



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

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

**Antigenicidad de la proteína de membrana externa GspD_L,
la supuesta secretina del T2SS de *Leptospira borgpetersenii*
serovariedad Hardjo (Hardjobovis)**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

ERNESTO ARMANDO RODRÍGUEZ REYES.

TUTOR:

DR. ALEJANDRO DE LA PEÑA MOCTEZUMA

COMITÉ TUTORAL:

DR. EDMUNDO CALVA MERCADO

DR. ALFREDO SAHAGÚN RUIZ

MÉXICO D. F.

2007



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.

AGRADECIMIENTOS

AGRADEZCO AL CONSEJO NACIONAL DE LA CIENCIA Y LA TECNOLOGÍA CONACYT, POR LA BECA OTORGADA PARA REALIZAR MIS ESTUDIOS DE DOCTORADO (NO. DE REGISTRO CONACYT - 176420), ASÍ COMO LA ASIGNACIÓN DE APOYO EN EL PROGRAMA DE FORMACIÓN DE DOCTORES, LO CUAL, ME PERMITIÓ DURANTE EL TIEMPO QUE DURARON MIS ESTUDIOS, DESARROLLAR MI PROYECTO DE INVESTIGACIÓN, ASISTIR A CURSOS DE ENTRENAMIENTO Y PRESENTAR LOS RESULTADOS PERLIMINARES TANTO EN FOROS NACIONALES COMO INTERNACIONALES.

HAGO UN RECONOCIMIENTO ESPECIAL A LOS PROYECTOS QUE FINANCIARON EL DESARROLLO DE MI PROYECTO, SIN LOS CUALES, NO HUBIERA SIDO POSIBLE DESARROLLARLO. PROYECTOS PAPIIT IN205202, IN 250404 Y UC-MEXUS CN0254.

AGRADEZCO AL PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL, POR EL APOYO Y FACILIDADES OTORGADAS DURANTE MI FORMACIÓN COMO ALUMNO DEL PROGRAMA, DURANTE EL TIEMPO QUE DURARON MIS ESTUDIOS.

AGRADEZCO AL PROGRAMA DE APOYO A ESTUDIANTES DE POSGRADO, POR EL APOYO OTORGADO PARA MI ASISTENCIA A CONGRESOS NACIONALES EN LOS QUE PRESENTÉ, RESULTADOS PRELIMINARES DE MI PROYECTO.

AGRADEZCO AL DOCTOR ALEJANDRO DE LA PEÑA MOCTEZUMA, AL DOCTOR EDMUNDO CALVA MERCADO Y AL DOCTOR ALFREDO SAHAGÚN RUIZ POR HABERME APOYADO INCONDICIONALMENTE DURANTE EL DESARROLLO DE MI PROYECTO, SIEMPRE PARTICIPANDO CON UNA VISIÓN OBJETIVA, CONSTRUCTIVA Y ANALÍTICA. ME UBICARON EN MI VISIÓN CIENTÍFICA Y AMPLIARON MIS HORIZONTES COMO ALUMNO Y SIEMPRE CON PACIENCIA Y MOTIVACIÓN, FUERON ENRIQUECIENDO MI FORMACION EN CADA SEMESTRE. SINCERAMENTE LES DOY LAS GRACIAS POR AYUDARME EN ESTA ETAPA DE MI VIDA.

AGRADECIMIENTOS

AGRADEZCO A MI PADRE CELESTIAL SU LUZ, GUIA, AYUDA Y MISERICORDIA. ÉL ES EL ÚNICO QUE ME HA TENIDO PRESENTE, QUE NO SE HA HECHO EL DESENTENDIDO ANTE LA AYUDA QUE HE IMPLORADO. ME HICIERON A UN LADO, LES QUITARON EL PAN A MIS HIJOS, NO VALORARON LO QUE “YO SOY”. PERO EL QUE ESTA ARRIBA DE ELLOS, ESTA DE MI LADO Y SIEMPRE HE ESTADO CONTEMPLADO EN SU PLAN. ELLOS PODRÁN USAR SU PODER PARA AISLAR UNA TRAYECTORIA, PERO JAMAS PODRÁN AISLAR NI IMPONER LÍMITES A UN ESPÍRITU DE DIOS. PODRÁN APARENTAR JUSTICIA, PERO JAMÁS MANTENER OCULTAS SUS INJUSTICIAS, PODRAN APARENTAR SER RESPETABLES, PERO JAMÁS SERÁN DIGNOS DE RESPETO. PORQUE NO ES DIGNO DE PODER, EL QUE LO USA PARA SERVIR A SUS INTERESES Y DOMINAR A OTROS, SINO EL QUE LO USA PARA DOMINARSE A SI MISMO Y SERVIR A LOS DEMÁS.

AGRADEZCO AL DOCTOR ALEJANDRO DE LA PEÑA MOCTEZUMA, QUIEN INICIO MI FORMACIÓN DESDE HONORARIO EN EL ENTONCES DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGÍA. TRASPASAMOS VELOS INTERNOS DE AMBOS LADOS, QUE NADIE MÁS TRASPASARÁ. ESPERO NO HABER DECEPCIONADO SUS EXPECTATIVAS DESDE AQUELLA INVITACIÓN ESTANDO USTED TODAVÍA EN AUSTRALIA, PARA DESARROLLAR ESTE PROYECTO. AGRADEZCO TANTAS ENSEÑANZAS, TANTOS REGAÑOS ALGUNOS MERECIDOS, SUS CONSEJOS, SUS CONSTANTES PALABRAS DE MOTIVACIÓN Y ALIENTO, SU CONFIANZA. GRACIAS POR SER MI MAESTRO DURANTE 17 AÑOS DE MI VIDA, POR NUESTRA AMISTAD QUE TRASPASÓ LÍMITES. EL CIRCULO SE HA LOGRADO CERRAR FINALMENTE Y LAS PALABRAS QUE QUEDAN EN MIS PENSAMIENTOS SON, GRACIAS, GRACIAS, GRACIAS.

“PORQUE DIOS SIEMPRE MANTIENE EL EQUILIBRIO”

AGRADEZCO A MI MAESTRO, DOCTOR ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ, QUIEN ME RESCATÓ AL INICIO DE MIS ESTUDIOS DE MAestrÍA Y ME FORMÓ EN EL POSGRADO, ESTABLECIMOS UNA ALIANZA Y COMPROMISO QUE SE FUE TRANSFORMANDO EN UNA CONEXIÓN QUE AL PASO DEL TIEMPO, DESCUBRIRIAMOS HABÍA TRASCENDIDO EL TIEMPO Y LA HISTORIA, CUYO SIMBOLISMO LO ENCIERRA UNA AVE FÉNIX. YO SÉ, LO FUNDAMENTAL QUE FUISTE PARA LA OBTENCIÓN DE MI GRADO DE MAESTRO Y LOS ALCANCES QUE HA TENIDO A MUCHOS NIVELES. HOY DOY EL JUSTO RECONOCIMIENTO A LO QUE HAZ HECHO POR MÍ Y CONTINUÁS HACIENDO, RESCATÁNDOME EN SITUACIONES DIFÍCILES. UN BUEN SIMBOLISMO ACADEMICO DE MÍ PASO EN TU LABORATORIO SERÍA, UN LEPTOSPIROLOGO CLONADO EN MICROBIOLOGÍA MOLECULAR. EL RESULTADO SABEMOS, ES UN CLON RECOMBINANTE. TOÑO, GRACIAS.

A MIS PADRES EMILIO Y MARY, POR SU APOYO INCONDICIONAL, SU PACIENCIA, CONFIANZA Y POR SOBRE TODO, SU INFINITO AMOR. ME HAN APOYADO COMO NADIE LO HARÍA, HE VIVIDO CON USTEDES UNA SEGUNDA ADOLESCENCIA QUE ME HA AYUDADO A FORTALECER MI SER, TERMINAR DE FORTALECER MIS ALAS PARA VOLAR HASTA ALTURAS INIMAGINABLES Y VALORAR LO QUE YO SOY.

A MI ESPOSA ROCÍO Y MIS HIJITOS ARMANDO, ANGÉLICA, ÁNGEL Y ARI, CUANTO LOS HE LIMITADO, CUANTO LOS HE DESCUIDADO, CUANTO LOS HE DESESPERADO Y MANTENIDO EN ESPERA. ASÍ COMO DIOS LIBERÓ A SU PUEBLO DE LA DESESPERANZA Y ESCLAVITUD DE EGIPTO, YO LOS LIBERARÉ DE TODAS LAS LIMITACIONES QUE HAN VIVIDO Y DE ESA ESPERA QUE SE HA IDO ALARGANDO CON EL PASO DE LOS AÑOS, PORQUE DIOS ESTA DE MI LADO. “DIOS EN MI Y YO EN ÉL, QUIÉN O QUE CONTRA MÍ”, “YO CON DIOS SOY MAYORÍA”.

A MI MAESTRA EN PROTEÍNAS, LA DRA. VEGA MANRIQUEZ DELIA XOCHIL, QUIEN FUE LA QUE ME ASESORÓ, ORIENTÓ Y APOYÓ EN LO REFERENTE AL ANÁLISIS Y MANEJO DE PROTEÍNAS.

AGRADEZCO A LOS DOCTORES, RIGOBERTO HERNÁNDEZ CASTRO Y DANIEL MARTÍNEZ, POR SU AYUDA, CONSEJOS, SUGERENCIAS Y RECOMENDACIONES DURANTE DIFERENTES ETAPAS DE MI PROYECTO DE INVESTIGACIÓN, LO CUAL SE REFLEJÓ EN LA REALIZACIÓN DE DIFERENTES EXPERIMENTOS. GRACIAS A LOS DOS.

AGRADEZCO AL DR. FRANCISCO JAVIER BASURTO ALCANTARA POR SUS CONSEJOS, RECOMENDACIONES Y APOYO A MI PERSONA, SINCERAMENTE, SE LO AGRADEZCO.

A LOS MIEMBROS DEL GrILLep, EN VERDAD SIÉNTANSE PARTICIPES DE ESTE LOGRO PARA EL GRUPO, YA QUE CADA UNO DE USTEDES COMPARTIÓ INNUMERABLES ENSEÑANZAS MUY VALIOSAS, QUE ME AYUDARON A CRECER. GRACIAS POR SUS CONSTANTES ATENCIONES HACIA MI PERSONA Y AYUDA INCONDICIONAL EN DIFERENTES MOMENTOS. ME HA TOCADO VER LA INCORPORACIÓN DE CADA UNO DE USTEDES, DESDE EL PRIMERO HASTA EL ÚLTIMO Y SER TESTIGO DE SU CRECIMIENTO. ESTA ES LA DESPEDIDA DEFINITIVA, AHORA LES TOCA A USTEDES CONTINUAR CON EL PRIVILEGIO DE ESTUDIAR Y AMPLIAR LOS HORIZONTES DE LA INVESTIGACIÓN SOBRE *Leptospira* Y LETOSPIROSIS. GRACIAS, ESTIMADO DR. RODRIGO, QUERIDA RAQUEL, “MI BRAZO DERECHO” ELENITA, AL BUEN JORGE ALEJANDRO, ERIKA FLORES, DISTINGUIDA ERIKA CARRILLO, A LA INCANSABLE Y TRABAJADORA OLIVIA, APRECIADOS MANUEL, TANIA, CARLOS Y ALEJANDRA. FINALMENTE, SI A ALGUNO DE USTEDES EN ALGÚN MOMENTO DADO LO OFENDÍ, CAUSE ALGÚN DAÑO O MOLESTIA CON ALGUNA ACTITUD INCORRECTA, LE PIDO PERDÓN.

A MIS ESTIMADOS DON MARIO CRUZ, RAÚL HERNÁNDEZ Y PABLITO VERA, QUIENES EN DIFERENTES MOMENTOS DE MI PROCESO DE INVESTIGACIÓN, ME APOYARON CON LA PREPARACIÓN DE MATERIAL DIVERSO, SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO. GRACIAS.

DEDICATORIA

A DIOS EL CENTRO Y LUZ DE MI VIDA.

A MIS PADRES EMILIO Y MARY, DETRÁS DE ESTE LOGRO, HAY MUCHO TRABAJO, ESFUERZO, TIEMPO Y DEDICACIÓN, DE ELLOS HACIA MÍ. QUE DIOS ME CONCEDA COMPARTIR CON USTEDES LA COSECHA DE ESTE LARGO PERIODO DE SIEMBRA.

A MI ESPOSA ROCÍO Y MIS HIJITOS ARMANDO, ANGÉLICA, ÁNGEL Y ARI, MI FAMILIA, PORQUE HAN VIVIDO PALMO A PALMO ESTE PROCESO DE FORMACIÓN SIENDO EL MOTIVO MÁS IMPORTANTE POR EL QUE HE DECIDIDO DEDICARME A SEMBRAR POR MÁS TIEMPO, SEMILLAS EN EL MUNDO.

A MIS HERMANOS ANA MARÍA, TERE, EMILIO, LETY, RICARDO Y ERIKA QUE QUIZAS MUCHAS VECES SE PREGUNTARON, BUENO Y ARMANDO ¿DONDE ESTA?, ¿PARA QUE TANTO ESTUDIO?, LA RESPUESTA ES: PARA AYUDAR A LOS QUE LO NECESITAN, O SEA, A LOS QUE ANDAN EN BUSCA DE RESPUESTAS, IGUAL QUE YO.

CON GRAN EMOTIVIDAD, AL DR. ALEJANDRO DE LA PEÑA MOCTEZUMA, FUNDADOR Y LÍDER DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN *Leptospira* Y LEPTOSPIROSIS. TODO COMENZÓ EN MAYO DE 1990, PERFECCIONÓ MIS TRAZOS CON EL ASA BACTERIOLÓGICA, ME ENSEÑÓ LOS SECRETOS DEL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO, ME INICIÓ EN EL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LEPTOSPIROSIS, ME ENSEÑÓ COMO SE CULTIVAN Y COMO SE MANTIENEN EN EL LABORATORIO, ME ENSEÑÓ A OBSERVALAS, DISTINGUIRLAS Y CARACTERIZARLAS. ME INICIÓ EN EL ESTUDIO DE ELLAS, ME LLEVÓ A PROFUNDIZAR EN SU INTERIOR, DE DONDE SURGE LO QUE SON, ME MOSTRÓ COMO FUNCIONA SU NATURALEZA ESTRUCTURAL. JUNTOS CONSEGUIMOS LOS APOYOS ECONÓMICOS PARA INICIAR LA INVESTIGACIÓN CON ELLAS. EL RECORRIDO HA SIDO IMPRESIONANTE, NADIE MAS ME PODRÁ LLEVAR COMO EL. ESTE GRAN RECORRIDO LLEGÓ A SU FIN.

“PORQUE DIOS CREÓ LA DUALIDAD”

CON GRAN RECONOCIMIENTO Y ESTIMACIÓN, AL DR. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ FUNDADOR DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR. CON ÉL, DIO INICIO EL ESTUDIO Y APLICACIÓN DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR EN LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. PIONERO EN LA OBTENCIÓN DE APOYO ECONÓMICO POR PARTE DEL PROGRAMA PAPIIT, PARA EL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA. JUNTOS INICIAMOS EL EQUIPAMIENTO DE SU LABORATORIO EN 1994. EN 1998, ME SUBIO A SU BICICLETA, ME IMPULSÓ Y ME LANZÓ HACIA UN RECORRIDO POR LAS ESPIRALES DEL ADN, SIEMPRE AL TANTO DE MI RECORRIDO, SIEMPRE APORTANDO UN AMPLIO TOQUE ANALÍTICO A LA ENSEÑANZA. CONFIÓ EN MÍ Y ME ABRIÓ NUEVAMENTE LAS PUERTAS DE LA DOCENCIA EN EL 2001 QUE HABÍAN PERMANECIDO CERRADAS POR VARIOS AÑOS. ME ENSEÑÓ QUE LAS RESPUESTAS HAY QUE BUSCARLAS “MISTERIO VERSUS MAESTRÍA”, “LA CABEZA EN EL CIELO Y LOS PIES EN LA TIERRA”.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
Reseña histórica de leptospirosis humana y bovina en México.....	3
Leptospirosis una enfermedad de impacto negativo para la salud pública..	8
Tipos de hospedero para leptospiras patógenas.....	10
Epidemiología de la leptospirosis.....	11
Ecología de la leptospirosis.....	13
Ecosistema silvestre.....	13
Ecosistema de la leptospirosis rural.....	14
Ecosistema de la leptospirosis urbana.....	15
Leptospirosis en bovinos.....	16
Leptospirosis aguda en bovinos.....	17
Leptospirosis crónica en bovinos.....	18
Patogenia de la leptospirosis.....	20
Biología del género <i>Leptospira</i>	24
Taxonomía.....	24
Morfología y movilidad.....	26
Supervivencia de <i>Leptospira</i> fuera del huésped y viscotaxis.....	28
Requerimientos nutricionales y atmosféricos.....	29

Antígenos estructurales de <i>Leptospira</i>	30
Inmunogenicidad.....	31
Protección heteróloga contra leptospirosis.....	33
Genomas de especies patógenas de <i>Leptospira</i>	35
Identificación y clasificación de las proteínas en especies patógenas de <i>Leptospira</i>	47
Otros tipos de proteínas recientemente identificados.....	48
El sistema de secreción tipo 2 (T2SS).....	51
Complejo de la membrana externa.....	58
Interacción de GspS y GspD.....	60
Fuentes de energía para el T2SS.....	61
Reconocimiento especie-específico de proteínas secretadas en el T2SS...	62
Participación de la secretina en el reconocimiento de las proteínas secretadas.....	63
Funcionamiento del T2SS.....	64
La errónea denominación GSP para referirse al T2SS.....	68
ANTECEDENTES	72
JUSTIFICACIÓN	73
HIPÓTESIS	74
OBJETIVOS	74
MATERIAL Y MÉTODOS	75
Cepas utilizadas.....	75

Vector de expresión.....	77
Extracción de ADN cromosomal.....	77
Amplificación de <i>gspD_L</i> de <i>L. borgpetersenii</i> serovariedad	
Hardjo mediante PCR.....	79
Extracción de ADN plasmídico.....	80
Clonación de <i>gspD_L</i> de <i>L. borgpetersenii</i> serovariedad	
Hardjo, Hardjobovis en pET28a.....	81
Preparación de bacterias competentes con CaCl ₂	84
Transformación de pAL208.....	85
Secuenciación de pET28a-recombinante para confirmar la integridad de <i>gspD_L</i>	86
Ensayos de expresión de GspD _L recombinante (rGspD _L) en diferentes cepas de <i>Escherichia coli</i>	89
Electroforesis de las proteínas totales en geles desnaturalizantes de poliacrilamida.....	91
Tinción de azul de Coomassie.....	92
Inmunodetección tipo Western.....	92
Inmunodetección de rGspD _L	94
Purificación de rGspD _L mediante electro-elución.....	95
Cuantificación de rGspD _L	96
Producción de un suero hiperinmune anti-rGspD _L	97
Adsorción del suero policlonal anti-rGspD _L	98

Preparación de proteínas de la membrana externa de <i>Leptospira</i>	99
Inmunodetección tipo Western de rGspD _L	101
Inmunodetección tipo Western de rGspD _L utilizando sueros de perros y hámsteres infectados con <i>Leptospira interrogans</i>	104
Ensayo piloto de inmunoprotección en hámsteres.....	105
Análisis filogenético de GspD.....	108
RESULTADOS	109
Amplificación y clonación de <i>gspD_L</i> de <i>L. borgpetersenii</i> serovariedad Hardjo, Hardjobovis en el vector pET28a.....	109
Análisis de la secuencia de GspD _L de <i>L. borgpetersenii</i> serovariedad Hardjo.....	111
Extracciones de ADN del vector de expresión pET28a.....	119
Ensayos de expresión de rGspD _L en diferentes cepas de <i>Escherichia coli</i>	122
Detección de la proteína rGspD _L	123
Purificación de rGspD _L mediante electro-elución.....	126
Titulación del suero hiperinmune policlonal anti-GspD _L producido en conejo.....	128
Inmunodetección tipo Western de GspD _L utilizando sueros hiperinmunes anti- <i>Leptospira</i> producidos en conejo.....	132
Inmunodetección tipo Western de GspD _L utilizando sueros de bovinos positivos en la prueba de aglutinación microscópica (AM).....	133

Inmunodetección tipo Western de GspD _L utilizando sueros de perros y hámsteres infectados con <i>Leptospira</i>	139
Ensayo piloto de inmunoprotección en hámsteres.....	140
Análisis <i>in silico</i> y filogenético de GspD de <i>L. borgpetersenii</i>	147
DISCUSIÓN	151
CONCLUSIONES	177
REFERENCIAS	178
APÉNDICE I. Medios de Cultivo	231
APÉNDICE II. Soluciones para purificación de ADN cromosomal y plásmidos	235
APÉNDICE III. Soluciones para el análisis purificación y detección de proteínas totales y de membrana externa	241
APÉNDICE IV. Soluciones para la expresión y purificación de proteínas recombinantes	249

LISTA DE CUADROS

<u>Cuadros</u>		<u>Página</u>
Cuadro 1	Seropositividad a <i>Leptospira</i> mediante la prueba AM en humanos de México.	5
Cuadro 2	Detección de serovariedades patógenas de <i>Leptospira</i> mediante la prueba de AM en bovinos de México por diferentes autores de 1962 a la fecha.	6
Cuadro 3	Algunas características de dos genomas de <i>Leptospira borgpetersenii</i> serovariedad Hardjo, cepas L550, no patógena para hámster y BJ197, patógena para hámster.	41
Cuadro 4	Cepas de <i>E. coli</i> utilizadas en los procedimientos de clonación y expresión	76
Cuadro 5	Relación de los iniciadores utilizados en este trabajo.	80
Cuadro 6	Lista de sueros de bovino empleados para evaluar la antigenicidad de rGspD _L en inmunotransferencias tipo Western.	102
Cuadro 7	Predicción del peso molecular de las secretinas de la membrana externa GspD de <i>E. coli</i> y otras proteínas homólogas.	119
Cuadro 8	Resultados en la inmunodetección tipo Western de rGspD _L con sueros de bovino positivos a la serovariedad Hardjoprajitno en la prueba de AM.	134
Cuadro 9	Resultados obtenidos en la prueba de AM y en ensayos de inmunodetección de rGspD _L con los sueros de bovinos seleccionados.	137
Cuadro 10	Relación del título de anticuerpos en la prueba AM de sueros de bovino seleccionados e inmunodetección tipo Western de rGspD _L .	138
Cuadro 11	Hallazgos macroscópicos y microscópicos en hámsteres inoculados con la cepa LOCaS-46R para reactivar la virulencia de la cepa.	142

- Cuadro 12** Hallazgos a la necropsia en los hámsteres del grupo 2 (Grupo control). **143**
Ensayo piloto de inmunoprotección en modelo animal.
- Cuadro 13** Hallazgos a la necropsia en los hámsteres del grupo 1 (inmunizados con rGspD). Ensayo piloto de inmunoprotección en modelo animal. **146**

LISTA DE FIGURAS

<u>Figuras</u>		<u>Página</u>
Figura 1	Diagrama de la filogenia del Orden <i>Spirochaetales</i> .	25
Figura 2	Microfotografía de <i>L. Interrogans</i> .	26
Figura 3	Modelo del movimiento de <i>Leptospira</i> .	27
Figura 4	Representación del genoma circular de <i>L. interrogans</i> serovariedad Lai.	37
Figura 5	Mapas de los cromosomas circulares (Pesado CI; Ligerero CII) de <i>Leptospira interrogans</i> serovariedad Copenhageni.	38
Figura 6	Mapa del genoma de <i>L. borgpetersenii</i> serovariedad Hardjo cepa L550.	43
Figura 7	Modelo de la arquitectura de la pared celular de <i>Leptospira</i> .	49
Figura 8	Modelo de ensamble del T2SS y de la interacción de GspS y GspD.	60
Figura 9	Secreción tipo II y su homología con la maquinaria para la biogénesis de pili tipo IV.	68
Figura 10	Representación gráfica del <i>locus gsp</i> obtenida a partir del genoma secuenciado de <i>L. borgpetersenii</i> serovariedad Hardjo (Hardjobovis) de la cepa L550.	72
Figura 11	Identificación de genes del T2SS, en el genoma de <i>Leptospira</i> .	73
Figura 12	Esquema de la metodología empleada para la clonación del fragmento amplificado de <i>gspD_L</i> de <i>L. borgpetersenii</i> serovariedad Hardjo en el vector de expresión pET28a.	84
Figura 13	Procedimiento para la determinación de la secuencia del fragmento clonado de <i>gspD_L</i> .	87

	<u>Página</u>
Figura 14 Esquema que muestra la región amplificada mediante PCR correspondiente al gen <i>gspD_L</i> de <i>L. borgpetersenii</i> serovariedad Hardjo (Hardjobovis).	88
Figura 15 Sistema pET28 para la expresión de proteínas recombinantes mediante el uso de cepas de <i>E. coli</i> lisógenas DE3.	89
Figura 16 Representación esquemática de los componentes requeridos para la transferencia de proteínas de un gel de poliacrilamida a una membrana de nylon.	93
Figura 17 Representación esquemática del proceso de electro elusión.	96
Figura 18 Esquema empleado de inmunización con rGspD _L , en el ensayo piloto de inmunoprotección en hámsteres.	107
Figura 19 Fragmento amplificado de <i>gspD_L</i> por PCR a partir de ADN cromosomal de <i>L. borgpetersenii</i> serovariedad Hardjo subtipo Hardjobovis.	109
Figura 20 Extracción de ADN del plásmido pET28a a partir de <i>E. coli</i> DH5α.	109
Figura 21 Digestión con <i>Bgl</i> II de <i>gspD_L</i> .	110
Figura 22 Digestión con <i>Kpn</i> I de <i>gspD_L</i> .	110
Figura 23 Preparación del fragmento amplificado y del plásmido pET28a previo al ensayo de clonación.	111
Figura 24 Secuencia de nucleótidos de <i>gspD_L</i> de <i>L. borgpetersenii</i> serovariedad Hardjo.	113
Figura 25 Alineamiento entre las secuencias de aminoácidos de GspD de <i>Escherichia coli</i> y <i>Leptospira borgpetersenii</i> serovariedad Hardjo.	114
Figura 26 Alineamiento entre las secuencias de aminoácidos de XcpQ de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y GspD _L de <i>Leptospira borgpetersenii</i> serovariedad Hardjo.	115

	<u>Página</u>
Figura 27 Alineamiento entre las secuencias de aminoácidos de GspD _L de <i>Leptospira borgpetersenii</i> serovariedad Hardjo y GspD de <i>Leptospira interrogans</i> serovariedad Copenhageni.	116
Figura 28 Alineamiento entre las secuencias de aminoácidos de GspD de <i>Leptospira interrogans</i> serovariedad Copenhageni y GspD de <i>Escherichia coli</i> .	117
Figura 29 Alineamiento entre las secuencias de aminoácidos de GspD de <i>Escherichia coli</i> y XcpQ de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	118
Figura 30 PCR de colonia utilizando los iniciadores MLe 1230 y MLe 1231.	120
Figura 31 Extracción de ADN de los plásmidos recombinantes obtenidos (pAL208).	121
Figura 32 PCR realizado a los tres plásmidos recombinantes, utilizando los iniciadores MLe 1230 y MLe 1231.	121
Figura 33 SDS-PAGE de los ensayos de expresión en la cepa C43 de <i>E. coli</i> .	122
Figura 34 SDS-PAGE de las preparaciones de proteínas totales del ensayo de expresión en las tres cepas de <i>E. coli</i> .	124
Figura 35 Inmunodetección tipo Western que muestra la expresión de rGspD _L usando anti-T7-HRP.	125
Figura 36 SDS-PAGE de las preparaciones de proteínas totales del ensayo de expresión en las tres cepas de <i>E. coli</i> (ensayo 2).	125
Figura 37 Inmunodetección tipo Western que muestra la expresión de rGspD _L usando usando anti-His-HRP.	126
Figura 38 SDS-PAGE que muestra diferentes procesos de electro-elusión.	127
Figura 39 Inmunodetección tipo Western que muestra a rGspD _L purificada mediante electro-elusión.	127
Figura 40 Cuantificación de rGspD _L por comparación con un estándar de albúmina sérica bovina.	127
Figura 41 Titulación del suero hiperinmune anti-rGspD _L producido en conejo mediante inmunodetección tipo Western.	128

	<u>Página</u>
Figura 42	SDS-PAGE de GspD _L purificada, proteínas de la membrana externa (PME-Hp) y proteínas totales (PT-Hp) de <i>L. interrogans</i> serovariedad Hardjoprajitno. 129
Figura 43	SDS-PAGE de preparaciones de proteínas totales de 9 serovariedades patógenas de <i>Leptospira</i> . 130
Figura 44	Inmunodetección tipo Western que muestra una banda común a partir de las preparaciones de proteínas totales de las nueve serovariedades patógenas de <i>Leptospira</i> . 130
Figura 45	SDS-PAGE de preparaciones de ME de 9 serovariedades de <i>Leptospira</i> patógenas. 131
Figura 46	Inmunodetección tipo Western que muestra una banda común a partir de las preparaciones de proteínas de ME de las nueve serovariedades patógenas de <i>Leptospira</i> . 131
Figura 47	SDS PAGE de rGspD _L y proteínas totales (PT) de <i>E. coli</i> cepa Rosetta-pAL208. 132
Figura 48	Inmunodetección tipo Western de rGspD _L y proteínas totales (PT) de <i>E. coli</i> cepa Rosetta-pAL208. 132
Figura 49	SDS PAGE de rGspD _L , Proteínas totales (PT) de <i>E. coli</i> Rosetta-pAL208, PT de <i>E. coli</i> Rosetta y PT de Hardjoprajitno. 133
Figura 50	Inmunodetección tipo Western de rGspD _L , Proteínas totales (PT) de <i>E. coli</i> Rosetta-pAL208, PT de <i>E. coli</i> Rosetta y PT de Hardjoprajitno. 133
Figura 51	Inmunodetección tipo Western de rGspD _L utilizando diferentes sueros de bovinos positivos (1:800) a la serovariedad Hardjo mediante la prueba AM. 135
Figura 52	Inmunodetección tipo Western de rGspD _L utilizando diferentes sueros de bovinos negativos (\leq 1:50) mediante la prueba AM. 136
Figura 53	Inmunodetección tipo Western de rGspD _L utilizando diferentes sueros de perros infectados naturalmente con la serovariedad Canicola. 139
Figura 54	Inmunodetección tipo Western que muestra la detección de rGspD _L utilizando diferentes sueros de hámsteres infectados experimentalmente con la cepa LOCaS 46-R de <i>L. interrogans</i> . 140
Figura 55	Resultados obtenidos en el ensayo piloto de inmunoprotección post-desafío. 145

		<u>Página</u>
Figura 56	Secuencia de aminoácidos de GspD _L de <i>L. borgpetersenii</i> serovariedad Hardjo.	147
Figura 57	Árbol filogenético de <i>Leptospira</i> y diferentes bacterias Gram negativas que poseen genes del T2SS, usando el gen <i>rrs</i> (ARN 16S).	149
Figura 58	Árbol filogenético de <i>Leptospira</i> y diferentes bacterias Gram negativas que poseen genes del T2SS, usando la secuencia de GspD.	150

LISTADO DE ABREVIATURAS

A	Adenina.
ADN	Ácido desoxiribonucleico.
ABC	Siglas en Inglés de <u>A</u> TP <u>b</u> inding <u>c</u> assette que hacen referencia de proteínas de unión al ATP.
ABO	Siglas que hacen referencia al grupo de antígenos de reconocimiento de los grupos sanguíneos.
AM	Aglutinación microscópica.
AFM	Amortiguador final de muestra.
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia.
ATP	Adenosin trifosfato.
ATPasa	Enzima que hidroliza ATP.
C	Citosina.
°C	Grados centígrados.
CaCl ₂	Cloruro de calcio.
C I	Cromosoma pesado.
C II	Cromosoma ligero.
Clo	Cloramfenicol.
CT	Siglas en Inglés de (cholera-toxin), toxina del cólera producida por <i>Vibrio cholerae</i> .
CTX ϕ	Siglas en Inglés que hacen referencia al fago filamentoso que codifica para la síntesis de la toxina del cólera producida por <i>Vibrio cholerae</i> .
DE3	Siglas que hacen referencia a lisógenos del fago lambda que poseen el gen para la síntesis de la enzima T7 RNA

	polimerasa.
d’NTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfatados.
DsbA	Siglas que hacen referencia a la enzima disulfuro isomerasa ubicada en el espacio periplásmico.
DO	Densidad óptica.
EpsD	Siglas en Inglés que hacen referencia a la secretina de la membrana externa del sistema de secreción tipo 2 de <i>Vibrio cholerae</i> .
FAc	Fase acuosa.
FDet	Fase de detergente.
FlaA	Proteína que constituye la porción interna del flagelo.
FlaB	Proteína que recubre la porción externa del flagelo.
<i>g</i>	Gravedades.
G	Guanina.
GLP	Glicolipoproteína.
GSP	Siglas en Inglés de <u>g</u> eneral <u>s</u> ecretory <u>p</u> athway, hacen referencia a la ruta secretoria general.
h	Horas.
HCl	Ácido clorhídrico.
HRP	Siglas en Inglés que hacen referencia a la enzima peroxidasa de rábano.
IgG	Inmunoglobulina del tipo G.
IgM	Inmunoglobulina del tipo M.
IL-10	Interleucina 10.
IM	Intramuscular.

IP	Intraperitoneal.
ImpL63	Proteína de la membrana citoplasmática L63.
INF- γ	Interferón gamma.
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactósido.
IS	Siglas en Inglés de insertion sequence, secuencia de inserción.
Ka	Kanamicina.
kDa	kiloDalton.
KCl	Cloruro de potasio.
KDO	Ácido ceto-deoxioctanoico.
Kg	Kilogramos.
l	Litros.
<i>lacI</i>	Siglas que hacen referencia al gen que codifica para una proteína represora de la transcripción del operón de la lactosa.
LB	Luria Bertani.
LD ₅₀	Dosis letal 50%.
LipL21	Lipoproteína de 21 kDa.
LipL32	Lipoproteína de 32 kDa.
LipL36	Lipoproteína de 36 kDa.
LipL41	Lipoproteína de 41 kDa.
LipL45	Lipoproteína de 45 kDa.
LipL48	Lipoproteína de 48 kDa.
LPS	Lipopolisacárido.
M	Molar.

mA	Miliamperes.
MAL	Marco abierto de lectura.
MDCK	Siglas en Inglés que hacen referencia a células de riñón. canino Madin-Darby.
ME	Membrana externa.
μg	Microgramos.
μl	Microlitros.
μm	Micrómetros.
Mb	Megabase, (un millón de pares de bases).
MC	Membrana citoplasmática.
Mg ⁺⁺	Iones Magnesio.
MgCl	Cloruro de magnesio.
MgSO ₄	Sulfato de magnesio.
mg	Miligramos.
ml	Mililitros.
min	Minutos.
mM	Milimolar.
mm	Milímetros.
NaCl	Cloruro de sodio.
NCBI	Siglas en Inglés que hacen referencia al Centro Nacional para la Investigación en Biotecnología.
ng	Nanogramos.
NTP	Nucleótidos trifosfatados.
NTPasa	Nucleótido trifosfatasa.

OmpL1	Porina de la membrana externa de <i>Leptospira</i> .
OMS	Organización Mundial de la Salud.
ORF	Siglas en Inglés que hacen referencia a un marco abierto de lectura.
PAGE	Siglas en Inglés de (polyacrilamide gel electrophoresis), electroforesis en geles de poliacrilamida.
PAM	Proteína aceptora de metilos.
pb	Par de bases.
PBS	Siglas en Inglés de (phosphate buffer solution), solución amortiguadora de fosfatos.
PCR	Siglas en Inglés de (polymerase chain reaction), reacción en cadena de la polimerasa.
PG	Peptidoglicano.
pH	Potencial de Hidrógeno.
PME	Proteínas de la membrana externa.
MFP	Siglas en Inglés de (Membrane fusion protein), proteína de fusión membranal.
PMSF	Fluoruro de fenil-metil sulfonilo.
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Siglas en Inglés de (Sodium dodecyl sulphate), dodecil sulfonato de sodio.
SphH	Siglas en Inglés que hacen referencia a la enzima esfingomielinasa.
Sec	Siglas utilizadas para hacer referencia a la secretina de la membrana citoplasmática que participa en la ruta secretoria general.
seg	Segundos.

SP	Siglas en Inglés de (signal peptidase), enzima peptidasa señal.
SRP	Siglas en Inglés que hacen referencia a una ruta de translocación a través de la membrana citoplasmática, de proteínas que se ubicarán en la superficie de la bacteria.
T	Timina.
TA	Temperatura ambiente
TC	Siglas en Inglés que hacen referencia a la toxina del cólera producida por <i>Vibrio cholerae</i> .
T-DNA	Siglas en Inglés que hacen referencia a genes que inducen la formación de tumores en algunas plantas.
Tly	Proteína con actividad hemolítica.
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa.
T1SS	Siglas en Inglés que hacen referencia al sistema de secreción tipo 1.
T2SS	Siglas en Inglés que hacen referencia al sistema de secreción tipo 2.
T3SS	Siglas en Inglés que hacen referencia al sistema de secreción tipo 3.
T4SS	Siglas en Inglés que hacen referencia al sistema de secreción tipo 4.
T5SS	Siglas en Inglés que hacen referencia al sistema de secreción tipo 5.
U	Unidades.
V	Volts.

Abreviaturas de los aminoácidos

Alanina **ala - A**

Arginina **arg - R**

Asparagina **asn - N**

Ácido aspartico **asp - D**

Cisteina **cys - C**

Glutamina **gln - Q**

Ácido Glutámico **glu - E**

Glicina **gly - G**

Histidina **his - H**

Isoleucina **ile - I**

Leucina **leu - L**

Lisina **lys - K**

Metionina **met - M**

Fenilalanina **phe - F**

Prolina **pro - P**

Serina **ser - S**

Treonina **thr - T**

Triptofano **trp - W**

Tirosina **tyr - Y**

Valina **val - V**

I. RESUMEN

Análisis bioinformático del genoma de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo reveló la presencia del sistema de secreción tipo 2 (T2SS), una ruta altamente conservada para la secreción de proteínas en bacterias Gram negativas. En este estudio se evaluó la expresión de GspD_L, la supuesta secretina del T2SS y su antigenicidad. Se amplificó un fragmento de 1,533 pb a partir de *L. borgpetersenii* Hardjo (Hardjobovis) cepa L550 con iniciadores derivados de su genoma. Un fragmento conteniendo a *gspD_L* de 1,515 pb obtenido por PCR y digerido con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI fue clonado en el vector de expresión pET28a para generar al plásmido pAL208. *E. coli* ROSETTA *codon plus* (DE3) fue utilizada para la expresión de rGspD_L. La expresión se confirmó mediante inmunotransferencia tipo Western utilizando el monoclonal anti-T7 marcado con peroxidasa (HRP). Se purificó rGspD_L mediante electro-elución para producir suero hiperinmune policlonal específico en conejo. Se detectó una banda común en las serovariedades Australis, Ballum, Bratislava, Canicola, Hardjo, Grippotyphosa, Pomona, Pyrogenes y Wolffi en inmunotransferencia con el suero hiperinmune anti-rGspD_L diluido 1:100. rGspD_L fue reconocida por un suero hiperinmune anti-Hardjobovis producido en conejo, por sueros de bovinos positivos a la serovariedad Hardjo (1:800) en la prueba de aglutinación microscópica (AM), por sueros de perros infectados naturalmente con *Leptospira* y por sueros de hámsteres infectados experimentalmente en el laboratorio, con una cepa virulenta aislada a partir de perro, antigénicamente relacionada a la serovariedad Canicola. Los resultados obtenidos sugieren que GspD_L es antigénica y se expresa *in vivo* durante el proceso de infección en animales, como son bovinos, hámsteres y perros. Un ensayo piloto de inmunoprotección con rGspD_L en el modelo de hámster reveló una supervivencia del 100 % de los animales inmunizados con rGspD_L contra un 33.0 % del grupo control. Sin embargo, todos los sobrevivientes presentaron colonización renal con leptospiros. Finalmente, los resultados del análisis filogenético sugieren la transferencia horizontal del gen *gspD* de miembros de la familia *Enterobacteriaceae* hacia *Leptospira*.

Palabras clave: *gspD*, *Leptospira borgpetersenii*, expresión, T2SS.

ABSTRACT

Bioinformatic analysis of the *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo genome reveals a type 2 secretion system (T2SS), a broadly conserved pathway for secretion of a wide variety of sub-cellular enzymes, structural proteins and toxins in Gram negative bacteria. In this study we evaluated the expression of GspD, the secretin component of the T2SS. A 1,515 bp DNA fragment was PCR cloned into the pET28a expression vector to generate the recombinant pAL208 plasmid. The expression *in vitro* of recombinant GspD_L (rGspD_L) with a T7 peptide label was obtained in *E. coli* ROSETTA Codon plus (DE3). The expression was confirmed by a Western blot assay using an anti-T7-peroxidase (anti-T7-HRP) monoclonal antibody. The rGspD_L was purified by electro-elution and used for the production of rabbit polyclonal hiperimmune serum. Western blot showed the detection of a common band in serovars Australis, Ballum, Bratislava, Canicola, Hardjo, Grippotyphosa, Pomona, Pyrogenes and Wolffi of *Leptospira*, using diluted (1:100) anti-GspD_L hiperimmune serum. Western blot assays using rabbit anti-rGspD_L hiperimmune sera, rabbit anti-Hardjobovis hiperimmune sera, infected hamsters sera, infected dogs sera and bovine Hardjo MAT positive sera, suggested that *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo (Hardjobovis) GspD_L is antigenic and expressed during the infection process in hamsters, dogs and cattle. A immunoprotection assay with rGspD_L using hámster revealed a survival of 100% of the hamsters immunized with rGspD_L against 33.0% of the control group. However, all the survivors presented renal colonization with leptospiras. Finally, comparison of *rrs* and *gspD* phylogenetic trees suggested horizontal acquisition of leptospiral *gspD* from *Enterobacteriaceae*. These studies suggest that GspD_L is expressed during infection of the mammalian host by pathogenic *Leptospira* species.

