutos. Terminado este tiempo, se observo el pellet de ADN y se decantó cuidando de no fraccionar el pellet y se lavó 2 veces con 1 ml de etanol al 70% almacenado a -20 °C. Por último se dejó secar a temperatura ambiente y se disolvió en 100 µl de agua desionizada estéril (Ausubel *et al.*,1997).

Concentración de ADN

La concentración de ADN de leptospira (ng/µl) se determinó por medio de un espectrofotómetro Pharmacia Biotech Ultrospec 300, con una absorbancia de 260 nm (Sheik, 1984). Esta medición se realizó mediante una cubeta de cuarzo con 1 ml de agua desionizada estéril y 2 µl de la muestra requerida, utilizando la fórmula de (lectura de absorbancia de la muestra)(factor del aparato = 45)(Factor dilución) con una lectura en µg/ml que se pasó a ng/µl (Sambrook *et al.*,1989).

Selección de los iniciadores

Con la finalidad de amplificar fragmentos de ADN de *Leptospira interrogans* serovariedad Icterohaemorrhagiae cepa RGA, se diseñaron unos iniciadores de 18 pb, para lo cual se tomó como referencia la secuencia del locus *gsp* de *Leptospira interrogans* serovariedad Copenhageni cepa Fiocruz (Cuadro 2). Los iniciadores fueron diseñados considerando un mínimo del 33% de G–C y la presencia de Gs o Cs en el extremo 3'. Esta secuencia se seleccionó debido a que Icterohaemorrhagiae y Copenhageni pertenecen a la misma especie y serogrupo.

Cuadro 2. Proteínas del *locus gsp* (Figura 3) de *Leptospira interrogans* serovariedad Copenhageni cepa Fiocruz (Nascimento *et al.*, 2004).

Gen	Proteínas para las que codifican los genes	Clave de la secuencia
Gen Reverso	Subunidad ChII de una quelatasa de Mg	LIC11566
Gen 1	Supuesta lipoproteína	LIC11567
Gen 2	Peptidasa membranal	LIC11568
Gen 3	Proteína Hipotética	LIC11569
Gen 4	GspD secretina del SST-II	LIC11570
Gen 5	GspE ATPasa del SST-II	LIC11571
Gen 6	GspF proteína del SST-II	LIC11572
Gen 7	GspG pseudopilina del SST-II	LIC11573
Gen 8	Proteína Hipotética	LIC11574
Gen 9	Proteína Hipotética	LIC11575
Gen 10	Proteína Hipotética	LIC11576
Gen 11	EtpK similar a GspK del SST-II en <i>E. coli</i>	LIC11577
Gen 12	FtsA proteína de filamento en la división celular en <i>E. coli</i>	LIC11578
Gen 13	Proteína Hipotética	LIC11579
Gen 14	Proteína Hipotética	LIC11580
Gen 15	Proteína Hipotética	LIC11581
Gen 16	Proteína Hipotética	LIC11582
Gen 17	Proteína Hipotética	LIC11583
Gen Reverso	Regulador transcripcional (familia TetR)	LIC11584

Secuencia de los iniciadores

Los iniciadores se mandaron a sintetizar al Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM en Cuernavaca, Morelos (Cuadro 3 y 4).

Cuadro 3. Iniciadores utilizados para secuenciar el *locus gsp* de *Leptospira interrogans* serovariedad Icterohaemorrhagiae cepa RGA para la PCR (Figura 4)

Clave BAP	Secuencia de los iniciadores	Región que amplifica	Gen en donde se localiza
A*2366 R*2378	5' TAA CAA GAA GTT GGC GGG 3' 5' CGA TTG CAC CTA TGA CCG 3'	A (quelatasa Ch II -MAL 2)	quelatasa Ch II Gen1-Sup. Lip Gen 2-Pept m
A*2377 R*2367	5' GAG TCG TAT CCT TTG CCG 3' 5' TCT TTA TGG CCA ACC GCC 3'	B (MAL 2-4)	Gen 3 – Prot. H Gen 4 – <i>gspD</i>
A*2368 R*2380	5' TTA CTT CTC CTA ATA CGG 3' 5' GAA GTA ATC AGA TAG GGC 3'	C (MAL 4-5)	Gen 5 – <i>gspE</i>
A*2379 R*2369	5' AAC GGA TCG TAA TGA GGC 3' 5' ATC AAA AGA CCC ATA ACC 3'	D (MAL 5-6)	Gen 6 – <i>gspF</i>
A*2370 R*2382	5' TTC TTT TGA GCA ACC GGG 3' 5' GTT AGG ATG AGT AGC CGC 3'	E (MAL 6-10)	Gen 7 – <i>gspG</i> Gen 8– Prot. H
A*2381 R*2371	5' GTT ACG ATC AAA TAT CCC 3' 5' ACT TGA CCA ACC GCT ACG 3'	F (MAL 9-11)	Gen 9 -10 pH Gen 11– <i>etpK</i>
A*2372 R*2384	5' ACC GCA TAC ATT CCT TCG 3' 5' AAA CGG CGC TTA CAT CGG 3'	G (MAL 11-13)	Gen 12 – <i>ftsA</i>
A*2383 R*2373	5' GAA AGT CAC CAA TAA GCC 3' 5' TTC CGA CAT CGT TTC GCT 3'	H (MAL 12-14)	Gen13– prot. H
A*2374 R*2386	5'ATG TAT TCC TGT GAT GGG 3' 5' ATT TGA TCA TTG CTG GGG 3'	I (MAL 14 – 17)	Gen 14-prot. H Gen 15-prot. H
A*2385 R*2375	5' TGT GAT CGT TCC GAT CGC 3' 5' TCA TGT CTG CTG ACA AGG 3'	J (MAL 16 - R)	Gen 16-prot. H Gen 17-prot. H

Se indica la orientación de los iniciadores (A* Iniciador adelantado; R* Iniciador reverso), la composición nucleotídica, la región sobre la que amplifica y el gen donde se localiza respecto al *locus gsp* de *Leptospira interrogans* serovariedad Copenhageni cepa Fiocruz.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La concentración de ADN que se utilizó para la PCR fue de 400 ng/μl, se ocupó un termociclador de gradientes de temperatura PCR-Express y un termociclador normal Perkin Elmer 2400 PCR System. Este se utilizó para una reacción de 50 μl, la cual contenía 30 μl de agua desionizada estéril, 3 μl de 10 mM de una mezcla de dNTPs, 5 μl de solución amortiguadora para PCR (10 X); 5 μl MgCl₂ 25 mM, 2 μl de cada iniciador (diluido 1:10) con una concentración aproximada de 20 pmol, 3 μl de ADN diluido en 100 μl de agua desionizada estéril y 5 unidades de la enzima *Taq* ADN polimerasa, esta mezcla se realizó en tubos de 0.2 ml. La PCR tuvo las siguientes condiciones de amplificación: 5 minutos a 94° C en la desnaturalización inicial, 40 segundos a 94° C de desnaturalización, la temperatura de la alineación dependía de la T_m (temperatura de fusión) del iniciador (50 – 56 °C) y se llevó a cabo durante 1 minuto, el tiempo de la extensión dependía del tamaño del fragmento que se amplificó (1.4 – 2.5 kb) a 72° C, por un total de 30 a 40 ciclos (dependiendo del tamaño del fragmento), con una extensión final de 7 minutos a 72°C. La amplificación de los productos y la identificación de las bandas de ADN se visualizó mediante una electroforésis en gel de agarosa al 1%. El tamaño de los fragmentos fue determinado por comparación con un marcador de peso molecular Lambda ADN / EcoRI + HindIII Marker 3, el cual genera fragmentos de 564, 831, 947, 1375, 1584, 1904, 2027, 3530, 4268, 4973, 5148 y 21226 pb. El ADN fue visualizado mediante una tinción de los geles de agarosa con 5 μl de bromuro de etidio (10 mg/ml), el cual es capaz de fluorescer con luz ultravioleta, este compuesto se intercala entre las cadenas de ADN, de tal forma que las muestras de ácido nucleico aparecen fluorescentes en los geles de agarosa y se observó en un transluminador UV Fotodyne Mod. 30-3025. Posteriormente las bandas de ADN fueron registradas en un equipo de analizador de geles BIO-RAD modelo Fluor –S tm Multilmager.

Purificación y secuenciación

La purificación de los fragmentos amplificados se realizó por medio del método de columna (QIAquick, gel extraction kit Quiagen) y se llevó al Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM en Cuernavaca Morelos para su secuenciación. Los fragmentos fueron secuenciados utilizando la solución de secuenciación PRISM Ready Reaction secuenciadores automáticos Perkin – Elmer. Para esto, se entregaron con los siguientes requisitos: un volumen final ADN y de iniciador de 16 µl cada uno en un tubo Eppendorf de 0.2 ml. El iniciador tuvo una concentración de 10 pmol/µl y el producto de PCR (10 ng de producto de iniciador por cada 100 pb)

Construcción de la secuencia del *locus gsp* de *Leptospira interrogans* serovariedad Icterohaemorrhagiae cepa RGA.

Las secuencias de ADN fueron analizadas mediante el programa de cómputo Secuencer 4.0 y se compararon las secuencias del *locus gsp* de las serovariedades Icterohaemorrhagiae y Copenhageni así como con otras secuencias en las bases de datos mediante el programa BLAST de National Center for Botechnology Information (National Center for Bacteriology and Information NCBI).¹

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.

Cuadro 4. El siguiente cuadro indica unos nuevos iniciadores que se diseñaron para terminar de alinear los fragmentos en el *locus gsp*.

Clave BAP	Secuencia de los iniciadores	Región que amplifica	Gen en donde se localiza
R*2395	5' AAC TCT TCT TCT TCT GGG 3'	K	MAL 12- 14
A*2397	5' AAG AGT CAA AAC CAA AGG 3'	L	MAL 6 – 10
R*2396	5' AAA TTC GTT CAC TCT TTC 3'		
A*2399	5' ATC GTT ATC CTA AAT CGG 3'	M	MAL 9 -11
R*2398	5' TTT TCT CGT TTG ATA CCG 3'		
A*2400	5' ATT CAA TTG AAT CTG TCC 3'	N	MAL 6 – 10
A*2402	5' ACT TCG GAA CTA GAG TCC 3'	O	MAL 11 – 13
R*2401	5' AGT TCC TGA ATC TGA GGG 3'		
A*2419	5' TGA AAA GCC CAC CAC GGG 3'	P	MAL 11 – 13
R*2420	5' ACT TCG GAA CTA GAG TCC 3'		
R*2421	5' TTT ACG TGA GGT GTG TCG 3'	Q	MAL 6 – 10
A*2423	5' TAG ATA AGA TCA AGG CGG 3'	R	MAL 4 – 5
R*2422	5' TCT ATA TCC TTA CCA GCC 3'		
A*2424	5' AAA CTA TTC CTA TCA CCC 3'	S	MAL 12 – 14
R*2425	5' ATA AGA ATC AGA ACC GCC 3'		
R*2426	5' TTC TAC TAC TCC GAA ACC 3'	T	MAL 2 – 4
A*2427	5' TCA ATC TAT CGT GAT CGG 3'	U	MAL 4 – 5
R*2428	5' AGA GTT TGG ATA GGG CGC 3'		