Key words: *gspD*, *Leptospira borgpetersenii*, expression, T2SS

Antigenicidad de la proteína de membrana externa GspD_L, la supuesta secretina del T2SS de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo (Hardjobovis).

II. INTRODUCCIÓN

Reseña histórica de leptospirosis humana y bovina en México

Los estudios de Leptospirosis en América inician en 1918, cuando Hideyo Noguchi, quién trabajaba para la Fundación Rockefeller en Nueva York, fue comisionado para estudiar un brote epidémico en el puerto de Guayaquil, Ecuador, que según los médicos de ahí era de fiebre amarilla, por lo que aceptó ese diagnóstico y comenzó a estudiarla. Descubrió en la sangre de los enfermos una espiroqueta que llamó *Leptospira icteroides*; preparó medios para su cultivo, obtuvo sueros y preparó una vacuna. En diciembre de 1919, se le notificó que había un brote de fiebre amarilla en Yucatán, por lo que se trasladó a este estado, trayendo sus productos biológicos. Llegó a Mérida el 23 de diciembre de 1919, poniéndose a su disposición el laboratorio del Hospital O' Horán.¹

Noguchi empezó por examinar enfermos diagnosticados por los médicos locales, que conocían muy bien la enfermedad de la fiebre amarilla. A todos los pacientes les practicó frotis de sangre pero sólo en un caso encontró leptospiros.² Debido a los cuadros clínicos se convenció de que esta enfermedad sí era fiebre amarilla, limitándose entonces a impartir una conferencia sobre leptospirosis y a fines de enero de 1920 se retiró. Luego, reconoció que el germen descubierto por él en Guayaquil era idéntico al descubierto antes en Japón y que años más tarde se definiría como *Leptospira interrogans*.¹

En México, los estudios sobre leptospirosis se han encaminado principalmente a la detección de anticuerpos contra las diferentes serovariedades patógenas de *Leptospira*. Posterior al hallazgo de Noguchi, Gastélum presenta en el X Congreso Médico Nacional de 1933, los primeros casos de leptospirosis en el hombre a partir de un estudio realizado en Mazatlán.³ En 1953, Varela y Vázquez reanudaron las

investigaciones en leptospirosis y presentaron un trabajo denominado “Nota preliminar acerca de la leptospirosis en la ciudad de México (1953)”.⁴ Varela *et al.*, (1954) realizaron estudios serológicos de leptospirosis en las ciudades de Veracruz, Tampico y México.⁵ El mismo Varela y colaboradores, en 1958, investigaron aglutininas en sueros de humanos y de animales de diversos estados para las serovariedades *Icterohaemorrhagiae*, *Pomona* y *Canicola*.⁶

Los estudios de sueros ictericos se iniciaron en México con Mendoza (1958), en pacientes del Hospital la Raza del IMSS, encontrando un 9.8 % de seropositivos, predominando *Canicola* en un 77.0 %.⁷ Varela y Zavala (1961) encontraron, en el Laboratorio del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales de la entonces SSA, en México, el 2.8 % de seropositividad en 282 sueros de habitantes de Mérida.⁸ Un año más tarde, los mismos autores reportaron un 10.7 % de aglutininas en 56 muestras de enfermos ictericos de una población de Yucatán y el hallazgo de leptospiras en orina de 300 ratas estudiadas. Zavala *et al.* (1976a, 1976b, 1977 y 1985), reportaron casos graves en Yucatán, algunos de ellos con desenlace funesto.^{9,10,11,12} En 1997 se encontró una seroprevalencia de 13.1 % en pacientes con aparente cuadro clínico sugerente de dengue hemorrágico, identificándose en 3.4 % y 1.2 % respectivamente, a las serovariedades *Pomona* e *Icterohaemorrhagiae*.¹³

Flisser *et al.*, (2002)¹⁴ en un estudio de zoonosis en México reportaron los resultados de seropositividad a serovariedades patógenas de *Leptospira* mediante la prueba de aglutinación microscópica (AM) en humanos (Cuadro 1).

En el área veterinaria en la especie bovina, destacan los trabajos de Zaiz (1962) quien emplea la prueba de AM, como un método indirecto para el diagnóstico de leptospirosis en bovinos.¹⁵ Varela y Roche (1965), llevan a cabo una investigación serológica de leptospirosis bovina, encuentran una seropositividad del 26.92 %, detectando anticuerpos contra las serovariedades *Icterohaemorrhagiae* y *Canicola*.¹⁶

Cuadro 1. Seropositividad a *Leptospira* mediante la prueba AM en humanos de México.

Lugar	Cantidad	Seropositividad (%)	Serovariedades
Culiacán, Sinaloa	260	29	Pomona y Canicola
Guadalajara, Jalisco	80	24	Pomona, Canicola e Icterohaemorrhagiae
Balancán, Chiapas	936	13	Canicola, Pomona e Icterohaemorrhagiae
Puebla	67	27	Canicola, Pomona e Icterohaemorrhagiae
Chihuahua	128	35	Pomona y Canicola

(Flisser *et al.*, 2002)¹⁴

Zavala *et al.*, (1984), realizaron un estudio en el Estado de Yucatán, incluyendo animales domésticos, lo cual no había sido encontrado en estudios previos, encontrando una seropositividad en porcinos de 23.3 %, en bovinos de 11.3 % y en humanos de 14.1 %.¹⁷

Vado *et al.*, al analizar 375 muestras de bovinos por la prueba de AM, encontraron una seropositividad de 5.6 %, detectándose anticuerpos contra las serovariedades Hardjo, Tarassovi, Wolffi, Grippotyphosa y Pomona.¹⁸ Moles *et al.*, (2002) llevan a efecto un estudio serológico sobre leptospirosis bovina en México, encontrando que las serovariedades hacia las que hubo reacción fueron Hardjo, Wolffi y Tarassovi.¹⁹ En el año 2004, se realizó un análisis bibliográfico a nivel nacional de los resultados disponibles, obtenidos en la prueba AM para el diagnóstico de leptospirosis, de acuerdo a las regiones ecológicas de México (árida, semi-árida, templada, trópico seco y trópico húmedo). De un total de 42,779 muestras, se obtuvo una seropositividad de 49.7 %. Las regiones árida y semi-árida presentaron una frecuencia del 37.8 % (rangos del 31.0

% al 59.0 %) y las serovariedades con mayor prevalencia fueron Hardjoprajitno cepa H-89, Hardjo, Wolffi y Tarassovi. En la región templada se encontró una frecuencia de 39.4 % (rangos del 22.0 % al 66.0 %), siendo las serovariedades Icterohaemorrhagiae cepa Palo Alto, Canicola serovariedad Portland-vere, Bratislava, Pyrogenes, Pomona, Hardjoprajitno cepa H-89, Hardjo, Wolffi y Tarassovi las que tuvieron una mayor prevalencia. En la región trópico seco se obtuvo un 45.9 % (rangos del 27.0 % al 72.0 %) y las serovariedades con mayor prevalencia fueron Wolffi, Hardjo y Tarassovi. Finalmente, en la región trópico húmedo se obtuvo una frecuencia promedio del 63.8 % (31.7 % al 84.6 %) y las serovariedades más prevalentes fueron Hardjoprajitno cepa H-89, Hardjo, Wolffi y Tarassovi.²⁰

En el Cuadro 2, se enlistan diferentes trabajos realizados en bovinos de México desde 1962 a la fecha, en los que se ha empleado la detección de anticuerpos por medio de la prueba AM para ayudar a establecer el diagnóstico de leptospirosis.

Cuadro 2. Detección de anticuerpos contra serovariedades patógenas de *Leptospira* mediante la prueba AM en bovinos de México.

SEROVARIEDADES ^a	ESTADO	SEROPOSITIVIDAD (%)	REFERENCIA
Pomona, Icterohaemorrhagiae, Canicola	Estado de México	39.5	Zaiz, 1962 ¹⁵
Icterohaemorrhagiae, Pomona, Canicola	Diferentes regiones de México	46.7	Varela, 1965 ²¹
Javanica, Medanensis, Pomona, Hardjo, Hebdomadis y Tarassovi	Distrito Federal y Estado de México	20.0	Rodríguez, 1969 ²²
Wolffi, Tarassovi, Pomona, Ballum, Hebdomadis, Bataviae	Sinaloa	27.00	Bobadilla, 1978 ²³
Hardjo, Pomona, Hebdomadis, Wolffi, Sejroe	Tizayuca, Hidalgo	4.6 a 13.7	Dorantes, 1985 ²⁴
Hardjo, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Tarassovi, Grippytyphosa	D. F. Edo de México y Michoacán	10.0	Alvarez, 1985 ²⁵

Continuación del Cuadro 2

SEROVARIEDADES ^a	ESTADO	SEROPOSITIVIDAD (%)	REFERENCIA
Hardjo, Pomona, Australis, Canicola	Guerrero	45.1	Vázquez, 1986 ²⁶
Pomona, Hardjo, Sejroe, Australis, Canicola, Hebdomadis	Diferentes estados de México	0.1 a 14.4	Sánchez, 1987 ²⁷
Pomona, Hardjo, Australis, Bataviae, Sejroe	Estado de México	42.0	Mendoza, 1987 ²⁸
Icterohaemorrhagiae, Pyrogenes, Pomona, Canicola, Celledoni	Atlixco, Puebla	84.4	Fernández, 1991 ²⁹
Hardjo, Pomona, Icterohaemorrhagiae, Canicola, Grippotyphosa, Tarassovi, Wolffi, Hebdomadis y Pyrogenes.	Tizayuca, Hidalgo	41.7	Arteaga, 1991 ³⁰
Wolffi, Hardjo	Estado de México	86.0	Torres, 1995 ³¹
Icterohaemorrhagiae, Bataviae, Ballum, Hardjo, Sejroe, Pyrogenes, Cynopteri, Wolffi	Diferentes Estados de México	47.0	Hernández, <i>et al.</i> , 1996 ³²
Icterohaemorrhagiae, Hardjo, Hebdomadis, Pyrogenes, Pomona, Tarassovi, Canicola, Bratislava, Grippotyphosa	Xochimilco, Distrito Federal	26.5	Esparza, 1998 ³³
Hardjo, Pomona, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae	Zona Central de México	79.2	Moles, <i>et al.</i> , 1999 ³⁴
Hardjo, Wolffi, Icterohaemorrhagiae, Tarassovi, Pomona	Querétaro	31.5	Torres, <i>et al.</i> , 1999 ³⁵
Hardjo, Wolffi, Tarassovi, Icterohaemorrhagiae,	Sonora	47.2	Moles y Torres, 2000 ³⁶
Icterohaemorrhagiae, Icterohaemorrhagiae RGA, Bratislava, Pyrogenes, Grippotyphosa, Canicola, Pomona, Canicola, Portland-Vere, Bratislava, Panama, Hardjo, Wolffi, Tarassovi	Guanajuato	10.3 a 22.0	Córdova <i>et al.</i> , 2000 ³⁷
Wolffi, Hardjo, Canicola, Tarassovi	Tehuixtla, Morelos	42.0	Gutiérrez, 2001 ³⁸
Hardjo, Tarassovi, Wolffi y Grippotyphosa	Mérida, Yucatán	5.6	Vado, <i>et al.</i> , 2002 ¹⁸
Hardjo, Wolffi, Tarassovi	Diferentes Estados de México	31.0	Moles, <i>et al.</i> , 2002 ¹⁹
Hardjo, Hardjo, Wolffi, Tarassovi, Bratislava, Icterohemorrhagiae, Canicola	Tabasco	76.1	Moles, <i>et al.</i> , 2003 ³⁹

Continuación del Cuadro 2

SEROVARIEDADES ^a	ESTADO	SEROPOSITIVIDAD (%)	REFERENCIA
Hardjo	Diferentes Estados de México	29.4 (Con un rango de 4.6 a 57)	Robles, 2003 ⁴⁰
Hardjo	Querétaro	90.9	Escamilla, 2004 ⁴¹
Grippotyphosa, Hardjo, Wolffi, Icterohaemorrhagiae, Canicola, Pyrogenes	Tizayuca, Hidalgo	15.6	Moles, <i>et al.</i> , 2004 ⁴²
Hardjo, Hardjo, Wolffi, Tarassovi Wolffi, Hardjo, Tarassovi Hardjo, Hardjo, Wolffi, Tarassovi Icterohaemorrhagiae, Canicola Portlandvere, Bratislava, Pyrogenes, Pomona, Hardjo, Hardjo, Wolffi, Tarassovi	Región árida y semiárida Región trópico seco Región trópico húmedo Región templada	22.1 al 54.3 27 al 72 31.7 al 84.6 22.1 al 54.3	Luna <i>et al.</i> , 2004 ²⁰
Hardjo, Wolffi, Hardjo	Campeche	75.5	Córdova <i>et al.</i> , 2005 ⁴³
Hardjo, Canicola, Grippotyphosa, Pomona, Pyrogenes, Icterohaemorrhagiae	Estado de México	78.8	Carmona y De la Peña, 2005 ⁴⁴
Hardjo Hardjoprajitno, Wolffi	17 Estados de México	41.5	Torres, <i>et al.</i> , 2005 ⁴⁵

^aDurante los años 1962 a 1998 la nomenclatura referente a las serovariedades de *Leptospira* establecía que el nombre debía escribirse con letra cursiva y la letra inicial minúscula. Durante los años 1991 a 2001 la nomenclatura referente a las serovariedades de *Leptospira* establecía que el nombre debía escribirse con letra cursiva y la letra inicial minúscula. A partir del año 2001 la ILS estableció que los nombres de las serovariedades deben ser escritos en forma no italizada y la letra inicial con mayúscula. A partir del año 2001 la ILS estableció que los nombres de las serovariedades deben ser escritos en forma no italizada y la letra inicial con mayúscula.

Leptospirosis una enfermedad de impacto negativo para la salud pública

La leptospirosis es una enfermedad infecciosa y contagiosa, causada por espiroquetas acuáticas del género *Leptospira*, la cual, al afectar a animales silvestres, domésticos y a humanos ha sido reconocida como la zoonosis más difundida en el mundo.^{46,47} Animales silvestres y domésticos que presentan infección renal crónica causada por serovariedades patógenas de *Leptospira*, eliminan a la bacteria a través de la orina.

Cuando la orina de estos animales o fuentes de agua contaminadas con dicha orina, entran en contacto con piel lesionada, reblandecida por humedad o con alguna superficie mucosa tanto de animales susceptibles como de hospederos accidentales como el humano, se produce la infección.^{48,49}

En los animales domésticos, puede tener una presentación aguda o crónica y cursar con una amplia variedad de signos clínicos como fiebre, infertilidad, aborto, pérdida de peso, ictericia, disminución de la producción láctea, signos asociados a insuficiencia hepática o renal, neumonía y meningitis. La infección en diversas especies animales puede persistir durante toda su vida.^{50,51}

La leptospirosis en humanos cursa en dos formas clínicas: anictérica o benigna que se presenta en un 85.0 a 95.0 % de los casos y la ictérica o grave, que se presenta en un 5.0 a 15.0 % de los casos, también llamada enfermedad de Weil. En la forma anictérica la sintomatología fundamental consiste en fiebre, cefalea, mialgias, artralgias y en algunos casos exantema. Se calcula que en un 8.0 % de los casos puede haber daño al sistema nervioso central (SNC) manifestado por síntomas de compromiso meníngeo (meningitis aséptica). En la enfermedad de Weil, los síntomas fundamentales son los relacionados al daño hepato-renal que se manifiesta como ictericia y nefritis con disfunción renal, con probabilidad de que ocurran lesiones pulmonares que se manifiestan como hemorragias que pueden llegar a producir hemoptisis. Los principales signos y síntomas de ambas formas clínicas son iguales al principio de su evolución, la diferenciación posterior se basa en las características del agente y el huésped, aunado a la aplicación o no de un tratamiento oportuno. El período de incubación de la enfermedad puede ser de 2 hasta 30 días, siendo lo usual entre 5 y 14 días. Se caracteriza por dos fases, la leptospirémica que dura de 7 a 10 días y la leptospirúrica que dura de una semana a varios meses o años. La amplia variedad de signos clínicos que la caracteriza hace que el diagnóstico se confunda con facilidad con otras

enfermedades de tipo febril. La puerta de entrada común de *Leptospira* es a través de abrasiones y otro tipo de heridas en la piel o por vía conjuntival. También se mencionan las mucosas oral y del tracto respiratorio debido a la ingesta e inhalación de agua o aerosoles contaminados. La transmisión entre humanos es rara, sin embargo se reportan algunos casos de transmisión sexual y de la madre al feto a través de la placenta y la leche.^{50,51}

Tipos de hospedero para leptospiras patógenas

Se han descrito dos categorías de hospedero: hospedero de mantenimiento y hospedero accidental. El primero tiene importancia desde el punto de vista epidemiológico, ya que la enfermedad es endémica y es adquirida de animal a animal mediante contacto directo. La infección generalmente ocurre a una edad temprana, quedando los animales como portadores y excretores de la bacteria en forma crónica, lo cual mantiene activas las potenciales fuentes de infección en la naturaleza. El segundo se caracteriza por incluir animales que son afectados por otras serovariedades, diferentes a aquellas de las que son hospederos naturales, resultando usualmente en casos graves de leptospirosis. En el caso del humano, no se ha demostrado la eliminación de la espiroqueta a través de la orina, o bien, esta es de muy corta duración, por lo que la participación del humano en la diseminación de leptospiras patógenas en la naturaleza no es relevante.^{46,49,52,53,54} Faine señala tres patrones epidemiológicos de la leptospirosis a considerar: áreas con climas templados, áreas con climas tropicales húmedos y el ambiente urbano.⁴⁸

Epidemiología de la leptospirosis

La diseminación de la enfermedad hacia huéspedes susceptibles dependerá de factores como clima, densidad de población, condiciones de higiene, grado de

infraestructura sanitaria y grado de exposición con huéspedes de mantenimiento principalmente. Diferentes especies de roedores pueden ser reservorios de distintas serovariedades, pero está aceptado que la rata gris o noruega (*Rattus norvegicus*) es huésped de mantenimiento del serogrupo Icterohaemorrhagiae, así como el ratón lo es para el serogrupo Ballum. Los animales domésticos que también pueden ser huéspedes de mantenimiento incluyen al bovino para la serovariedad Hardjo y Grippotyphosa; al cerdo para las serovariedades Pomona, Bratislava y Tarassovi; la oveja para la serovariedad Hardjo y el perro para Canicola.⁴⁶

En el caso de los bovinos, las condiciones climatológicas en mayor o menor grado pueden favorecer su supervivencia, ya que el rango de temperatura óptima de la bacteria en el medio ambiente es de 28 a 32°C en aguas no salinas con un pH ligeramente alcalino de 7.2 a 8.0.^{46,55} Dependiendo de las condiciones, leptospiras pueden sobrevivir desde unas cuantas horas en poca humedad hasta seis meses en agua estancada en inundaciones. Si bien, el impacto se aprecia con mayor frecuencia en áreas tropicales y subtropicales donde la enfermedad se manifiesta todo el año, también en áreas templadas se presenta en forma estacional durante los meses en que se registran altas temperaturas y lluvias (primavera-verano), en las regiones áridas debido a las condiciones propias se presenta cerca de sitios donde existe agua y una alta densidad de animales.⁵⁶ No se han establecido con precisión, los mecanismos mediante los cuales leptospiras patógenas, pueden persistir por largos periodos de tiempo en ambientes acuosos fuera de un hospedero. *Leptospira*, similar a otras espiroquetas, se adapta rápidamente a ambientes viscosos, en los cuales incrementa su movimiento de traslación con respecto a otras bacterias.^{57,58} Inclusive, algunos autores hacen referencia al fenómeno de viscotaxis para *Leptospira*.⁵⁹ En contraparte, Trueba (2004) comprobó que cuando leptospiras patógenas eran cultivadas en agua destilada (pH 7.2), estas permanecían viables durante 110 días, sin embargo, cuando

estas fueron cultivadas en el mismo tipo de agua a la cual se le agregó 0.5 % de agarosa purificada, se triplicó el tiempo de supervivencia (347 días). La observación en microscopio de campo oscuro de estos cultivos reveló un patrón de agregación que no fue afectado por la carencia de nutrientes. Es posible que en el ambiente, al entrar en contacto con fuentes de agua, *Leptospira* pueda tener afinidad para detectar la viscosidad formada por componentes de naturaleza polisacárida o biopelículas de otros microorganismos sobre los cuales esta espiroqueta logre formar agregados. De esta forma, podría sugerirse que la agregación de leptospiras es un mecanismo de protección en ambientes acuosos, que favorece su persistencia en este tipo de nichos, tal como sucede cuando éstas se cultivan en medios semisólidos.⁶⁰

Respecto a los factores de riesgo independientes del medio, cabe destacar el tipo de estrategias de crianza ganadera,³⁰ si se considera que en los bovinos, los casos de leptospirosis parecen ser más frecuentes y de peor pronóstico en las explotaciones de bovinos productores de leche, que en aquellas dedicadas a la crianza de bovinos productores de carne.⁴³ Esto es debido, principalmente, a que el ganado bovino lechero se explota por lo general en sistema intensivo o semiextensivo que implica un mayor hacinamiento, lo cual favorece la transmisión. Además, en el caso de bovinos productores de leche, las crías suelen separarse de las madres tras el parto, manteniéndose aisladas del hato e introduciéndolas en el núcleo del mismo hasta su primera gestación. Esto supone la introducción de animales no expuestos, totalmente susceptibles a la infección y que pueden infectarse en los momentos de mayor riesgo, haciendo que las tasas de la enfermedad más altas se produzcan entre los 2-3 años de edad.^{30,56}

A diferencia de lo que sucede en otras especies animales, en los bovinos son más comunes los abortos y la existencia de portadores renales.⁶¹ El aborto en leptospirosis se puede considerar como una secuela crónica de la infección, que se produce

semanas después de la leptospiremia, con títulos de anticuerpos en fase descendente y muchas veces por debajo de niveles detectables.⁵⁰ En los casos de aborto, es recomendable tomar muestras de suero tanto de la hembra abortada como del animal abortado para realizar los análisis serológicos. La determinación de anticuerpos fetales tiene un gran interés (el feto es inmunocompetente hasta los 100-120 días de vida). Dado que los anticuerpos maternos no pasan la barrera placentaria y en consecuencia no hay interferencias con reacciones vacunales. El aborto ocurre, generalmente en el último tercio de gestación, de seis a doce semanas después de la leptospiremia inicial.⁶¹

La prevalencia de la leptospirosis bovina actualmente es reconocida en todo el mundo causando grandes pérdidas económicas.⁵⁶ En México, existen reportes de aislamiento de la serovariedad Hardjo subtipo Hardjoprajitno a partir de un feto bovino en la Cuenca Lechera de Tizayuca, Hidalgo.^{62,63}

Ecología de la leptospirosis

Ecosistema silvestre

Especies patógenas de *Leptospira* se mantienen en ambientes silvestres en equilibrio con la naturaleza asegurando su perpetuación. Diversas especies de animales silvestres son portadoras de leptospirosis patógenas, como roedores, zarigüeyas, mapaches, nutrias, comadrejas entre otros, siendo importantes hospederos de mantenimiento, prácticamente de por vida. De éstos, los roedores son considerados el principal reservorio de *Leptospira*.^{64,65,66}

La presencia de *Leptospira* en los ecosistemas silvestres es endémica y usualmente transferida de animal a animal. Cuando se altera el equilibrio en el ambiente silvestre de *Leptospira*, por fenómenos naturales como el del “Niño”, excesivas lluvias, huracanes, incendios o tala indiscriminada de la selva, que destruyen el nicho

ecológico de los hospederos silvestres de mantenimiento, éstos se acercan a las poblaciones humanas. En consecuencia, se transforman en fuente de infección para animales domésticos como vacas, cerdos y perros, así como también para el humano. Esto ha causado la aparición de la leptospirosis como una enfermedad emergente o bien reemergente, de ahí que sea muy importante el conocimiento geográfico de los nichos ecológicos de los reservorios.^{48,67,68}

Ecosistema de la leptospirosis rural

Antes de 1970, la Organización Mundial de la Salud (OMS) consideraba a la leptospirosis como una enfermedad exclusiva de zonas rurales, ambiente tropical y ocupacional, afectando a personas cuya profesión permite el contacto directo con animales infectados o con su hábitat. Algunos grupos laborales con riesgo de infección incluyen a los agricultores, ganaderos, veterinarios, trabajadores de arrozales, trabajadores de rastro, trabajadores de desasolve del drenaje y alcantarillas y militares entre otros; así como los propietarios de mascotas.⁶⁹ En la actualidad, la epidemiología de la leptospirosis rural ha cambiado y se tienen que considerar factores que favorecen la transmisión de la enfermedad como son: las condiciones climáticas;⁷⁰ la distribución de la población; la urbanización y los niveles sociales, económicos y culturales de la población.⁷¹ El riesgo de adquirir la infección abarca tanto el ambiente extra-domiciliario como el domiciliario, la incidencia puede ser similar entre sexos aunque la infección suele presentarse más comúnmente en hombres que en mujeres.^{18,68} La infección representa no sólo un problema con implicaciones epidemiológicas sino también económicas y sociales, constituyendo un serio problema de salud pública, en especial en aquellas zonas con saneamiento inadecuado, donde las condiciones de trabajo y el tipo de actividad favorecen su desarrollo.⁷¹

Por otro lado, las actividades de tipo recreativo, sobre todo en los deportes acuáticos como son nadar en estanques, lagunas, ríos, cenotes, canotaje, pesca, y en eventos deportivos tales como triatlones y eco-retos han sido documentados como un riesgo de infección por *Leptospira*. Ha quedado confirmado que el contacto con agua de nichos silvestres aumenta el riesgo de contraer la leptospirosis.^{18,72,73,74}

Las condiciones para la viabilidad de leptospiras en diferentes fuentes de agua tanto naturales como artificiales, suelo, lodo y alimentos, dependen de condiciones fisicoquímicas como el pH, la salinidad, la viscosidad, la temperatura y la humedad.^{46,60}

Ecosistema de la leptospirosis urbana

La epidemiología de la infección humana por serovariedades patógenas de *Leptospira* en el ecosistema urbano, puede incluir un contacto esporádico y casual con la orina de ratas que están en el ambiente suburbano y zonas marginadas con deficientes servicios sanitarios.^{75,76}

Una constante en la aparición de brotes urbanos en países subdesarrollados es la urbanización deficiente, que se refleja en una infraestructura sanitaria precaria, registrando inundaciones periódicas, zanjas y tiraderos de basura como parte del paisaje cotidiano, en donde dos de los hospederos de mantenimiento son comúnmente atraídos, la rata y el perro. Las evidencias demuestran que el perro es un eslabón importante en la epidemiología urbana de la enfermedad al presentar un estado de portador asintomático en el que actúa como diseminador de leptospiras. El perro es sin lugar a dudas, una de las fuentes de contagio más importantes, por el estrecho contacto que tiene con la población humana. En términos generales, los propietarios de animales no consideran a la leptospirosis como un riesgo de salud tanto para el animal, como para el grupo familiar debido entre otras razones, a la falta de información por parte de los médicos cirujanos y de los sistemas de salud.^{65,68} La leptospirosis es el

clásico ejemplo de una enfermedad que requiere de una estrecha colaboración entre las autoridades de salud pública y veterinaria, si en verdad se pretende lograr un control exitoso de la enfermedad, evitando en lo posible, su transmisión hacia el humano.

Leptospirosis en bovinos

La leptospirosis es una enfermedad importante que afecta los parámetros reproductivos del ganado bovino de todo el mundo, donde una estimación precisa de la prevalencia es difícil de establecer. En México, estimaciones basadas en estudios serológicos indican prevalencias que van del 4.0 hasta el 90.0 % en bovinos (Cuadro 2).^{24,41,77}

Se ha considerado a la serovariedad Hardjo, adaptada al bovino, como la más importante en esta especie. Los bovinos son hospederos naturales de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo subtipo Hardjobovis y *L. interrogans* serovariedad Hardjo subtipo Hardjoprajtino en donde la infección con ambas serovariedades, se asocia con trastornos de tipo reproductivo.^{52,53,54} Ambos subtipos de la serovariedades Hardjo pertenecen a especies genéticamente distintas y sin embargo, son antigénicamente indistinguibles aun con el uso de anticuerpos monoclonales.^{78,79,80}

Las principales manifestaciones clínicas resultantes de la infección incluyen, trastornos reproductivos como infertilidad, aborto, nacimiento de crías débiles y disminución temporal de la producción láctea. La serovariedad Hardjo tiene una distribución importante en las unidades de producción bovina, en Brasil se diagnosticó en 80.9 % de 21 establos lecheros analizados y en el sur de Australia, se identificó en el 100 % de los establos estudiados.⁵¹

En un estudio realizado a 4,043 muestras de suero de bovino de diferentes Estados de la República Mexicana, se encontró una seropositividad de 31.1 %, cercana a la obtenida en un estudio similar en donde se encontró una seropositividad de 34.0 % a

partir de 4,413 muestras de suero de bovinos, siendo las serovariedades Hardjo y Wolffi las que destacaron en ambos estudios.^{19,63}

Con la información generada en este estudio, se concluyó que las serovariedades Hardjo, Wolffi y Tarassovi fueron las tres serovariedades más importantes en bovinos de México para el año 2002 y se encontró que existe coincidencia con los hallazgos publicados en otros países.¹⁹

Con la finalidad de establecer el perfil serológico de leptospirosis en bovinos del Estado de Chiapas, se analizaron 3,454 muestras, por medio de la prueba de AM, resultando el 31.7 % de animales positivos, destacando igualmente las serovariedades Hardjo, Wolffi y Tarassovi.⁸¹

Leptospirosis aguda en bovinos

Ésta se observa generalmente en animales recién nacidos y terneros de un mes de edad, los cuales presentan hematuria, hemoglobinuria, ictericia, meningitis y muerte como resultado de un estado septicémico grave causado por serovariedades como Pomona o Canicola. Dentro de los 3 a 5 días de iniciada la enfermedad, ésta se manifiesta por fiebre (40.5 a 41.5 °C), depresión, falta de apetito, hemorragias en encías, anemia hemolítica con orina rojiza, ictericia, meningitis y palidez de mucosas. Hay aumento de la frecuencia cardíaca, alteración de la respiración y muerte.^{48,56} A la necropsia, se observan hemorragias generalizadas en submucosas y serosas. En riñón se observan pequeños focos blanquecinos. Pueden encontrarse úlceras y hemorragias en la mucosa del abomaso y en caso de hemoglobinuria intensa, ésta se asocia a menudo con edema pulmonar y enfisema. El estudio histopatológico permite observar nefritis intersticial difusa, local y necrosis hepática centrolobulillar.⁶¹ En las infecciones provocadas en terneros por la serovariedad Hardjo Hardjobovis, no se manifiesta

ictericia, ni hemoglobinuria, ni anemia y los abortos a diferencia de la serovariedad Pomona tienden a ser esporádicos.⁴⁸

Se ha reportado agalactia subclínica en vacas en producción que presentan infecciones con la serovariedad Hardjo Hardjoprajitno.⁶¹

Los animales afectados pueden tener baja producción de leche dentro de las primeras 12-24 horas y presentar un periodo corto febril. La leche puede tener aspecto rojizo y coágulos confundiendo con los primeros calostros; la ubre se torna flácida y blanda sin inflamación ni dolor y los cuatro cuartos se ven afectados simultáneamente. En algunos casos (15.0 % de presentación) no se reporta un cambio físico en la ubre, por lo cual se le conoce a esta signología como “mastitis fría”. La agalactia puede durar de dos a 10 días e incluso más. 50.0 % de los animales afectados retorna a la producción previa y el 50.0 % de éstos sólo recuperará el 90.0 % de la producción original. Sin embargo, si la infección se presenta en etapas finales de lactación, la producción puede no retornar ocasionando un secado prematuro.^{50,61}

Leptospirosis crónica en bovinos

Los efectos de la leptospirosis crónica son mucho más importantes económicamente que los efectos de la forma aguda. En estos casos puede haber falla reproductiva caracterizada por: aborto, mortinatos, nacimiento de animales débiles y bajos de peso, partos prematuros e infertilidad. La eliminación de leptospiras a través de la orina, membranas, líquidos uterinos y fetos de los animales infectados representa el mayor riesgo para la salud de humanos que entran en contacto con estos animales. Los bovinos infectados pueden pasar desapercibidos siempre que no haya ninguna actividad reproductiva que indique alguna anomalía.⁶¹

Posterior a la infección inicial de un hato, sin antecedentes de exposición a serovariedades patógenas de *Leptospira*, podría esperarse hasta un 30.0 % de

abortos, mientras que en un hato donde la infección ha estado ya presente el porcentaje de abortos fluctúa entre un 1 y 5.0 %. El aborto se presenta alrededor de las 4 a 12 semanas posteriores a la infección porque las leptospiras que invaden el útero y el feto durante el estado agudo o septicémico de la enfermedad, ocasionan la muerte fetal 24 horas antes del aborto.^{48,56} El aborto puede ocurrir en cualquier etapa de gestación, aunque generalmente se manifiesta del sexto mes en adelante (último tercio). En un estudio de 472 fetos abortados, se reportó que el 95.5 % de abortos ocurrió, en promedio, al 5º mes de gestación.⁶¹ Las lesiones observadas en los fetos abortados y en becerros nacidos débiles, están asociadas con pérdida de la vascularización, edema de los tejidos de la placenta (alantoides y amnios) y en ocasiones necrosis de cotiledones.⁴⁸

Puede ocurrir retención placentaria e infertilidad en algunos casos de leptospirosis crónica.^{48,56,61} Posterior al aborto, la bacteria se eliminará en las descargas uterinas durante dos semanas. A la necropsia, en el feto se observa ictericia en tejido subcutáneo, líquido sanguinolento en cavidades, hemorragia y esplenomegalia. Los hallazgos histopatológicos en el feto son nefritis intersticial difusa y local, necrosis hepática centrolobulillar y en algunos casos lesiones vasculares en meninges y cerebro.⁶¹ Se ha relacionado la estacionalidad con la presencia de abortos causados por *Leptospira* siendo más frecuente en los meses de septiembre a diciembre, debido probablemente a que las condiciones de humedad y precipitación pluvial favorecen la infección. Aunque se ha considerado que la mortalidad por leptospirosis es baja en bovinos (del 5.0 al 15.0 %), la morbilidad suele ser elevada según datos clínicos y serológicos (75.0 % en animales adultos y hasta el 100 % en terneros) .⁴⁸

Patogenia de la leptospirosis

La entrada del microorganismo tiene lugar por laceraciones cutáneas, piel reblandecida por exceso de humedad o a través de mucosas. La fuente de infección es casi siempre

la orina de animales enfermos que a su vez contamina pastizales y depósitos naturales de agua con leptospiras patógenas, fetos abortados o secreciones uterinas. Se considera que el semen de los toros infectados también puede ser una fuente de leptospiras patógenas, produciéndose la transmisión de la infección durante la cópula e inclusive durante la inseminación artificial.^{48,50}

Dependiendo del nivel de inmunidad del huésped, de su condición física, su edad al momento de la infección y de la virulencia de la cepa patógena de *Leptospira*, el curso de la enfermedad puede conllevar a cuadros de septicemia, endotoxemia, hemorragias, hepatitis, nefritis, meningitis, iridociclitis, aborto, nacimiento de animales prematuros, débiles, retención placentaria, infertilidad, o bien a una forma subclínica, reconocida únicamente por la producción e identificación de anticuerpos. De igual forma, la capacidad de recuperación de los animales dependerá del grado de susceptibilidad, la virulencia de la cepa involucrada y de la magnitud de las lesiones ocasionadas en los órganos vitales, particularmente el riñón y el hígado.⁵⁶

Los mecanismos específicos mediante los cuales las leptospiras causan daño a los diferentes tejidos del hospedador y conducen a la aparición de manifestaciones clínicas no han sido plenamente estudiados. Los diferentes reportes enfocados en los mecanismos de patogenicidad no han identificado el componente específico de *Leptospira*, responsable del efecto estudiado. Por ejemplo, ha sido demostrada la adherencia de leptospiras virulentas a células del epitelio tubular renal de ratón *in vitro* o a monoestratos de fibroblastos.^{82,83} Sin embargo, en ningún caso se identificaron las adhesinas responsables. Se ha postulado a proteínas de unión a la fibronectina como uno de los componentes de *Leptospira* que median la unión con las células del huésped, dado que la fibronectina posee una amplia distribución en el organismo.⁸⁴

Una preparación de peptidoglicano de la serovariedad Copenhageni fue capaz de inducir la liberación de TNF- α a partir de células mononucleares de sangre

periférica.^{85,86} En la fase aguda de la enfermedad, los niveles de TNF- α se encuentran elevados y esta condición se ha relacionado con la severidad del daño.^{87,88} Se propone que una glicolipoproteína (GLP) de 30 kDa, induce efectos tóxicos a través de su porción lipídica, resultando en una perforación de la MC con la salida de componentes bacterianos y finalmente muerte celular.⁸⁹ Se ha observado que en células epiteliales de los túbulos renales de conejo, la GLP inhibe la actividad de la ATPasa que participa en la bomba de sodio y potasio de una manera dosis-dependiente.⁹⁰ Pereira *et al.*, (1997) obtuvieron los perfiles proteicos de la GLP de la serovariedad Canicola en electroforesis de geles desnaturalizantes, fueron observadas bandas con un rango de peso de 14 a 66 kDa.⁹¹ En un modelo experimental con cobayos infectados con leptospiras patógenas, la GLP fue detectada adherida a células endoteliales de los tejidos dañados y a la membrana de células epiteliales junto con otros antígenos, posterior a la destrucción de *Leptospira* por parte de elementos del sistema inmune.⁹² La activación celular inducida por la GLP derivó en un incremento significativo de los niveles de TNF- α e IL10. Esta inducción también dio lugar a la expresión de receptores diversos en la superficie de linfocitos y macrófagos, pero este efecto únicamente se presentó con la GLP de *L. interrogans* y no se presentó cuando se utilizó la GLP de *L. biflexa*.⁹³ Una fracción de una glicoproteína de *Leptospira* mostró la capacidad de inhibir la función de la enzima ATPasa,⁹⁰ dicha actividad se atribuyó a la presencia de largas cadenas de ácidos grasos en la molécula.⁹⁴ De igual forma, las bases moleculares de la quimiotaxis hacia una hemoglobina reportada *in vitro*, no han sido establecidas.⁹⁵ Leptospiras virulentas pueden resistir la acción bactericida del complemento y de los neutrófilos,^{96,97} sin embargo, son rápidamente eliminadas en presencia de anticuerpos específicos.^{98,99,100} No hay evidencia de algún tipo de toxina secretada por *Leptospira*, el daño endotelial que se presenta ha sido asociado a la presencia misma de *Leptospira* en tejido renal de cobayos infectados

experimentalmente.¹⁰¹ Se han encontrado evidencias de la capacidad de *Leptospira* para invadir células Vero e inducir apoptosis en macrófagos, pero sin definir el determinante de virulencia específico. Ambas propiedades se perdieron significativamente después de un subcultivo *in vitro*.¹⁰² A pesar de que *Leptospira* no se considera un patógeno intracelular, leptospiras virulentas fueron capaces de penetrar monoestratos de células de riñón canino Madin-Darby polarizadas (MDCK:Madin-Darby canine kidney cells), más eficientemente que leptospiras avirulentas.¹⁰³ Resulta interesante que esto se logró sin ninguna alteración del citoesqueleto.

Una proteína de unión a fibronectina con un peso molecular de 36 kDa fue identificada en una cepa virulenta de la serovariedad Icterohaemorrhagiae y no detectada en una variante avirulenta ni en una cepa saprofita; sin embargo, el gen homólogo no logró ser identificado.⁸⁴

La actividad hemolítica se ha demostrado en varias serovariedades de *Leptospira* y por consiguiente, ha resultado de interés caracterizar los genes que codifican para este tipo de proteínas (hemolisinas). Una esfingomielinasa C codificada por el gen *sphA* fue identificada en la serovariedad Hardjo, subtipo Hardjobovis.¹⁰⁴ Secuencias similares fueron encontradas en todas las cepas patógenas probadas y en contraste, no se encontró este tipo de secuencias en serovariedades no patógenas.¹⁰⁴ Por otro lado, la actividad de la esfingomielinasa ha sido reportada en serovariedades como Canicola y Pomona. Con base en ensayos de hibridación y experimentos de clonación, por lo menos otros siete genes similares a *sphA* han sido identificados en algunas especies patógenas de *Leptospira*. Se ha postulado que la esfingomielinasa SphH reportada en la serovariedad Lai, pertenece a la familia de hemolisinas formadoras de poro.¹⁰⁵

El LPS de *Leptospira* constituye el antígeno principal de superficie hacia el cual se dirige la respuesta inmune con anticuerpos de tipo aglutinante (IgM) y contribuye a la patología de la enfermedad. Su estructura exacta no ha sido establecida, sin embargo,

el análisis químico de éste reveló la presencia de hexosas comunes, aminohexosas, pentosas y azúcares como xilosa y arabinosa raramente encontradas como constituyentes del LPS en otras bacterias. Así mismo, el descubrimiento del ácido ceto-deoxioctanoico (KDO) en el LPS de las serovariedades Copenhageni y Hardjo, indica una composición similar al LPS de bacterias Gram negativas.^{79,89} Azúcares metilados y acetilados también han sido reportados.¹⁰⁶ A pesar de la similitud estructural, bioquímica e inmunológica del LPS de *Leptospira* con el LPS de bacterias Gram negativas, éste es por lo menos 10 veces menos tóxico para animales y células que el de otras bacterias, característica también observada en el LPS de otros patógenos como *Brucella* en donde su actividad tóxica es inferior al LPS de otras bacterias como *E. coli*.^{107,108} No obstante, puede activar macrófagos y actuar como un mitógeno para células B.^{109,110} Dicha activación de macrófagos ocurre a través de los receptores CD14 y TLR2, en lugar de la vía que se sigue mediante la interacción de receptores TLR4 con el LPS de otras bacterias Gram negativas.¹¹¹ Resulta interesante considerar que el TLR2 es el receptor con el que interactúan las bacterias Gram positivas y otros componentes microbianos diferentes al LPS.¹¹¹

Algo que caracteriza a la leptospirosis es el daño a los endotelios vasculares, que da lugar a una vasculitis y posteriormente, facilita la extravasación de sangre y leptospiras dentro de los tejidos afectados. Esta condición reduce el oxígeno y provoca una isquemia secundaria que afecta a órganos como los riñones, hígado, glándulas adrenales y pulmones.⁵⁶ El mecanismo por el cual *Leptospira* induce el daño renal, no se ha establecido aún, sin embargo, se ha planteado la hipótesis de la liberación de algún tipo de toxina por parte de *Leptospira* como responsable del daño a los endotelios.^{112,113}

La gran movilidad de *Leptospira*, es sin lugar a dudas, un factor que contribuye de manera importante a la diseminación del microorganismo hacia órganos específicos,

posterior a la condición de leptospiremia, lo cual le permite además evadir en ciertas condiciones, la respuesta inmune del huésped.⁴⁸

Es evidente que como mecanismo de patogenicidad, la invasividad posterior al proceso de infección, tiene una mayor relevancia como causa de daño por parte de *Leptospira*, que la toxigenicidad.