Se indica la orientación de los iniciadores (A* Iniciador adelantado; R* Iniciador reverso), la composición nucleotídica, la región sobre la que amplifica y el gen donde se localiza respecto al *locus gsp* de *Leptospira interrogans* serovariedad Copenhageni cepa Fiocruz.

XIII. RESULTADOS

Observación de ADN. Después de realizar la extracción de ADN, se llevó a cabo una electroforésis en gel de agarosa al 1% y el gel se tiñó con bromuro de etidio para verificar la integridad del ADN, el cual tuvo una concentración de 405 a 600 ng/ μ l según la medición del espectrofotómetro. El ADN se disolvió en 1 ml de agua desionizada estéril y se mantenía en congelación a 4°C para que no se fragmentara y perdiera la concentración con DNAsas.

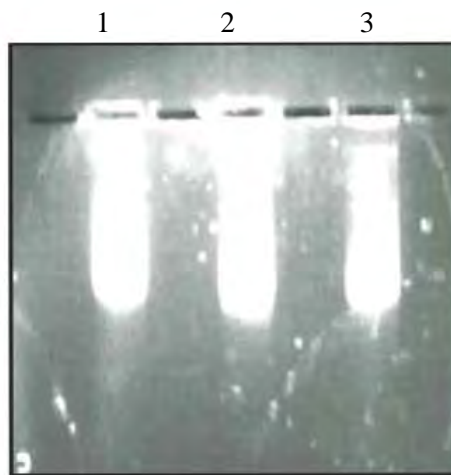


Figura 5. Observación de la extracción de ADN. En el carril 1 se colocaron 5 μ l de ADN; en el carril 2, 6 μ l de ADN y en el carril 3, 7 μ l de ADN.

Se realizó la amplificación de los fragmentos A, B y C con un tamaño de 2.3 Kb con una temperatura de 55°C, 2.1 Kb con una Tm de 56°C y 2.5 Kb a 51°C, respectivamente, ésto se llevó a cabo mediante el método de la PCR, utilizando la técnica descrita en material y métodos.

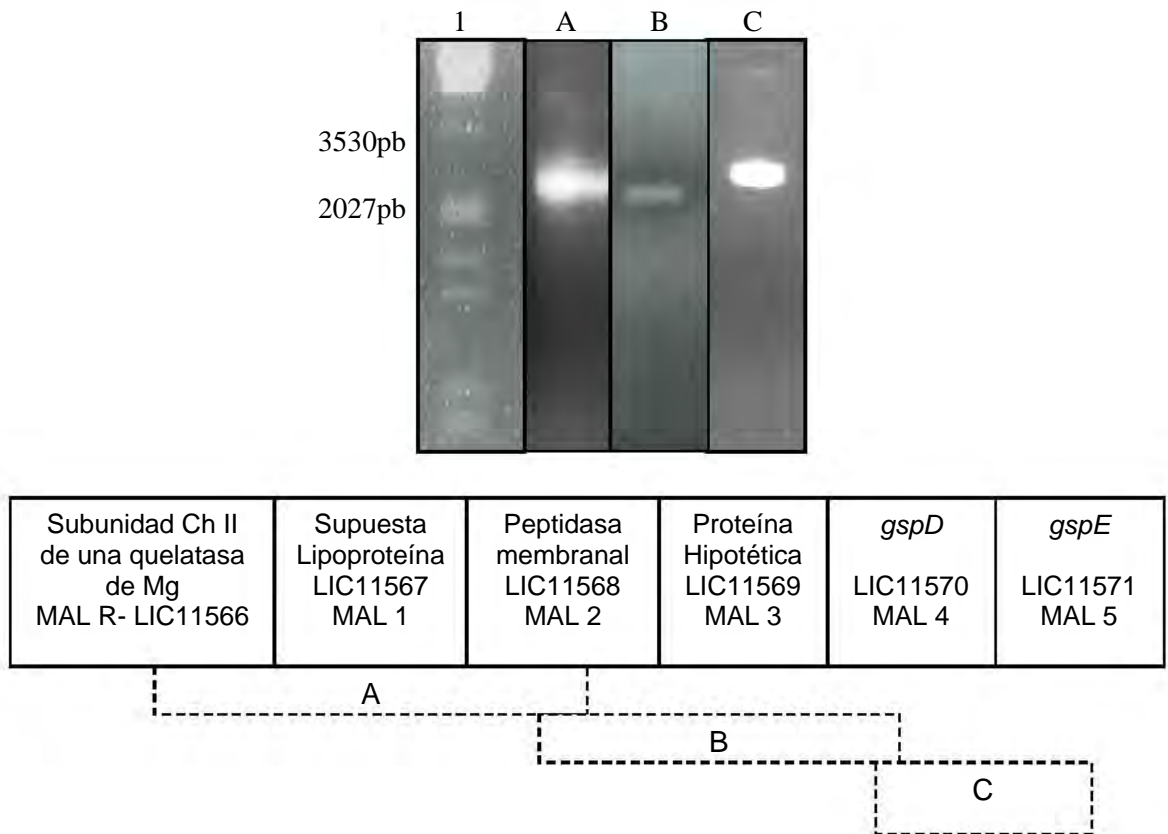


Figura 6 Amplificación mediante el método de PCR, en el carril 1 se ve el marcador, el carril 2 tiene el fragmento A, en el carril 3 se observa el fragmento B; en el carril 4 el fragmento C.