Biología del género *Leptospira*

Taxonomía

El análisis de la secuencia de los genes de ARN ribosomal y reacciones de hibridación de ADN, han permitido un nuevo ordenamiento taxonómico de las más de 250 serovariedades reconocidas. De esta forma, la actual clasificación genética comprende 12 especies de *Leptospira*, 9 patógenas: *L. alexanderi*, *L. borgpetersenii*, *L. fainei*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. weilii* y 3 no patógenas *L. biflexa*, *L. meyeri* y *L. wolbachii*.^{48,114,115} Una mayor comprensión de las relaciones filogénicas entre cepas de patógenas y saprofitas será alcanzada toda vez que se determine la secuencia del genoma de las leptospiras saprófitas.

La clasificación genética (inicialmente se usó el término geno-especies) tiene muy poca relación con la clasificación serológica (serogrupos y serovariedades), sin embargo, en el caso de los dos subtipos antigénicamente indistinguibles de la serovariedad Hardjo, hay diferencias genéticas que las colocan a cada una en diferente especie (*L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo subtipo Hardjobovis y *L. interrogans* serovariedad Hardjo subtipo Hardjoprajitno).⁴⁸

El orden *Spirochaetales* comprende a dos Familias, *Leptospiraceae* y *Spirochaetaceae*.

La familia *Leptospiraceae*, incluye a tres géneros: *Leptospira* que agrupa tanto a

especies patógenas como no patógenas y los géneros *Leptonema* y *Turneria*, los cuales comprenden especies no patógenas (Figura 1).

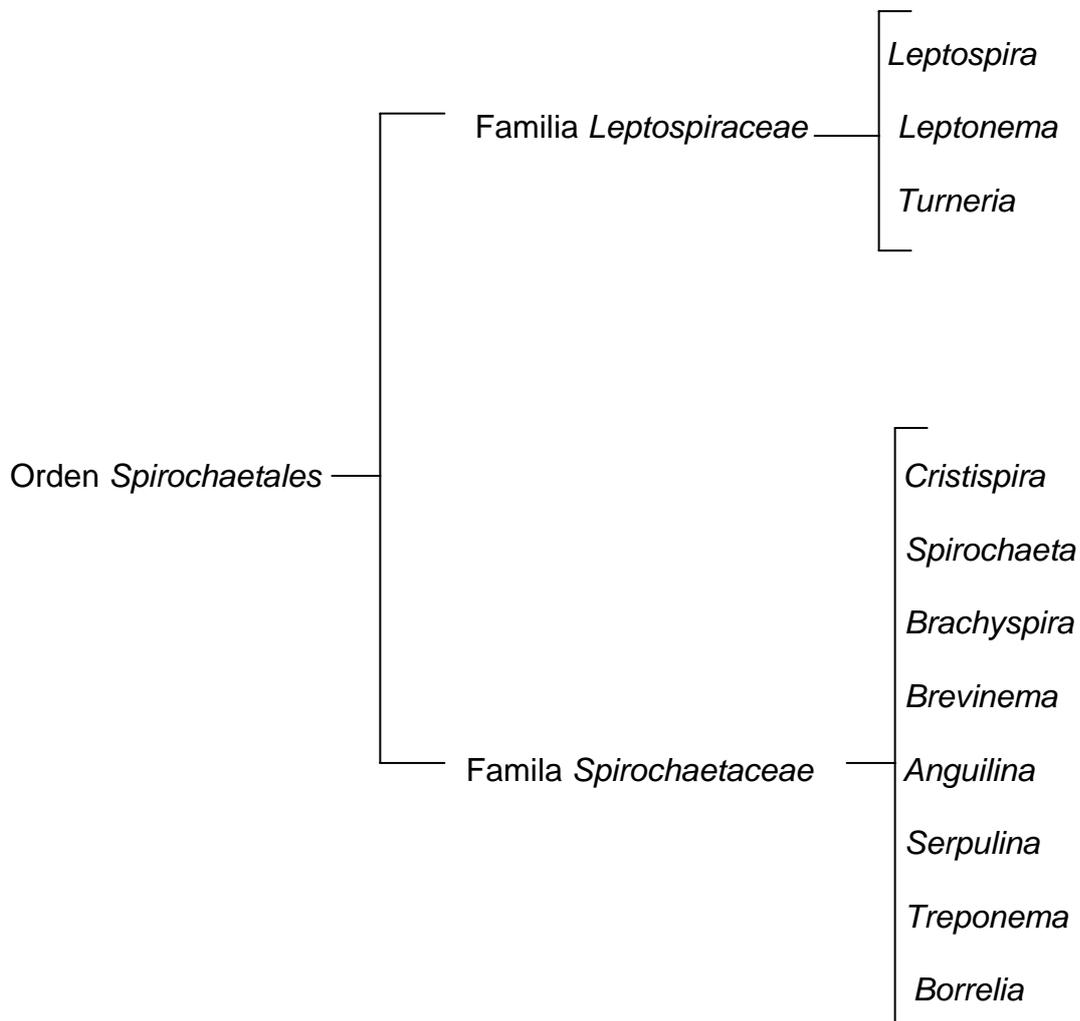


Figura 1. Diagrama de la filogenia del Orden *Spirochaetales*.

Morfología y movilidad

El género *Leptospira* comprende a un grupo de espiroquetas acuáticas, las cuales miden de 6 – 20 μm de largo por 0.1 μm de diámetro,⁴⁶ siendo las más pequeñas y delgadas del orden *Spirochaetales*. Las leptospiras son bacterias espirales con dos flagelos localizados en el periplasma (Figura 2), que envuelven el cilindro protoplásmico y que se insertan sub-terminalmente en la MC.¹¹⁶ Este tipo de flagelo se denomina endoflagelo o filamento axial y está constituido por dos tipos de proteínas: el primero es

una proteína con alta similitud (secuencia de aminoácidos) a la flagelina bacteriana y que forma la médula del flagelo (FlaA), mientras que el segundo tipo de proteína (FlaB) forma la envoltura del flagelo.¹¹⁷ Ambos tipos de proteínas son conservados entre las distintas especies de *Leptospira*.

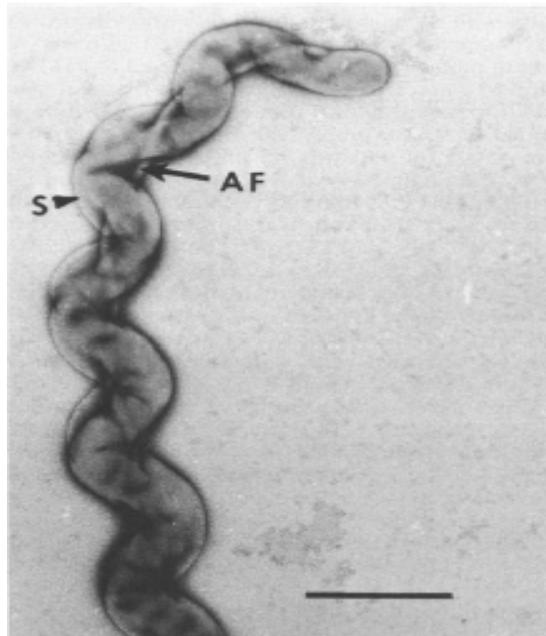


Figura 2. Microfotografía de *L. interrogans* que muestra el endoflagelo mediante una tinción de acetato de uranilo. AF – Filamento axial; S – Cubierta externa. La barra equivale a 0.5 μm .

(Nauman *et al.*, 1969)¹⁶

El funcionamiento de los endoflagelos y el tipo de movilidad en espiroquetas es algo más complejo que en otras bacterias. En el caso de *Leptospira* se han descrito tres tipos de movimiento (rotación, translación y contorsión). Cuando uno de los endoflagelos gira en dirección contraria a las manecillas del reloj, el extremo de la célula asume una forma espiral y la célula tenderá a moverse en la dirección señalada por este. Cuando los dos endoflagelos giran en la dirección de las manecillas del reloj, entonces los extremos adquieren la forma de gancho y la célula no se desplaza. La célula rota sin moverse en una dirección definida (Figura 3). El desplazamiento en una

dirección ocurre cuando uno de los flagelos gira en dirección contraria a las manecillas del reloj, y el otro en la dirección de las manecillas del reloj.¹¹⁸

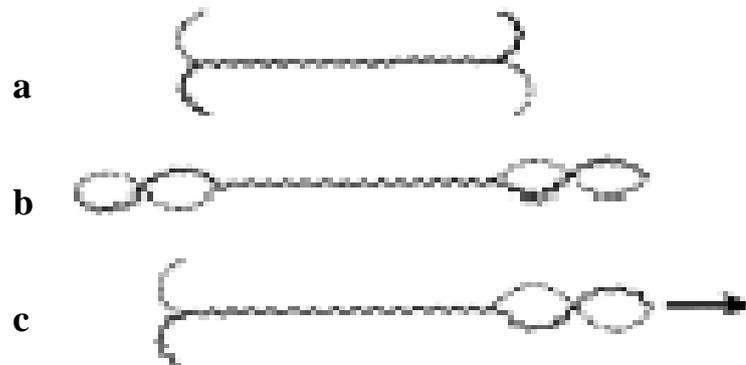


Figura 3. Modelo del movimiento de *Leptospira*. a) con los dos extremos en forma de gancho; b) *Leptospira* con los dos extremos en forma de espiral; c) *Leptospira* con un extremo en forma de gancho y el otro en forma de espiral.

(Goldstein and Charon, 1990)¹¹⁸

El genoma de *Leptospira* está constituido por dos cromosomas que en su conjunto, constituyen un genoma de 4.6 Mb, que supera en tamaño al de espiroquetas de vida estrictamente parásita como *Borrelia* y *Treponema*, en las que el tamaño es de 1 y 3 Mb respectivamente.¹¹⁹ Esta última característica probablemente explica la capacidad de las serovariedades patógenas de *Leptospira* para sobrevivir durante semanas o meses en agua o medios acuosos, dependiendo del tipo de pH, salinidad y viscosidad.^{46, 60}

Supervivencia de *Leptospira* fuera del huésped y viscotaxis

Fuera de los hospederos de mantenimiento, las leptospiras patógenas pueden permanecer viables en agua destilada por 152 días;⁴⁸ sin embargo, no toleran la presencia de sales o competencia con bacterias ambientales. Por lo tanto, el agua de lluvia baja en sales y con baja concentración de bacterias ambientales resulta ideal

para su supervivencia. Las leptospiras están adaptadas a medios viscosos por los que tienen una alta afinidad denominada por Petrino y Doetsch (1978) como viscotaxis.⁵⁹ En estos medios, *Leptospira* desarrolla una movilidad direccional, cuya velocidad no es superada por otras bacterias flageladas.⁵⁷ Esta movilidad, similar a la de un sacacorchos, probablemente contribuye a la capacidad invasiva de *Leptospira*.⁵⁷ Adicionalmente, en estos medios viscosos carentes de nutrientes se ha observado que leptospiras patógenas se agregan y pueden sobrevivir por periodos de hasta 347 días.⁶⁰ Algo similar se ha observado en las tuberías de agua potable, donde leptospiras saprófitas aparentemente se asocian a biopelículas bacterianas.¹²⁰ *L. interrogans* posee dos genes estrechamente relacionados a los genes *devR* y *devS* de *Myxococcus xanthus*, los cuales le permiten mantener su viabilidad en ambientes acuáticos.¹¹⁹ Dichos genes, en *Myxococcus xanthus* son esenciales para activar cambios estructurales inducidos por la carencia de nutrientes y que tienen como propósito primordial, preparar a la bacteria para mantener su viabilidad durante condiciones adversas.¹²¹ Es posible que tengan una función similar en *Leptospira*.

Requerimientos nutricionales y atmosféricos

Los requerimientos nutricionales de *Leptospira* son simples e incluyen sales inorgánicas y como fuente de energía ácidos grasos de 12 a 18 átomos de carbono (palmítico, esteárico y mirístico), los cuales son metabolizados mediante β -oxidación, generando un número importante de intermediarios metabólicos que producen un alto rendimiento de energía.¹²² No fermentan azúcares y no los pueden usar como fuentes de carbono. Mientras que *L. biflexa* requiere ácidos grasos saturados, *L. interrogans* requiere ácidos grasos insaturados.¹²³ Los ácidos grasos esenciales requeridos para su nutrición, en altas concentraciones se

vuelven tóxicos, razón por la cual deben presentarse en combinación con un agente destoxicante que los adsorba del medio. El compuesto que se utiliza para lograr este efecto con los ácidos grasos es la albúmina sérica bovina. Adicionalmente, los ácidos grasos pueden ser presentados en una forma no tóxica al combinarlos en un complejo junto con ésteres de sorbitán de polioxietileno (Tween), los diferentes Tween, son químicos industriales los cuales también aportan ácidos grasos no esterificados, compuesto al cual se le asigna un grado con un valor numérico de acuerdo a sus propiedades físicas, así se encuentra Tween 20, 40 y 80.¹²⁴ El glicerol (200 mg/l) incrementa el desarrollo de algunas leptospiras, mientras que el piruvato ayuda al desarrollo de algunas cepas de las serovariedades Hardjo y Ballum. Los iones de amonio, obtenidos por desaminación de aminoácidos, son la única fuente reconocida de nitrógeno. La adición al medio de cultivo de vitaminas como, cianocobalamina (vitamina B12), tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B6) y la biotina. Sales de fosfato, hierro, calcio y el magnesio, en su conjunto favorecen la actividad metabólica de *Leptospira in vitro*.^{125,126}

Antígenos estructurales de *Leptospira*

La organización de su pared celular como en otras espiroquetas, es semejante a la de bacterias Gram negativas.⁴⁶ En su membrana externa (ME), el lipopolisacárido (LPS) representa el antígeno más importante, siendo la base para la clasificación serológica de *Leptospira*.^{79,127,128} El LPS de *Leptospira* se caracteriza por ser mucho más corto que el de una típica bacteria Gram negativa. Adicionalmente, tiene muy poca actividad biológica y estimula a los macrófagos a través del receptor Toll-like 2.¹¹¹ El LPS es detectado en la prueba AM y por lo tanto es la base para la clasificación antigénica en serogrupos y serovariedades. Los anticuerpos contra el LPS de *Leptospira* son

considerados protectivos en ciertas especies animales; sin embargo, la protección que genera es serovariedad específica y de corta duración.⁴⁶

Los genes para la biosíntesis del LPS de *Leptospira* están organizados en el *locus rfb*. 31 marcos abiertos de lectura (MAL) fueron caracterizados genéticamente y el análisis de los *loci rfb* de los subtipos Hardjobovis y Hardjoprajitno, pertenecientes a distintas especies (*L. borgpetersenii* y *L. interrogans*), sugiere que la similitud antigénica se originó a partir de transferencia horizontal de genes de Hardjobovis hacia el ancestro de la serovariedad Copenhageni, dando origen al subtipo Hardjoprajitno adaptado al bovino.^{128,129}

Por otro lado, otros antígenos superficiales incluyen a las proteínas de la membrana externa (PME) que en su mayoría están constituidas por lipoproteínas. En la ME de serovariedades patógenas de *Leptospira* se han identificado 67 unidades proteicas, de las cuales por lo menos 12 son productos de distintos genes.¹³⁰ Se ha demostrado que algunas de estas proteínas inducen respuestas inmunes protectoras en animales de laboratorio.⁴⁶

Inmunogenicidad

Como sucede en bacterias Gram positivas, la MC de las espiroquetas está estrechamente asociada con el peptidoglicano de la pared celular. Además, poseen una ME que las provee de una barrera impermeable, además de contener antígenos que interaccionan con el medio extracelular. Su superficie es dominada proporcionalmente por la porción polisacárida del lipopolisacárido (LPS), el cual es accesible al sistema inmune.⁴⁸

Un análisis de la movilidad de *Leptospira* reveló que la ME es totalmente fluida, lo cual contrasta con la ME de las bacterias Gram negativas.¹³¹

Estudios utilizando anticuerpos monoclonales han mostrado que el LPS es el blanco de anticuerpos opsonizantes aglutinantes de tipo IgM, de ahí que tenga un papel importante en la inmunidad contra la infección.¹⁰⁰ Así mismo, anticuerpos monoclonales contra el LPS proveen protección pasiva contra la infección y LPS purificado puede estimular inmunidad activa.^{78,132} El LPS como antígeno aglutinante, es el más importante para la clasificación antigénica de *Leptospira*.

Es claro que preparaciones de LPS de *Leptospira* pueden promover una inmunidad protectora; sin embargo, esta inmunidad es generalmente serovariedad específica.⁴⁸

Análisis químicos del LPS mostraron la presencia de hexosas, aminohexosas, pentosas y algunos otros azúcares raramente encontrados como componentes del lipopolisacárido, como xilosa y arabinosa.⁸⁹ A pesar de la similitud estructural, bioquímica e inmunológica del LPS de *Leptospira* con el de bacterias Gram negativas, el primero es al menos 10 veces menos tóxico para animales y células. No obstante, el LPS de *Leptospira* puede activar macrófagos y actuar como un mitógeno para células B.¹⁰⁹ Se ha postulado que esa disminución en la actividad tóxica pudiera ser el resultado de la ausencia de ácido β -hidroxi-mirístico en el LPS de *Leptospira*.¹¹⁰

Kalambaheti *et al.*, (1999) dio a conocer la organización de los primeros 31 MAL en *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo subtipo Hardjobovis, los cuales codifican para enzimas involucradas en la biosíntesis de azúcares activadas, glicosiltransferasas y proteínas transportadoras y procesadoras de azúcares.¹³³ Posteriormente, 75 MAL correspondientes al *locus rfb* de *Leptospira interrogans* serovariedad Hardjo subtipo Hardjoprajitno fueron secuenciados y analizados, sin embargo, la secuenciación de este *locus* no fue concluida.¹³⁴ Es interesante que el *locus rfb* en Hardjobovis posee secuencias de inserción (dos elementos IS 1533 y un elemento semejante a la familia IS5 localizado entre los MAL 14 y 15), lo cual deja abierta la posibilidad de adquisición horizontal de información genética. Al analizar el *locus rfb* de Hardjoprajitno

(serovariedad serológicamente indistinguible de Hardjobovis) se comprobó que no poseía elementos de inserción y, al realizar la comparación de las dos secuencias, se determinó que este *locus* estaba organizado en cuatro segmentos. Dos de estos MAL 1-14 (ORFJ1–14) y MAL 21-22 (ORFJ21–22), denominados A y C, tuvieron una mayor identidad con sus homólogos en *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjobovis, mientras que los MAL 15-20 (ORFJ15-20) y MAL 23-31 (ORFJ23-31), denominados B y D, mostraron un mayor grado de identidad a la serovariedad Copenhageni de *Leptospira interrogans*.¹²⁸

La hipótesis de transferencia de información genética se ve reforzada por el hallazgo de esas cuatro regiones en el *locus rfb* del subtipo Hardjoprajitno en dos de las cuales A y C, la identidad nucleotídica cercana al 100 % entre los subtipos Hardjobovis y Hardjoprajitno sugiere la posibilidad de transferencia horizontal de esas regiones, desde Hardjobovis hacia un ancestro de Hardjoprajitno. Tal ancestro pudiera ser una serovariedad como Copenhageni, la cual muestra una alta identidad nucleotídica en las regiones B y D del *locus rfb* con Hardjoprajitno.¹²⁸ Recientemente, Carrillo *et al.* (2004; 2005) demostraron la presencia de un regulador de la transcripción, corriente debajo de *orfJ14* – *orfJ15*. Este elemento muestra una hipotética estructura secundaria semejante al regulador de la transcripción del *locus trp* de *Bacillus subtilis* y pudiera jugar un papel en la expresión del LPS del subtipo Hardjoprajitno de manera similar a la que la IS 5 (localizada en la misma región).^{135,136}

Se ha establecido que la diversidad de las serovariedades del género *Leptospira* está relacionada con la estructura y composición del LPS.¹³⁷ En varios trabajos se ha estudiado el papel que tiene el LPS del género *Leptospira* con relación a la inmunidad en diferentes especies^{78,100} y los genes asociados con su biosíntesis han sido parcialmente encontrados en una región denominada *locus rfb*.^{128,138}

En el año 2004, la secuenciación del *locus rfb* fue concluida en su totalidad para dos serovariedades correspondientes a diferente especie. Por un lado, el análisis completo del genoma de *Leptospira interrogans* serovariedades Copenhageni y Lai reveló una región de 119 kb en la cual la predicción de 108 posibles MAL transcritos en la misma orientación posee genes relacionados con la biosíntesis del LPS, incluyendo el grupo de genes que codifica para el antígeno "O".^{119,139} Aunque en las primeras 14 kb de esta región se encontraron genes relacionados con proteínas ribosomales y para la replicación del ADN, en las restantes 105 kb se encontraron 94 MAL, 56 de los cuales están claramente relacionados con la biosíntesis del LPS. Por otra parte, la secuenciación del genoma de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo reveló un total de 106 MALs, lo cual hace a este *locus rfb* el más grande para biosíntesis de LPS, reportado a la fecha.¹⁴⁰

Protección heteróloga contra leptospirosis

Ya se ha establecido una interacción específica entre anticuerpos reactivos y activación del complemento con la envoltura externa de las leptospiras.⁹⁸ De igual forma, se ha comprobado que la envoltura externa actúa como un potente inmunógeno en ensayos realizados en hámsteres,¹⁴¹ bovinos¹⁴² y perros,¹⁴³ los cuales al ser inmunizados exitosamente con preparaciones de la envoltura externa, se mantuvieron libres de enfermedad y en la mayoría de los casos se evitó el estado de portador renal.

Brown *et al.* (1991) realizaron una descripción de los antígenos de la ME y proteínas totales solubles en detergente obtenidas de lisados a partir de diferentes serovariedades patógenas, entre éstas, las serovariedades Hardjobovis y Hardjoprajitno. La similitud en los perfiles proteicos entre Hardjobovis y Hardjoprajitno es evidente tanto en los extractos totales como en las preparaciones de ME solubles en detergente. Sin embargo, se notó una diferencia al parecer cuantitativa más que

cualitativa en la distribución de proteínas entre ambas cepas y entre las distintas cepas evaluadas.¹⁴⁴ Varios investigadores también han concluido que algunas interacciones entre antisueros y diferentes cepas de *Leptospira* sugieren, de igual forma, diferencias cuantitativas y no cualitativas en las proteínas expresadas. Johnson y Muschel (1966) encontraron que las diferencias en la sensibilidad de leptospiras a anticuerpos y complemento se debían a la cantidad de antígenos específicos presentes en su superficie;¹⁴⁵ mientras que Thiermann y Garret (1983) encontraron que animales infectados experimentalmente, frecuentemente presentaban altos títulos de anticuerpos contra serovariedades heterólogas más que contra serovariedades homólogas.¹⁴⁶

Durante la década de los noventa, surgió un interés mayor por estudiar a fondo aquellos componentes estructurales de la envoltura externa de leptospiras patógenas que pudieran asociarse con inmunogenicidad, ya que era claro que, al estar expuestos en la superficie de la bacteria, establecen la interacción primaria con el sistema inmune. En un estudio realizado por Nicholson y Prescott (1993), PME de 7 serovariedades patógenas de *Leptospira* (*Grippotyphosa*, *Hardjobovis*, *Autumnalis*, *Bratislava*, *Canicola*, *Icterohaemorrhagiae* y *Pomona*) fueron investigadas para identificar proteínas comunes expuestas en la superficie. Electroferesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (siglas en Inglés de sodium dodecyl sulfonate-polyacrilamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) revelaron siete bandas de proteínas con masas moleculares aproximadas de 77, 66, 59.5, 42, 35.5, 24 y 18 kDa, comunes para todas las serovariedades utilizadas. Inmunotransferencias tipo Western de las mismas fracciones fueron detectadas utilizando anticuerpos policlonales contra leptospiras patógenas (*Bratislava*, *Canicola* y *Hardjo*), evidenciando seis bandas comunes con pesos de 66, 59.5, 44, 42, 35.5 y 18 kDa en las 7 serovariedades.¹⁴⁷ La banda común de la PME de 66 kDa había sido previamente asociada con virulencia en un estudio con la serovariedad *Grippotyphosa*,¹⁴⁸ pero en el estudio realizado por

Nicholson y Prescott se encontró esta proteína tanto en cepas de laboratorio como en aislados de campo. Existe la posibilidad que esta banda pueda ser la misma reportada por otros investigadores como una PME de 63 kDa, la cual parece ser el precursor de una hemolisina.¹⁴⁹

En años recientes, el foco de atención para los investigadores de la leptospirosis ha sido la búsqueda de antígenos protectores, pero ahora dirigido hacia proteínas conservadas de la ME de leptospiras patógenas, las cuales pudieran ser capaces de estimular una inmunidad heteróloga entre diferentes serovariedades del género *Leptospira*.¹³⁰

Genomas de especies patógenas de *Leptospira*

La secuenciación de cuatro genomas de *Leptospira* ha generado hallazgos con un potencial relevante para futuras investigaciones. El genoma de *Leptospira interrogans* serovariedad Lai fue el primero de este género bacteriano en ser secuenciado. Tiene un tamaño de 4,691,184 pb, siendo mucho más grande que el de otras espiroquetas por ejemplo, *T. pallidum* 1,138,000 pb y *B. burgdorferi* 1,519,857 pb incluyendo plásmidos). En la serovariedad Lai, el genoma consiste de dos cromosomas circulares, uno pesado de 4,332,241 pb (CI) y uno ligero de 358,943 pb (CII), (Figura 4). Más de 30 copias de secuencias de inserción (por sus siglas en Inglés de insertion sequence, IS), incluyendo miembros de las familias IS1500 y IS1501 han sido identificadas en el genoma de *Leptospira*. Se obtuvo la predicción genética de 4,768 posibles genes, entre estos, 37 genes para ácido ribonucleico de transferencia ARNt y cuatro genes para ácido ribonucleico ribosomal 16S (*rrs*). El número bajo de genes de ARNt puede explicar en parte el desarrollo lento de *Leptospira interrogans in vitro*.¹¹⁹

De 4,727 secuencias que codifican para proteínas supuestas y verdaderas, 4,360 se encuentran sobre el CI y 367 en el CII, todos los genes que codifican para ARNr (2

genes) y ARNt (37 genes) fueron encontrados en el CI. Aunque muchos de los genes requeridos para el desarrollo y viabilidad se encuentran localizados sobre el CI, algunos genes esenciales para *Leptospira* se encuentran en el CII, como el gen *asd*, cuyo producto es esencial para la producción de diaminopimelato, uno de los constituyentes del peptidoglicano de *Leptospira*, el cual es fundamental para la estructura de la pared celular. Lo anterior, sustenta el hecho de que verdaderamente el CII, es un cromosoma que forma parte del genoma y no es un plásmido.^{150,151}

Sobre las bases de la similitud de secuencias, se han asignado funciones biológicas a cerca del 44.0 % de los genes (2,060), mientras que el 15.0 % de ellos (715) se encuentran codificando para proteínas con función desconocida.

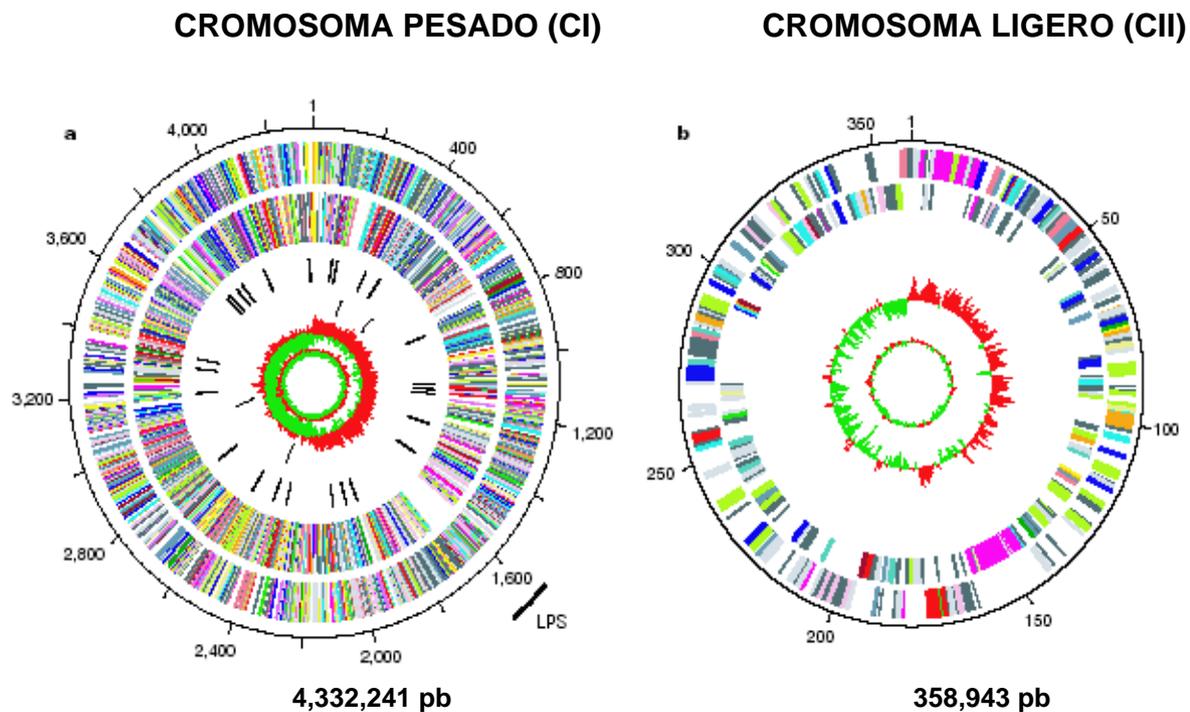


Figura 4. Representación del genoma circular de *L. interrogans* serovariedad Lai, que comprende un cromosoma pesado (CI) y un cromosoma ligero (CII). La escala externa se muestra en kilobases. El rango de círculos va de 1 (el círculo exterior) a 6 (el círculo interno) para CI y de I (círculo exterior) a IV (círculo interno) para CII. Los círculos 1/I y 2/II, corresponden a los genes en sentido adelantado y reverso respectivamente; círculo 3, genes correspondientes a tRNA; círculo 4, genes correspondientes a rRNA; círculo 5/III, GC relación (el G-C)/(G ó C); rojo indica los valores > 0; el verde indica los valores < 0); círculos 6/IV, contenido de G + C. Todos los genes están coloreados de acuerdo a las funciones que codifican: Naranja, biosíntesis de aminoácidos; verde, purinas, pirimidinas, nucleosidos y nucleótidos; azul, metabolismo de ácidos grasos y fosfolípidos; magenta, biosíntesis de cofactores, grupos prostéticos y acarreadores; el caqui, metabolismo central intermediario; azul verdoso, metabolismo de energía; orquídea transporte y proteínas de unión; amarillo, metabolismo de ADN; verde oscuro, transcripción; café, síntesis de proteínas; verde amarillento, funciones regulatorias; rosa, pared celular; salmón, procesos celulares; azul marino, otras categorías; gris claro, regiones conservadas; gris oscuro, proteínas hipotéticas; gris pizarra, proteínas de función desconocida y negro, tRNA y rRNA.

(Ren *et al.*, 2003)¹¹⁹

De los genes, 1,952 (41.0 %) no presentó similitud a ninguno de los genes reportados en otros microorganismos.¹¹⁹

La quimiotaxis es considerada un importante mecanismo en bacterias patógenas. Al menos 50 genes (no incluidos genes de quimiotaxis) relacionados con la movilidad, han sido encontrados. Aparentemente, el sistema de quimiotaxis de *L. interrogans* es más complejo que el de otras espiroquetas, ya que al menos 12 genes codificando para proteínas aceptoras de metilos (PAM) relacionadas con la quimiotaxis han sido encontrados. Un gen que mostró homología con el gen *gspD*, cuyo producto de expresión, la secretina GspD, forma parte del sistema de secreción tipo II (T2SS) de *Escherichia coli*, ha sido identificado en el CI de la serovariedad Lai junto con otros 16 genes relacionados. Similar a *B. burgdorferi*, *T. pallidum* y espiroquetas intestinales como *Brachyspira*, *L. interrogans* posee las proteínas de recubrimiento FlaA y la proteína del núcleo FlaB como el componente esencial de su filamento axial. El genoma de *L. interrogans* serovariedad Copenhageni posee igualmente dos cromosomas circulares con un total de 4,627,366 pb: El cromosoma CI posee 4,277,185 pb y el cromosoma CII posee 350,181 pb (Figura 5), en ambos cromosomas el origen de la replicación ha sido identificado.¹³⁹ Como se ha descrito anteriormente, genes codificando para ARNr no se encuentran organizados en operones como en muchas otras bacterias Gram negativas y se han encontrado en el CI. Se han identificado un gen *rrf*, dos genes *rrl* y dos *rrs* los cuales codifican para ARNr 5S, 23S y 16S respectivamente.¹⁵²

CROMOSOMA PESADO (CI)

CROMOSOMA LIGERO (CII)

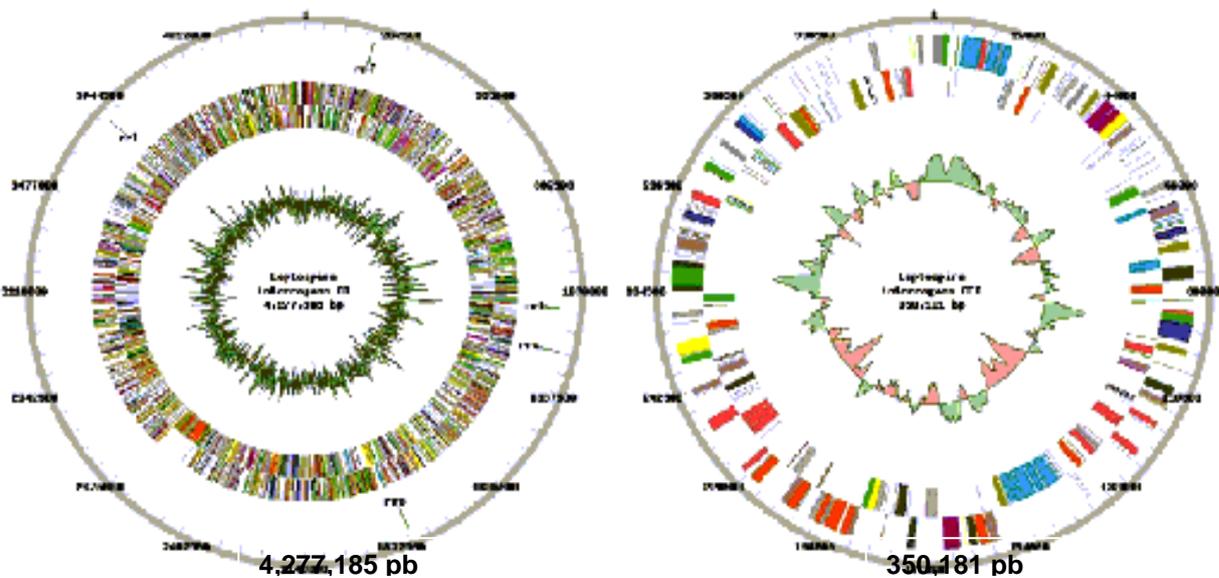


Figura 5. Mapas de los cromosomas circulares (Pesado CI; Ligero CII) de *Leptospira interrogans* serovariedad Copenhageni. Los círculos 1 y 2 (del exterior al interior, sentido adelantado y reverso de la cadena, respectivamente), todos predijeron para regiones codificantes de proteínas. El color se refiere a la categoría del gen. El círculo 3 indica el contenido de G + C. Los números en el círculo exterior corresponden a los pares de bases. Genes del rRNA, rrl, rrs y rrf son 23S, 16S y 5S, respectivamente. Nota: los dos replicones no están esquematizados con misma escala, CII es 12 veces menor que CI. (Nascimento *et al.*,

2004)¹³⁹

De 3,731 secuencias que codifican para proteínas, 3,455 se encuentran sobre CI y 276 en CII. Sobre las bases de la similitud de secuencias, se han asignado funciones biológicas al 52.0 % de los genes (1,812), mientras que el 48.0 % de los genes (1,643) se encuentran codificando para proteínas hipotéticas en el CI. De igual forma, se encontraron secuencias que codifican para 37 ARNt.

En el CII, se han asignado funciones biológicas al 58.0 % de los genes (161), mientras que el 42.0 % de los genes (115) se encuentran codificando para proteínas hipotéticas.¹³⁹ Información genómica referente a los mecanismos de virulencia y patogenicidad reveló la presencia de varios genes cuyos homólogos están relacionados con la adhesión e invasión a células eucariotas como los genes *mce* de *Mycobacterium avium* (NCBI NC: 008596, GeneID:4526549, 2006), *invA* de *Salmonella enterica* subsp.

enterica serovariedad Choleraesuis cepa SC-B67,¹⁵³ *astE* de *Bordetella bronchiseptica* RB50¹⁵⁴ y el gen *mviN* de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovariedad Typhi cepa CT18.¹⁵⁵ La primera lesión causada por leptospiras patógenas es el daño al endotelio de pequeños vasos, provocando hemorragia, isquemia localizada y posteriormente en múltiples órganos. Como una consecuencia, necrosis de túbulo renales, daño hepatocelular, meningitis y miositis puede ocurrir en los huéspedes infectados, en los cuales la hemólisis puede jugar un papel importante en este proceso.⁴⁸ Varios genes codificando para potenciales hemolisinas fueron identificados en el genoma de Copenhageni. Algunos de éstos están estructuralmente relacionados con la esfingomielinasa C (LIC10657, LIC12631, LIC12632, LIC11040 y LIC13198). Aunque genéricamente estas moléculas son consideradas esfingomielinasas, es posible que estos genes codifiquen para hidrolasas, las cuales no sólo actúan contra esfingomielina, sino también sobre otros esfingolípidos. De ahí que los eritrocitos representen el blanco para estas enzimas dado que poseen importantes cantidades de glicoesfingolípidos similares a los determinantes antigénicos del sistema ABO de los grupos sanguíneos.¹³⁹

Otro tipo de hemolisinas corresponden a la clase Tly, primeramente identificadas en *Brachyspira hyodysenteriae*, en cuyo caso fue demostrada la actividad hemolítica y citotóxica de las proteínas recombinantes TlyA, TlyB y TlyC expresadas en *E. coli*.¹⁵⁶ Este tipo de hemolisinas pertenece a la familia de proteasas dependientes de ATP. Cinco genes de la clase *tlyABC* (LIC10284, LIC10339, LIC11814, LIC12017 y LIC13143) fueron identificados en el genoma de Copenhageni, los cuales, no presentan una similitud estructural con *tlyABC* de *Brachyspira hyodysenteriae*.¹⁵⁶

Bulach *et al.* (2006) publicaron la secuencia completa de dos genomas de *Leptospira*, a partir de dos cepas de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo (Hardjobovis), la cepa L550 apatógena para hámster y la cepa BJ197 patógena para hámster, (Cuadro 3). Al igual que otros genomas del género *Leptospira*^{119,139}, las cepas L550 y BJ197 de *L.*

borgpetersenii poseen dos cromosomas, uno pesado (CI) con 3,614,446 pb y 3,576,473 pb y un cromosoma ligero (CII) con 317,336 pb y 299,762 pb respectivamente, (Figura 6).¹⁴⁰

Zuerner primeramente, reportó la presencia de elementos de inserción de la familia IS1533, correspondiendo aproximadamente al 3.5 % del genoma de *L. borgpetersenii*.¹⁵⁷ Bulach *et al.*, (2006) encontraron 77 y 84 copias completas de IS1533 en las cepas L550 y JB197 respectivamente y aproximadamente 25 copias parciales de esta misma se encuentran distribuidas en cada genoma, lo cual sugiere evidencias de los frecuentes eventos de transposición y recombinación que alteran la organización del genoma y por consiguiente, contribuyen significativamente a cambios en la organización y función de diversos genes en *Leptospira*. Dichos elementos genéticos móviles, comprenden aproximadamente al 7.0 % del genoma de *L. borgpetersenii*.¹⁴⁰ Se encontró que elementos IS, frecuentemente flanquean rearrreglos cromosomales y se estima que el 17.0 % de los pseudogenes encontrados, son resultado una disrupción mediada por este tipo de elementos. Un total de 15 genes en la cepa L550 y 25 en la cepa JB197 están truncados por el elemento IS1533.

Cuadro 3. Algunas características de dos genomas de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo, cepas L550, no patógena para hámster y BJ197, patógena para hámster.

CARACTERISTICAS	L550		JB197	
	CI	CII	CI	CII
Tamaño del cromosoma, (pb)	3,614,446	317,336	3,576,473	299,762
Contenido de G + C, %	40.23	40.16	40.23	40.43
Proteínas codificadas, %	74.0	73.9	73.8	74.8
Secuencias que codifican para genes funcionales	2,607	235	2,540	230
Genes con función asignada	1,647	134	1,594	131
Proteínas hipotéticas conservadas	363	31	363	30
Proteínas hipotéticas únicas	597	70	583	69
Pseudogenes	228	20	248	22
Transposasas (intactas)	114	7	121	5
Total de secuencias codificantes *	2,949	262	2,909	257
ARNt	37	0	37	0
ARNr 23S	2	0	2	0
ARNr 16S	2	0	2	0
ARNr 5S	1	0	1	0

(Bulach *et al.*,

2006)¹⁴⁰

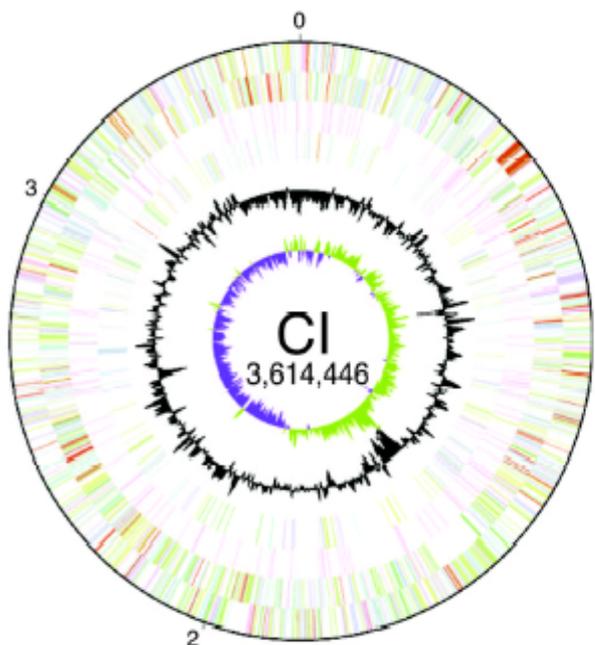
* No incluyendo transposasas y pseudogenes

Por otro lado, De la Peña (2002) reportó la presencia de un vestigio de una transposasa de un elemento semejante al de la familia de los elementos IS5, en la región intergénica *orfJ14 – ofrJ15* del *locus rfb* de *L. Interrogans* serovariedad Hardjo subtipo Hardjoprajitno. Dicho vestigio es correspondiente a un fragmento de 199 pb de la transposasa IS5 presente en la misma región intergénica pero de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo subtipo Hardjobovis.¹³⁴ Se plantea la hipótesis de que la serovariedad Hardjoprajitno tuvo su origen en algún antecesor de la serovariedad Copenhageni, la cual adquirió por transferencia horizontal regiones del *locus rfb* procedentes de la serovariedad Hardjo subtipo Hardjobovis, para dar origen a la serovariedad Hardjo subtipo Hardjoprajitno y poder adaptarse a los tejidos del bovino, fenómeno en el que pudieron participar los elementos semejantes a los de la familia IS5, lo cual explica la presencia del vestigio de 199 pb anteriormente referido.¹²⁸

Así mismo, 14 nuevos elementos IS fueron descubiertos en el genoma de *L. borgpetersenii*, los cuales también promueven la formación de pseudogenes. En varios *loci*, múltiples copias de diferentes elementos IS están en estrecha proximidad unos con otros para generar *loci* complejos con un tamaño superior a las 5 kb.¹⁴⁰

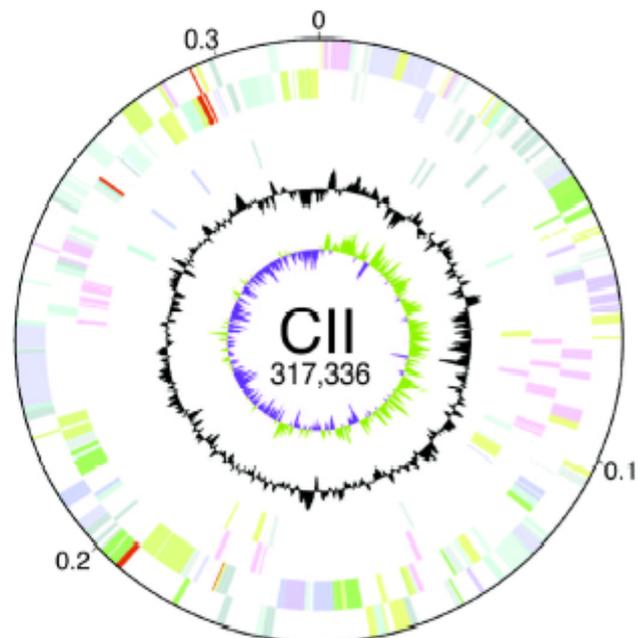
CROMOSOMA PESADO (CI)

3,614,446 pb



CROMOSOMA LIGERO (CII)

317,336 pb



J	Traducción, estruct. Ribosomal y biogénesis	N	Movilidad y secreción	F	Transporte de nucleótidos y metabolismo
K	Transcripción	P	Transpor de iones y metabol	H	Coenzimas y metabolismo
L	Replicación de ADN, recomb. y reparación	T	Transducción de señales	I	Metabolismo de lípidos
D	División bacteriana y división del cromosoma	C	Produc de energía y convers	Q	Biosínt de metab. Sec, transporte y metab
O	Modific. Postraducc, prot acarread. Chaper	G	Transporte de CHO'S, metab	R	Predicción de funciones generales
M	Biogénesis de envolt celular y memb. externa	E	Transport de aa y metabolism	S	Funciones no conocidas

Figura 6. Mapa del genoma de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo cepa L550. La información funcional para los cromosomas pesado (CI) y ligero (CII), se presenta en anillos concéntricos (los mapas no están dibujados a escala; los tamaños de los replicones se muestran en pb). Empezando del exterior: genes codificados en la cima de la cadena (primero el anillo), genes codificados en el fondo de la cadena (segundo anillo), transposasas (tercer anillo) y pseudogenes (cuarto anillo). Los genes están coloreados según las categorías funcionales correspondientes mostradas en la figura. El quinto anillo muestra las desviaciones del contenido G-C a partir del promedio genómico calculado usando una ventana de 10 kb en los pasos de 1 kb; valores mayores que el promedio quedaron fuera del anillo y valores menores al promedio quedaron dentro del anillo. El anillo más profundo muestra sesgo de G-C calculado, usando una ventana de 10 kb en pasos de 1 kb; se muestra es sesgo positivo en color verde y el sesgo negativo en color púrpura.

(Bulach *et al.*, 2006)¹⁴⁰

Intrones del grupo II recientemente detectados en procariontes, pueden ser transferidos entre bacterias sobre elementos conjugativos y moverse de un sitio a otro en el mismo cromosoma mediante retrotransposición.¹⁵⁸ Su presencia en *L. borgpetersenii* provee evidencia de la transferencia lateral de información genética en *Leptospira*.

La presencia de elementos IS en *L. borgpetersenii* es evidencia de eventos de recombinación y funciones de reparación asociadas con transposasas. Aproximadamente, 12.0 % de las secuencias codificantes, codifican para transposasas y pseudogenes o fragmentos de genes, mientras que en el genoma de *L. interrogans* dichas secuencias corresponden a menos del 4.0 %.¹⁴⁰ Diferencias significativas en la organización de los genomas de *L. borgpetersenii* y *L. interrogans* son probablemente debidas a rearrreglos mediados por IS. Sorprendentemente, muchos posibles operones no presentan disrupción de sus genes, sin embargo, su localización esta alterada. De manera interesante, los cambios en la organización genética y la pérdida de genes que ha sido demostrada en *L. borgpetersenii* no afecta la virulencia, ya que tanto *L. borgpetersenii* como *L. interrogans* pueden causar infecciones letales en especies animales para las cuales no son consideradas hospederos de mantenimiento.

Considerando que el genoma de *L. borgpetersenii* es 16.0 % más pequeño que el genoma de *L. Interrogans*, se ha especulado sobre la posibilidad de que *L. borgpetersenii* esté llevando a cabo un proceso de reducción de su genoma mediado por IS, con base en los hallazgos obtenidos en el género *Bordetella*, donde la pérdida de ADN a través de eventos de recombinación entre elementos IS, pudiera ser un mecanismo de especiación.¹⁵⁹ En contraste, *L. interrogans* puede estar llevando a cabo una expansión de su genoma mediante duplicación de genes, así como adquisición de material genético, como fue evidenciado por la presencia de nuevos genes con respecto a *L. borgpetersenii*, incluyendo genes potenciales de fagos.^{119,139}

La comparación de los genomas de *L. interrogans* y *L. borgpetersenii* mostró que la pérdida de información genética en ésta última, estaba concentrada en los genes que codifican para proteínas que le permitirían adaptarse y sobrevivir en diversos ambientes (transducción sensoria y mecanismos de defensa). La presencia de muy pocos genes relacionados con funciones metabólicas y transporte de solutos, probablemente limite la diversidad de nutrientes que pueden ser utilizados por *L. borgpetersenii*. En contraste, *L. interrogans* posee un mayor número de genes relacionados con transducción de señales, factores reguladores transcripcionales, diversas funciones metabólicas y transporte de solutos, consistentes con su capacidad para sobrevivir en el agua durante semanas, e incluso meses.

La evaluación de la sobrevivencia de *L. borgpetersenii* y *L. interrogans* en condiciones experimentales, utilizando agua a 20 °C, reveló una pérdida >90.0 % de la viabilidad para *L. borgpetersenii* a las 48 hrs de incubación, mientras que *L. interrogans* mantuvo el 100 % de su viabilidad durante el mismo tiempo de incubación. *L. interrogans* mantuvo 30.0 % de viabilidad a las tres semanas de incubación, al tiempo que no se detectó ninguna forma de *L. borgpetersenii* viable (Zuerner RL, dato no publicado), coincidiendo en parte con lo demostrado previamente por Trueba *et al.*, (2004) respecto a la supervivencia de *Leptospira* en agua.⁶⁰ Estos resultados soportan la hipótesis acerca de que *L. borgpetersenii* no tolera la carencia de nutrientes estando fuera de un hospedero mamífero. Opuestamente, *L. interrogans* parece ser más tolerante a la carencia de nutrientes y permanecer viable fuera del hospedero en ambientes acuáticos y posteriormente, adaptarse fácilmente a un nuevo hospedero mamífero.

Esta interpretación es consistente con estudios epidemiológicos que muestran que las infecciones con *L. interrogans* usualmente resultan a partir de la exposición con agua superficial contaminada, mientras que las infecciones con *L. borgpetersenii* ocurren por contacto directo con fluidos corporales contaminados con esta

espiroqueta.¹⁴⁰ Así mismo, dicha dificultad que presenta *L. borgpetersenii* para sensar las condiciones ambientales y adaptabilidad a la carencia de nutrientes incrementa su dependencia hacia un hospedero mamífero para mantenerse viable, la limita a un ciclo de transmisión hospedero a hospedero. Bacterias que dependen de un hospedero para sobrevivir incluyen a patógenos como *Treponema pallidum* y simbiontes como *Buchnera aphidicola*, las cuales han reducido su genoma, quedando con un limitado potencial metabólico, así como una limitada capacidad para responder a cambios ambientales.^{160,161,162}

Aproximadamente el 55.0 % de las secuencias que codifican para posibles proteínas en *L. borgpetersenii* contienen regiones con similitud para secuencias conocidas, lo cual facilitó la clasificación de acuerdo a los grupos de ortólogos. De esas secuencias, 31.0 % codifican para proteínas con predicciones de localización en la MC, un valor similar al encontrado en *L. interrogans*. La identificación de PME potenciales es esencial para desarrollar vacunas de sub-unidades. Las PME usualmente asumen una conformación de β -barril,¹⁶³ en las cepas L550 y BJ197, 50 y 49 genes que codifican para proteínas con potencial para asumir dicha conformación, fueron encontrados respectivamente, incluyendo a OmpL1, una porina transmembranal confirmada en su actividad,¹⁶⁴ además de los genes que mostraron relación con aquellos que codifican para las proteínas TonB y TolC.^{119,139} En las cepas L550 y BJ197, fueron identificados 128 y 121 genes que codifican para posibles lipoproteínas, no incluyendo pseudogenes respectivamente, éstos incluían a todas las lipoproteínas conocidas de *Leptospira* y un homólogo de *ompA*.

Identificación y clasificación de las proteínas en especies patógenas de *Leptospira*

El tipo de proteínas predominante en la ME de espiroquetas lo constituyen las lipoproteínas y *Leptospira* no es la excepción. En *Leptospira*, dos clases principales de proteínas de la pared celular han sido identificadas. La primera clase comprende a las lipoproteínas, a las cuales se les ha asignado las siglas LipL, éstas son las más abundantes y la mayoría se ubica en la ME. De éstas, LipL32 es la más abundante y se ubica en la superficie;^{165,166} LipL36 se ubica en el periplásmo;^{167,168} LipL48 se encuentra inmersa en la ME;¹⁶⁹ LipL41 también está expuesta en la superficie.¹⁷⁰ LipL21, ha sido definida como la segunda lipoproteína más abundante expuesta sobre la ME, la cual tiene un peso molecular de 21 kDa. Estas proteínas ha sido encontradas en forma conservada únicamente en especies patógenas entre las que se encuentran *L. borgpetersenii*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. santorosai* y *L. weillii*.¹⁷¹ El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de LipL21 a partir de estas seis serovariedades patógenas reveló una identidad del 96.0 al 100 %, indicando que esta proteína pertenece a la familia de proteínas conservadas de la ME que son únicas en su tipo para serovariedades patógenas y que no tienen una significativa similitud con proteínas de otros organismos, incluidas otras espiroquetas patógenas.¹⁷¹

Al igual que otras lipoproteínas de bacterias Gram negativas, las lipoproteínas de *Leptospira* se encuentran ancladas a la membrana por medio de sus cadenas de ácidos grasos que modifican el aminoácido cisteína de la porción amino terminal. En el genoma de *L. interrogans* serovariedad Copenhageni, un total de 184 genes fueron encontrados con una señal de reconocimiento de lipoproteínas. Lip45 participa en las rutas de secreción de lipoproteínas hacia ambas membranas, interna y externa.¹⁷²

Algunas de las posibles funciones asignadas a las recientemente identificadas

lipoproteínas son: termolisinas, metaloproteasas, esfingomielinasas, fosfolipasas, citocromo C peroxidasa, glucosa deshidrogenasa y colesterol oxidasa.¹³⁹

La segunda clase está representada por proteínas transmembranales, de éstas, la primer proteína transmembranal descrita en espiroquetas, se denominó OmpL1, la cual conforma un trímero, que es una estructura característica de proteínas transmembranales y al parecer funciona como una porina modificable por calor que permite el paso de moléculas con un peso molecular menor a los 1,000 Daltons.^{164,173}

El análisis del genoma de Copenhageni reveló 83 MAL que codifican para PME transmembranales.^{139,164}

Proteínas conservadas de la ME incluyen a las anteriormente descritas OmpL1, LipL32 y LipL41. Dado que estas proteínas son únicas para leptospiras patógenas, es probable que pudieran tener una función específica en la patogénesis. Aunque es interesante esta especulación, sobre patogénesis y PME conservadas, sería necesario generar mutantes a partir de especies patógenas de *Leptospira* y así realizar su evaluación funcional; sin embargo, no existe tecnología hasta ahora para el desarrollo de estos estudios.¹⁷¹ Un esquema de la localización de proteínas externas de *Leptospira* se presenta en la Figura 7.

Otros tipos de proteínas recientemente identificados

Recientemente, un estudio sistemático de la ME identificó 8 nuevas proteínas de la ME en *Leptospira interrogans* serovariedad Lai. En ese estudio preparaciones de la ME de leptospiras que fueron cultivadas bajo diferentes condiciones ambientales (presencia y ausencia de Fe y suero y temperaturas de 25, 30, 37 y 42°C), fueron separadas mediante electroforesis de doble dimensión y posteriormente analizadas por espectrometría de masas.¹³⁰

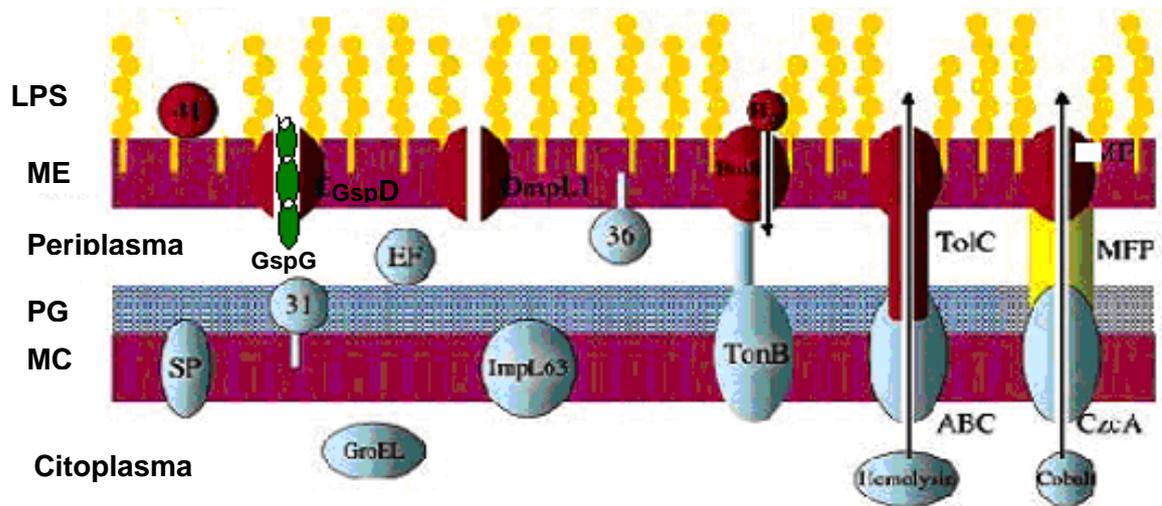


Figura 7. Modelo de la arquitectura de la pared celular de *Leptospira*. Posee dos membranas, una membrana externa (ME) y una membrana citoplasmática o membrana interna (MC). Como en las bacterias Gram-positivas, el peptidoglicano (PG) de la pared celular está estrechamente asociado con la MC. La superficie de *Leptospira* está dominada por el lipopolisacárido (LPS). Las proteínas de sub-superficie incluyen a la proteína citoplásmica, GroEL, y el endoflagelo periplásmico (EP). La MC contiene lipoproteínas como LipL31 y proteínas transmembranales, tales como una peptidasa señal (SP) y una proteína estructural denominada ImpL63. La ME contiene principalmente lipoproteínas que incluyen a LipL41 y LipL36, y proteínas transmembranales incluyendo la porina, OmpL1. Un análisis de la secuencia del genoma reveló varios posibles nuevos tipos de proteínas de la membrana externa (PME), incluyendo una supuesta proteína TonB dependiente involucrada en la adquisición de nutrientes. BtuB es un ejemplo de una PME TonB-dependiente involucrada en la captación de vitamina B12. El sistema de secreción tipo I está representado por TolC que forma un complejo con proteínas de unión a ATP (ATP-binding cassette "ABC"), que participan en la secreción de hemolisinas y otros componentes del citoplasma. El genoma de *Leptospira* también contiene genes involucrados en sistemas de exflujo de tres componentes que constan de un componente ubicado en la membrana externa (FME), una proteína de fusión a membrana (PFM) y un transportador de la membrana interna. Un ejemplo es CzcA involucrada en la detoxificación de metales pesados. GspD y GspG, proteínas del sistema de secreción tipo 2 (T2SS).

Modificado de: (Nascimento *et al.*, 2004)¹³⁹

Por otro lado, análisis genómicos identificaron genes que codifican para proteínas que al parecer no han sido reportadas anteriormente en *Leptospira*; entre éstos, uno que codifica para una proteína formadora de canal similar a **TonB**, así como 13 genes más que codifican para PME TonB-dependientes. Las bacterias que poseen este sistema de

proteínas TonB-dependientes, lo utilizan para la adquisición de nutrientes como hierro (hemoglobina) y vitamina B12, en un proceso dependiente de energía.¹³⁹

El sistema de secreción tipo I (T1SS) está representado por una proteína similar a **ToIC** (LIC13135), que en otros organismos se sabe que participa en la secreción de hemolisinas y algunos fármacos, junto con una proteína homóloga de **CusC** (LIC11941), un exportador de iones de cobre de la ME. Otra ruta de secreción encontrada por homología de secuencias en el genoma de *Leptospira*, corresponde a un mecanismo de antiporte. El sistema consta de un transportador en la membrana citoplasmática (**MC**), una proteína de fusión a la membrana (**PFM**) y un factor de la membrana externa (**FME**) involucrados en otros microorganismos en la secreción de proteínas, carbohidratos, fármacos y metales pesados tóxicos. Además, se identificaron dos genes homólogos al gen que codifica para la proteína CzcD. Esta proteína pertenece a la familia de facilitadores de la difusión de cationes. Las capas S constituyen un tipo de proteínas que se ubican en la superficie de algunas bacterias y se asocian con la evasión de la fagocitosis mediante variación antigénica. Aunque capas S no han sido observadas en leptospiras patógenas, el genoma de Copenhageni contiene al menos dos genes que mostraron homología con los codificantes de capas S (LIC10868 y LIC12952). Son necesarias evidencias experimentales para determinar que en verdad expresan algún tipo de capa S.

Muchos de los genes que codifican para PME han sido identificados en estudios independientes a partir de bancos genómicos utilizando tanto sondas de ADN como escrutinios serológicos con anticuerpos policlonales producidos en conejos. Entre otras proteínas codificadas en el genoma de Copenhageni se encuentran: proteínas de unión al ATP, transportadores de aminoácidos, sistema de transporte para cinasas, proteínas transportadoras de ácidos grasos, proteínas facilitadoras para la difusión de glicerol, diferentes tipos de permeasas, proteínas acarreadoras de fosfatos, transportadores de

sodio, glucosa, biopolímeros, cationes divalentes, hierro, magnesio, níquel y amonio, proteínas formadoras de poro, secretinas de la MC y componentes de sistemas de secreción Sec independientes.¹³⁹

El sistema de secreción tipo 2 (T2SS)

El sistema de secreción tipo 2, identificado a través del tiempo por las siglas GSP, STII, SSTII, SST2, T2S y más recientemente **T2SS**, también conocido como ruta dependiente del secretón, es uno de los cinco sistemas de secreción de proteínas, que en bacterias Gram negativas se caracteriza por translocar a través de la ME, proteínas que han adquirido el plegamiento en el periplásma al medio extracelular o la superficie de la bacteria.

Un análisis a partir de diferentes genomas secuenciados ha revelado que genes del T2SS son comunes, pero de ninguna manera universales en bacterias Gram negativas. Recientes estudios funcionales indican que el T2SS puede promover la virulencia en bacterias patógenas de humanos, animales y plantas, así como ser de utilidad para la fisiología de varias bacterias ambientales.

La secreción de proteínas a través del T2SS, se lleva a cabo en dos etapas: en la primera, la proteína es translocada a través de la MC mediante los sistemas Sec o Tat, los cuales permiten que la proteína se ubique en el periplásma, en donde ésta adquiere el plegamiento adecuado, para ser secretada al medio externo a través de la ME, mediante la maquinaria del T2SS.^{174,175,176,177}

Bacterias como *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Vibrio* y *Aeromonas* han sido modelos de estudio para entender el funcionamiento de los diferentes componentes del T2SS, así como el proceso de secreción en su conjunto.¹⁷⁶ Es claro que el aparato de secreción del T2SS muestra una relación evolucionaria con el aparato que participa en la síntesis del pili tipo IV.¹⁷⁸

Para describir a continuación a lo largo del texto a los diferentes componentes del secretón tipo 2, se utilizarán las siglas T2SS (GspC = T2SS C, GspD = T2SS D). Análisis fenotípicos y genotípicos a partir de diferentes géneros bacterianos, han permitido definir 12 componentes importantes de este aparato tipo 2: una secretina de la ME (T2SS D); una ATPasa citoplasmática (T2SS E); una proteína transmembranal interna (T2SS F); una pseudopilina principal (T2SS G) y pseudopilinas menores (T2SS H, I, J, K); proteínas facilitadoras del acoplamiento de T2SS E (T2SS L y M); que junto con T2SS F, forman una plataforma en la MC; la pre-pseudopilin peptidasa/metiltransferasa (T2SS O), que también actúa sobre 4 tipos de prepilinas y, finalmente, una proteína que puede estar involucrada en el reconocimiento del sustrato, además e interactuar con la secretina (T2SS C).^{176,178}

Durante la década de los noventa, el estudio del T2SS estaba restringido a 8 especies de bacterias pertenecientes al grupo de las γ -proteobacterias.¹⁷⁹ En el año 2005, una revisión de la literatura, junto con una examinación de 230 genomas completos registrados en las bases de datos del Centro Nacional para la Información en Biotecnología (siglas en Inglés de National Center for Biotechnology Information, NCBI), reveló que genes del T2SS se encuentran presentes en un diverso grupo de bacterias Gram negativas.¹⁸⁰ Como se evidenció en los primeros estudios realizados, el T2SS es totalmente prevalente entre el grupo de las γ -proteobacterias, del cual, los 15 géneros representativos incluyen a: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Idiomarina*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Methylococcus*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Vibrio*, *Xanthomonas*, *Xylella* y *Yersinia*. De igual forma, este tipo de genes se ha identificado en el grupo de la α -proteobacterias, en el que los géneros representativos incluyen a: *Bradyrhizobium*, *Caulobacter*, *Gluconacetobacter* y *Mesorhizobium* entre otros; en las β -proteobacterias, que incluye a los géneros: *Azoarcus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium* y *Ralstonia*; de las δ -proteobacterias,

sobresalen: *Bdellovibrio bacteriovorus* y *Geobacter sulfurreducens*. En la mayoría de los microorganismos antes mencionados, se han identificado los genes que codifican para todas las proteínas que constituyen el secretón tipo 2 (T2SS C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M y O).¹⁷⁸ Estas evidencias genéticas, sugieren fuertemente la presencia de un T2SS funcional en estas bacterias. En adición, se ha demostrado en un número creciente de microorganismos, que diferentes tipos de enzimas secretadas, así como otro tipo de proteínas, son dependientes del T2SS. El número de proteínas secretadas a través de un T2SS particular, varía de una, como en el caso de *Klebsiella oxytoca* la lipoproteína pululanasa (PulA), a 11, como en el caso de *Legionella pneumophila*.^{180,181} Por otra parte, en los últimos años, se ha incrementado el interés por la variedad y características de las proteínas secretadas a través del T2SS. Entre las enzimas que se han identificados se encuentran: aciltransferasas, amilasas, quitinasas, celulasas, pectin liasas, enzimas ADP-ribosilantes, proteasas, lipasas, fosfolipasa A y C, lisofosfolipasas, fosfatasas ácida y alcalina, así como nucleasas entre otras.

Por otro lado, en especies de *Burkholderia* se observó que un T2SS completo resultó con diferencias en su funcionalidad. Al hacer una comparación de los genes del T2SS entre diferentes especies de *Burkholderia*, se observó que *B. mallei* presentaba una mutación en el MAL correspondiente a T2SS J y una inserción de 54 bases en el MAL correspondiente a T2SS L, lo cual explicó en parte la baja actividad de secreción que tiene este microorganismo.¹⁸² En contraparte, en *Azoarcus*, *Chromobacterium*, *Mesorhizobium*, *Yersinia pestis* y *Yersinia pseudotuberculosis*, se ha determinado la ausencia del gen que codifica para T2SS M. En *Acinetobacter* y *Bdellovibrio* hay aparentemente ausencia de los genes que codifican para T2SS L y M; en *Gluconacetobacter* se evidenció ausencia de T2SS K, *Methylococcus* carecía de T2SS C y *Bradyrhizobium* no poseía a los genes correspondientes a T2SS C, I y M. Estas aparentes ausencias de genes del T2SS en los géneros bacterianos antes

mencionados, no necesariamente significa que carezcan de un sistema funcional, ya que actividades de secreción han sido asociadas con genes del T2SS de *Acinetobacter* y *Gluconacetobacter*.^{183,184} De las diferentes proteínas reportadas, posiblemente la proteína T2SS C, se pudo haber perdido debido a que es la menos conservada entre los constituyentes del secretón. Se ha sugerido que la presencia de un T2SS incompleto, por ejemplo T2SS D, E, F, G, H, I, J, K y O, puede ser un indicativo de un sistema para la síntesis de pili tipo 4 o de un sistema de captación de ADN.

Aunque hay una tendencia en el patrón de orden de los genes del T2SS, se ha observado algunas variaciones en la ubicación y unión de éstos.¹⁷⁹ Un hallazgo relevante ha sido la presencia múltiple de T2SS en algunas bacterias. *Ps. aeruginosa*, *Ps. putida*, *R. solanacearum*, *X. axonopodia* y *Y. enterocolitica* portan dos *locus* de genes del T2SS, cada uno aparentemente con distintas funciones secretoras.^{185,186,187}

Peabody *et al.*, (2003) reportaron en algunas bacterias la presencia del *locus* T2SS, pero incompleto, lo cual no permite establecer claramente que el sistema sea funcional. En *Aquifex aeolicus* se encontraron genes que mostraron homología con los genes que codifican para las proteínas T2SS DEFGO. En *Thermotoga maritime* se encontraron los genes que codifican para T2SS DEFG y en los géneros *Chlamydia* y *Chlamydomphila* los genes correspondientes a T2SS CDEFG.¹⁷⁸

El análisis de algunos de los genomas recientemente secuenciados disponibles en las bases de datos del NCBI, ha evidenciado la presencia de genes relacionados al T2SS, como en el caso de la β -proteobacteria *Nitrosomonas europea*, que al parecer posee genes que codifican para T2SS DEFGKO. Finalmente, *Rhodopirellula baltica*, la cual es similar a otros *Plantomycetes* posee una pared celular rica en proteínas, entre las cuales hay homólogos del T2SS DEFGIKO, junto con remanentes genéticos de una pared celular de bacterias Gram negativas.¹⁸⁸ De ahí que sea necesario determinar cuales de estos grupos de genes homólogos al T2SS, verdaderamente codifican y

expresan un secretón funcional ya que, como se ha mencionado previamente, la presencia de estos homólogos al T2SS podrían corresponder a sistemas para la síntesis de algún tipo de pili retráctil o para la captación de ADN. Es posible que ensayos de mutagénesis en algunos de los genes homólogos al T2SS permita evaluar su efecto sobre algunas proteínas secretadas, previamente identificadas en estas bacterias.

Al T2SS se le denominó por algún tiempo erróneamente como la ruta secretoria general (GSP), ya que propiamente dicho, la ruta secretoria general corresponde al proceso de translocación de proteínas del citoplasma hacia el periplásma, a través de la MC, mediante el sistema Sec (secretina de la MC y proteínas accesorias) y es en el periplásma donde el T2SS toma participación. De ahí que al T2SS se le clasifique como un sistema Sec-dependiente, donde la secreción de proteínas que requieren este sistema portan un péptido señal, que es generalmente una secuencia corta (de aproximadamente 30 aminoácidos), de los que uno o varios aminoácidos presentan carga positiva, además de una secuencia de 10 a 20 aminoácidos hidrofóbicos. Este péptido señal le permite a la proteína interactuar con la maquinaria Sec de la MC. Posteriormente, la proteína pierde el péptido señal y adquiere su conformación nativa en el periplásma, este evento le permite interactuar con el secretón del T2SS y posteriormente ser secretada a través de la ME.^{189,190}

La maquinaria para el transporte a través de la ME está constituida por 12 a 16 proteínas accesorias dependiendo del género bacteriano. A pesar de lo mencionado anteriormente referente a la denominación del T2SS, la nomenclatura de los componentes en el caso de *Escherichia coli* conservó las siglas GSP para las diferentes proteínas (siglas en inglés de general secretion pathway).^{189,190} A continuación se describen con mayor detalle las etapas de la secreción de proteínas mediante el T2SS en *E. coli*.

1) Transporte a través de la MC

En *E. coli*, el poro de translocación de la vía Sec está compuesto por tres proteínas denominadas SecY, E y G, que pueden aceptar sustratos de dos diferentes fuentes. Por un lado, la proteína precursora (con el péptido señal), se mantiene en un estado de secreción competente o desplegado gracias a la unión con la proteína chaperona SecB, quien la dirige a la subunidad periférica SecA del complejo de translocación heterotrimérico SecYEG, en la membrana citoplásmica.^{190,191,192} La proteína SecA es una ATPasa cuya actividad de hidrólisis provee de la energía necesaria para la exportación. Por otro lado, un segundo mecanismo involucra una translocación co-traducciona, en donde una proteína naciente con su secuencia señal es reconocida por la partícula de reconocimiento de la señal (SRP) y su receptor. Estas rutas convergen en el poro de translocación SecYEG que se encuentra asociado con SecA. La selección de la ruta se determina inmediatamente después de que la secuencia señal naciente sale del ribosoma.^{191,192} Una vez que los polipéptidos son translocados, actúa una peptidasa que procesa el péptido líder, para finalmente liberar a la proteína madura en el periplasma.

En la ruta regulada por la chaperona SecB, ésta reconoce al dominio naciente de la proteína. El complejo binario se dirige a SecYEG unido a SecA, o bien, primero se asocia con SecA en el citoplasma a través de una interacción de baja afinidad, hasta que los sitios de translocación en la membrana estén disponibles. Para interactuar con la translocasa se requiere de la unión de alta afinidad entre SecB y SecA, lo cual es seguido de la unión de la secuencia señal a SecA, lo que a su vez estabiliza la interacción SecA-SecB. Por último, se transfiere la proteína de SecB a SecA, se libera SecB de la membrana y se inicia la translocación, proceso que se encuentra acoplado a la unión de ATP por SecA.^{191,192} La energía de la hidrólisis de ATP se utiliza para la

transferencia de la proteína de SecA hacia SecYEG. Una vez que esto sucede, la translocación puede ser dirigida por la fuerza protón motriz.

2) Transporte a través de la ME

El T2SS incluye dos componentes en la ME: Las proteínas GspD y GspS. La secretina GspD, se inserta en la ME y forma un anillo dodecamérico con un diámetro interno de entre 76 y 95 Å, suficientemente amplio para transportar polipéptidos plegados.

La secretina (GspD) está conservada entre los diferentes sistemas de secreción tipo 2 y secretinas homólogas que también son un componente del T3SS y del sistema de biogénesis de pili tipo IV, que es una estructura filamentosa de adhesión presente en muchas bacterias patógenas y que también participa en la movilidad independiente de flagelo que se da sobre superficies sólidas.¹⁸⁹ Por su parte, GspS es una lipoproteína de la ME que actúa como chaperona para GspD, contribuyendo a su correcto plegamiento y actividad.¹⁹⁰

Sin embargo, la mayoría de las proteínas de este sistema (GspB, C, F, G, H, I, J, K, L, M, N y O) se localizan en la MC o en el periplasma, mientras que la ATPasa (GspE), que energiza el proceso, se localiza en el citoplasma e interactúa con el componente GspL de la MC.¹⁷⁹ Cinco de los componentes del T2SS (GspG, H, I, J y K) son similares a las subunidades de pilina del pili tipo IV, por lo que se han denominado pseudopilinas;^{179,190} y se exportan con una secuencia señal de prepilina que es procesada por GspO. Se ha propuesto que estas proteínas se ensamblan en una estructura similar a un pili, que atraviesa el periplasma y puede ayudar de forma directa o indirecta en el proceso de secreción. En este sentido, se ha demostrado que la sobre-expresión de la proteína GspG, genera el ensamblaje de largos pseudopilis.¹⁹³ Se ha propuesto que este componente en el T2SS podría actuar como un pistón que empuja a las proteínas a secretarse a través del poro en la ME. Sin embargo, aún no existe evidencia concluyente sobre la formación de dicha estructura. En este modelo, la

ATPasa (GspE) puede proveer la energía necesaria para la translocación o para el ensamblaje del pseudopili a través de ciclos repetitivos de unión e hidrólisis de ATP. Estas observaciones sugieren que los dos sistemas, T2SS y biogénesis del pili tipo IV, están evolutivamente relacionados.¹⁷⁹

Complejo de la membrana externa

GspD se encuentra ensamblada en la ME y de una manera general se le denomina secretina.¹⁹⁴ La comparación de las secuencias ha mostrado que en todos los casos, el dominio C-terminal es altamente conservado, mientras que el dominio N-terminal es variable.¹⁹⁵

La región conservada del extremo C-terminal comprende de 200 a 300 residuos de aminoácidos, conteniendo a su vez un bloque altamente conservado de cerca de 60 aminoácidos que incluye invariablemente a glicina y prolina.¹⁹⁶ GspD es un complejo multimérico, constituido por 12 a 15 subunidades.¹⁹⁷ Proteínas del tipo de GspD son extremadamente estables y en muchos casos resistentes a la acción del calor y detergentes. En el caso de la secretina de *Pseudomonas aeruginosa*, 13 posibles cadenas transmembranales fueron encontradas en el dominio C-terminal de la secretina.¹⁹⁷ Esta observación sugiere que el dominio C-terminal de GspD es requerido para la inserción de esta proteína en la ME, mientras que el dominio N-terminal se extiende hacia el periplasma para facilitar la interacción con otras proteínas. Esto fue confirmado por el hecho de que la región C-terminal de las secretinas es un dominio resistente a la acción de las proteasas.^{198,199} La multimerización de proteínas como GspD hace posible la formación de una estructura similar a un poro en la ME. Estudios de microscopía electrónica y análisis bioquímicos han mostrado que la secretina de *Ps. aeruginosa* puede formar verdaderamente, una estructura en forma de anillo con un canal central con un diámetro de 95 Å.¹⁹⁷

El dominio C-terminal de la secretina únicamente tiene la propiedad de formar el poro y al parecer no tiene control sobre la apertura del poro. Una posibilidad es que el dominio N-terminal se pliegue hacia el interior del canal formado por el dominio C-terminal¹⁹⁹ y/o que la interacción con otras proteínas controle la apertura del canal. Otros canales de la ME que funcionan de una manera semejante incluyen al complejo hierro-sideróforo y receptores para la captación de vitamina B12 y colicinas. En estos casos, los mecanismos involucran un cambio conformacional en el receptor y un proceso transductor de energía dependiente de la fuerza protón motriz.²⁰⁰ No se conoce con precisión el mecanismo de transducción de energía a la ME, pero puede requerir la participación de una proteína bitópica de la MC llamada TonB. TonB posee un dominio periplásmico largo, el cual interacciona con un receptor de la ME. Con respecto a la unión con el sustrato, TonB induce un cambio conformacional del receptor permitiendo la entrada del sustrato en el periplasma. Se ha pensado que la translocación de proteínas a través de la ME usando el secretón tipo 2, podría depender de la fuerza protón motriz como sucede con otros sistemas de translocación a través de la membrana.²⁰¹

Proteínas de la familia de secretinas no sólo se encuentran en el T2SS, se ha demostrado su presencia en el sistema de secreción tipo 3, sistema de ensamblaje del pili tipo IV (familia *pilQ*), sistemas de captación de ADN (familia *comE*), sistemas de ensamblaje de proteínas de las capas "S" y ensamblaje y extrusión de fagos filamentosos (familia *pIV*).²⁰² El tamaño de la cavidad central y el número de monómeros pueden variar de un sistema a otro.^{203,204} Resulta interesante saber que una secretina en particular puede estar involucrada en dos diferentes procesos de transporte, tal es el caso de la secretina EpsD de *V. cholerae*, la cual es requerida para la secreción de la toxina del cólera (TC) mediante el sistema tipo 2 y participa en la extrusión del fago filamentososo CTXΦ.²⁰⁵

Interacción de GspS y GspD

En algunos casos la inserción de la secretina GspD a la ME depende de la interacción de la lipoproteína de la ME GspS, componente del T2SS e identificada en bacterias como *Klebsiella oxytoca* y diferentes especies de *Erwinia*. La interacción de GspS con GspD cumple dos funciones: por un lado, es esencial para la inserción de GspD a la ME y, por el otro, protege a la secretina contra degradación proteolítica (Figura 8).^{206,207,208} El efecto protector de GspS contra la degradación proteolítica ha sido demostrado, usando proteínas híbridas conteniendo el extremo C-terminal de GspD, el cual al parecer funciona como sitio de unión para GspS. La adición de este dominio a la secretina pIV o a proteínas no relacionadas, tales como la proteína de unión a maltosa o la pectato liasa, hizo a estas proteínas dependientes de la estabilidad de GspS.^{208,209} GspS también puede ser parte del complejo de la secretina como lo han propuesto Nouwen *et al.* (1999).²¹⁰

No se puede excluir la posibilidad de que el gen *gspS* en algunas bacterias no pertenezca al grupo de genes *gsp* y pueda tener otra localización cromosomal como se ha observado en *E. coli* K12.²¹¹

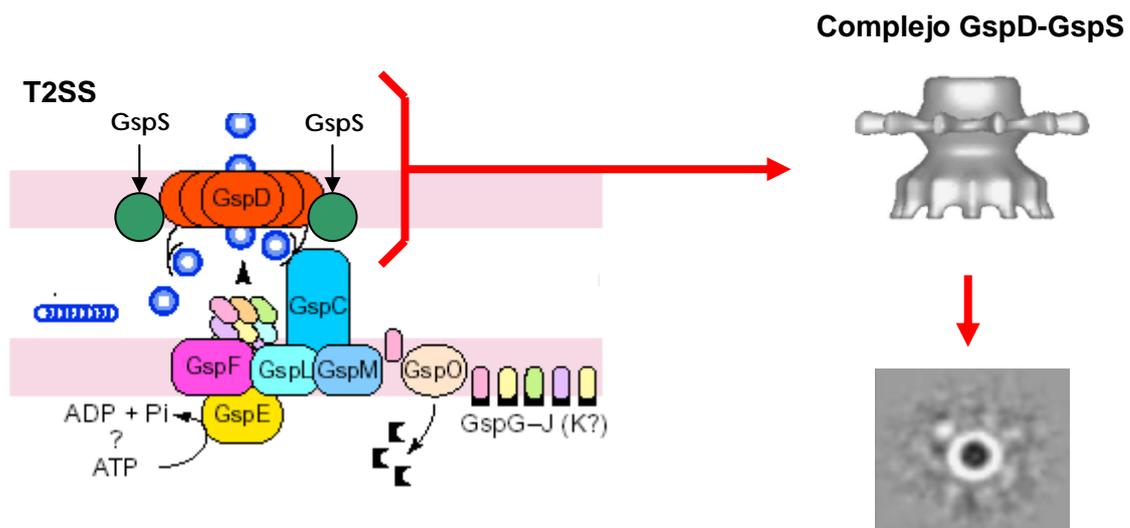


Figura 8. Modelo de ensamblaje del T2SS y de la interacción de GspS y GspD.