Para encontrar la temperatura adecuada de los fragmentos se utilizó un termociclador de gradientes en temperaturas de 50° a 58°C, esto dio mejores resultados en la búsqueda de los tamaños requeridos. El fragmento D, con un tamaño de 2 Kb a 52°C, fragmento E de 2.3 Kb a 55°C y el fragmento F de un tamaño de 1.9 Kb con una temperatura de 53°C.

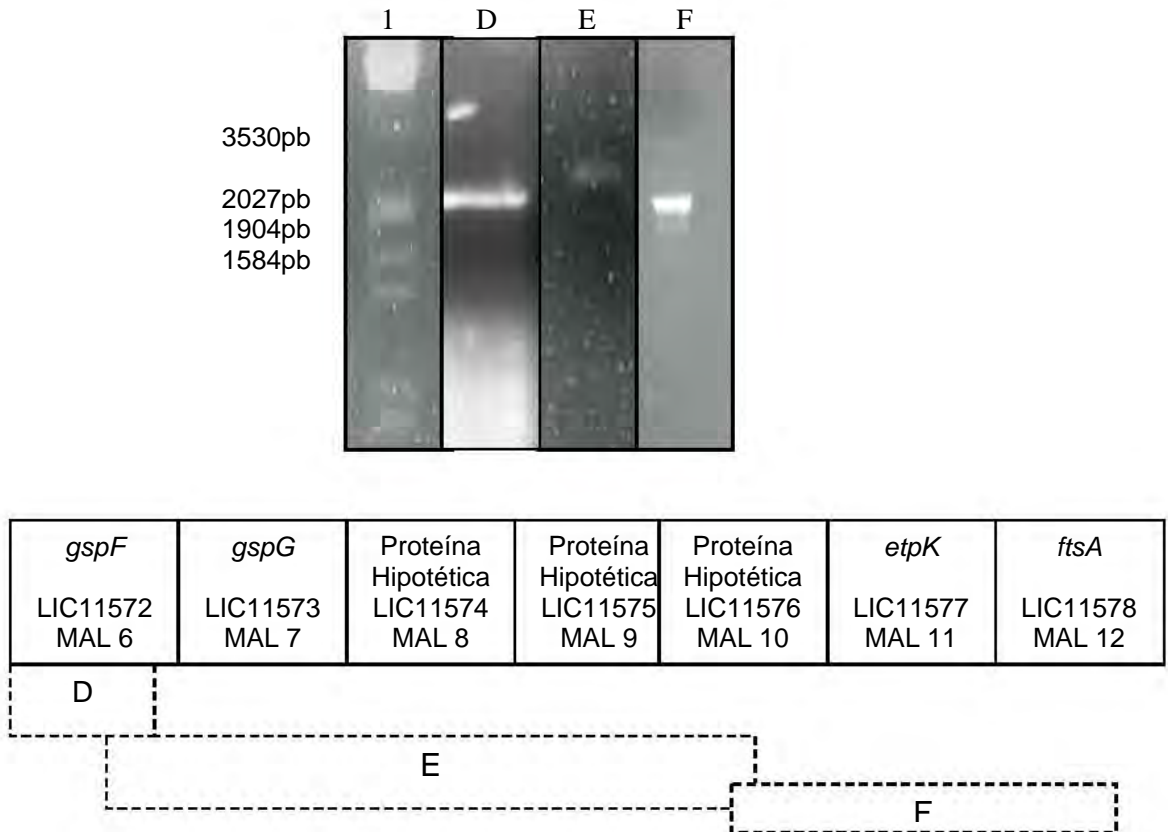


Figura 7 Fragmentos amplificados con ADN de *Leptospira interrogans* SV Icterohaemorrhagiae cepa RGA. En el carril 1 marcador, carril 2 fragmento D, carril 3 fragmento E y en el carril 4 el fragmento F.

En este esquema el fragmento G con un tamaño de 2.2 Kb se puso a una temperatura de 55°C, el fragmento H de 1.7 Kb con una temperatura de 53°C, el fragmento I de 2 Kb con una Tm de 52°C y el fragmento J con un tamaño de 1.4 Kb a 55°C.

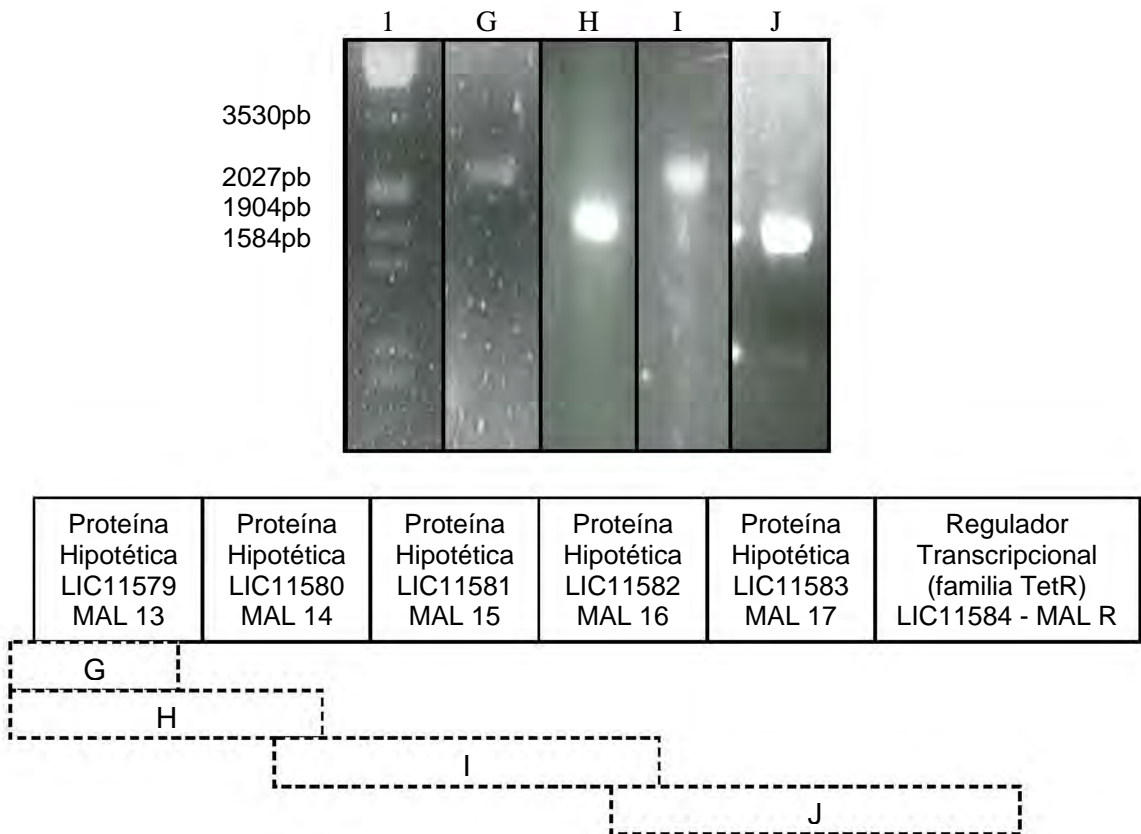


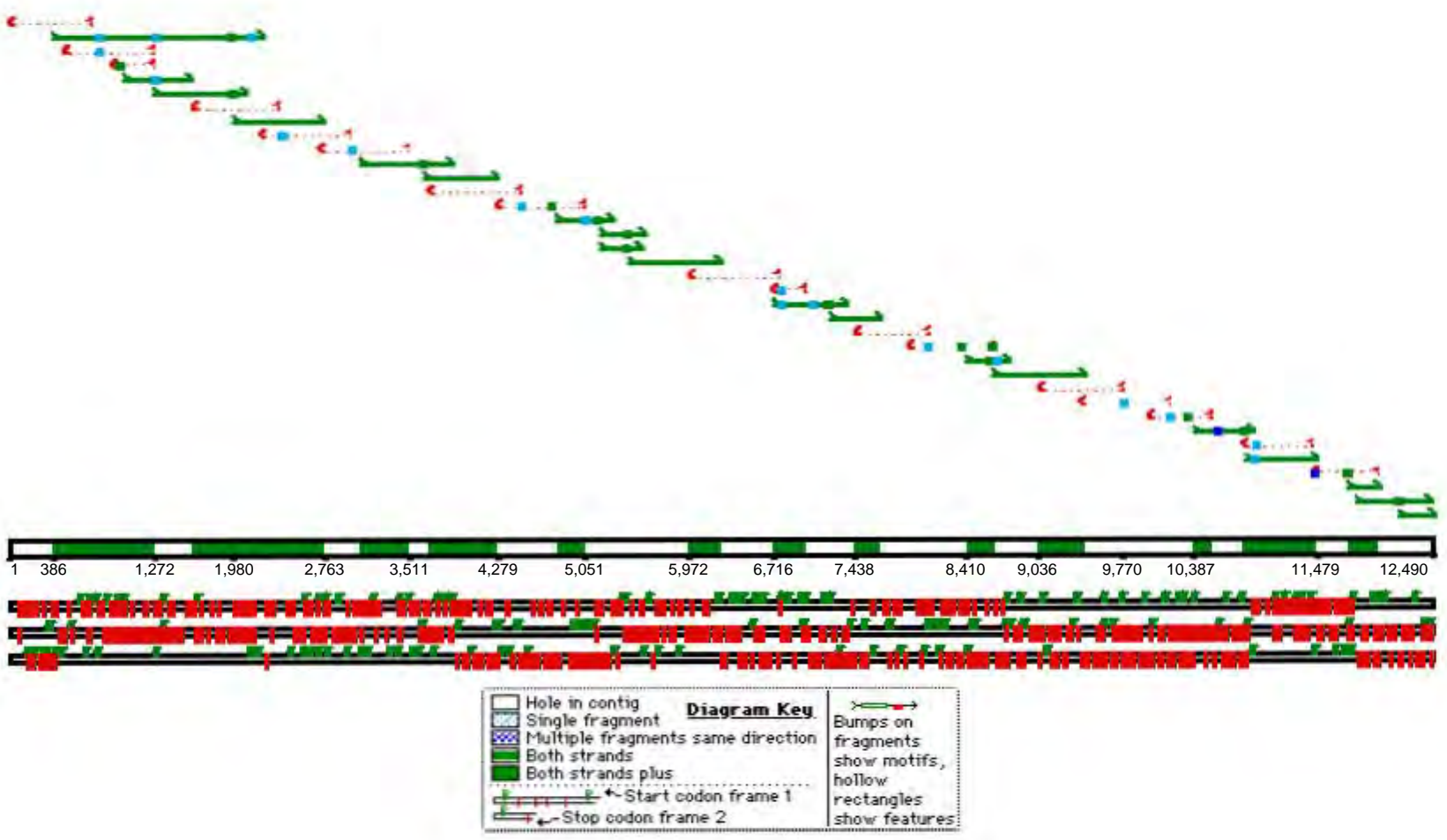
Figura 8 Fragmentos amplificados con ADN de *Leptospira interrogans* SV Icterohaemorrhagiae cepa RGA. En el carril 1 se muestra el marcador, carril 2 fragmento G, en el carril 3 fragmento H, en el carril 4 se muestra el fragmento I y en el carril 5 el fragmento J.