Modificado de: (Nunn, 1999)²¹²

Fuentes de energía para el T2SS

La secreción de proteínas es un proceso activo que requiere fuentes de energía. Proteínas como GspE tienen secuencias con un patrón de unión a nucleótidos trifosfatados (NTP). Mutaciones en los residuos conservados de glicina dentro de la secuencia de GspE en bacterias como *Ps. aeruginosa*, *K. oxytoca*, *Er. chrysanthemi* y *V. cholerae* provocan una secreción defectuosa.^{213,214,215,216} Se piensa que la actividad de unión al ATP puede ser estimulada cuando GspE interactúa con otras proteínas del T2SS o con otros componentes de la membrana como los fosfolípidos. Miembros de la familia GspE poseen una región central altamente conservada que consiste de dos motivos cortos ricos en aspartato llamados, cajas de aspartato, los cuales son requeridos para ayudar a la función de GspE en el proceso de secreción, ya que se demostró una disminución substancial de la secreción de pululanasa (80.0 – 90.0 %) cuando se reemplazó un residuo de aspartato por un residuo de arginina en *Klebsiella oxytoca*. Los residuos de aspartato pueden estar involucrados en la formación y estabilización del pliegue de unión a nucleótidos por interacción con Mg⁺⁺.²¹⁴

La secuencia deducida de aminoácidos de proteínas similares a GspE, mostró que estas son principalmente hidrofílicas y no poseen ningún dominio hidrofóbico que pudiera anclar la proteína a la membrana. Esta observación es consistente con lo observado en *E. coli* en donde proteínas del tipo de GspE se ubican en el citoplasma.²¹⁷ Sin embargo, estas proteínas están asociadas con la MC en su huésped original. Esto sugiere que GspE está interactuando con otros componentes Gsp para formar una maquinaria funcional. Parece ser que GspE se une a la parte interna de la MC gracias a una interacción con GspL. Esto es demostrado por la co-expresión de los genes que codifican para GspE y GspL de *V. cholerae* y *Ps. aeruginosa* en *E. coli*, así como el bajo nivel de asociación a la MC de GspE. Proteínas del tipo de GspE pertenecen a una gran superfamilia de NTPasas, las cuales se han identificado

en los sistemas de secreción tipo 2 y 4 (T2SS y T4SS). A este tipo de proteínas se le ha denominado ATPasas de tráfico, cuya clasificación ya ha sido reportada.²¹⁸ Aunque se han clasificado en la misma superfamilia, los componentes del T4SS, genes T-DNA (genes que inducen la formación de tumores) y de conjugación bacteriana, cuyo prototipo es VirB11, parecen tener una mayor distancia en la homología a GspE de la superfamilia involucrada en el T2SS y la biogénesis de pili tipo IV. La mayoría de las ATPasas similares a VirB11 son más cortas, comparadas con GspE.²¹⁹

La función exacta de GspE en el T2SS no se conoce, pero las varias observaciones discutidas anteriormente sugieren que esta actúa como una ATPasa de tráfico para el transporte a través de la MC.²¹⁶ Algunos autores proponen su participación en la translocación de pseudopilinas y pilinas a través de la MC antes de su ensamblaje como pilis o pseudopilis. Ensayos de mutagénesis soportan la idea de que las pseudopilinas son sustratos para GspE, la cual interactúa con pseudopilinas a través de la MC de una manera similar a los ciclos de inserción-desinserción de SecA.^{220,221}

Reconocimiento especie-específico de proteínas secretadas en el T2SS

Proteínas dependientes del T2SS, tal como la pululanasa de *K. oxytoca*, no son reconocidas por el T2SS de *Ps. aeruginosa*, demostrando que el proceso es específico.²²² Estas dos bacterias no están estrechamente relacionadas y se ha descrito secreción heteróloga en organismos estrechamente relacionados. De ahí que, uno de los aspectos de interés en el estudio del mecanismo de secreción del T2SS, sea conocer cuál es la señal que posee la proteína que será secretada para ser reconocida.^{190,193} La comparación de las secuencias de proteínas que son secretadas no evidenció similitudes, aunado al hecho de que algunas proteínas se transportan de forma monomérica (como la elastasa) y otras en forma oligomérica (como la toxina del cólera).

El principio sobre el cual se basa el proceso de reconocimiento de la proteína es incierto, pero la proteína a ser secretada debe contar con una señal para la secreción que no se ha identificado. *Ps. aeruginosa* secreta enzimas tan diversas como lipasas, elastasa, fosfatasa alcalina, fosfolipasas y la exotoxina A, en donde todas usan la misma maquinaria de secreción. Todas estas proteínas deberían por lo tanto, tener una señal de secreción común. Sin embargo, el análisis de las secuencias no ha identificado una región lineal homóloga en estas proteínas que pudiera actuar como señal de reconocimiento.

El plegamiento periplásmico es un requisito para proteínas secretadas a través del T2SS, el cual se da por la formación de uniones disulfuro entre cisteínas,²²³ catalizadas por una disulfuro isomerasa (DsbA).²²⁴ Se ha especulado que la señal de secreción puede ser formada y presentada al aparato de secreción una vez que se presenta el plegamiento de la proteína, sin embargo, se ha establecido que las uniones disulfuro no son la señal de reconocimiento para la secreción, ya que proteínas que carecen de cisteínas son eficientemente secretadas.²²⁵ A pesar de ello, la secreción de una pululanasa sintetizada sin cisteínas es todavía dependiente de DsbA, lo cual aumenta las interrogantes acerca de la función exacta de DsbA.

Dos componentes del secretón, GspK y GspS, poseen uniones disulfuro. La formación de estas uniones ha mostrado ser crucial para la actividad de GspK y la estabilidad de GspS en *K. oxytoca*.²²⁶ Lo que es un hecho, es que el plegamiento de muchas proteínas con actividad biológica es necesario para su activación y posterior estabilidad.²²⁷

Participación de la secretina en el reconocimiento de las proteínas secretadas

Uno de los componentes del T2SS involucrado en la cascada de eventos de reconocimiento para dirigir a la proteína, es la secretina de ME. La pectato

liasa PelB de *Er. chrysanthemi* se une al extremo N-terminal de la secretina.²²⁸ Como ya se ha mencionado, el extremo N-terminal es la región más variable de la secretina, tiene la función de especificidad para el reconocimiento de la proteína que será secretada. Las evidencias han sido confirmadas con la secretina GspD en *K. oxytoca*.²²⁹ Esta observación es consistente con el hecho de que de todos los componentes del sistema de secreción de *Er. chrysanthemi* requeridos para la secreción de la pectato liasa, sólo dos no pueden ser remplazados por sus homólogos presentes en *Er. carotovora*, GspC y GspD.²³⁰ Lo anterior sugiere que estas dos proteínas están íntimamente relacionadas con el reconocimiento de proteínas que son secretadas por este sistema. Otra posibilidad es que estas proteínas no sean incorporadas dentro del sistema heterólogo, debido a que fallan para hacer interacciones específicas con los otros componentes del sistema de secreción, que son requeridos para el ensamblaje de la maquinaria de secreción. Esta segunda hipótesis esta respaldada por los trabajos realizados por Groot *et al.*, (2001),²³¹ quienes mostraron que las proteínas GspC o GspD no pueden ser intercambiadas de manera individual entre *Ps. aeruginosa* y *Ps. alcaligenes*, sin embargo, si pueden ser intercambiadas simultáneamente. Esto podría indicar que existe una interacción específica entre estos dos componentes.

Funcionamiento del T2SS

Translocación de pseudopilinas: Es posible imaginar la existencia de estructuras perfectamente organizadas en el periplasma con una conformación helicoidal, las cuales se denominan pseudopilinas. El ensamblaje de los componentes puede requerir de una peptidasa, una proteína de unión a ATP y posiblemente de varias proteínas de la MC, para lograr la translocación de pseudopilinas al periplasma. Ha sido propuesto que dicha translocación es iniciada una vez que las pseudopilinas se colocan en la

cavidad del anillo hexamérico correspondiente a la ATPasa GspE. Ciclos de hidrólisis de ATP por GspE alternan un estado de apertura y cierre del anillo hexamérico que permite el paso de las pseudopilinas a través de otro canal que puede ser formado por la proteína politópica GspF. Sin embargo, la inserción inicial y el proceso de translocación de las pseudopilinas a través de MC mediante GspE espera aún ser demostrado, debido a que se propone que las pseudopilinas son primero insertadas en la MC a través de la ruta Sec. Finalmente, el ensamblaje de las pseudopilinas puede ser el principal elemento en el empuje de la proteína a través del canal de la secretina para su liberación final. Alternativamente, las pseudopilinas pueden actuar de manera similar a un tapón, contribuyendo al bloqueo del canal de la secretina. Las pseudopilinas pueden también servir como una guía de la ruta que seguirá la proteína hacia el canal de la secretina. Es por eso que, el estudio de las diferentes pseudopilinas, su composición exacta, su estructura y su capacidad de retracción, aportará información crucial para un mejor entendimiento acerca del funcionamiento del T2SS.²³²

GspC promueve el ensamblaje de pseudopilinas: La participación de GspC puede ser coordinada para el ensamblaje de las pseudopilinas. Además, GspC interactúa con la plataforma interna constituida por GspL, y GspM, mediante su extremo N-terminal y con la secretina de la ME por medio de extremo C-terminal. Es también posible que interactúe con GspG y con la proteína que será secretada.²³³

La actividad de GspE es importante para la funcionalidad del T2SS: La actividad de ATPasa de GspE por un lado, puede promover el ensamblaje de las pseudopilinas y por otro lado, puede promover un cambio conformacional en el complejo GspL, Y, M, Z, E y R. Tal cambio puede resultar en una interacción más relajada de GspC con la

secretina GspD, dando acceso a la liberación de la proteína por empuje de las pseudopilinas. La caracterización molecular de la interacción de GspC-GspD, puede ser de utilidad para entender la dinámica del canal de la secretina y más generalmente del T2SS. De ahí que la información sobre la estructura de ambos componentes sea requerida.^{217,218}

La secretina es el elemento que permite la liberación de la proteína al medio externo: La secretina (GspD) constituye el componente del T2SS que permite a la proteína secretada alcanzar el medio extracelular. Se constituye de 12 a 15 subunidades y el canal interno atraviesa la ME y tiene un diámetro de 95 Å. La liberación de la proteína solo puede ocurrir si la cavidad de la secretina no está ocupada por pseudopilinas.¹⁹⁴

El T2SS se considera un sistema conservado con alta especificidad: A pesar de que el T2SS es un sistema conservado, el intercambio de componentes entre especies diferentes no es posible, sugiriendo que hay una especificidad dentro de la misma maquinaria de secreción. Es por eso que la probabilidad de obtener una maquinaria híbrida, depende de la distancia filogenética entre los organismos involucrados.²³⁴

Al parecer, de todos los componentes del T2SS, GspG es la proteína que puede ser intercambiada de una manera estable.²³⁵

Interrogantes acerca de la señal para la secreción: La proteína que será secretada debe tener alguna señal de secreción que promueva el reconocimiento de componentes del T2SS como GspD. El plegamiento de la proteína se da en el periplasma y la señal de reconocimiento es probablemente conformacional en vez de lineal. De cualquier forma, el sustento experimental de esta hipótesis no ha sido

probado, por lo que son necesarias las evidencias experimentales antes de alcanzar una conclusión final al respecto. La translocación de proteínas plegadas a través de la ME contrasta con el hecho dogmático de un estado competente no plegado para la translocación de proteínas a través de la MC por medio de la maquinaria Sec. No obstante, un reciente mecanismo de translocación (Sec-independiente) hacia el periplásmo, para metaloenzimas que han adquirido una conformación plegada en el citoplasma, ha sido descrito.²³⁶ Así mismo, trabajos recientes indican que el sistema Tat puede en algunos casos ser usado como primer paso del T2SS en lugar del Sistema Sec.¹⁷⁴

Las pseudopilinas y el evento de secreción: Está claro que los componentes de la maquinaria del T2SS ya se han definido. Sin embargo, todavía no se tiene un entendimiento preciso de la organización de la maquinaria y los mecanismos que controlan la función de la secreción. En este caso, la función de los pseudopilis es probablemente una de las principales características del aparato de secreción tipo 2. El ensamblaje de estas proteínas puede ser uno de los principales elementos en la translocación de la proteína a través de la ME a través de la secretina. Los pili tipo IV son estructuras retráctiles que participan en el movimiento sobre superficies sólidas que llevan a cabo algunas bacterias y debido a la relación estructural entre ambos sistemas (T2SS y maquinaria para la Biogénesis de pili tipo IV), se ha postulado la retracción de los pseudopilis como un mecanismo para promover el paso de la proteína, a través de la secretina (Figura 9). La interacción de todos los componentes del T2SS para formar un gran complejo multiproteico denominado “secretón” constituye una estructura de gran importancia para el proceso de secreción de proteínas en bacterias Gram negativas. La caracterización individual de los componentes y la integración en una imagen en tercera dimensión reconstituyendo al secretón completo

mediante el uso de técnicas de microscopía electrónica puede ser el siguiente paso hacia el entendimiento de los mecanismos de este sistema de secreción. Es importante señalar que, la apropiada incorporación del secretón puede involucrar la interacción con constituyentes adicionales de la pared celular, como sucede con el lipopolisacárido.²³⁷

La errónea denominación GSP para referirse al T2SS

Una de las más comunes e incorrectas declaraciones encontradas en la literatura es la denominación del término GSP como sinónimo de la ruta secretoria tipo 2 (T2SS).^{238,239}

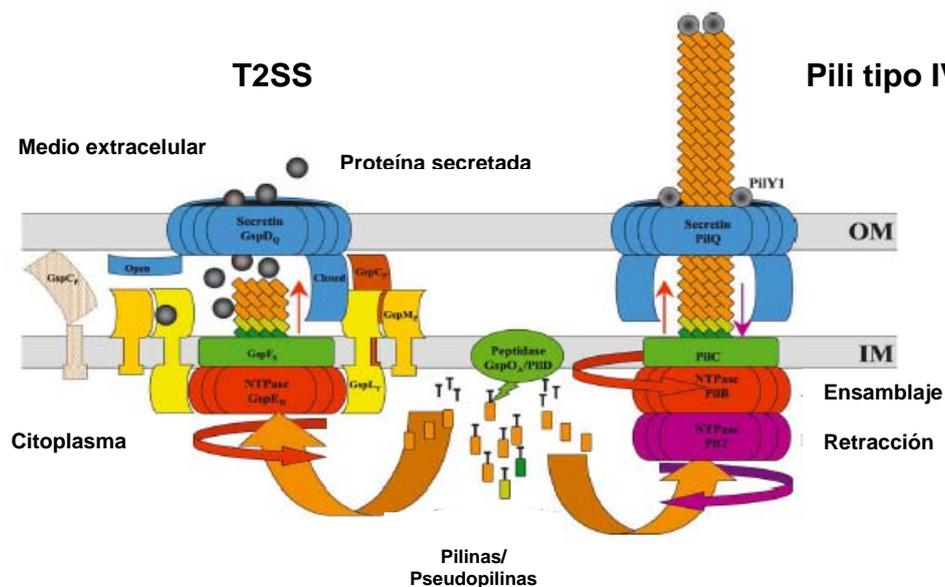


Figura 9. Secreción tipo 2 y su homología con la maquinaria para la biogénesis de pili tipo IV.

Experimentos de biología molecular revelaron la presencia del translocón Sec, constituido por las proteínas SecYEG/Sec61agb) ampliamente difundidas en microorganismos.²⁴⁰ La presencia, conservación y naturaleza esencial del translocón Sec ha dado un aumento a la noción de un mecanismo de secreción de proteínas general con *E. coli* como el paradigma bacteriano.²⁴¹ Al tiempo en que el término GSP

fue establecido, la ruta de secreción tipo 2 fue la única ruta conocida en bacterias Gram negativas asociada con el translocón Sec. Por lo tanto, en bacterias Gram negativas la ruta de secreción tipo 2 fue primeramente definida como un proceso en dos pasos bajo la denominación GSP.^{242,243} Es en este punto que la confusión en la nomenclatura de los sistemas de secreción comenzó a acumularse en la literatura científica. De manera confusa, en bacterias Gram negativas se denominó ruta general de exportación (GEP) a la translocación a través de la MC Sec-dependiente, mientras que en bacterias Gram positivas se conservó el término GSP. Por consiguiente, ambos GSP y GEP hacían referencia a la secreción dependiente del translocón Sec.^{243,244,245} Además, el sistema de secreción tipo 2 fue también referido como la principal rama terminal (MTB) de la GSP. Así fue como se pensó que ésta era la principal ruta involucrada en la secreción de proteínas en bacterias Gram negativas.^{246,247} Sin embargo, en los siguientes años, algunos autores investigando la secreción de proteínas en bacterias comenzaron a utilizar el término GSP para referirse directamente a la ruta de secreción tipo 2, mientras que otras investigaciones sobre secreción en eucariontes y bacterias Gram positivas continuaron empleando el término GSP para describir a la maquinaria Sec presente en todos los organismos vivos.^{238,239,240} En años recientes, el descubrimiento de un amplio rango de proteínas bacterianas secretadas ha permitido la descripción de nuevos sistemas de secreción tanto en bacterias Gram negativas como en bacterias Gram positivas.^{248,249} En bacterias Gram negativas, estos sistemas de secreción corresponden al T3SS, T4SS y T5SS. Sin embargo, para continuar contribuyendo a la confusión referente a la terminología GSP, el T4SS y el T5SS fueron también agrupados como ramas más simples de la ruta GSP.¹⁸⁹

Con respecto al T4SS, se ha observado una secreción de moléculas efectoras Sec-dependientes y Sec-independientes dependiendo del microorganismo o el tipo de proteína secretada.^{250,251} De manera similar, parece que proteínas autotransportadoras

secretadas a través del T5SS pueden ser dirigidas para su translocación a través de la membrana interna por dos diferentes mecanismos: La ruta SRP (siglas en Inglés de signal-recognition particle) y/o SecB (en la que participa el sistema Sec de la MC).²⁵² Originalmente, se pensó que SecB estaba involucrada en la dirección y translocación de todas las proteínas exportadas a través del translocón Sec.²⁴⁴ En contraste, SRP fue considerada un mecanismo específico para la integración de proteínas de la MC y proteínas secretadas.²⁵³ Las rutas SRP y SecB fueron descritas como dos diferentes rutas convergentes sobre el translocón Sec. De esta forma, ahora se sabe que las proteínas pueden ser dirigidas al Sistema Sec a través de diferentes rutas.^{253,254} Estos datos soportan fuertemente el reciente concepto reportado en la literatura que hace referencia a que la secreción de proteínas en bacterias es más versátil y flexible de lo que se pensó originalmente.^{235,242} Con base en los hallazgos anteriormente señalados, puede ser argumentado definitivamente que en Procarya los términos GSP, MTB y GEP como originalmente se definieron, son ahora obsoletos y que un cambio en la terminología debe ser iniciado para traer más claridad a la nomenclatura en este campo de la investigación. Cabe aclarar que el término GSP al ser conservado, su uso debe ser restringido únicamente para señalar la translocación a través de la MC mediante el aparato Sec.

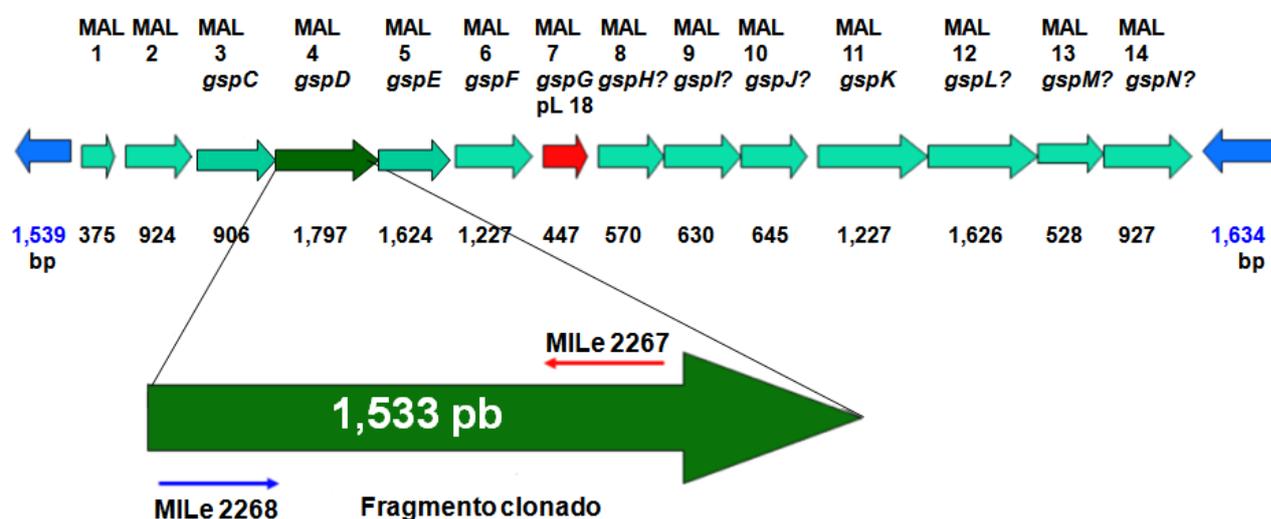
Entre los genes relacionados con sistemas de secreción que son de interés para este proyecto y que han sido identificados tanto en el CI de *L. interrogans* serovariedades Copenhageni y Lai, como en el CI de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo, destacan los genes que codifican para las proteínas GspC, GspD, GspE, GspF, GspG, GspH, GspI y GspK las cuales forman parte de la maquinaria funcional del T2SS. En el caso de *L. interrogans* serovariedades Copenhageni y Lai, el *locus gsp* tiene una organización que incluye 17 MAL, mientras que en *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo, el *locus gsp* tiene una organización que incluye 14 MAL.^{119,139,140}

La detección en *Leptospira biflexa* serovariedad Patoc, de los genes *gspD* (1,788 pb) y *GspE* (1,677 pb) relacionados con el T2SS, constituye un hallazgo relevante ya que se trata de una espiroqueta no patógena, indicando que este tipo de sistema no es exclusivo de leptospiras patógenas.²⁵⁵ El alineamiento de *gspD* de la serovariedad Patoc con sus homólogos en las serovariedades Copenhageni y Lai reveló tres fracciones menores de 62 pb con identidades de 82.0, 88.0 y 92.0 % respectivamente. El alineamiento con *gspD* de la serovariedad Hardjobovis mostró únicamente dos regiones con una identidad de 76 y 72.0 %. El alineamiento de *GspD* de la serovariedad Patoc con sus homólogos en las serovariedades Copenhageni y Lai mostró una identidad del 63.0 %, mientras que con su homólogo en la serovariedad Hardjobovis mostró una identidad de 61.0 %. El alineamiento con su homólogo en bacterias como *E. coli* y *K. pneumoniae* reveló una identidad que varió entre 27.0 y 28.0 % respectivamente.²⁵⁵

La secuenciación del *locus gsp* en la serovariedad Patoc, permitirá conocer la organización genética y definir las estrategias para llevar a cabo la caracterización funcional del mismo, en este grupo no patógeno de *Leptospira*, para el cual, se han logrado desarrollar herramientas moleculares que permiten desarrollar ensayos de mutagénesis dirigida, que no ha sido posible realizar en serovariedades patógenas de *Leptospira*.

ANTECEDENTES

El análisis proteómico de *Leptospira interrogans* serovar Lai (Cullen *et al.*, 2002),¹³⁰ permitió identificar ocho nuevas proteínas en la membrana externa, una de estas con un peso aproximado a 18 kDa (pL18). Análisis bioinformático del genoma de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo subtipo Hardjobovis permitió la identificación del MAL codificante. En el año 2002, la comparación de la secuencia parcial de pL18, utilizando el genoma en desarrollo de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo (Hardjobovis)^a con las bases de datos, reveló similitud del 46.0 % con GspG, una proteína del (T2SS) en *E. coli*.²⁵⁶ Análisis de la secuencia adyacente reveló un locus de 14 MAL en la misma cadena, codificando proteínas homólogas al T2SS de *E. coli* y flanqueadas corriente arriba por un MAL de 1,539 pb que codifica para una ATPasa con actividad de chaperona y corriente abajo por un MAL de 1,634 pb que codifica para un elemento de la familia IS1501, ambos en contrasentido (Figura 10). Tres MAL corriente arriba de GspG, se identificó un homólogo a *gspD* de 1,797 pb que codifica para una secretina de localización superficial. Al comparar la secuencia de aminoácidos de GspD_L con las bases de datos, se observó una similitud de 46.0 % con GspD de *E. coli*.



Bulach *et al.*, 2006 *Proced. Natl Acad Sci* 103:14560-14565.

Figura 10. Representación gráfica del *locus gsp* obtenida a partir del genoma secuenciado de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo (Hardjobovis) de la cepa L550, el cual consta de 14 MAL contiguos. Tres MAL corriente arriba del MAL correspondiente a PL18 (GspG), se encuentra un MAL de 1,797 pb correspondiente a GspD (motivo de nuestro estudio). Los iniciadores MILE 2267 y MILE 2268, se utilizaron para amplificar un fragmento de 1,533 pb del gen *gspD*, el cual fue clonado en el vector de expresión pET28a.

^a Bullach DM, comunicación personal

Considerando su ubicación en bacterias Gram negativas, existe la posibilidad de que GspD_L sea reconocida por la respuesta inmune dirigida contra *Leptospira* (Figura 11). Con este interés, iniciamos el estudio de GspD_L en *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo.

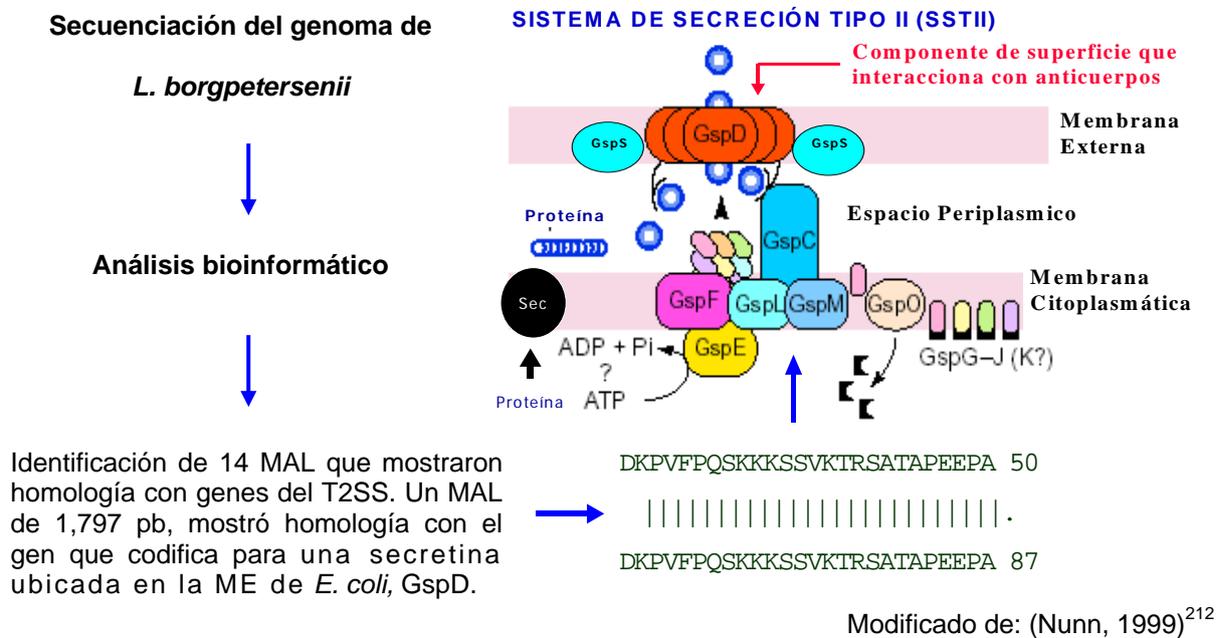


Figura 11. Identificación de genes del T2SS, en el genoma de *Leptospira*.

III. JUSTIFICACIÓN

Análisis bioinformático del genoma de *L. borgpeterseni* serovariedad Hardjo reveló la presencia del T2SS, el principal sistema de secreción de proteínas y el mejor estudiado en bacterias Gram negativas, el cual se ha reportado participa en la secreción de enzimas extracelulares y diversas toxinas. El hecho de que GspD, motivo de nuestro estudio, sea la única proteína de este sistema que en diferentes bacterias Gram negativas se ubica en la superficie de la membrana externa y que su integridad es fundamental para el óptimo funcionamiento de esta ruta de secreción bacteriana, plantea la posibilidad de estudiarla en *Leptospira*, como un antígeno con inferencia directa en inmunogenicidad y patogenicidad.

IV. HIPÓTESIS

GspD_L de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo subtipo Hardjobovis es expresada *in vivo* por lo que es reconocida por la respuesta inmune en hospederos mamíferos.

V. OBJETIVO GENERAL

Obtener la proteína GspD_L recombinante de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo subtipo Hardjobovis y evaluar su antigenicidad.

VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Amplificar el gen *gspD_L* a partir de ADN cromosomal de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo subtipo Hardjobovis y clonarlo en un vector de expresión.
2. Inducir la expresión del gen *gspD_L* en lisógenos DE3 de *Escherichia coli* para proceder a la purificación de GspD_L recombinante a partir de preparaciones de proteínas totales de las cepas de expresión de *E. coli*.

3. Determinar si GspD_L recombinante es antigénica para evaluar su potencial uso en la implementación de una prueba de utilidad diagnóstica.

4. Determinar si GspD_L es un antígeno conservado en serovariedades patógenas de *Leptospira* para definir si esta proteína podría ser considerada como un posible candidato para el desarrollo de una vacuna sub-celular recombinante.

5. Evaluar la inmunogenicidad de GspD_L en un modelo de infección en hámster.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas utilizadas

Se utilizó ADN de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo subtipo Hardjobovis cepa L550, para amplificar el gen *gspD_L*. Adicionalmente, se utilizaron las serovariedades Australis, Ballum, Bratislava, Canicola, Cynopteri, Grippotyphosa, Hardjo subtipo Hardjoprajitno, Icterohaemorrhagiae, Lai, Patoc, Pomona, Pyrogenes, Sejroe, Tarassovi y Wolffi las cuales fueron proporcionadas por el Centro de Referencia e Investigación sobre Leptospirosis OMS/FAO.^b para la obtención de proteínas totales y de membrana externa, así como ADN cromosomal. Todas las serovariedades de *Leptospira* fueron cultivadas a 30 °C durante 10 días en medio líquido EMJH descrito por Ellinghausen & McCullough y modificado por Johnson & Harris,²⁵⁷ el cual fue suplementado con 1 % de albúmina sérica bovina, fracción V (Apéndice).

Se utilizaron diferentes cepas de *Escherichia coli* para la amplificación del plásmido recombinantes y la expresión de la proteína de interés (Cuadro 4). Para lograr la replicación del vector de clonación se utilizó *E. coli* DH5 α (*Invitrogene*) [(F- f80 *lacZ* M15_*lacZ* YA-*argF*) U169 *deoR* *recA1* *endA1* *hsd* R17(rk-, mk+) *phoA* *supE44* *thi-1* *gyrA96* *relA1* *tonA*], la cual es sensible a antibióticos como ampicilina, cloramfenicol y kanamicina.

La designación de lisógenos DE3, se refiere a que la cepa de *E. coli*, posee como lisógeno al fago λ DE3, el cual porta el gen que codifica para la T7 RNA polimerasa, que se encuentra bajo el control del promotor *lacUV5*, lo cual permite cierto grado de transcripción en el estado no inducido y en presencia de un inductor, se encuentra disponible para la expresión de algunos genes cuyos productos resultan inocuos para el desarrollo de la bacteria. Se requiere isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG) para lograr la inducción de la T7

^b WHO/FAO/OIE Collaborating Centre for Reference and Research on Leptospirosis, Australia and Western Pacific Region

RNA polimerasa en altos niveles. Para la expresión de la proteína recombinante se utilizaron: *E. coli* C43 DE3 (*Novagene*), que posee el gen de la T7 RNA polimerasa, que reconoce el sitio promotor T7, presente en algunos vectores de expresión y así transcribir el gen de interés clonado junto a este sitio. *E. coli* Rosetta DE3 (*Novagene*) codon plus la cual posee como característica principal, la de sintetizar ARNt's para codones que otras cepas de *E. coli* no poseen (AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA). Esta cepa es resistente a cloramfenicol debido al gen *cat* presente en el plásmido que codifica para los diferentes ARNt's. *E. coli* pLysS DE3 (*Novagene*), la cual posee un gen que codifica para la T7 lisozima, la cual controla la actividad de la T7 RNA polimerasa, con lo que se controla de manera eficiente la expresión de productos tóxicos, posee resistencia a cloramfenicol. Las diferentes cepas de *E. coli* fueron cultivadas a 37 °C y a temperatura ambiente (TA) en agar y caldo Luria-Bertani (por sus siglas en Inglés, LB)²⁵⁸ (Apéndice).

Cuadro 4. Cepas de *E. coli* utilizadas en los procedimientos de clonación y expresión.

Cepa de <i>E. coli</i>	Características	Resistencia
DH5 α	Utilidad en experimentos de clonación al permitir la replicación de plásmidos recombinantes	Ninguna
C43	Favorecen la expresión de proteínas unidas a la membrana	Ninguna
Rosetta <i>codon plus</i>	<i>E. coli</i> derivada de la cepa Turner. Posee un plásmido que codifica para codones raros (AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA), favoreciendo la expresión de diferentes tipos de proteínas	Cloramfenicol
pLysS	<i>E. coli</i> derivada de la cepa BL21. Posee un gen que codifica para la T7 lisozima que controla la actividad de la T7RNA polimerasa, favoreciendo la expresión de proteínas que pudieran ser tóxicas	Cloramfenicol

Vector de expresión

Se utilizó el vector de expresión pET28a, el cual permite la clonación y posterior expresión de proteínas recombinantes con etiquetas de 6 histidinas y de un péptido antigénico de 11 aminoácidos del fago T7. Posee además el promotor y terminador T7 aledaños al sitio múltiple de clonación para facilitar la expresión de los fragmentos clonados. La región T7 promotor es reconocida por la T7 RNA polimerasa, lo que garantiza la transcripción y posterior traducción del gen de interés. Posee como marcador un gen de resistencia a kanamicina. Es un vector compatible con lisógenos de *E. coli* DE3, que poseen en su cromosoma el gen que codifica para la T7 RNA polimerasa, la cual al encontrarse bajo el control del producto del gen *lacI*, requiere IPTG para inducir la expresión del sistema.

Extracción de ADN cromosomal

La extracción de ADN cromosomal de *Leptospira* se realizó siguiendo el método de lisis alcalina con algunas modificaciones²⁵⁸.

Se concentró un cultivo de *Leptospira* en fase exponencial (desarrollo de 5 días a 30 °C) mediante centrifugación a 31,000 X g (rotor *Beckman JA-17 17,000 RPM MAX. SER.586*) durante 20 min a 4 °C y el sedimento obtenido se reconstituyó en una solución Tris 10 mM - EDTA 1 mM pH 8.0 (solución amortiguadora TE) para luego ser transferido a un tubo de microcentrifugación y ser centrifugado nuevamente durante 10 min a 13,000 X g (rotor *Savant model RSR-20, 13,000 X g*) a 4°C.

El sobrenadante se eliminó y el sedimento fue reconstituido en 500 µl de una solución de lisis fresca (Glucosa 50 mM - EDTA 10 mM - Tris 2.5 mM pH 8.0 conteniendo 10 mg/ml de lisozima). Se incubó durante 30 min a 37 °C y posteriormente, se procedió a la lisis alcalina mediante la adición de 40 µl de dodecil sulfonato de sodio al 10.0 %, (SDS, *Invitrogene*), se continuó la incubación durante 20 min a 37 °C y posteriormente, se adicionaron 20 µl de una

solución fría de acetato de potasio (3 M K – 5 M CH₃COO) (Apéndice), colocando el tubo en hielo por 5 a 10 min. La mezcla fue entonces centrifugada a 13,000 X g (rotor *Savant model RSR-20, 13,000 X g*) durante 10 min a 4 °C y el sobrenadante conteniendo ADN cromosomal fue transferido a otro tubo nuevo.

La mezcla fue tratada entonces con una solución al 50.0 % de fenol (*Sigma*) equilibrado pH 8.0 – 50.0 % cloroformo (*JT Backer*) - alcohol isoamílico (*JT Backer*) con una relación 24:1, invirtiendo el tubo suavemente 20 veces. Posteriormente, se centrifugó a 13,000 X g (rotor *Savant model RSR-20, 13,000 X g*) durante 10 min y cuidadosamente se separó la fase acuosa (superficial) evitando el precipitado proteico. En un tubo nuevo, se adicionaron 60 µl de una solución fría de acetato de sodio 3 M y 750 µl de isopropanol (*JT Backer*) a la fase acuosa y esta solución se incubó a –20 °C durante 3 h para precipitar el ADN.

El ADN precipitado, se colectó por centrifugación a 13,000 X g durante 10 min y el sedimento fue lavado con etanol al 70.0 % y secado al aire durante 10 min. El sedimento conteniendo ADN cromosomal finalmente se resuspendió en 50 µl de solución amortiguadora TE estéril y 100 µg/ml de RNAasa libre de DNAasa y se conservó en refrigeración.

La presencia de ADN cromosomal se determinó mediante electroforesis a 100 V/ 60 min en geles de agarosa al 0.7 %, los cuales fueron teñidos con bromuro de etidio, (*Sigma*) usando 5 µg/ml y posteriormente visualizados en un transiluminador (Fotodyne 30-3025) de luz ultravioleta. La concentración de ADN (ng/µl), se determinó por fluorimetría (Hoefler DyNA Quant 200 Fluorometer) usando densidad óptica a una longitud de onda de 260 nm (por sus siglas en Inglés, OD₂₆₀).

Amplificación de *gspD_L* de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo mediante PCR

A partir de la secuencia de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo subtipo Hardjobovis^c, se diseñaron dos iniciadores que incluyeron sitios de corte para las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI (*Invitrogen*), con la finalidad de amplificar y clonar el gen *gspD_L* con la orientación deseada en el vector de expresión pET28a. Los iniciadores fueron MILE 2267 con sitio *Eco*RI (iniciador reverso) y MILE 2268 con sitio *Bam*HI (iniciador adelantado) (Cuadro 5).

La reacción de PCR se realizó en un volumen de 25 μ l incluyendo: PCR Buffer 10X - 2.5 μ l; MgCl 50 mM - 2 μ l; d’NTPs (*Invitrogene*) 10 mM - 1 μ l; MILE 2267 - 1 μ l; MILE 2268 - 1 μ l; ADN - 2 μ l (40 ng/ μ l); Taq Pol (*Promega*) - 2 U; H₂O -15.25 μ l. Las condiciones de la PCR fueron: 1 ciclo de 94 °C / 5 min ; 30 ciclos de: 94 °C / 30 seg, 50 °C / 50 seg, 72 °C/ 1:30 min y un ciclo final de 72 °C/ 7 min (termociclador Perkin Elmer 2400).

Posterior a la PCR, la amplificación se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.0 % teñidos con bromuro de etidio usando 5 μ g/ml.

^c (Bulach DM, 2003 comunicación personal, ahora Bulach *et al.*, 2006).

Cuadro 5. Relación de los iniciadores utilizados en este trabajo.

INICIADOR	SECUENCIA	DESCRIPCIÓN
MILe 2267	5' TCG TAG AAT TCC TGT AGC ATC 3'	Iniciador reverso para amplificar <i>gspD_L</i> con sitio <i>EcoRI</i>
MILe 2268	5' TCT CAA AGG ATC CAG CGC TAT C 3'	Iniciador adelantado para amplificar <i>gspD_L</i> con sitio <i>BamHI</i>
MILe 1230	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG G 3'	Iniciador del Promotor T7 para vectores de la serie pET
MILe 1231	5' GCT AGT TAT TGC TCA GCG G 3'	Iniciador del Terminador T7 para los vectores de la serie pET
MILe 2349	5' ACC CTG TGG TTC AAT CCG 3'	Iniciador adelantado para cerrar un hueco de 250 pb en <i>gspD_L</i> de <i>L. borgpetersenii</i> serovariedad Hardjo Hardjobovis.

Extracción de ADN plásmídico

La extracción del plásmido pET28a se realizó por el método de lisis alcalina utilizando un sistema comercial para purificación (*Cocert Maxiprep spin system, Gibco BRL*).

E. coli DH5 α conteniendo pET28a fue cultivada en 50 ml de caldo LB (Apéndice) e incubada 24 h a 37 °C en agitación orbital a 200 rpm. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 5,000 X g durante 10 min a TA, se eliminó el sobrenadante y el sedimento bacteriano se secó de 10 a 15 min a TA.

El sedimento se resuspendió en 210 μ l de la solución de suspensión (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA), conteniendo RNAasa A, (*Sigma*) a 20 mg/ml hasta homogenizar por

completo. Posteriormente, se añadió la solución de lisis (200 mM NaOH, 1.0 % SDS p/v) y se homogeneizó suavemente invirtiendo el tubo 5 veces y se incubó a TA por 5 min.

A continuación, se añadieron 280 μ l de la solución de neutralización (hidrocloruro de guanidina y acetato de potasio), se homogeneizó inmediatamente invirtiendo el tubo 5 veces y fue entonces centrifugado a 12,000 X g durante 10 min.

Dentro de un tubo de 2 ml se colocó un cartucho con un fondo a base de membranas de sílice y dentro de éste, se añadió el sobrenadante obtenido en el paso anterior, se centrifugó a 12,000 X g durante 1 min. El cartucho se colocó dentro de un tubo nuevo de 2 ml, se adicionaron 700 μ l de la solución de lavado (NaCl 10 mM, EDTA 1 mM y Tris HCl 10 mM, pH 8.0) conteniendo etanol absoluto, se centrifugó a 12,000 X g durante 1 min.

Por último, el cartucho se colocó dentro de un tubo de 1.5 ml y se adicionaron directamente en el centro de la membrana del cartucho 75 μ l de TE calentado a 50 °C, se dejó incubando a TA por 1 min y se centrifugó a 12,000 X g durante 2 min. Se retiró el cartucho y en el tubo quedó el ADN del plásmido pET28a ya purificado. Se registró la extracción mediante electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (*Sigma*) a 5 μ g/ml y obteniendo finalmente el registro fotográfico (Analizador de imágenes). El ADN del plásmido pET28a fue almacenado a 4 °C.