Además de estos fragmentos, para llenar huecos en la secuencia se buscaron otros iniciadores y se realizaron más PCRs para terminar la alineación.

Cuadro 5. Porcentaje de la identidad de nucleótidos y aminoácidos de *Leptospira interrogans* serovariedad Icterohaemorrhagiae cepa RGA con *Leptospira interrogans* SV Copenhageni cepa Fiocruz y *Leptospira biflexa* SV Patoc en GspD y GspE, y con Copenhageni en GspF, GspG, Proteínas Hipotéticas, EtpK y FtsA (MAL 4 al 12) (Nascimento *et al.*,2004; Mena 2006).

Proteínas del SST – II	Identidad de nucleótidos Copenhageni	Identidad de aminoácidos Copenhageni	Identidad de nucleótidos Patoc	Identidad de aminoácidos Patoc
GspD secretina del SST-II	100%	100%	82%	82%
GspE ATPasa del SST-II	100%	C 100%	82%	82%
GspF proteína del SST-II	100%	100%		
GspG pseudopilina del SST-II	100%	100%		
Proteína Hipotética	100%	100%		
Proteína Hipotética	100%	100%		
Proteína Hipotética	100%	100%		
EtpK similar a GspK del SST-II	100%	100%		
FtsA proteína de filamento	100%	100%		

Figura 9. Fragmento del locus *gsp* de *Leptospira interrogans* SV Icterohaemorrhagiae cepa RGA secuenciado



XIII. Discusión y Conclusiones

La secuencia completa de los genomas de *Leptospira interrogans* serovariedades Copenhageni cepa Fiocruz y Lai cepa 56601 (Nascimento, 2004; Ren 2003), son importantes herramientas de investigación para el avance de los estudios sobre las propiedades antigénicas, las bases patogénicas y otras propiedades biológicas de esta bacteria.

Actualmente, un prerequisite para el entendimiento de las bases genéticas de la biología de un organismo es la determinación de la secuencia completa de su genoma (Fleischman *et al.*, 1995). En este trabajo se obtuvo la secuencia parcial del *locus gsp* que codifica las proteínas del Sistema de Transporte Tipo II, de las cuales, se ha reportado poco en el género *Leptospira*.

En este estudio, se destaca que en *Leptospira interrogans* serovariedad Icterohaemorrhagiae 9 de los 17 genes descritos en la serovariedad Copenhageni; se encuentran conservados y en el mismo orden, en contraste con otras bacterias que utilizan también este sistema, que incluyen de 12 a 16 genes dependiendo de la especie. (Sandkvist, 2001). Esto sugiere que podría haber más proteínas necesarias para el funcionamiento del STT-II en *Leptospira interrogans*.

Un análisis del *locus gsp* de 2 cepas de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo², muestra sólo 14 MAL en contraste con las 17 MAL observados en los genomas de *Leptospira interrogans*.

El genoma de *L. interrogans* contiene mínimo 263 genes que codifican para proteínas de membrana en la superficie expuesta, de las cuales no se conocen 250 (Nascimento, 2004). Se ha sugerido que el transporte de las proteínas de membrana a la superficie de *Leptospira* es mediada por proteínas de la vía Sec, combinada con la señal de peptidasa I (LepB), la vía de biosíntesis de lipoproteínas y las proteínas que actúan en el transporte e incorporación de lipoproteínas en la ME (Nascimento, 2004).

² Bulach *et al.*, Zuerner *et al.*, Comunicación Personal

Por otra parte, se observó que la técnica de PCR fue exitosa para la amplificación de estos fragmentos, sin embargo en esta investigación se requirió una concentración alta de ADN (400 ng/μl), ya que se observó que con menor cantidad no amplificaban los fragmentos requeridos.