Clonación de *gspD_L* de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo, Hardjobovis en pET28a

Con la finalidad de asegurar que el fragmento amplificado (*gspD_L*) quedara en fase para su posterior expresión, se realizó su digestión y la del vector (pET28a) con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI (*Invitrogen*), 10 unidades de cada una en un volumen final de 50 μ l. Para ello, se transfirieron en un tubo nuevo, 2 μ l de ADN del fragmento amplificado (250 ng/ μ l), 1 μ l de la enzima *Eco*RI (10 U), 5 μ l de amortiguador de reacción 3 (React 3,

Invitrogene) y 42 μ l de agua desionizada estéril, para completar un volumen final de 50 μ l. Por separado, en un tubo nuevo se transfirieron 30 μ l de ADN del plásmido pET28a (70 ng/ μ l), 2 μ l de enzima *EcoRI* (20 U), 10 μ l de amortiguador de reacción 3 (React 3, *Invitrogene*) y 58 μ l de agua desionizada estéril, para completar un volumen final de 100 μ l. La incubación de ambas reacciones se llevó a cabo en un baño María (*Fisher Scientific, IW*) a 37 °C durante una hora. Al término de la incubación, se adicionaron a las reacciones de digestión del inserto y del vector, 10 y 20 U de la enzima *BamHI*, respectivamente. Después de homogeneizar, ambos tubos de reacción se incubaron en baño María (*Fisher Scientific, IW*) a 37 °C durante 12 h.

Posteriormente, para inactivar ambas enzimas y limpiar los productos, se agregó un volumen de una solución de Fenol-cloroformo (Apéndice), se mezcló por inversión hasta homogenizar adecuadamente y ambos tubos fueron centrifugados durante 5 min a 13,000 X g. Se recuperó el sobrenadante, evitando el precipitado proteico y se transfirió a un nuevo tubo al que se añadió un volumen de una solución de cloroformo:alcohol isoamílico (Apéndice), la mezcla fue homogenizada, en un homogenizador oscilatorio de alta velocidad (vortex, *Termolyne, Maxi-Mix Plus*) y nuevamente fue centrifugada bajo las mismas constantes. El sobrenadante fue recuperado en un tubo nuevo y se añadió una décima parte de solución de acetato de sodio 5 M (Apéndice) y dos volúmenes de etanol absoluto frío. El tubo se mezcló suavemente y se incubó durante tres horas a -20 °C. Posteriormente, el tubo fue centrifugado nuevamente durante 5 min. El sedimento de ADN, fue lavado con etanol al 70.0 % mediante movimientos suaves y fue centrifugado nuevamente durante 5 min. Finalmente, el sobrenadante fue decantado y el sedimento conteniendo al ADN, se secó al aire y finalmente fue reconstituido en 50 μ l de agua deionizada estéril por autoclave. El análisis de los fragmentos digeridos, se hizo mediante electroforesis en geles de agarosa al

1.0 % teñidos con bromuro de etidio (*Sigma*) a 5 µg/ml, exposición a luz ultravioleta y registro fotográfico en un analizador de imágenes (*Fluor S Multiimager, Bio-Rad*).

El ADN digerido del vector pET28a fue defosforilado de la siguiente forma: En un tubo nuevo se colocaron 20 µl (5 µg) de ADN linearizado de pET28a, se añadió 1 µl (20 U) de fosfatasa alcalina intestinal de ternero (*Pharmacia*) y 29 µl de agua deionizada para obtener un volumen final de 50 µl. La mezcla se mezcló en un homogenizador oscilatorio de alta velocidad (*Termolyne, Maxi-Mix Plus*), se centrifugó a 13,000 X g durante tres segundos para concentrar los componentes en el fondo del tubo. Se incubó a 37 °C durante 30 min y posteriormente, se añadió nuevamente 1 µl (20 U) de fosfatasa alcalina intestinal de ternero, se mezcló, centrifugó a 13,000 X g por tres segundos e incubó a 37 °C durante 30 min adicionales. Al término de la incubación, la mezcla se incubó durante 10 min a 70 °C, para inactivar la enzima. Finalmente, la mezcla se colocó en hielo de 5 a 10 min y se mantuvo a -20 °C hasta su uso.

La reacción de ligazón se realizó con una relación inserto-vector 3:1 (300 ng:100 ng) con 2 U de T4 ligasa (*Invitrogen*) a 4 °C durante 18 a 24 h. El ADN ligado fue tratado con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) (Apéndice) para limpiarlo y fue precipitado con la adición de dos volúmenes de etanol absoluto y 0.1 volúmenes de acetato de potasio 5 M (Apéndice) -20 °C durante 24 horas. El plásmido recombinante fue denominado pAL208 (Figura 12).

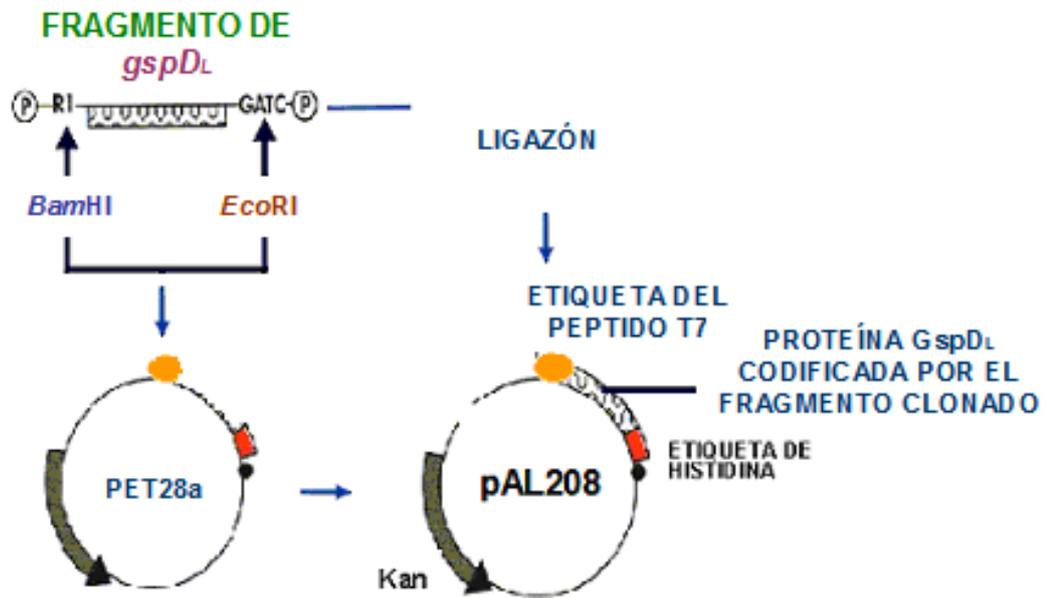


Figura 12. Esquema de la metodología empleada para la clonación del fragmento amplificado de *gspDL* de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo en el vector de expresión pET28a.

Preparación de bacterias competentes con CaCl_2

Se inoculó medio líquido LB (50 ml) sin antibióticos con 3 colonias de *E. coli* DH5 α . El cultivo se incubó a 37 °C con agitación orbital a 200 rpm durante 16 h. Posteriormente, fue diluído con una relación 1:50 en medio líquido LB (10 ml del cultivo con 16 h de desarrollo + 490 ml de medio líquido LB). Este nuevo cultivo se incubó a 37 °C con agitación orbital a 200 rpm hasta que el cultivo alcanzó valor de absorbancia de 0.7 a una densidad óptica de 600 nm e inmediatamente fue colocado en hielo (2 – 4 °C), las bacterias se mantuvieron en hielo durante todo el proceso (si se rompe la cadena fría, se alterara la calidad del lote de bacterias competentes).

El cultivo fue centrifugado a 8000 rpm a 4 °C durante 10 min. El sobrenadante fue eliminado y el sedimento de bacterias, fue colocado inmediatamente en hielo para ser resuspendido con 0.2 volúmenes de una solución fría (2 – 4 °C) de 50 mM de CaCl_2 (estéril). La mezcla de bacterias en 50 mM de CaCl_2 , se incubó en hielo durante 3 h. Al término de esta incubación,

las bacterias fueron centrifugadas a 8000 rpm a 4 °C durante 10 min. El sobrenadante fue eliminado y el sedimento de bacterias, fue colocada inmediatamente en hielo para ser resuspendida con 0.2 volúmenes de una solución 50 mM de CaCl₂. Finalmente la pastilla de bacterias se resuspendió en 0.1 volúmenes de CaCl₂ 50 mM/20.0 % de glicerol (estéril).

Se prepararon alícuotas con 100 µl de bacterias competentes por tubo, los cuales mantuvieron en todo momento en hielo. Finalmente, las alícuotas se conservaron en un ultracongelador (-80 °C) para mantener su estado de competencia hasta su uso.

Transformación de pAL208

pAL208 fue transformado en *E. coli* DH5α competentes (CaCl₂) mediante choque térmico (transformación química),²⁵⁹ utilizando 5 µl (62 ng) de pAL208 y 100 µl de *E. coli* DH5α competentes. La mezcla se incubó en hielo durante 10 min y posteriormente fue sometida a un choque térmico a 42 °C durante dos min. La mezcla fue transferida de inmediato a 1 ml de medio SOC (Apéndice), adicionado con 100 mM cloruro de magnesio y 100 mM sulfato de magnesio. La bacterias transformantes se incubaron a 37 °C durante 1 h en agitación orbital a 200 rpm, para su recuperación. Al término de la incubación, se inocularon 3 cajas de agar LB con kanamicina 50 µg/ml (LBK₅₀), con 50, 100 y 200 µl de las bacterias transformadas en medio SOC, el cual contribuirá al proceso de transformación ofreciendo una estabilidad a la pared celular de las bacterias transformantes, al tiempo que la glucosa constituye una fuente de energía para favorecer su desarrollo. El inóculo fue extendido sobre toda la superficie de la caja con una varilla de vidrio (bastón en “L”) estéril. Las cajas inoculadas se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

Las colonias transformantes resistentes a kanamicina, fueron subcultivadas en otra caja de agar LBK₅₀ (caja réplica). Posteriormente, se hizo el escrutinio de las colonias transformantes kanamicina resistentes conteniendo al plásmido pAL208 recombinante

mediante un ensayo de PCR de colonia. Se utilizaron los iniciadores correspondientes a las secuencias del Promotor T7 (T7 Prom), MILE 1230 y del Terminador T7 (T7 Term), MILE 1231, ubicadas en vectores de expresión de la serie pET (Cuadro 2).

La PCR se realizó con: Buffer 10X - 5µl; MgCl 50 mM - 4µl; d’NTPs (*Invitrogene*) 10 mM - 1µl; MILE 1230 - 1µl; MILE 1231 - 1µl; ADN - 1 colonia; TAQ POL (*Promega*) - 2 U y H₂O - 33.75 µl para un volumen final de 50 µl y bajo las siguientes condiciones de temperatura: 1 ciclo de 94 °C / 5 min seguidos de 38 ciclos de 94 °C / 30 seg; 56 °C / 50 seg; 72 °C/ 1:30 min y un ciclo final de 72 °C/ 7 min. A partir de las colonias transformantes conteniendo a pAL208 (amplificación de *gspD_L* positiva), se realizó la extracción del plásmido recombinante como ha sido ya descrito. Para ratificar la identidad de los plásmidos recombinantes, se realizó nuevamente, un ensayo de PCR utilizando los iniciadores MILE 1230 Y MILE 1231.

Secuenciación de pET28a-recombinante para confirmar la integridad de *gspD_L*

Utilizando los iniciadores MILE1230 Y MILE1231 se amplificó el fragmento clonado a partir del plásmido recombinante y posteriormente fue purificado mediante el sistema comercial QIAquick PCR (*QIAGEN*). El producto purificado (*gspD_L*) fue enviado al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México en Cuernavaca, Morelos para ser secuenciado utilizando los mismos iniciadores MILE 1230 Y MILE 1231, en un secuenciador automático (Figura 13).

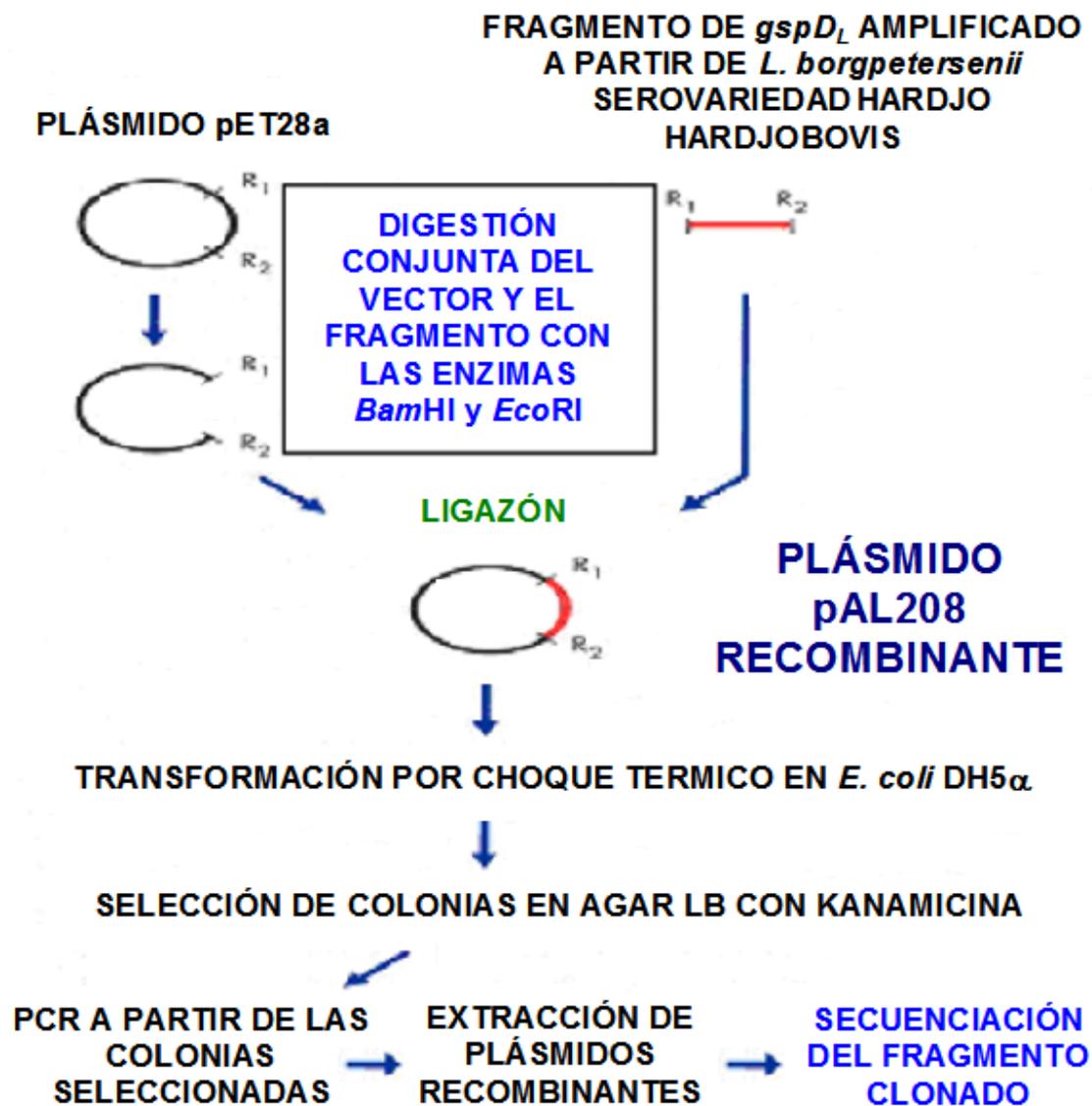


Figura 13. Procedimiento para la determinación de la secuencia del fragmento clonado de *gspD_L*.

La secuencia obtenida fue alineada con la secuencia del genoma de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo,^d con ayuda del programa Sequencher®. Se diseñó un tercer iniciador MILE 2349 para terminar de secuenciar el gen *gspD_L* completo cerrando un hueco de 250 pb. La síntesis del mismo fue realizada en la Unidad de Síntesis del Instituto de

^d Acceso autorizado por los Doctores Adler B y Bulach D. Monash University Victoria, Australia (2003).

Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México en Cuernavaca, Morelos (Figura 14).

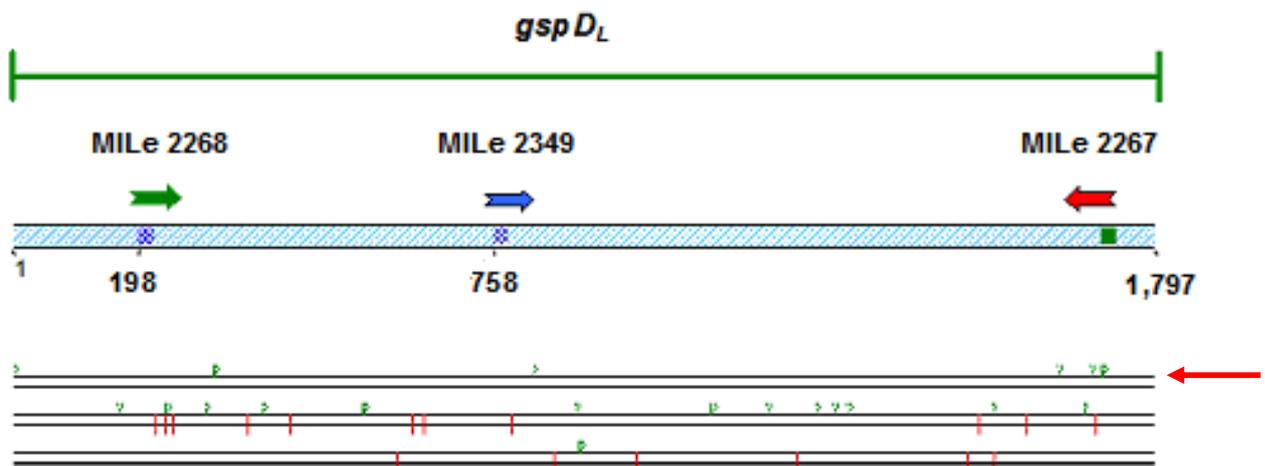


Figura 14. Esquema que muestra la región amplificada mediante PCR correspondiente al gen *gspD_L* de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo (Hardjobovis), en el que se muestra la ubicación de los iniciadores diseñados para lograr su amplificación, MILE 2268 y MILE2267 y concluir su secuenciación, MILE 2349. La flecha indica el MAL correcto.

(Elaborado en el programa Sequencher)

El análisis de la secuencia de ADN fue realizado con los programas Sequencher® y Bioedit y la búsqueda de homologías utilizando el sistema BLASTX 2. 0. 3. del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Así mismo, previo a los ensayos de expresión, utilizando el programa Sequencher® se obtuvo una predicción del patrón de restricción con diferentes enzimas. Se eligieron las enzimas *BglI* y *KpnI*, las cuales cortan una sola vez en la secuencia de *gspD_L* y se procedió a realizar las digestiones para confirmar el patrón de restricción. La digestión y la visualización del ADN de *gspD_L* digerido por separado con ambas enzimas se realizó conforme se ha descrito anteriormente.

Ensayos de expresión de GspD_L recombinante (rGspD_L) en diferentes cepas de *Escherichia coli*

Se utilizaron alícuotas de 100 µl de bacterias competentes de *E. coli* cepa C43 sensible a kanamicina; pLysS sensible a kanamicina y Rosetta codon plus sensible a kanamicina y resistente a cloranfenicol, las cuales fueron transformadas con pAL208.

E. coli C43 es una cepa lisógena del fago lambda DE3 y posee el gen que codifica para la síntesis de una enzima T7 RNA polimerasa cuyo promotor se encuentra regulado por el producto de expresión del gen *lacI*, por lo que la inducción de la expresión de la proteína recombinante se realizó mediante la incorporación de IPTG (0.5 a 10 mM) a los cultivos (Figura 15).

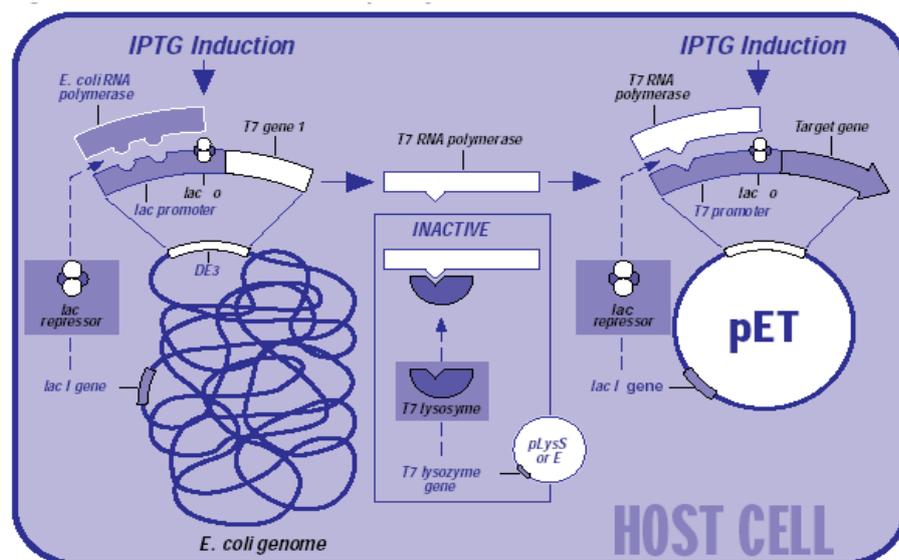


Figura 15. Sistema pET28 para la expresión de proteínas recombinantes mediante el uso de cepas de *E. coli* lisógenas DE3, que poseen el gen que codifica para la T7 RNA polimerasa que se expresa mediante inducción con IPTG, el cual a su vez favorece su actividad en vectores que poseen el sitio promotor T7.

Utilizando 140 ng de ADN del plásmido pAL208 se realizó una transformación por choque termico, utilizando inicialmente la cepa de expresión de *E. coli* C43, siguiendo el

procedimiento anteriormente descrito. El cultivo de las bacterias transformantes se hizo en agar LBK₅₀. Se obtuvieron 60 colonias transformantes kanamicina resistentes, las cuales fueron subcultivadas nuevamente agar LBK₅₀ (caja réplica). Posteriormente, se hizo el escrutinio de las colonias transformantes kanamicina resistentes conteniendo al plásmido pAL208 mediante un ensayo de PCR de colonia, utilizando los iniciadores MILE 1230 y MILE 1231. Las colonias en las que se obtuvo la amplificación de un fragmento cercano a las 2,000 pb fueron seleccionadas para inducir la expresión de la proteína.

A partir de una colonia que había resultado positiva en el ensayo de PCR se inocularon 50 ml de medio líquido LBK₅₀. El cultivo se mantuvo a 37 °C en agitación orbital a 200 rpm (New Brunswick Scientific. Mod. G-24) hasta que alcanzó un valor de absorbancia de 0.6 a una densidad óptica con una longitud de onda de 600 nanómetros (por sus siglas en Inglés, OD₆₀₀), determinada en espectrofotómetro. Los cultivos fueron inducidos con IPTG a concentraciones de 0.5 a 10 mM y se incubaron tanto a 37 °C como a TA, manteniéndolos en agitación orbital a 200 rpm (Lab Line Shaker Dual action Mod. 3508) por 3.5 a 16 h. Cuando se realizó la transformación utilizando las cepas Rosetta y pLysS se siguió el procedimiento anteriormente descrito, sin embargo en esta ocasión, para el cultivo de colonias transformantes y los ensayos de expresión se utilizó tanto agar como medio líquido LBK₅₀, conteniendo además cloramfenicol 34 µg/ml (LBK₅₀-Cl₃₄).

Al finalizar el tiempo de incubación, el cultivo se centrifugó a 5,000 X g (rotor *Jouan 0.600 KG RPM tr/mn 11,500 MAXI*) por 5 min a 4 °C, el sobrenadante fue eliminado y el sedimento de bacterias se resuspendió en 5 ml de una solución de Na₂HPO₄ 10 mM, pH 7.2, manteniendo en todo momento la suspensión de bacterias en hielo. Las bacterias resuspendidas fueron rotas en un sonicador (Cole Parmer. Mod. CPX600) bajo las siguientes constantes: 4 °C, amplitud 60.0 %, pulsos de 9 seg y descanso de 30 seg. Los ciclos de sonicación se repitieron hasta que la solución clarificó (aproximadamente tres

ciclos). En todo momento, las muestras procesadas se mantuvieron en hielo. La concentración de proteínas fue cuantificada mediante el sistema comercial, Micro BCA™ Protein Assay Kit (*Pierce*). Finalmente los sonicados fueron almacenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Electroforesis de las proteínas totales en geles desnaturizantes de poliacrilamida

Las proteínas totales obtenidas por sonicación de la *E. coli* transformante con el plásmido pAL208, fueron suspendidas en solución amortiguadora de muestra (Apéndice), relación 1:1. Las suspensiones se mantuvieron en ebullición durante 5 min en baño María (Precision) y posteriormente fueron centrifugadas a 12,000 rpm (Fisher Scientific Mod. 235C) a TA durante 5 min.

Se preparó un gel desnaturizante de poliacrilamida-SDS al 12.0 % (gel separador), con un grosor de 0.75 mm. En la parte superior se preparó un gel al 4.0 % (gel concentrador) con el mismo grosor. La composición de los geles y de las soluciones amortiguadoras se prepararon de acuerdo a la técnica de Laemmli (1970).²⁶⁰

El amortiguador de muestra contenía 2-mercapto etanol, el cual rompe los enlaces disulfuro de las proteínas, lo cual va a permitir que las proteínas queden con su estructura primaria y de esta manera puedan separarse a través de los poros del gel de poliacrilamida. Debido a la acción del SDS, las proteínas quedan con carga negativa, de tal forma que, estas a su vez se separan de acuerdo a su peso molecular por su movimiento a través de los poros de la matriz de poliacrilamida.²⁶⁰ Los geles ya polimerizados se colocaron en una cámara de electroforesis (Bio-Rad. Mod. Mini-PROTEAN II Cell). La cuantificación de proteínas se realizó utilizando el Micro BCA™ Protein assay kit (*Pierce*). Las muestras fueron colocadas en los pozos correspondientes a razón de 10 μg por pozo. Se utilizó el marcador de peso molecular Mark 12 (*Invitrogene*) para la comparación de los pesos moleculares de las

diferentes proteínas de las muestras. La separación de proteínas se realizó a 50 V para el gel concentrador y 100 V para el gel separador durante una y tres horas respectivamente.

Tinción de azul de Coomassie

Una vez que finalizó la electroforesis, el gel fue teñido manteniéndolo inmerso en solución teñidora de azul de Coomassie (Apéndice) durante toda la noche en agitación constante, después, se retiró la tinción y se agregó solución decolorante de Coomassie (Apéndice), realizando varios cambios hasta que las bandas fueron visualizadas. Se desechó la solución y el gel se lavó tres veces con agua destilada, haciendo recambios de agua, después de mantener el gel en agitación suave durante 20 min cada lavado. Posteriormente, el gel se secó en un bastidor con papel celofán (dulce) para su conservación y registro fotográfico.

Inmunodetección tipo Western

Posterior a la electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, las muestras seleccionadas (extractos de proteínas totales incluyendo la proteína recombinante), fueron transferidas a una membrana de *nylon*, (*Hybond N+*, *Amersham*) cortada al tamaño del gel. La membrana fue colocada en un recipiente conteniendo metanol absoluto, se mantuvo inmersa durante 15 seg y después se colocó durante 5 min en solución amortiguadora de Towbin (Apéndice).

El gel de poliacrilamida se identificó cortando una de las esquinas y se mantuvo en el amortiguador de Towbin en agitación orbital a TA durante 15 min a 15 rpm. Las esponjas y el papel filtro también se humedecieron en el mismo amortiguador antes de ensamblar todos los componentes.

El ensamblaje del estuche se realizó en el interior de un recipiente conteniendo amortiguador de Towbin, de tal forma que se permitiere el paso de corriente del gel de poliacrilamida a la membrana de nylon (Figura 16).

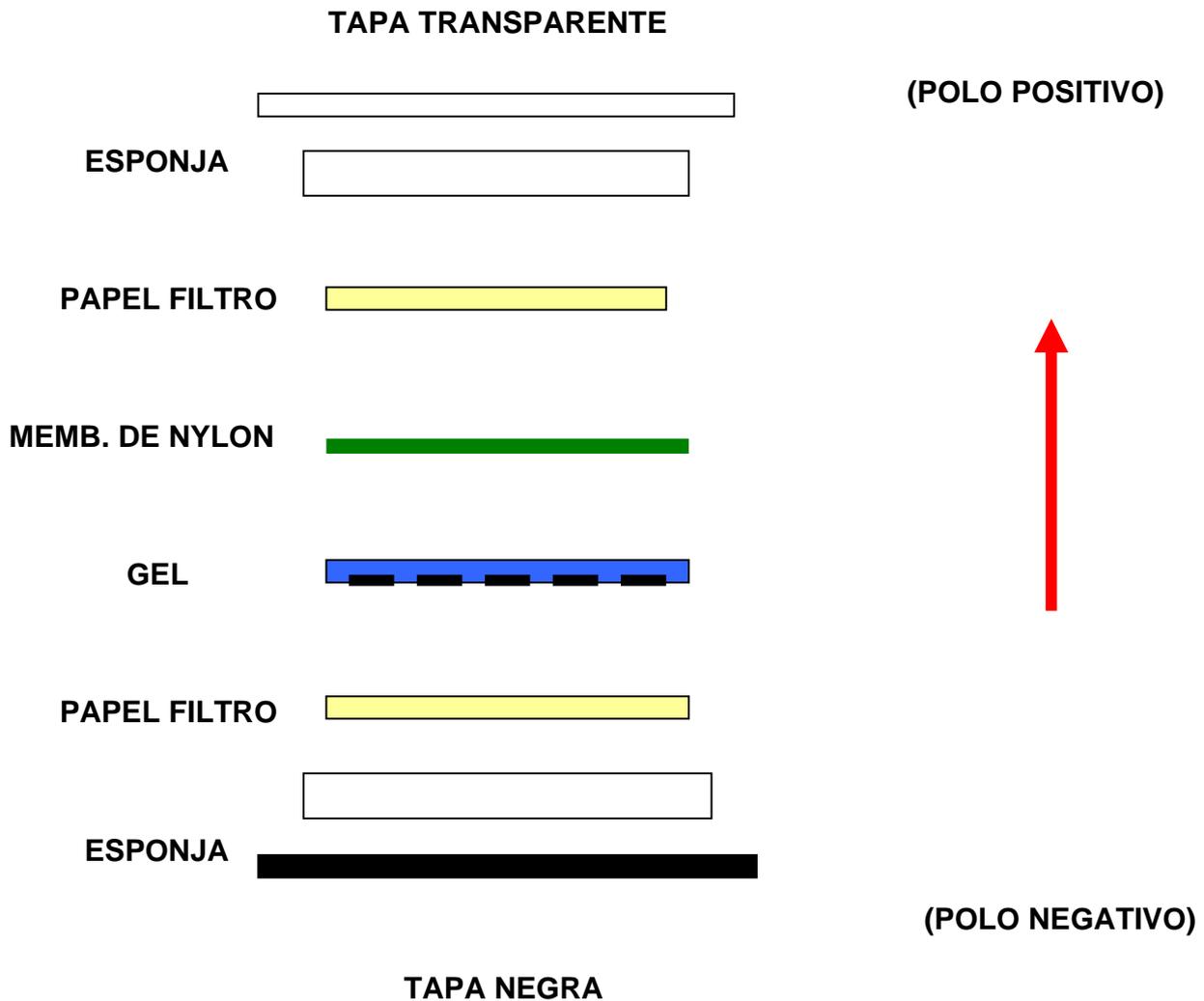


Figura 16. Representación esquemática de los componentes requeridos para la transferencia de proteínas de un gel de poliacrilamida a una membrana de nylon.

La cámara fue colocada dentro de un recipiente con hielo y posteriormente se llenó con amortiguador de transferencia frío. La cámara se colocó sobre un agitador magnético (para mantener en circulación el amortiguador por medio de bala magnética).

Las condiciones de transferencia fueron 100 V 1.5 h. Al término de la transferencia, la membrana fue lavada en una solución de TBS (Apéndice) durante 5 min, se dejó secando al

aire sobre una hoja de papel filtro y finalmente se conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ entre dos hojas de papel filtro en una bolsa de plástico sellada hasta su uso.

Inmunodetección de rGspD_L

La detección de la proteína recombinante se realizó mediante inmunodetección tipo Western siguiendo las metodologías descritas en Ausubel *et al.*, (1993),²⁵⁸ utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra una región del péptido T7 (*Anti-T7-HRP monoclonal antibody, Novagene*) codificada en el vector y expresadas como producto de fusión a rGspD_L. El anticuerpo anti-T7 HRP (*Novagene*) fue diluido 1:5,000. Se utilizó como control positivo una proteína de 31.102 kDa marcada con el péptido T7. Para esto, la membrana fue bloqueada mediante una incubación con solución de TBS-T (Apéndice) conteniendo 5.0 % de leche descremada. Se incubó en esta solución durante 30 min en agitación orbital a 15 rpm a TA. Posteriormente, la membrana fue incubada con el correspondiente anticuerpo monoclonal anti-T7-HRP, diluido 1:5,000 en TBS-T durante 16 h (de un día a otro) a TA.

La membrana fue lavada 4 veces en TBS-T conteniendo 5.0 % de leche descremada durante 5 min cada lavado y dos lavados finales con TBS durante 5 min. Todos los lavados se realizaron en agitación orbital a 15 rpm.

La membrana fue entonces colocada en una solución de revelado (Apéndice), a la que se agregaron 60 μl de peróxido de hidrógeno al 30.0 %. La membrana se mantuvo así en agitación orbital a 15 rpm durante 15 min a TA hasta observar la aparición de las bandas de proteína de una tonalidad púrpura.

Purificación de rGspD_L mediante electro-elución

Se preparó un gel desnaturalizante de poliacrilamida-SDS al 12.0 %, con un grosor de 0.75 mm. Se colocó la misma muestra (rGspD_L) en los 9 pozos mezclada con amortiguador de muestra con una relación 1:1. En el pozo 10 se colocó albúmina sérica bovina (P.M. 66.0 kDa) como banda de referencia para ubicar a la proteína rGspD_L (63 kDa). La separación en el gel concentrador fue a 50 V y para el gel separador a 100 V. Al término de la electroforesis, el gel fue colocado en una solución de KCl 250 mM fría, se incubó durante 5 min a 4 °C. El gel fue retirado de la solución y colocado en una superficie oscura para poner de manifiesto el patrón de bandas de proteínas así como la proteína de referencia, las cuales se apreciaron de un color blanco. Con ayuda de una navaja, se cortó la banda de interés en todos los pozos en sentido horizontal. El pedazo de gel recuperado fue fragmentado en trozos muy pequeños y depositado en el tubo de vidrio del electro-elutor (Bio-Rad Electro-Eluter Mod.422) (Figura 17).

La membrana humedecida fue ensamblada en un adaptador de silicón y el compartimiento interno llenado con buffer de elución (Apéndice). El adaptador de silicón (con una membrana de diálisis con capacidad de retención de proteínas mayores de 30 kDa), fue unido al tubo de vidrio que posee en el fondo una superficie porosa que separó a los trocitos de gel con la proteína del compartimiento en donde se recuperó finalmente la proteína electro-eluída. Los tubos ya con las membranas se unieron a un soporte de acrílico especialmente diseñado para procesar 6 tubos a la vez. La parte inferior de la cámara fue llenada con 500 ml de solución de elución, cantidad que cubrió adecuadamente los adaptadores de silicón. El compartimiento superior de la cámara con los tubos ya unidos fue ensamblado con la parte inferior de la cámara. Paso seguido, se procedió a eliminar las burbujas de la parte inferior externa de los tubos que pudieran interferir con el proceso.

Finalmente, se depositaron todos los trocitos dentro del tubo, el compartimiento superior se llenó con solución de elución y se colocó la tapa de la cámara. El proceso de electro-elución se realizó a 8 mA/tubo durante 16 h. Al final del proceso, se retiró el tubo de la cámara y con mucho cuidado se separó el adaptador con la membrana del tubo, la proteína eluída se recuperó del compartimiento de silicón y la proteína fue almacenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Se añadió un volumen de 4 ml de la proteína electro-eluída a cada uno de los tubos conteniendo sistemas de filtración con punto de corte, 30 kDa (*Amicon Ultra 30,000 MWCO Millipore*). Los tubos fueron centrifugados a 4,500 RPM a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 25 min. Al finalizar la centrifugación la proteína quedó concentrada en un volumen de 500 μl .

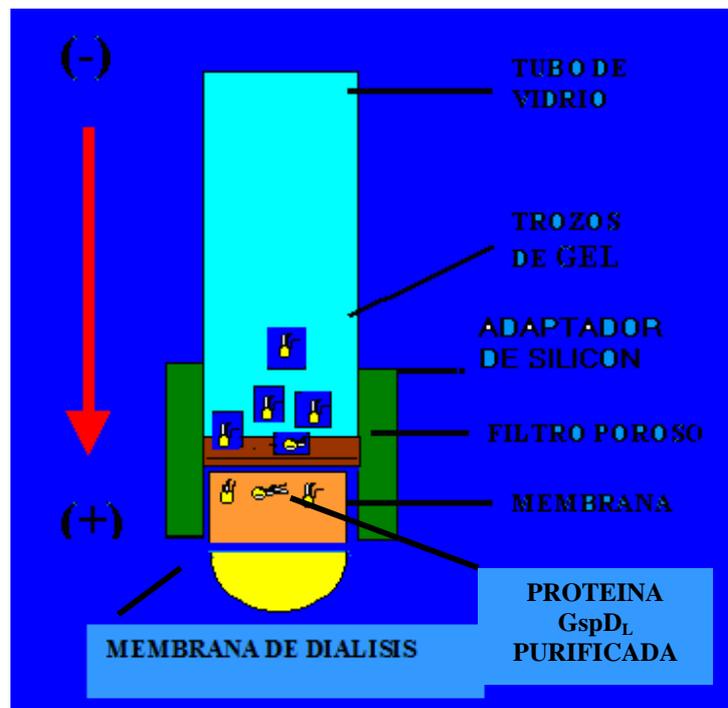


Figura 17. Representación esquemática del proceso de electro elución.

Cuantificación de rGspD_L

Inicialmente se realizó la cuantificación de la proteína, utilizando como método indirecto la comparación con diferentes concentraciones de 5, 2.5, 1.25 y 0.625 μg albúmina bovina sérica (ABS), en geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie.

Producción de un suero hiperinmune anti-rGspD_L

La producción del suero hiperinmune policlonal se realizó de acuerdo al protocolo recomendado por Cooper and Paterson (2003)²⁶¹ del Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne, Australia, con algunas modificaciones.

Se utilizaron dos conejos adultos de 2.5 kg de peso aproximadamente. Se obtuvo una muestra de sangre a partir de la arteria auricular, en el día cero. Una vez tomada se dejó a temperatura ambiente durante 30 min para formar coagulo y entonces la muestra fue centrifugada a 3,000 rpm. Se obtuvo el suero y se realizó dilución 1:25 utilizando solución amortiguadora de fosfatos (siglas en Inglés de phosphate buffer solution, PBS) pH 7.4 (Apéndice). En el día cero, se realizó la prueba AM en campo oscuro utilizando 19 serovariedades de *Leptospira*, para constatar que los conejos no presentaban anticuerpos contra *Leptospira*.

La proteína rGspD_L electroeluída y concentrada (100 µg) fue mezclada con adyuvante incompleto de Freund (*Sigma*) con una relación 1:1. El compuesto fue emulsificado durante 12 min y colocado en dos jeringas conectadas a una aguja de dos vías.

Los conejos se inocularon con el compuesto vía intramuscular profunda bajo el siguiente esquema:

Día cero.	150 µg de proteína.
Día 21.	100 µg de proteína.
Día 32.	100 µg de proteína.
Día 39	Sangrado en blanco, previa anestesia disociativa (ketamina 0.25 ml/kg).

Para la titulación del suero policlonal producido, se utilizó una concentración constante de rGspD_L (10 µg). La proteína fue separada mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 12.0 % y posteriormente transferida a una membrana

de *nylon* como ha sido descrito. La proteína fue enfrentada a diferentes diluciones (1:100, 1:1,600 y 1:6,400) del suero hiperinmune anti-rGspD_L en PBS pH 7.2 El revelado de las reacciones se realizó con un suero hiperinmune conjugado a peroxidasa, anti-IgG de conejo-HRP (*Jackson ImmunoResearch*) diluido 1:400 y 4-1-Cloro-naftol (*Sigma*).

El suero producido fue esterilizado por filtración utilizando membranas estériles con diámetro de poro de 0.45 µm (*Millipore*) y se almacenó en volúmenes de 1 ml a -20 °C.

Adsorción del suero policlonal anti-rGspD_L

Con la finalidad de minimizar reacciones inespecíficas, el suero hiperinmune anti-rGspD_L se sometió a una serie de adsorciones con antígenos de *E. coli* cepa Rosetta. La adsorción del suero se realizó con antígenos internos y externos de la cepa Rosetta para evitar reacciones inespecíficas, siguiendo el protocolo descrito por Graber and Zingales (1985).²⁶²

Se inocularon por separado dos matraces con 500 ml de medio líquido LB con la cepa Rosetta de *E. coli* (cultivada previamente en agar LB) y se incubaron durante 16 h a 37 °C con agitación orbital a 200 rpm. Un cultivo de 500 ml fue esterilizado a 121 °C a 15 libras de presión por 15 min y los otros 500 ml de cultivo se inactivaron con formalina a una concentración final de 0.5 % por 2 h a 37 °C con agitación orbital a 200 rpm. Ambos cultivos fueron mezclados y centrifugados a 5,000 rpm (rotor *Jouan 0.600 KG RPM tr/mn 11,500 MAXI*) a 4 °C por 10 min y lavados 2 veces con PBS pH 7.4 centrifugando en cada lavado a 5,000 rpm (rotor *Jouan 0.600 KG RPM tr/mn 11,500 MAXI*) a 4 °C por 10 min. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento (antígenos bacterianos) se resuspendió en PBS (2 ml por cada 50 ml de cultivo procesado) y se almacenó en volúmenes de 1 ml a -70 °C.

El suero policlonal anti-rGspD_L fue diluido 1:10 en PBS con 1.0 % de albúmina en un volumen final de 15 ml y mezclado con 1 ml de antígenos bacterianos previamente

obtenidos. Esta suspensión se dejó incubando durante 16 h con agitación orbital a 200 rpm a 4 °C.

La mezcla se centrifugó a 5,000 rpm (rotor *Jouan 0.600 KG RPM tr/mn 11,500 MAXI*) durante 10 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante (suero policlonal) en otro tubo. Se añadió nuevamente, 1 ml de antígenos bacterianos y la mezcla se incubó 2 h a 4 °C con agitación orbital. Este proceso de adsorción se repitió 4 veces.

Finalmente, el suero se esterilizó por filtración a través de membranas estériles (*Millipore*) de 0.22 µm y se almacenó en volúmenes de 0.5 ml a -70 °C hasta su uso.

Preparación de proteínas de la membrana externa de *Leptospira*

La obtención de proteínas de la membrana externa se realizó de acuerdo al método descrito por Matsunaga (2003).²⁶³

Cultivo de bacterias: Se cultivó la serovariedad Hardjo en 100 ml medio líquido EMJH hasta alcanzar una cuenta de 2×10^8 leptospiras/ml. El cultivo fue centrifugado a 10,000 rpm durante 10 min a 4 °C (rotor *Jouan 0.600 KG RPM tr/mn 11,500 MAXI*). Al término del proceso, se eliminó el sobrenadante y el sedimento de leptospiras fue resuspendida en PBS con 5 mM MgCl (Apéndice) y mantenida a 4 °C (1X volumen del cultivo). Se centrifugó nuevamente y al término de la centrifugación se eliminó el sobrenadante.

El sedimento de leptospiras fue resuspendido ahora en un décimo del volumen inicial (10 ml) de PBS con 5mM MgCl frío (2 a 4 °C). Posteriormente, se transfirió una muestra de 0.5 ml (1×10^9 /ml leptospiras) a cada uno de dos tubos de 1.7 ml y se adicionaron 100 µl de 1X amortiguador final de muestra (AFM) (Apéndice) y 0.25 mM de inhibidor de proteasas fluoruro de fenil-metil sulfonilo (PMSF) (*Sigma*) y almacenó a -20 °C. Este material corresponde al material celular completo. Los restantes 9 ml se distribuyeron en 6 tubos de

1.7 ml y se centrifugaron a 10,000 X g (rotor *Savant model RSR-20 13,000 X g*) durante dos min a 4 °C, terminado el proceso, se eliminó el sobrenadante. Los sedimentos se resuspendieron en 450 µl de 2X TNE-PI (Apéndice) más 450 µl de agua desionizada estéril. Se homogenizaron las muestras y colocaron en hielo (2 – 4 °C) para proceder a la extracción de proteínas.

La extracción de proteínas se realizó con detergente Tritón X-114. A cada tubo de material celular completo, se adicionaron 100 µl de Tritón X-114 (*ICN* grado proteína) al 10.0 % frío (2 – 4 °C) y el compuesto se mantuvo durante 30 min a 4 °C en un agitador orbital. Los compuestos fueron centrifugadas a 10,000 X g (rotor *Savant model RSR-20 13,000 X g*) durante dos min a 4 °C para obtener la fracción del cilindro protoplasmático y al término de la centrifugación, se resuspendió cada pastilla en 100 µl de 1X AFM/0.25 mM PMSF (*Sigma*) y almacenó a -20 °C y el sobrenadante de cada tubo fue transferido a un nuevo tubo conteniendo 20 µl de 1 M CaCl₂ (Apéndice). Se recuperó un volumen de 100 µl de la “fracción de extracción detergente” y fue colocado en un tubo y se conservó a -20 °C como muestra. El volumen restante del sobrenadante de cada tubo fue mezclado con 100 µl de Tritón X-114 frío al 10.0 % (grado proteína). La mezcla anterior se incubó a 37 °C durante 10 min para separar la fase detergente (botón) de la fase acuosa (sobrenadante). El material soluble en tritón fue centrifugado a 2,000 X g (rotor *Savant model RSR-20 13,000 X g*) a TA durante 10 min.

Se transfirió la fase acuosa (FAC) correspondiente al sobrenadante, en un nuevo tubo de microcentrifuga, dejando la fase de detergente (FDet) en el mismo tubo.

Lavado de las fracciones: A la FAC se adicionaron 200 µl de Tritón X-100 frío al 10.0 %. A la FDet se adicionaron 800 µl de 1X TNE-PI frío. Ambas fases FAC y de FDet fueron

Incubadas a 37 °C durante 10 min y centrifugadas a 2,000 X g (rotor *Savant model RSR-20 13,000 X g*) a TA durante 10 min.

El sobrenadante de la FAc se transfirió a nuevos tubos. Por otro lado, se eliminó el sobrenadante de la FDet y se recuperó el contenido del fondo y el sedimento.

Precipitación con acetona: Se adicionó 1 y 3 volúmenes de acetona (grado reactivo) fría a las FAc y FDet respectivamente, se homogenizaron vigorosamente en un agitador para tubos y a continuación, se mantuvieron en agitación a 4 °C durante toda la noche.

Finalmente, se centrifugaron a 13,000 X g (rotor *Savant model RSR-20 13,000 X g*) durante 15 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante de ambas fases, se dejaron secar ambos tubos perfectamente y se resuspendió cada sedimento en 100 µl de amortiguador final de muestra (AFM-0.25 mM PMSF).

La electroforesis se realizó bajo las condiciones anteriormente descritas.

Inmunodetección tipo Western de rGspD_L

A partir de una colección de sueros hiperinmunes (anticuerpos policlonales) anti-Hardjo producidos en conejos, fueron seleccionados diferentes sueros hiperinmunes con un título de al menos 1:800 en la prueba AM. El suero fue enfrentado a preparaciones de rGspD_L; proteínas totales de *E. coli* cepa Rosetta transformada con pAL208; *E. coli* cepa Rosetta sin transformar y a proteínas totales de la serovariedad Hardjo. Se utilizó como control negativo, el suero de los conejos empleados para la producción del suero hiperinmune anti-rGspD_L antes de ser inmunizados, carente de anticuerpos contra la *Leptospira* en la prueba de AM. rGspD_L se enfrentó también a sueros de animales positivos a *Leptospira* en la prueba de AM. Inicialmente, a partir de un lote de sueros de bovinos remitido a la sección de Diagnóstico de Leptospirosis del Departamento de Microbiología e Inmunología de la F.M.V.Z.-U.N.A.M., se seleccionaron 8 sueros que habían reaccionado hacia la

serovariedad Hardjo con títulos de 1:800 en la prueba AM (Cuadro 6). Para los ensayos de inmunodetección tipo Western, los sueros de bovino y los sueros hiperinmunes de conejo (anticuerpo primario) fueron diluidos 1:80 y 1:100 respectivamente. Los anticuerpos secundarios, anti-IgG de bovino-HRP y anti-IgG de conejo-HRP (*Jackson ImmunoResearch*) a la dilución 1:5,000 sugerida por el fabricante, no fueron capaces de detectar al anticuerpo primario, por lo cual se ajustó a una concentración de trabajo de 1:400.

Cuadro 6. Lista de sueros de bovino empleados para evaluar la antigenicidad de rGspD_L en inmunotransferencias tipo Western.

No. de caso	No. de suero	Título/serovariedad en AM
B03-158	220	1:800 - Hardjoprajitno
B03-160	264	1:800 - Hardjoprajitno
B03-161	345	1:800 - Hardjoprajitno
B03-163	543	1:800 - Hardjoprajitno
B03-163	550	1:800 - Hardjoprajitno
B03-163	551	1:800 - Hardjoprajitno

Se preparó un gel desnaturante de poliacrilamida-SDS al 12.0 % (gel separador), con un grosor de 0.75 mm. En la parte superior se preparó un gel al 4.0 % (gel concentrador) con el mismo grosor utilizando un peine ciego (un pozo único). La muestra de 150 µg de proteína rGspD_L en un volumen de 300 µl fue mezclada con amortiguador de muestra (Apéndice), relación 1:1, posteriormente, se mantuvieron en ebullición durante 5 min y al término del proceso el compuesto fue centrifugado a 12,000 rpm a TA durante 5 min. La muestra fue colocada en el pozo único y en un pozo aledaño se colocaron 5 µl de marcador preteñido de peso molecular, (Dual color, *Invitrogene*) como referencia. La separación de proteínas se realizó a 50 V para el gel concentrador y 100 V para el gel separador. Al finalizar la electroforesis, la proteína fue transferida a una membrana de nitrocelulosa siguiendo el protocolo anteriormente descrito. Una vez transferida la proteína a la membrana, se recortaron tiras de 2 a 3 mm. Cada tira por separado, fue incubada con un suero diferente para realizar ensayos de inmunodetección tipo Western, siguiendo el protocolo antes descrito.

Los sueros de bovino utilizados, fueron obtenidos de un estudio realizado por Carmona y De la Peña (2005)⁴⁴ para la detección de leptospiras patógenas en bovinos de una unidad de producción lechera del norte del Estado de México con una historia reciente de abortos. Estudios de laboratorio previos, realizados por el dueño de la unidad de producción descartaban la posibilidad de infecciones con *Brucella*, *Neospora* y algunas enfermedades virales. Reportaron una frecuencia de *Leptospira* del 79.80 % mediante la prueba AM, en un total de 287 muestras procesadas. Las serovariedades que destacaron en este estudio fueron: Hardjo 55.45 % (159 sueros), Canicola 48.08 % (138 sueros), Grippotyphosa 37.63 % (108 sueros) Pomona 24.4 % (69 sueros), Pyrogenes 16.02 % (46 sueros) e Icterohaemorrhagiae 14.63 % (42 sueros).⁴⁴ Se seleccionaron diferentes sueros positivos a la serovariedad Hardjo, considerando que todos los sueros seleccionados reaccionaron además, contra diferentes

serovariedades. Estos sueros, también se utilizaron para realizar ensayos de inmunodetección tipo Western con rGspD_L. La dilución de trabajo del suero para los ensayos de inmunodetección fue 1:50 y el anticuerpo secundario Anti-IgG de bovino-HRP (*Jackson ImmunoResearch*) se utilizó a una dilución de 1:400. Es importante señalar que en esta unidad de producción se detectó la presencia de fauna nociva (*Mus musculus* y *Rattus rattus*) y un entorno ecológico húmedo favorable para *Leptospira*.

Inmunodetección tipo Western de rGspD_L utilizando sueros de perros y hámsteres infectados con *Leptospira interrogans*

Para tener evidencias más precisas de la exposición de GspD_L sobre la superficie de *Leptospira* durante la infección, sueros de animales positivos fueron probados mediante inmunodetección tipo Western. Suero de 4 perros identificados con los números 28, 31, 34 y 46, que en los cuatro casos habían reaccionado contra las serovariedades Canicola y Pyrogenes con títulos de 1:3,200 a 1:6,400 en la prueba AM y de los cuales se logró el aislamiento de *Leptospira*.²⁶⁴

Para reactivar la virulencia, se inocularon hámsteres Sirios de 1 mes de edad. Los hámsteres infectados al momento de sacrificarlos, revelaron la presencia de abundantes leptospiras en la observación microscópica en campo oscuro de macerados de riñón. La recuperación de aislados de la cepa LOCaS 46-R a partir de los mismos riñones, confirmó la infección de los hámsteres. El suero de éstos hámsteres, fue igualmente utilizado en ensayos de inmunodetección de rGspD_L como control positivo de animales infectados con *Leptospira* (infección en el laboratorio), con la misma finalidad que se utilizaron los sueros de los perros infectados (naturalmente). De igual forma, la dilución utilizada fue 1:100 (anticuerpo primario) y para el conjugado, anti IgG de perro-HRP o anti-IgG de hámster-HRP (*Jackson ImmunoResearch*) fue de 1:400 (anticuerpo secundario).

Ensayo piloto de inmunoprotección en hámsteres

Durante el año 2004, se logró el aislamiento de cinco cepas autóctonas de *Leptospira* a partir de perros de la Ciudad de México, cuatro de ellos procedentes del Centro de Control Canino Luis Pasteur y el quinto de un perro que murió con signología característica.

Para determinar su virulencia, se procedió a realizar ensayos de infección en modelo animal. Para el estudio del proceso de infección y patogenia de la leptospirosis, el hámster ha sido considerado el modelo animal idóneo, debido a que es altamente susceptible a la infección con leptospiras patógenas,²⁶⁵ en la cual se puede evaluar la virulencia de aislados de *Leptospira* y es utilizado en pruebas de desafío para la evaluación de biológicos desarrollados para prevenir la leptospirosis. Para nuestro estudio, la infección de hámsteres con cada uno de las cinco aislados de *Leptospira* en repetidas ocasiones, confirmó su virulencia, ya que les causaba la muerte después de cuatro a nueve días post-inoculación y se apreciaron lesiones características en órganos como pulmón, hígado y riñones, que coincidían con lo reportado en la literatura.²⁶⁴ Los resultados de la serotipificación con sueros inmunes de referencia^b sugieren que corresponden al serogrupo Canicola.

A partir de un sexto pase *in vitro* de la cepa LOCaS-46R mantenida en medio Fletcher enriquecido con 8-10 % de suero de conejo, se iniciaron inoculaciones en Hámsteres para activar su virulencia, lo cual es necesario para realizar ensayos de desafío. Tres hámsteres de 21 días de edad fueron inoculados vía intra peritoneal (IP) con un volumen de 0.7 ml del cultivo de leptospiras de la cepa 46R (anillo de Dinger) en medio Fletcher. Después de 20 días de la inoculación se sacrificaron dos de los tres hámsteres inoculados, por exposición a éter. Con la cepa ya reactivada en su virulencia, se procedió a realizar una segunda inoculación de 3 hámsteres, determinando la cuenta de leptospiras por ml de cultivo en una

^b WHO/FAO/OIE Collaborating Centre for Reference and Research on Leptospirosis, Australia and Western Pacific Region

cámara de Petroff-Haüusser. La dosis de leptospiras inoculadas IP a cada hámster fue de 1.3×10^8 leptospiras en un volumen de 0.8 ml.

Para el ensayo de inmunoprotección, con la finalidad de determinar si existía alguna protección en el grupo inmunizado con rGspD_L y el grupo control, se formaron dos grupos de tres hámsteres cada uno, con una edad aproximada de los animales de 1 mes. El grupo 1 se inoculó con 50 µg de proteína rGspD_L purificada, la cual fue mezclada con adyuvante incompleto de Freund (*Sigma*). con una relación 1:1; la mezcla fue emulsificada durante 12 min previos a su inoculación. Los hámsteres se inocularon vía intramuscular (IM) profunda de acuerdo al siguiente esquema:

Primera inoculación	Día cero.	50 µg de proteína GspD _L
Segunda inoculación	Día 30.	50 µg de proteína GspD _L .
Desafío	Día 56	1.237×10^8 leptospiras/hámster

El grupo 2 se dejó sin inocular y se mantuvo bajo las mismas condiciones de alojamiento y alimentación que el grupo 1 (Figura 18).

El día 56 se procedió al desafío de ambos grupos con la cepa LOCaS 46R patógena para hámster, con una dosis de 1.2×10^8 leptospiras/hámster.

Posterior a la muerte por infección o a la necropsia de los animales, según fue el caso, se colectaron muestras de sangre (para re-aislar la cepa de *Leptospira* en medio semisólido y obtención de suero), hígado, orina, riñón y pulmón para cultivo, histopatología y PCR. Los pulmones se colectaron para realizar histopatología. A partir del cultivo inicial de los órganos, se realizaron dos diluciones con la finalidad de determinar cualitativamente la cantidad de leptospiras presentes el tejido.

Grupo 1
inmunizado con 50 μg de rGspD_L
recombinante en dos ocasiones



Día cero - 50 μg de rGspD_L

Día 30 - 50 μg de rGspD_L

Grupo 2 Control
Mantenido sin inocular



Día 56

Desafío de ambos grupos
con la cepa LOCaS-46R de
origen canino 1.237×10^8
leptospiras.

Figura 18. Esquema empleado de inmunización con rGspD_L, en el ensayo piloto de inmunoprotección en hámsteres.

Análisis filogenético de GspD

Fueron elaborados filogramas usando el programa Clustal W, para los genes *rrs* y *gspD_L*, de diferentes bacterias Gram negativas en las que se han identificado genes del T2SS. El análisis incluyó a los géneros: *Alcanivorax*, *Aeromonas*, *Azoarcus*, *Burkholderia*, *Candidatus*, *Chlamydia*, *Cytophaga*, *E. coli*, *Legionella*, *Mixococcus*, *Neisseria*, *Photorhabdus*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Shewanella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Xanthomonas*, *Yersinia* y *Leptospira*.

VIII. RESULTADOS

Amplificación y clonación de *gspD_L* de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo, Hardjobovis en el vector pET28a

Se amplificó un producto de 1,533 pb de un total de 1,797 pb de *gspD_L* (Figura 19). La digestión del producto de PCR con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI generó un fragmento de 1,515 pb, a partir del par de bases 205 hasta el par de bases 1,719 y fue clonado correctamente, según se demostró por secuencia, en el vector de expresión pET28a, generando así al plásmido recombinante pAL208. pAL208 fue recuperado de 10 ml de cultivo de colonias transformantes de *E. coli* DH5 α crecidas en agar LB con kanamicina (50 μ g/ml) y purificado mediante el sistema comercial (*Miniprep QIAGene*) a razón de 10 μ g en un volumen de 50 μ l (Figura 20).

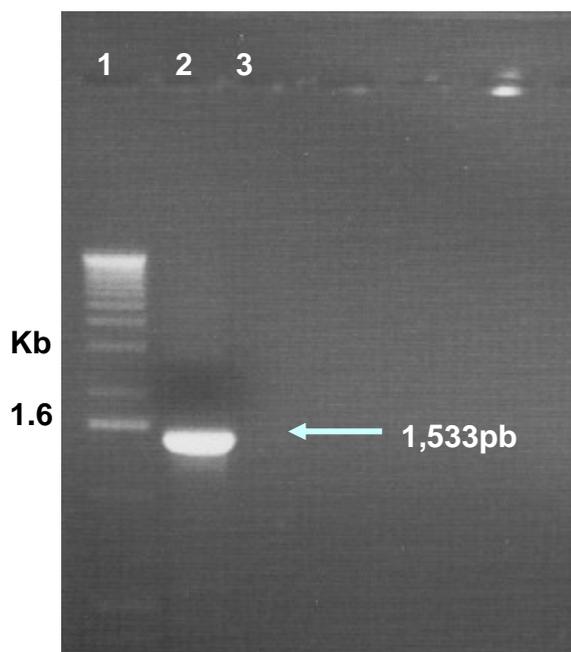


Figura 19. Fragmento amplificado de *gspD_L* por PCR a partir de ADN cromosomal de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo subtipo Hardjobovis, utilizando los iniciadores MILE 2267 y MILE 2268. Línea 1, Marcador de peso molecular λ *Hind*III; línea 2, Producto amplificado correspondiente a *gspD_L*; 3, (Control negativo).

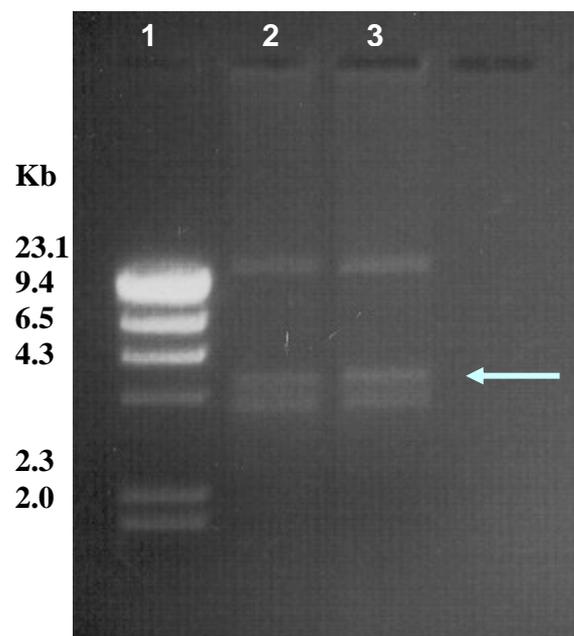


Figura 20. Extracción de ADN del plásmido pET28a a partir de *E. coli* DH5 α . Línea 1, Marcador de peso molecular λ *Hind*III; línea 2, ADN del plásmido pET28a; línea 3, ADN del plásmido pET28b.

Utilizando el programa Sequencher® se obtuvo una predicción del patrón de restricción con diferentes enzimas. Se eligieron las enzimas *Bgl*II y *Kpn*I, las cuales cortan una sola vez en la secuencia de *gspD_L* y se procedió a realizar las digestiones para confirmar el patrón de restricción. La Digestión con cada una de las enzimas demostró que en ambos casos hubo un corte único en la secuencia, por lo que se apreciaron dos bandas al realizar la visualización de los geles de agarosa al 1.0 % (Figuras 21 y 22).

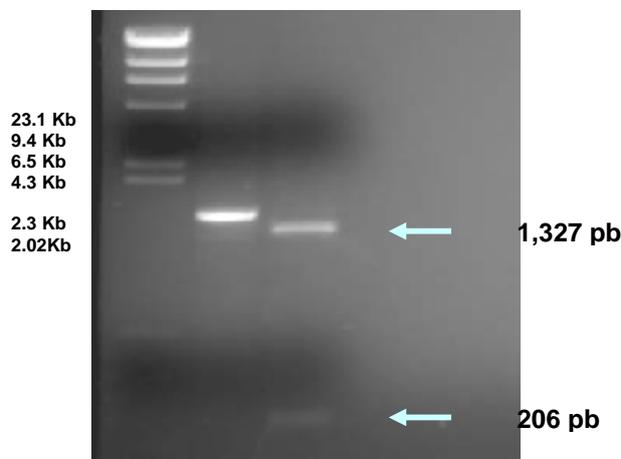


Figura 21. Digestión con *Bgl*II de *gspD_L*. Línea 1, marcador de peso molecular λ *Hind*III; línea 2, ADN de *gspD_L* sin digerir; línea 3, ADN de *gspD_L* digerido con *Bgl*II.

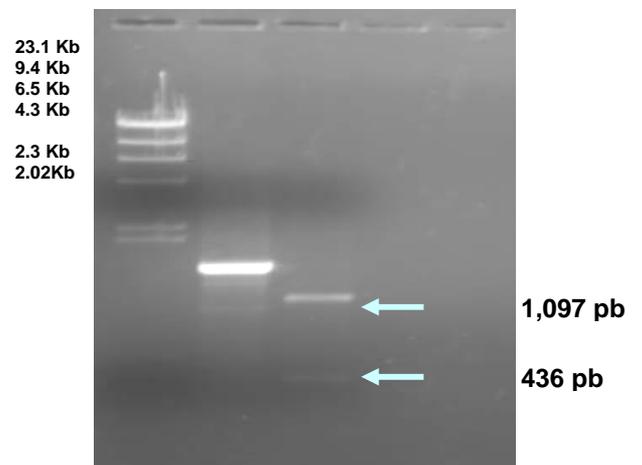


Figura 22. Digestión con *Kpn*I de *gspD_L*. Línea 1, marcador de peso molecular λ *Hind*III; línea 2, ADN de *gspD_L* sin digerir; línea 3, ADN de *gspD_L* digerido con *Kpn*I.

La digestión por separado, con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI del fragmento amplificado correspondiente a *gspD_L* y del plásmido pET28a (Figura 23), permitió realizar la ligazón de ambos, que derivó en la obtención del plásmido recombinante pAL208. A partir de este plásmido recombinante, se confirmó mediante secuenciación, la correcta inserción del fragmento clonado.

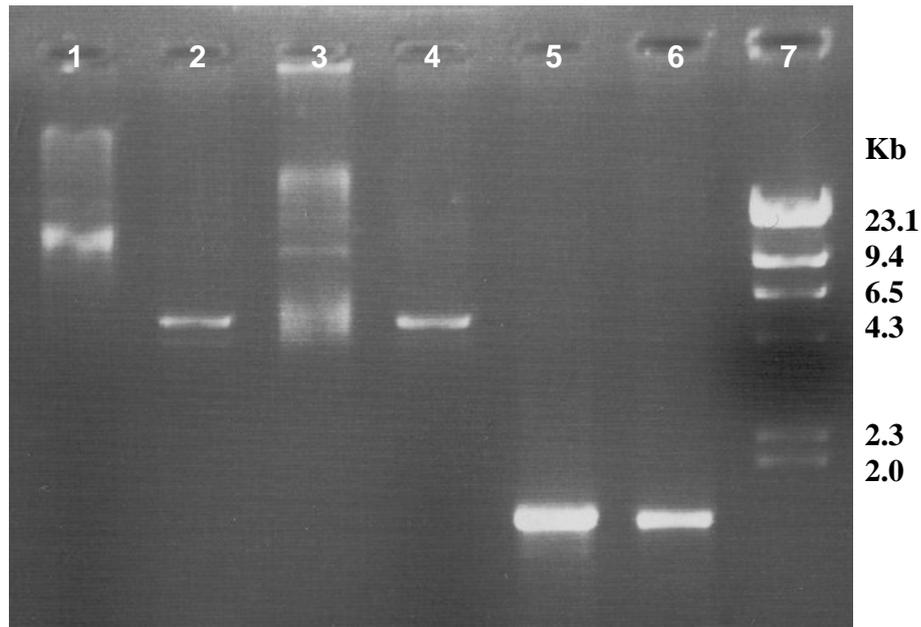


Figura 23. Preparación del fragmento amplificado y del Plásmido pET28a previo al ensayo de clonación. Línea 1, plásmido pET28a sin digerir; línea 2, plásmido pET28a digerido (*Bam*Hi y *Eco*RI); línea 3, plásmido pET28b sin digerir; línea 4, plásmido pET28b digerido (*Bam*Hi y *Eco*RI); línea 5, ADN de *gspD_L* amplificado sin digerir; línea 6, ADN de *gspD_L* amplificado digerido (*Bam*Hi y *Eco*RI); línea 7, marcador de peso molecular λ *Hind*III.

Análisis de la secuencia de GspD_L de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo

Con ayuda de los programas Bioedit y Secuencer®, se realizó el alineamiento de la secuencia obtenida con secuencias reportadas en las bases de datos, así como con las secuencias de tres genomas disponibles de *Leptospira* (*L. borgpetersenii* Hardjo, *L. interrogans* Lai y Copenhageni). El análisis de la secuencia demostró que el fragmento clonado presentaba una identidad del 100 % con la secuencia de *gspD_L* del genoma de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo. El gen *gspD_L* completo, tiene una longitud de 1,797 pb y codifica para una proteína (GspD_L) conformada por 598 aminoácidos (Figura 24). La comparación de la secuencia de GspD_L con las bases de datos, reveló una identidad del 25.0 % y una similitud del 46.0 % con la secretina GspD de *E. coli* y una

identidad del 24.0 % y una similitud de 41.0 % con la secretina XcpQ de *Pseudomonas aeruginosa*. Así mismo, al realizar la comparación con la secuencia de las secretinas de *Leptospira interrogans* serovariedades Lai y Copenhageni, se observó una identidad del 92.0 % y una similitud del 96.0 % con ambas. El alineamiento entre GspD de las serovariedades Lai y Copenhageni reveló una identidad y una similitud del 100 % (dato no presentado en figura). El alineamiento entre la secuencias de GspD de la serovariedad Copenhageni y de *E. coli*, mostró una identidad del 28.0 % y una similitud del 48.0 %. Finalmente, el alineamiento entre las secuencias de GspD de *E. coli* y XcpQ de *Pseudomonas aeruginosa* reveló una identidad del 27.0 % y una similitud del 46.0 %. La diferencia encontrada entre las secuencias de aminoácidos de GspD de la serovariedad Hardjo y las serovariedades Copenhageni y Lai podría deberse a que éstas últimas pertenecen a la especie *L. interrogans*, mientras que Hardjo pertenece a la especie *L. borgpetersenii*. (Figuras 25 a 29).

La predicción del peso molecular de GspD_L de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo se estimó en 66.7 kDa con ayuda del programa [ScanSite pl/Mw](http://ca.expasy.org/cgi-bin/peptide-mass.pl) en el sitio Expasy^e, peso muy similar a las proteínas homólogas de las serovariedades Copenhageni y Lai de *L. interrogans*, estimado en 66.5 y 68.7 kDa respectivamente con base en el análisis del producto codificado, con el mismo programa Expasy. En contraste, la secretina GspD de *E. coli* se estimó un peso de 70.7 kDa (Cuadro 7).

^e <http://ca.expasy.org/cgi-bin/peptide-mass.pl>

1 ATGTACGGAACAATCAGTCAATTTTCAATCTTTAGAAATATCCCCATTCTCATACTTTTA
61 TTTTGTAGTGTGGGACAAACCGGTATTTCTCAGAGCAAGAAAAAATCTTCCGTTAAACA
121 AGATCGGCCACCGCTCCGGAAGAACCGCGGAAAAGAGCTTTTATGCGAATTGGAGAGAC
181 ACCGAATTGAACGATTTTTC TCAAAGGAATGAGCGCTATCTTAAAGAAAAACATTCTTTTA
MILe2268
241 GATGAGAGTTTTAAAGGTAAAAAGATTACGATCATTCTCAAAGGAAATTCGATTAAA
301 AATGCATTTCATCTTTATGAAATCAGTTTTAGAAATCCCTCGGTTTTGGCGTGGTGAAGAA
361 CCGATCTGATTTGATTGTCAAGATTAAGGATGCGCTTGCAAGATCTCCCGTGGTCCGA
BglII
421 GTCGGTAAGGAATTGATTCTGAAACGGAAGTCCGGCATTACAGAACGATCACTCAGATT
481 ATTCCTATTGAAAATACAAAACCGGAAGAACTAGAACCGATTCTCAAACGTCTGACGTCT
541 CCAAATACGGATGTAATCGTTTTATAGAAATACGAACACGATTGTTCTTTCCGGTTCGGA
601 GCTGACATCAATAAATTGCTGGTTTTGATAAACGAACTCGACCTGAAATTTGGAAGAGGCA
661 AGTCCGGGGCAATCGCGTCCGCGGTGACGTGCATTTATACTCTGGAGCATAGCGAG
721 GCCGAAAAGATCGCGCCACTCTCGTTAAATTGGATAAACCTGTGGTTCAATCCGAAGAA
781 TTGAGCCCCGAGAAAAAGTTCGGGACAGATACCGATGAAAAGTGGAGAAGATCAAGGCA
841 GTAGGTCATAAAGAATCTAATTCGGTTATTGTAACCGCAACGAATGCCGAATGGGCCGAG
901 ATTCGAAAGATCATTAAAGTTTTGGATTCCGCTCGAAAACAGGTTCTCTTAGAAGTGCTA
961 ATTGTGGAACCTTACTCTAGCGACTTGAACGACTTCGGGATCGATTGGAGATATAAGGGA
1021 GAGGCTTTTGGTCAATTCAACTCGGGTCTTTCTAAAGAGGCAAATATCATCAATTCAAAC
1081 GGACAAATCAATCCAAATGTCAACACACTCAGCGGTTTCTCTTTGGGGTTCTTAAAAGCA
1141 GGTTCGGAACAGATCATCGGAATTTAAGTGCTAACCAAGGAAATGAAAATTTCAACGTA
1201 TTATCCGCTCCTCAGGTACTCACCGTGGATAATCAAGAAGCGGAAATCAGTGTCCGCCAA
1261 GATGTTCCGGTTCGGACGCAGAGTAGGAATGCCGGTACCGGTGGAACAAATGCCGTTACA
KpnI
1321 GTAGACAACCTACGAATATCGTCCCACAGGTATCAAACCTCAAGTTTACTCCGCACGTAAAC
1381 AAAAACAATAGGATTACTCTCGAACTCTTCCAGGAGATTAAGAATATCGCTGAGATTGCC
1441 CTTGCCGGAGGGAATCCGACTTTCAATCGACGCGAAATCAAACTTCCATTTCCATTGAA
1501 AACACTCAGTCTATCGTGATCGGGGACTTATCTCAAATGATAAAACAAAAGAGGATTATT
1561 AAAATTCCTTTTCTTGGAGATATTCGGTATTTAGGTCATCTTTTCAAAGGACTACCGAA
1621 AAAATCAAAAAGACGAACCTGATGTTTTTATCACCCGCATATACTGGACAGTAGAGAA
1681 AATGCGGATAAGATGACCGTGAAGAAAAGATGCTACAGGAACAATACGAGCTCGAAAGA
MILe2267
1741 GAAAGAATCCTCAATAAAGAAAAAGAAATCAAATCTTTCTTTGAAAAAGAGGATTAA

1797

Figura 24. Secuencia de nucleotidos de *gspD_L* de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo. El color verde indica la secuencia de *gspD_L* clonada en el vector de expresión pET28a; *B* – Indica el sitio de corte para la enzima *BglII*; *K* – indica el sitio de corte para la enzima *KpnI*; MILe2268 – Señala la secuencia del iniciador adelantado; MILe2267 – Señala la secuencia del iniciador reverso y complementario.

```

Ecoli: 26  EQYGANFNADIRQFVEIVGQHLGKTLIDPSVQGT-ISVRSNDTFSQQEYYQFFLSILD 84
      + + AN+ + ++ F++ +   L K IL+D S++G I++ S       + + F S+L+
LepHa: 52  KSFYANWRDTELNDFLKGMsAILKKNILLDESLKGGKITIISQKEIPIKNAFIFMKSvLE 111

Ecoli: 85  LYGYSVITLDN--GFLKV----VRSANVKTSPGMIADSSRPGVGD-ELVTRIVPLENVPA 137
      G+ V+   +   +K+   RS V+   +I ++   VGD   +T+I+P+EN
LepHa: 112 SLGFGVVEEPDLISIVKIKDALARSPVVRVGKELIPETE---VGDYRTITQIIPIENTKP 168

Ecoli: 138 RDLAPLLRQMMDAGSVGNVVHYEPSNVLILTGRASTINKLIEVIKRVDVIGTEKQQIIHL 197
      +L P+L+++   + +V+ Y  +N ++L+G  + INKL+ +I  +D           + L
LepHa: 169 EELEPILKRLTSPNT--DVIVYRNTNTIVLSGSGADINKLLVLINELD-----LKL 217

Ecoli: 198 EYASAEDLAEILNQLISESHGKSQMPALLSAKIVADKRTNSLIISGPEKARQRITSLKLS 257
      E AS   +A
LepHa: 218 EEASPGAIASA----- 228

Ecoli: 258 LDVEESEEGNTRVYYLKYAKATNLVEVLTGV-----SEKLKDEKGNARKPSSSGA-MDN 310
      G+ +Y L++++A  +   L  +   SE+L EK   + P   ++
LepHa: 229 -----GDVHIYTLHSEAEKIAATLVKLDNPVVQSEELSPK---KVPGQIPMKVEK 277

Ecoli: 311 VAITADEQTNSLVITADQSVQEKLATVIARLDIRRAQVLVEAIIIVEVQDGNGLNLGVQWA 370
      +   +++NS+++TA  +   ++   +I LD R QVL+E +IVE+   + + G+ W
LepHa: 278 IKAUGHKESNSVIVTATNAEWAEIRKI IKVLDSARKQVLEVLIVELTSSDLNDFGIDWR 337

Ecoli: 371 NKNVGAQQFTNTGLPIFNAAQGVADYKKNNGGITSANPAWDMFSAYNGMAAGFFNGDWGVL 430
      K   QF N+GL   ++   NG I   NP  + S   G  + GF   +
LepHa: 338 YKGEAFGQF-NSGL-----SKEANIINSNGQI---NPNVNTLS---GFSLGFLKAGSEQI 385

Ecoli: 431 LTALASNNKND---ILATPSIVTLDNKLASFNVGQDVPVLSGSQT--TSGDNVF--NTVE 483
      + L++N N+   +L+ P ++T+DN+ A  +VGQDVPV + S+   T G N   + E
LepHa: 386 IGILSANQGNENFNVLsAPQVLTVDNQEAIEISVGQDVPVVRTQSRNAGTGGTNAVTVDNYE 445

Ecoli: 484 RKTvGtKLKvTPQVNEGDAVLEIEQEXXXXXXXXXXTLGPTFNRTIQNAVLVKTGETV 543
      + G KLK TP VN+ + + LE+ QE           PTFN R I+ ++ ++   +++
LepHa: 446 YRPTGIKLKFTPHVNKNRITLELFQEIKNIAEIALAGGNPTFNREIKTSISIENTQSI 505

Ecoli: 544 VLGGLLDDFSKEQVSKVPLLGDIPLVGLFRYtSTERAKRNLmVfIRPTII--RDDDvYR 601
      V+GGL+ +   +++++ K+P LGDIP +G LF+ T+ +   K NLMVFI P I+ R++
LepHa: 506 VIGGLISNDKQKRiIKIPFLGDIPYLGHlFKRTTEKIKKtNLMVfITPHILDSREnADKM 565

Ecoli: 602 SLSKEKYTRYRQEQQRIDGKSKAL 626
      ++ K+   +   +++RI K K  +
LepHa: 566 TVKkKMLQEQYELERERILNKEKEI 590

```

Identidad: 25.0 %.

Similitud: 46.0 %

Ecoli: *Escherichia coli*.

LepHa: *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo.

Figura 25. Alineamiento entre las secuencias de aminoácidos de GspD de *Escherichia coli* y *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo realizado con el programa Blast. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

```

Pseud: 50 EAHWTINLKDADIREFIDQISEITGETFVVDPRVKGQ-VSVVSKAQLSLSEVYQLFLSVM 108
E + N +D ++ +F+ +S I + ++D +KG+ ++++S+ ++ + + SV+
LepHa: 51 EKSFYANWRDTELNDFLKGMSSAILKKNILLDESLKGGKIKITIIISQKEIPIKNAFIFMKSVL 110

Pseud: 109 STHGFTVVAQGDQARIVPNAEAKTEAG----GGQSAPD-----RLETRVIQVQQSPVSE 158
+ GF VV + D IV +A + G + P+ R T++I ++ + E
LepHa: 111 ESLGFGVVEEPDLISIVKIKDALARSPVVRVGKELIPETEVGDYRTITQIIPIENTKPEE 170

Pseud: 159 LIPLIRPLVLPQYGHAAVPSANALIIIDRSANIARIEDVIRQLDQKGSYDYSVINLRYGW 218
L P+++ L + + N +++S A+I ++ +I +LD K + G
LepHa: 171 LEPILKRLTSPNTDVIYRNTNTIVLSGSGADINKLLVLINELDLK-----LEEASPGA 224

Pseud: 219 VMDAAEVLNNAMSRGQAKGAAGAQVIADARTNRLIILGPPQARAKLVQLAQSLLDTPTARS 278
+ A +V + +A+ A V LD P +S
LepHa: 225 IASAGDVHIYTLHSEAEKIAATLV-----KLDNPPVQS 258

Pseud: 279 ANTRVIRLRHNDAKTLAETLQGISEGKNNXXXXXXXXXXXXRPSNILIRADESTNALVLL 338
+ + GQI + I + +N++++
LepHa: 259 -----EELSPEKKVPGQIP-----MKVEKIKAVGHKESNSVIVT 292

Pseud: 339 ADPDTVNALEDIVRQLDVPRAQVLVEAAIVEISGDIQDAVGVQWAINKGGMGGTKTNFAN 398
A + I++ LD R QVL+E IVE++ + G+ W G N
LepHa: 293 ATNAEWAEIRKIKVLDLSARKQVLLLEVLIVELTSSDLNDFGIDWRKGEAFGQF-----N 347

Pseud: 399 TGLSIGTLLQSLESNKAPE-SIPDGAIVGI---GSSSFGALVTALSAXXXXXXXXXXXXXX 454
+GLS + + P + G +G GS +++A
LepHa: 348 SGLSKEANIINSNGQINPNVNTLSGFSGLGFLKAGSEQIIGILSANQGNENFNVLASAPQVL 407

Pseud: 455 XXXXQKAEILVGQNVFPQTGSYTTNSEGSSNPFTT--VERKDIGVSLKVTPHINDGAALR 512
Q+AEI VGQ+VP +T S + G +N T E + G+ LK TPH+N +
LepHa: 408 TVDNQEAELISVGQDVPVTRTQSRNAGT-GGTNAVTVVDNYEYRPTGIKLFKTPHVNKNRIT 466

Pseud: 513 LEIEQEISALLPNAQQRNNTDLITSKRSIKSTILAENGQVIVIGGLIQDDVSQAESKVPL 572
LE+ QEI + A N ++R IK++I EN Q IVIGGLI +D + K+P
LepHa: 467 LELFQEIKNIAEIALAGGNPTF--NRREIKTISIENQIVIGGLISNDKQKRIIKIPF 524

Pseud: 573 LGDIPLLGRLFRSTKDTHTKRNLMVFLRPTVVRDSAGLAALSGKK 617
LGDIP LG LF+ T + K NLMVF+ P ++ ++ KK
LepHa: 525 LGDIPYLGHLFKRTTEKIKKTNLMVFITPHILDSRENADKMTVKK 569

```

Identidad: 24.0 %

Similitud: 41.0 %

Pseud: *Pseudomonas aeruginosa*.

LepHa: *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo.