En este trabajo se amplificaron algunos fragmentos del *locus gsp* por medio de la técnica de PCR, que incluyen 9 de los 17 genes del SST-II homólogos a: *gspD* (LIC11570), *gspE* (LIC11571), *gspF* (LIC11572), *gspG* (LIC11573); Ph (LIC11574), Ph (LIC11575), Ph (LIC11576), *etpK* (LIC11577) y *ftsA* (LIC11578) de *Leptospira interrogans* serovariedad Copenhageni cepa Fiocruz localizados en un fragmento de ADN con una longitud de 10,387 pb. Las secuencias de los fragmentos resultaron en longitudes de 300 a 500 pb lo que dio un fragmento limpio de sales y proteínas y que por lo tanto resultaron en una buena secuenciación.

Al analizar la identidad de las secuencias en el programa de cómputo BLAST-N con otras bacterias, resultó un 100% de identidad a nivel de nucleótidos con Copenhageni, lo cual era de esperarse, ya que son de la misma especie.

Cuando se comparó con la serovariedad apatógena Patoc de *Leptospira biflexa*, se encontró una identidad con *gspD* y *gspE* del 82%, además de otras bacterias que poseen este tipo de sistema de secreción (Mena, 2006)

Las identidades de los genes del *locus gsp* entre *L. interrogans* serovariedades Icterohaemorrhagiae, Copenhageni y Lai reflejan en cierto modo, la adaptación a los distintos reservorios, *Rattus norvegicus* en el caso de las serovariedades Icterohaemorrhagiae y Copenhageni y *Apodemus agrarius* en el caso de la serovariedad Lai. Se ha sugerido que los mecanismos de adaptación de los reservorios incluye probablemente modificaciones en los polisacáridos de superficie (Nascimento, *et al.*, 2004).

Los estudios sobre los genes del *locus gsp* que codifican para la síntesis de proteínas en el Sistema de Secreción Tipo II, provee nuevos conocimientos para el entendimiento del metabolismo y la patogénesis de *Leptospira* así como de alternativas para la prevención y tratamiento de la leptospirosis. Un grupo de

proteínas que conforman el Sistema de Secreción Tipo II (SST-II) incluyen aquellas PME's con funciones de translocación de proteínas al exterior de la célula bacteriana. Estas PME's como GspD, son actualmente objeto de estudio debido a su localización sobre la superficie externa del microorganismo y a su amplia conservación entre SV's patógenas de *Leptospira*, con la finalidad de encontrar un antígeno protector común contra la leptospirosis.

XV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Erosa BA. Leptospirosis. Rev Biomed 2001; 12:282 – 287
2. Adler B, De la Peña MA. Leptospirosis. Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO. Patogénesis of bacterial infections in animals. Blackwell Publishing 3era ed 385-392.
3. Lee CR, Cumley WR. Leptospirosis, enfermedad de Weil. El libro de la salud. Editorial Continental 1984.
4. Braselli,A;2002.
<http://www.infecto.edu.vy/revisiontemas/tema25/leptospirosis.htm>
5. Colin JR, Trujillo B, Caballero S. Seroprevalencia a leptospirosis en trabajadores de un rastro de la ciudad de Colima. “Leptospirosis Habana- 2004” Segundo taller internacional y segunda reunión científica. Cuba, Mayo 2002.
6. Noguchi H, Kheger J. Immunological studies with a strain of *Leptospira* isolated from a case of yellow fever in Merida, Yucatán. J Exp Med 1920; 32:627 – 630
7. Gavaldón DG, Cisneros MA, Rojas N, Moles CLP. La importancia de la leptospirosis humana en México. Detección de anticuerpos antileptospira en una población de donadores de sangre. Gac Méd Mex 1997; 131:1523 – 1528.
8. Zavala VJ, Pinzón CJ, Flores CM, Damián CA. La leptospirosis en Yucatán. Estudio serológico en humanos y animales. Sal Púb Méx 1984; 26:254 – 259.
9. Thiermann AB. Leptospirosis: Current Developments and Trends. JAVMA 1984, 73: 722-725.
10. Prescott JF. Leptospirosis. Apuntes de curso. Department of Veterinary Microbiology; University of Guelph; Canada.1992; 1-20

11. Benenson A. Manual para el control de las enfermedades transmisibles. Páb. Científ 1997; Núm. 564.
12. Ellis WA. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. Vet Clin North Am 1994; 10: 463-478.
13. Zepeda MOO, Sánchez MPH. Algunas consideraciones para el diagnóstico de la Leptospirosis en el laboratorio. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos – Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. Folleto Tecnológico para Técnicos N. 1 Diciembre 1987; 1 – 8.
14. Matsunaga J, Barocchi MA, Croda J, Young TA, Sánchez Y, Siqueira I, Bolin CA, Mitermayer GR, Lee W, Haake DA, Ko AI. Pathogenic *Leptospira* species express surface – exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. Molec Microbiol 2003; 49: 929 – 945.
15. Blood DC, Radostits OM, Henderson JA. Veterinary Medicine. 6 Ed. 1982; 675-685.
16. Jiménez GE, Díaz RC, Doperto DJM. Detección de anticuerpos contra *Leptospira* de 4354 sueros porcinos. Vet Méx 1986; 17:35 - 38
17. Chamizo E. Manual de Patología Veterinaria Especial. Ed. ISCAH. 1998; 269-271.
18. Mims CA, Playfair JHL, Roitt IM, Wakelin D, Williams R. Leptospirosis. Medical Microbiology St Louis. Mosby Yearbook Publisher 1993.
19. Smith CR, Hetterer PJ, McGowan MR, Corney BG. A review of laboratory techniques and their use in the diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo infection in cattle. Aust Vet J 1995; 71:290 – 294.
20. Tepstra J, Hartskeerl R, Smits L, Korver H. International course in laboratory techniques for the diagnosis of Leptospirosis. INCIENSA Costa Rica ; 1998.

21. Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng R, *et al.* Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole – genome sequencing. *Nature* 2003; 422:888-893.
22. Seijo A, Coto H, San Juan J, Videla J, Deodato B, *et al.* Distrés respiratorio debido a hemorragia pulmonar por leptospirosis. Una modalidad clínica no habitual en Buenos Aires. *Medicina* 2002; 62:132-140.
23. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and Leptospirosis, 2nd ed. Med Sci Melbourne (Australia) 1999.
24. Myers DM. Manual de métodos para el diagnóstico de laboratorio de la Leptospirosis. Centro panamericano de zoonosis. Organización panamericana de la salud Oficina sanitaria panamericana. Oficina regional de la organización mundial de la salud 1985.
25. Fukunaga M, Horie I, Mifuchi I, Takemoto M. Cloning, characterization and taxonomic significance of genes for the 5S ribosomal RNA of *Leptonema illini* strain 3055. *Journal of General Microbiology* 1991; 137: 1523– 1528.
26. Belfaiza J, Guillou Y, Margarita D, *et al.* Operator – constitutive mutations of the *Escherichia coli* MetF gene. *J Bacteriol* 1987; 169:670-674.
27. Cuadrado Y, Fernandez M, Recio E, Aparicio JF, *et al.* La sobreexpresión de los genes *ask* y *asd* en *Streptomyces* ssp NRRL 5331 incrementan la producción de aminoetoxivinil glicina (AVG) un inhibidor de la etileno sintetasa de plantas. *Sociedad española de bioquímica y biología molecular. Reunión genética molecular y biotecnología* 2002.
28. Jackson L, Blake T, Green J, *et al.* Regulation of *ndh* expression in *Escherichia coli* by Fis. *Microbiology* 2004; 150:407-413.
29. Nascimento A, Ko A, Martins EAL, Monteiro VCB, *et al.* Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *Journal of Bacteriology* 2004; 186: 2164– 2172.

30. Bonifaz NA. Historia, forma y tamaño; nutrición y división celular; Biología, Unidad, Diversidad y Continuidad de los seres vivos. Edit Continental 1982.
31. Desvaux M, Parham NJ, Scott TA, Henderson IR. The general secretory pathway: a general misnomer?. *TRENDS in Microbiology* 2004; 12:306 – 315.
32. Francetic O, Belin D, Badaut C, Pugsley PA. Expression of the endogenous type II secretion pathway in *Escherichia coli* leads to chitinase secretion. *The EMBO Journal* 2000; 19:6697-6703.
33. Stathopoulos C, Hendrixson DR, Thanassi DG, Hultgren SJ, Geme III JS, Curtiss R. Secretion of virulence determinants by the general secretory pathway in Gram – negative pathogens: an evolving story. *Microbes and Infection* 2000; 2:1061 – 1073.
34. Thanassi DG, Hultgren SJ. Múltiple pathway allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Current Opinion in Cell Biology* 2000; 12:420 – 430.
35. Russel M. Macromolecular assembly and secretion across the bacterial cell envelope: type II protein secretion systems. *J Mol Biol* 1998; 279:485 – 499.
36. Sandkvist M. Biology of type II secretion. *Molec Microb* 2001; 40:271 – 283.
37. Pugsley PA. General Secretory Pathway. *Microbiol Rev* 1993; 57:51 – 97.
38. Filloux AM, Chery BM. GSP – dependent protein. *Microbiol Rev* 1998; 22: 177 – 198.
39. Filloux A. The underlying mechanisms of type II protein secretion. *Biochimica et Biophysica Acta* 1694 (2004); 163 – 179.
40. Kihara A, Ito K. Translocation, folding, and stability of the HflKc complex with signal anchor topogenic sequences. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273:29770 – 29775
41. Soto GE, Dodson KW, Ogg D, Liu C, Heuser J, Knight S, Kihlberg J, Jones HJ, Hultgren SJ. Periplasmic chaperone recognition motif of

- subunits mediates quaternary interactions in the pilus. EMBO J 1998; 17:6155 – 6167.
42. Ausubel F.M, Brent R, Kingston R.E, Moore D.D, Seidman j.A, Smith J.A, Struhl K. Current protocols in molecular biology. Willey Intrescience and sons NY 1997.
43. Sheik HG, Hahn BR, Hartkope VA. Introducción a la espectofotometría y a los instrumentos espectofotométricos. Química analítica cuantitativa. Principios y aplicaciones a las ciencias de la vida. Editorial Continental México 1984; 307 – 334.
44. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual by Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989; 2da edición.
45. Fleischmann RD, Adams MD, White O, *et al.* Whole – genome random secuencing and assembly of Haemophilus infuenzae Rd. Science 1995; 269: 496 – 512.
46. Mena BR. Análisis *in silico* de los genes *gspDL* y *gspEL* del sistema de secreción tipo–II de *Leptospira biflexa* serovariedad Patoc (Tesis de Maestría en Ciencias de la Producción y Salud Animal) México: Univ Nac Aut de Méx 2006.