Figura 26. Alineamiento entre las secuencias de aminoácidos de XcpQ de *Pseudomonas aeruginosa* y GspD_L de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo realizado con el programa Blast. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

LeHar	1	MYGTISQFSIFRIFPILILLFLVWDKPVFPQSKKKSSVKTRSATAPEEPAEKSFYANWRD	60
		M GTISQ SIFRIF +LILLFLVWDKPVFPQSKKK+S KT+S T EEP+EK+FYANWRD	
LeCop	1	MSGTISQLSIFRIFSLILLFLVWDKPVFPQSKKKTSAKTKSVTQ-EEPSEKTFYANWRD	59
LeHar	61	TELNDFLKGM SAILKKNILLDESLKGGKITIISQKEIPIKNAFIFMKS VLES LGFVVEE	120
		TELNDFLKGM SAILKKNILLDESLKGGKITIISQKEIPIKN FIFMKS VLES LGFVVEE	
LeCop	60	TELNDFLKGM SAILKKNILLDESLKGGKITIISQKEIPIKNGFIFMKS VLES LGFVVEE	119
LeHar	121	PDLISIVKIKDALARSPVVRVGKELIPETEVDYRTITQIPIENTKPEELEPILKRLTS	180
		PDLISIVKIKDALARSP+VRVGKELIPE EVGDYRTITQ+IPIEN KPEELEPILKRLTS	
LeCop	120	PDLISIVKIKDALARSPIVRVGKELIPEEEVGDYRTITQVIPIENVKPEELEPILKRLTS	179
LeHar	181	PNTDVIVYRNTNTIVLSGSGADINKLLVLINELDKLEEASPGAIASAGDVHIYTLHSE	240
		PNTDVIVYRNTNTIVLSGS ADINKLLVL++E D+K+EEA+PG+I+SAGD+HIYTL+SE	
LeCop	180	PNTDVIVYRNTNTIVLSGSAADINKLLVLVSEFDVKIEEATPGS ISSAGDIHIYTLEYSE	239
LeHar	241	AEKIAATLVKLDNPVQSEELSPEKKVP--GQIPMKVEKIKAVGHKESNSVIVTATNAEW	298
		AEKIAATLVKLDNPV+QSE+L E+K P GQ KV+KIKAVGHKESNSVIVTATNAEW	
LeCop	240	AEKIAATLVKLDNPVIQSEDLGSEKPPPPGQMPKVDKIKAVGHKESNSVIVTATNAEW	299
LeHar	299	AEIRKIIKVLDSARKQVLLLEVLIVELTSSDLNDFGIDWRYKGEAFGQFNSGLSKEANIIN	358
		AEIRKIIKVLDSARKQVLLLEVLIVELTSSDLNDFGIDWRYKGEAFGQFNSGLSKEANIIN	
LeCop	300	AEIRKIIKVLDSARKQVLLLEVLIVELTSSDLNDFGIDWRYKGEAFGQFNSGLSKEANIIN	359
LeHar	359	SNGQINPNVNTLSGFSLGFLKAGSEQIIGILSANQGNENFNVL SAPQVLTVDNQEAEISV	418
		SNGQ+NPN+NTLSGFSLGFLKAGSEQIIGILSANQGNENFNVL SAPQVLTVDNQEAEISV	
LeCop	360	SNGQVNPNTLSGFSLGFLKAGSEQIIGILSANQGNENFNVL SAPQVLTVDNQEAEISV	419
LeHar	419	GQDVPVRTQSRNAGTGGTNAVTVDNIEYRPTGIKLFKFTPHVNKNNRITLLEL FQEIKNIAE	478
		GQDVPVRTQSRNAGTGGTNAVTVDNIEYRPTGIKLFKFTPHVNKNN+ITLLEL FQEIKNIAE	
LeCop	420	GQDVPVRTQSRNAGTGGTNAVTVDNIEYRPTGIKLFKFTPHVNKNNKITLLEL FQEIKNIAE	479
LeHar	479	IALAGGNPTFNRREIKTSSISIENTQSIVIGGLISNDKQKR I IKIPFLGDIPYLGHLFKRT	538
		IALAGGNPTFNRREIKTSSISIENTQSIVIGGLISNDKQKR I IKIPFLGDIPYLGHLFKRT	
LeCop	480	IALAGGNPTFNRREIKTSSISIENTQSIVIGGLISNDKQKR I IKIPFLGDIPYLGHLFKRT	539
LeHar	539	TEKIKKTNLMVFITPHILDSRENADKMTVKKKMLQEYELERERILN	585
		TEKIKKTNLMVFITPHILDSRE ADKMTVKKKM QE+YELERERILN	
LeCop	540	TEKIKKTNLMVFITPHILDSRETADKMTVKKKMQQERYELERERILN	586

Identidad: 92.0 %

Similitud: 96.0 %

LeHar: *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo.

LeCop: *Leptospira interrogans* serovariedad Copenhageni.

Figura 27. Alineamiento entre las secuencias de aminoácidos de GspD_L de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo y GspD de *Leptospira interrogans* serovariedad Copenhageni realizado con el programa Blast. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

LeCop	50	EKTFYANWRDTELNDFLKGM SAILKKNILLDES LKGGKITIISQKEIPIKNGFIFMKS VL	109
Ecoli	42	EATFTANFKD TDLKSF IETV GANLNKTIIMGPGVQG-KVSIR TMTPLNERQYYQLFLNLL	100
LeCop	110	ESLGFVVE-EPDLISIVKIKDALARS-PIVRVGKELIPEEEVGDYRTITQVIPIENVKP	167
Ecoli	101	EAQGYAVVPMENDVLKVVKSSAAKVEPLPLVGE GSDNYAGDEM-----VTKVVPVRNVSV	155
LeCop	168	EELEPILKRL--TSPNTDVIVYRNTNTIVLSGSAADINKLLVLVSEFD---VKIEEATPG	222
Ecoli	156	RELAPILRQMIDSAGSGNVVNYDPSNVIMLTGRASVVERL TEVIQRVDHAGNRTEEVIPL	215
LeCop	223	SISSAGDIH--IY TLEYSEAEKIAATLV-----KLD	251
Ecoli	216	DNASASEIARVLESLTKNSGENQPATLKSQIVADERTNSVIVSGDPATRDKMRRLLIRRLD	275
LeCop	252	NPVIQS-----EDLGSERKPPPPGQPMPKVDKIKAVG-----HKESN	288
Ecoli	276	SEMERSGNSQV FYLKYSKAEDLVDVLKQVSGTLTAAKEEAEGTVGSGREVV SIAASKHSN	335
LeCop	289	SVIVTATNAEWAEIRKIIKVLDSARKQV LLEVLIVELTSSDLNDFGIDWRYKGEAFGQFN	348
Ecoli	336	ALIVTAPQDIMQSLQSVIEQLDIRRAQVHVEALIVEVAEGSNINFGVQWGSKDAGLMQFA	395
LeCop	349	SGL-----SKEANIINSNG--QVNPIN-----TLSGFSLGFLKAG	382
Ecoli	396	NGTQIPIGTLGAAISA AKPQKGSTVISENGATTINPDTNGDLSTLAQLLSGFSGTAVGVV	455
LeCop	383	SEQIIGILSANQGNENFNVL SAPQVLTVDNQEA EISVGQDVPVRTQSRNAGTGGTNAVTV	442
Ecoli	456	KGDWMALVQAVKNDSSSNVLSTPSITTLDNQEAFFVMVGQDVPVLTGST---VGSNNSNPF	512
LeCop	443	DNYEYRPTGIK LKFTPHVNKNNKITLELFQEIKNIAEIALAGGNPTFNRREIKTSIS IEN	502
Ecoli	513	NTVERKKVGI MLKVTPQINEGNAVQMVIEQEVSKVE--GQTS LDVVFGERK LKT TVLAND	570
LeCop	503	TQSIVIGGLISNDKQKRII KIPFLGDIPYLGHLFKRTTEKIKKTNL MVFITPHILDSRET	562
Ecoli	571	GELIVLGGLMDDQAGESVAKVPL LGDIPVIGNLFKSTADKKEKRNLMVFIRPTILRDGMA	630
LeCop	563	ADKMTVKKKMQQERYELERE	582
Ecoli	631	ADGVSQRKYNMRAEQIYRD	650

Identidad: 28.0 %

Similitud: 48.0 %

LeCop: *Leptospira interrogans* serovariedad Copenhageni.

Ecoli: *Escherichia coli*.

Figura 28. Alineamiento entre las secuencias de aminoácidos de GspD de *Leptospira interrogans* serovariedad Copenhageni y GspD de *Escherichia coli*, realizado con el programa Blast. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

Ecoli	166	IDSAGSGNVVNYDPSNVIMLTGRASVVERLTEVIQRVDHAGNRTEEVIPLDNASASEIAR	225
		+D GNV+ P++ I R + E +++ E+I ++ A A++IA+	
Pseud	340	LDKRKLGNVLLVAPADEIAARERQEL-----EAQKQIAELAPLRRELIQVNYAKAADI	394
Ecoli	226	VLES�TKNSGENQPATLKSQIVADERTNSVIVSGDPATRDKMRRLLRRLD	275
		+ +S+T + G+ + I D+RTNS+I D++RR++ +LD	
Pseud	395	LFQSVTSDGGQEGKEGGRGSITVDDRTNSIIAYQPQERLDELRRIVSQLD	444

Identidad: 26.0 %

Similitud: 50.0 %

Ecoli: *Escherichia coli*.

Pseud: *Pseudomonas aeruginosa*.

Ecoli	285	QVFYLYKYSKAEDLVDVLKQVSGTLTAAKEEAEGTVGSGREVVSIAASKHSNALIVTAPQD	344
		++ + Y+KA D+ + + V T +E EG GS I +N++I PQ+	
Pseud	380	ELIQVNYAKAADI AKLFQSV--TSDGGQEGKEGGRGS-----ITVDDRTNSIIAYQPQE	431
Ecoli	345	IMQSLQSVIEQLDIRRAQVHVEALIVEVAEGSNINFGVQWGSKDAGLMQFANGTQIPIGT	404
		+ L+ ++ QLDI QV +EA IVE G + + GV+WG G IG	
Pseud	432	RLDELRRIVSQLDIPVRQVMIEARIVEANVG YDKSLGVRWGGAYHKGNWSGYKDGNI	491
Ecoli	405	LGAAISAAPKQKSTVISENGATTINPDTNGDLSTLAQLLSGFSGTAVGVKGDWMLVQ	464
		P GS G T+ +P DL SG +G + + + +Q	
Pseud	492	KDEDGMNCGPIAGSCTFPTTG-TSKSPSPFVDLGA K----DATSGIGIGFITDNIILDLQ	546
Ecoli	465	--AVKNDSSSNVLSTPSITTLDNQEAFFMVGQDVPVLTGSTVGSNNSNPFNTVERKKVGI	522
		A++ + ++S P + T D + A + G +VP S+ G+ +++ K+ +	
Pseud	547	LSAMEKTGNGEIVSQPKVVTSDKETAKILKGSEVPYQEASSSGATSTS-----FKEAAL	600
Ecoli	523	MLKVTPQINEGNAVQMVIEQEVSKVEGQTSLDVV--FGERKLT TVLANDGELIVLGGML	580
		L+VTPQI N + + ++ + Q L+ V + ++ +L NDGE IV+GG+	
Pseud	601	SLEVTPQITPDNRIIVEVKVTKDAPDYQNMLNGVPPINKNEVNAKILVNDGETIVIGGVF	660
Ecoli	581	DDQAGESVAKVPLLDIPVIGNLFKSTADKKEKRNLMVFIRPTILRDGMAADG	633
		++ +SV KVP LG++P +G LF+ K L+VF+ P I+ + A G	
Pseud	661	SNEQSKSVEKVPFLGELPYLGRFLFRDRDVTDRKNELLVFLTPRIMNQAI AIG	713

Identidad: 27.0 %

Similitud: 46.0 %

Ecoli: *Escherichia coli*.

Pseud: *Pseudomonas aeruginosa*.

Figura 29. Alineamiento entre las secuencias de aminoácidos de GspD de *Escherichia coli* y XcpQ de *Pseudomonas aeruginosa*, realizado con el programa Blast. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

Cuadro 7. Predicción del peso molecular de las secretinas de la membrana externa, GspD de *E. coli* y otras proteínas homólogas.

Bacteria	Denominación	Número de (aa)	Peso Molecular (kDa)
<i>Escherichia coli</i> (Chen <i>et al.</i> , 2006) ²⁶⁶	GspD	650	74.17
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1, (Stover <i>et al.</i> , 2000) ²⁶⁷	XcpQ	658	69.95
<i>L. interrogans</i> serovar Lai (Ren <i>et al.</i> , 2003) ¹¹⁹	GspD	615	68.71
<i>L. interrogans</i> serovar Copenhageni (Nascimento <i>et al.</i> , 2004) ¹³⁹	GspD	596	66.46
<i>L. borgpetersenii</i> serovar Hardjo (Bulach <i>et al.</i> , 2006) ¹⁴⁰	GspD	598	66.70

Extracciones de ADN del vector de expresión pET28a

Los ensayos iniciales de expresión de la proteína rGspD_L se realizaron en la cepa de *Escherichia coli* C43, la cual fue transformada con pAL208. La presencia de pAL208 fue confirmada mediante PCR a partir de las colonias transformantes que desarrollaron en agar LBK₅₀ utilizando los iniciadores MILE1230 (T7 P) y MILE1231 (T7 T), Figura 30.

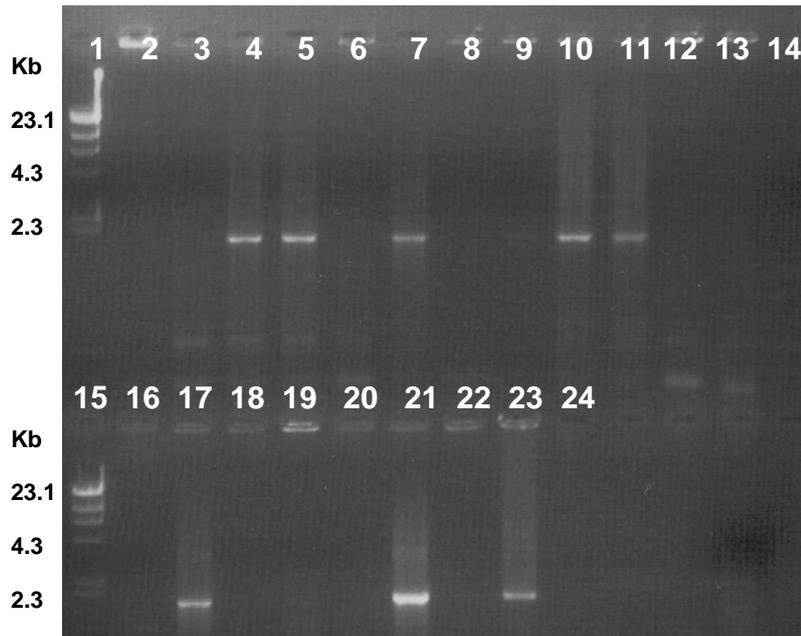


Figura 30. PCR de colonia utilizando los iniciadores MILE 1230 y MILE 1231. En las líneas 1 y 15 se colocó el marcador de peso molecular λ HindIII. Líneas 2 a la 14 y 16 a la 22 PCR de las colonias seleccionadas. Línea 23, plásmido pAL208 control positivo y 24, control negativo.

Fueron seleccionadas tres colonias transformantes con resultado de PCR positivo y a partir de ellas se obtuvo la extracción del plásmido recombinante (Figura 31). Para confirmar que se trataba de plásmidos recombinantes, se realizó un nuevo ensayo de PCR utilizando los iniciadores MILE 1230 Y MILE 1231, obteniendo en los tres casos, la amplificación del fragmento clonado con un tamaño cercano a las 2,000 pb (Figura 32).

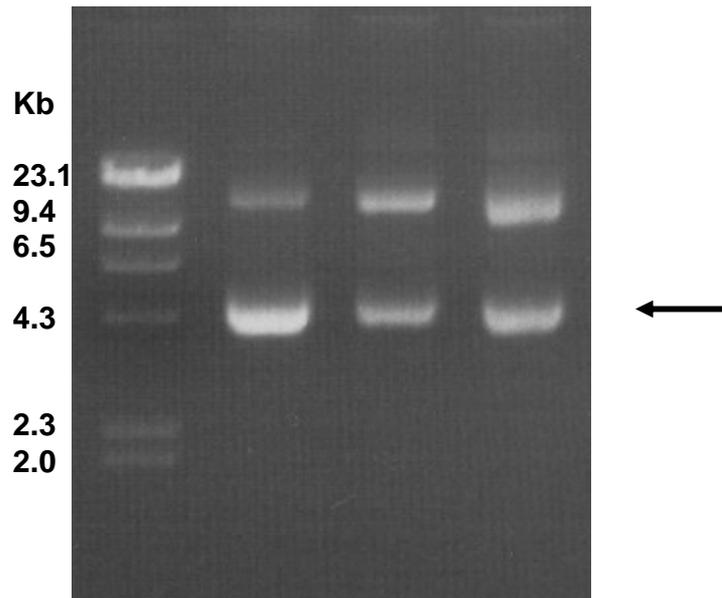


Figura 31. Extracción de ADN de los plásmidos recombinantes obtenidos a partir de las transformantes seleccionadas de *E. coli* DH5 α . Línea 1, marcador de peso molecular λ HindIII. Líneas 2 a 4, extracción de plásmidos de tres colonias recombinantes.

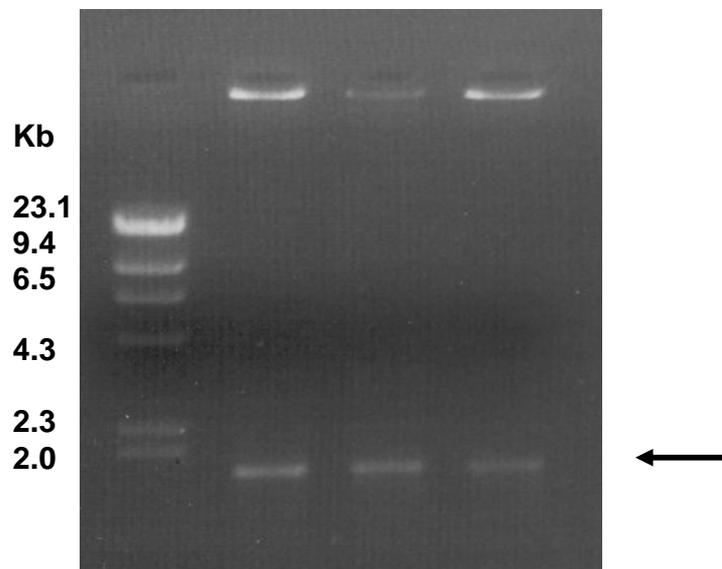


Figura 32. PCR realizado a los tres plásmidos recombinantes, utilizando los iniciadores MILE 1230 y MILE 1231. Línea 1, marcador de peso molecular λ HindIII; línea 2 a 4, productos amplificados de los plásmidos obtenidos.

Ensayos de expresión de rGspD_L en diferentes cepas de *Escherichia coli*

El análisis de las proteínas totales en los geles de poliacrilamida evidenció una diferencia en el patrón de bandas con peso cercano a los 66 kDa entre la cepa que contenía a pAL208 y los controles negativos correspondientes a las cepas C43 sola y C43 con pET28a sin inserto (Figura 33).

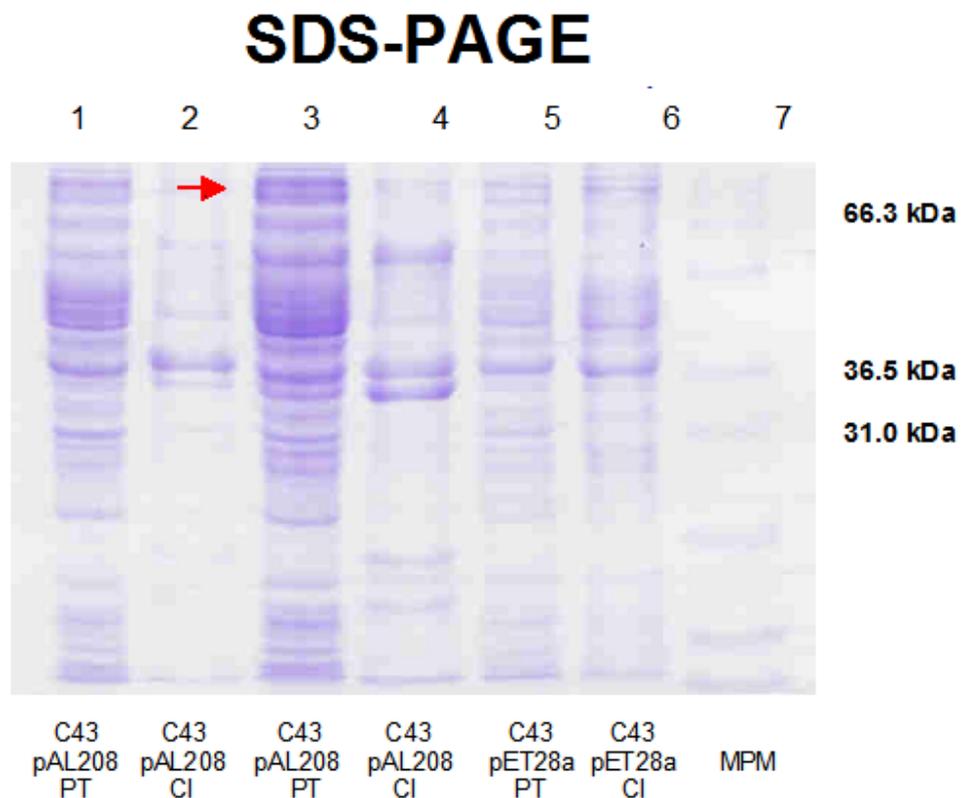


Figura 33. SDS-PAGE de los ensayos de expresión en la cepa C43 de *E. coli*. Líneas 1, 3 y 5 corresponden a extractos de proteínas totales (PT). Líneas 2, 4 y 6 preparaciones a partir de cuerpos de inclusión de las mismas preparaciones de PT. pAL208 (plásmido recombinante); pET28a (plásmido sin inserto). Línea 7, marcador de peso molecular (MPM).

Detección de la proteína rGspD_L

Inicialmente, en los ensayos de detección en *E. coli* C43 transformada con pAL208 no mostraron señales positivas de la expresión de rGspD_L. En un nuevo ensayo de expresión empleando 0.2 % de glucosa previo a la inducción con IPTG, para sincronizar el cultivo y favorecer la expresión de la proteína recombinante, en caldo LBK₅₀, tampoco mostró resultados positivos. Al realizar un análisis más detallado de la secuencia clonada, se determinó que había diferencias en el uso de codones que utiliza *E. coli* C43 y los que poseía la secuencia *gspD_L* clonada. Mientras que el uso de codones para arginina en la secuencia del inserto de *L. borgpetersenii* (*gspD_L*), es: AGA–45.4 %; AGG–18.1 %; CGA–18.1 %; el uso de codones para arginina en *E. coli* es: AGA–3.9 %; AGG–2.2 %; CGA–3.9 %. Debido a esta situación, se utilizaron las cepas de expresión de *E. coli*, Rosetta DE3 codon-plus y pLysS (*Novagene*). La cepa Rosetta DE3 codon plus codifica para diferentes tRNAs que en condiciones normales, cepas de *E. coli* no poseen (estos incluyen los tres codones codificantes para arginina anteriormente mencionados), lo cual favorece la expresión de una amplia gama de proteínas recombinantes. La cepa pLysS posee un gen que codifica para la T7 lisozima, la cual ejerce un control más estricto sobre la T7 ARN polimerasa, controlando la expresión de productos tóxicos para *E. coli*.

En un nuevo ensayo de expresión se emplearon las tres cepas de *E. coli*, C43 en medio líquido LBK₅₀ y pLysS y Rosetta en medio líquido LBK₅₀-ClO₃₄ incubadas a 37 °C previo a la inducción con IPTG (10 mM) y a TA después de la inducción. El análisis de las proteínas en geles de poliacrilamida al 12.0 % mostró un patrón diferente para las proteínas totales de la cepa Rosetta, por debajo de los 66 kDa, lo cual coincidía con el peso esperado de acuerdo a la predicción del fragmento clonado (63 kDa), banda no apreciada en las otras dos cepas ni en los controles negativos (Figura 34). Para confirmar la expresión de rGspD_L, se realizó una inmunodetección tipo Western, utilizando nuevamente los anticuerpos monoclonales

anti-T7-HRP (*Novagene*) dirigidos contra el péptido T7 y anti-His-HRP contra el péptido de histidinas. Como resultado de la inmunodetección utilizando anti-T7-HRP (*Novagene*) diluido 1:5,000 se observó la aparición de dos bandas bien definidas con un peso menor a 66 kDa en la preparación de proteínas totales de la cepa Rosetta. Las mismas señales aparecieron pero con mucho menor intensidad en la preparación de proteínas totales de la cepa pLysS. Al igual que en los ensayos anteriores, se confirmó que la cepa C43 no expresó a rGspD_L (Figura 35). La expresión de rGspD_L en la misma cepa Rosetta fue también confirmada utilizando el anticuerpo monoclonal anti-histidinas, PENTAHIS-HRP (*QIAGEN*) diluido 1:5,000 en un nuevo ensayo de detección con las tres cepas de expresión (C43, Rosetta y pLysS). Nuevamente, se observó la aparición de dos bandas bien definidas aunque con menor intensidad debajo de los 66 kDa. No se observó reacción hacia el control positivo (6xHis Protein Ladder *QIAGEN*), posiblemente por degradación del mismo, ya que no se observaron las bandas bien definidas en el gel. A pesar de ello, este resultado confirmó la expresión de rGspD_L a través de las etiquetas de histidina (Figuras 36 y 37).

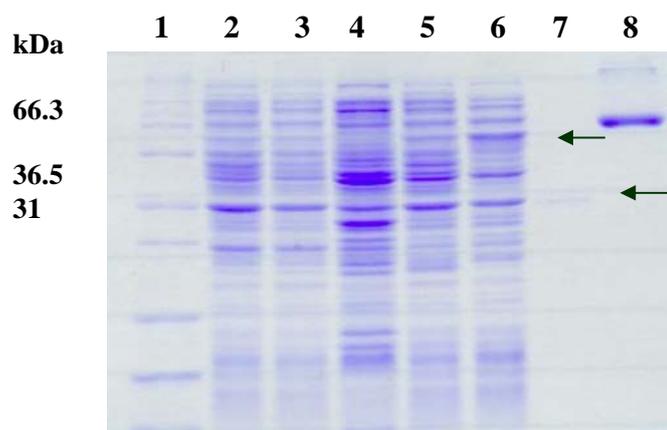


Figura 34. SDS-PAGE de las preparaciones de proteínas totales del ensayo de expresión en las tres cepas de *E. coli*. La expresión de rGspD_L se observó únicamente en la cepa Rosetta transformada con pAL208. Línea 1, marcador de peso molecular; línea 2, cepa Roseta; línea 3, cepa Rosetta-pET28a sin inserto; línea 4, cepa C43-pAL208; línea 5, cepa pLysS-pAL208; línea 6, cepa Rosetta-pAL208; línea 7, proteína con etiqueta del péptido T7 (control positivo); línea 8, albúmina sérica bovina.

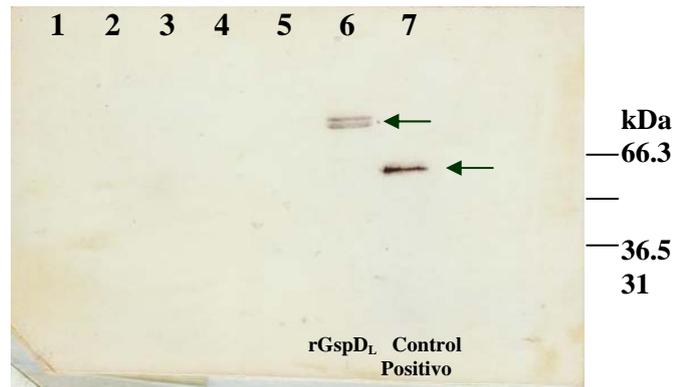


Figura. 35. Inmunodetección tipo Western que muestra la expresión de rGspD_L realizada a partir del gel de la figura 34, utilizando suero hiperinmune anti-T7-HRP. Línea 6, detección positiva de la expresión de rGspD_L en la cepa Rosetta; línea 7, detección positiva de una proteína que posee una etiqueta del péptido T7 (control positivo).

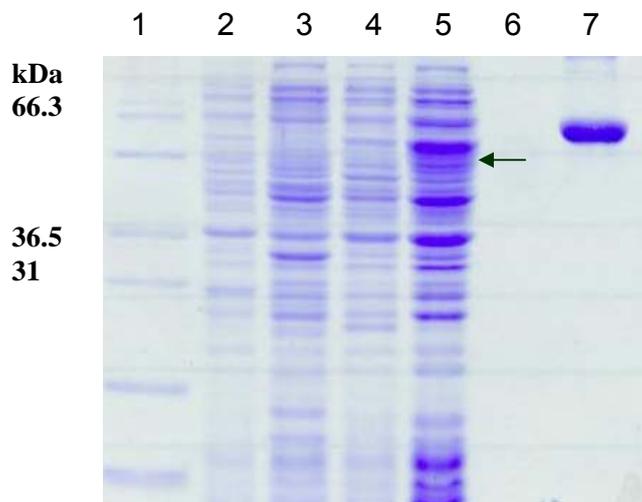


Figura 36. SDS-PAGE de las preparaciones de proteínas totales del ensayo de expresión en las tres cepas de *E. coli*. La expresión de rGspD_L se observó únicamente en la cepa Rosetta transformada con pAL208. Línea 1, marcador de peso molecular; línea 2, cepa Rosetta-pET28a sin inserto, línea 3, C43-pAL208; línea 4, cepa pLysS-pAL208; línea 5, cepa Rosetta-pAL208; línea 6, Penta-His; línea 7, albúmina sérica bovina.

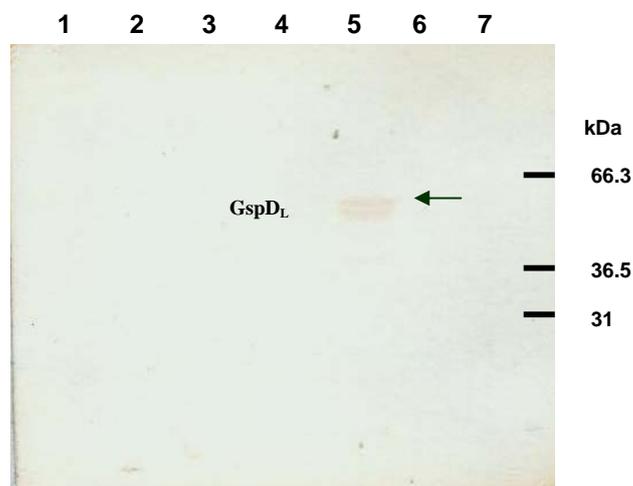


Figura 37. Inmunodetección tipo Western que muestra la expresión de rGspD_L realizada a partir del gel de la figura 36 utilizando Pentahis-HRP (1:2,000). Línea 5, detección positiva de la expresión de rGspD_L en la cepa Rosetta; línea 7, 6xHis *protein Ladder* posee etiquetas de histidina (control positivo).

Purificación de rGspD_L mediante electro-elución

Debido a que el sistema de detección y purificación basado en las etiquetas de histidinas no funcionó en nuestras manos, se procedió a realizar la purificación de la proteína mediante electro-elución. Después de la electro-elución de las bandas de 25 gels, se procedió a realizar los ensayos de electroforesis e inmunodetección de rGspD_L purificada. La inmunodetección se realizó utilizando el anticuerpo monoclonal anti-T7-HRP (*Novagene*) diluido 1:5,000 siguiendo el protocolo anteriormente descrito. Los resultados de ambos procedimientos mostraron que se logró purificar mediante esta metodología la proteína recombinante (Figuras 38 y 39).

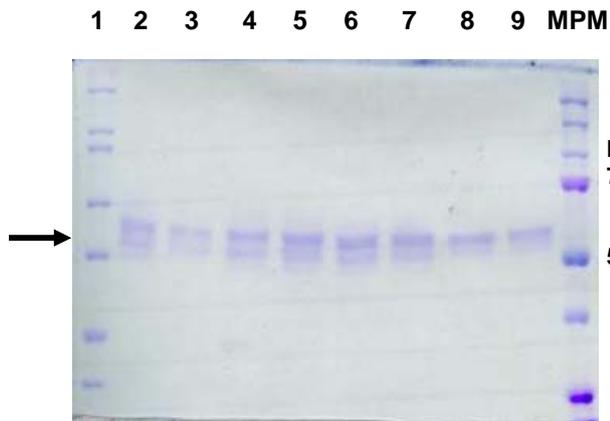


Figura 38. SDS-PAGE que muestra diferentes procesos de electro-elución. Líneas 2 a 9 rGspD_L electro-eluída. Líneas 1 y 9. MPM, marcador de peso molecular.

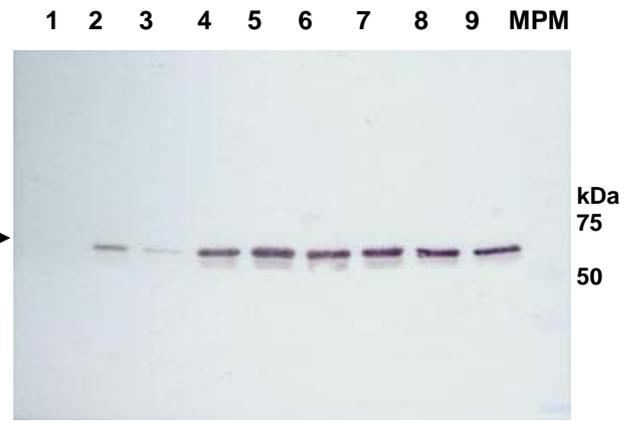


Figura 39. Inmunodetección tipo Western que muestra a rGspD_L purificada mediante electro-elución (líneas 2 a 9) utilizando anti-T7-HRP (1:5,000). MPM, marcador de peso molecular.

De acuerdo al método de cuantificación indirecta con un estándar de albúmina sérica bovina, se estimó una concentración aproximada de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ después de la concentración de rGspD_L por filtración (Figura 40).



Figura 40. Cuantificación de rGspD_L por comparación con un estándar de albúmina sérica bovina.

ASB – Albúmina sérica bovina; **rGspD_L** – Proteína recombinante

Titulación del suero hiperinmune policlonal anti-rGspD_L producido en conejo

El suero del conejo no. 1 alcanzó un título de 1:6,400 mientras que el suero del conejo no.2 alcanzó un título de 1:3,200 en ensayos de inmunodetección tipo Western con 15 µg de rGspD_L. En ambos casos el título obtenido se consideró adecuado (Figura 41).

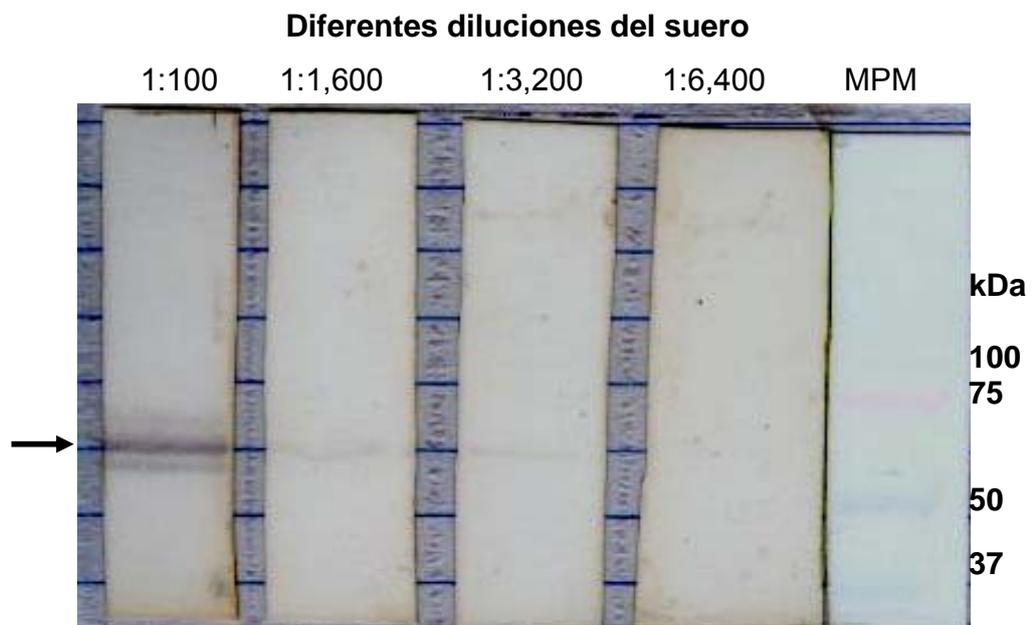


Figura 41. Titulación del suero hiperinmune anti-rGspD_L producido en conejo mediante inmunodetección tipo Western, utilizando tiras nitrocelulosa en las cuales fue transferida rGspD_L. La flecha muestra la señal de reacción positiva, resultado de la interacción del suero hiperinmune y la proteína. Para la detección se utilizó anti-IgG de conejo-HRP (1:400). MPM, marcador de peso molecular.

Las preparaciones de proteínas de membrana externa a partir de *L. interrogans* serovariedad Hardjo resultaron satisfactorias (Figura 42). Ensayos de inmunodetección tipo Western a partir de proteínas de la membrana externa y utilizando el suero hiperinmune anti-rGspD_L revelaron una banda bien definida con peso aproximado a los 63 kDa.

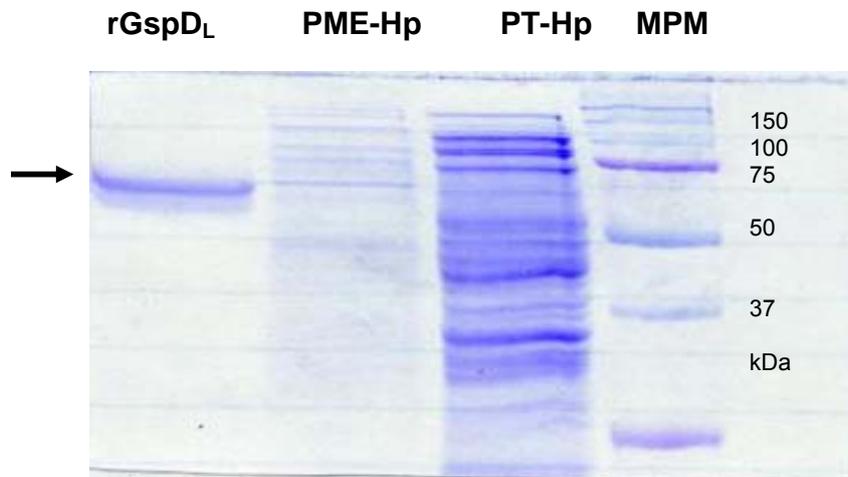


Figura 42. SDS-PAGE de GspD_L purificada, proteínas de la membrana externa (PME-Hp) y proteínas totales (PT-Hp) de *L. interrogans* serovariedad Hardjoprajitno. MPM, marcador de peso molecular.

El suero policlonal producido (anti-rGspD_L) fue utilizado como sonda para la detección de rGspD_L a partir de preparaciones de proteínas totales y de membrana externa de 9 serovariedades patógenas (Australis, Ballum, Bratislava, Canicola, Hardjo, Grippotyphosa, Pomona, Pyrogenes y Wolffi). Como resultado de la inmunodetección tipo Western, se obtuvo en todas las serovariedades probadas; en las preparaciones de proteínas totales y en las preparaciones de membranas externas, una banda bien definida con un peso molecular por arriba de los 60 kDa (Figuras 43 a 46).

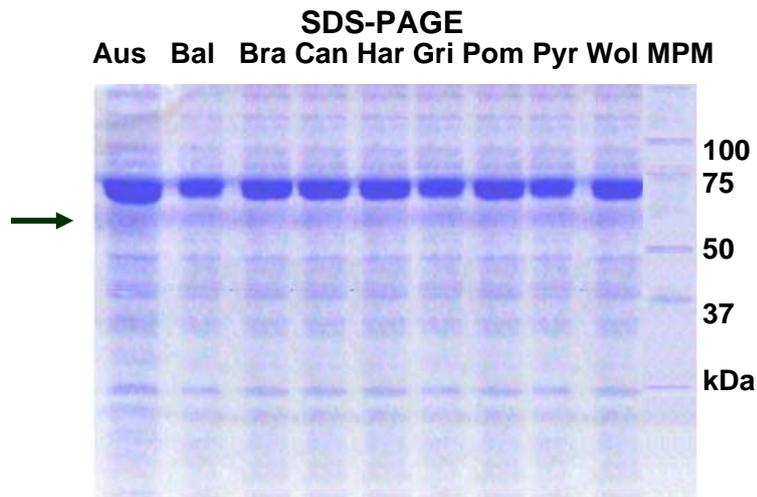


Figura 43. SDS-PAGE de preparaciones de proteínas totales de 9 serovariedades patógenas de *Leptospira*. De izquierda a derecha Aus-Australis; Bal-Ballum; Bra-Bratislava; Can-Canicola; Har-Hardjo; Gri-Grippotyphosa; Pom-Pomona; Pyr-Pyrogenes y Wol-Wolffi. MPM, marcador de peso molecular.

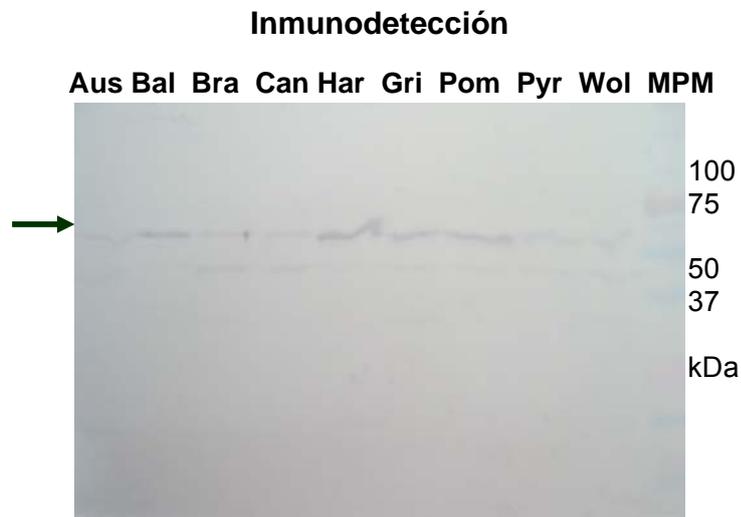


Figura 44. Inmunodetección tipo Western que muestra una banda común a partir de las preparaciones de proteínas totales de las nueve serovariedades patógenas de *Leptospira*. De izquierda a derecha Aus-Australis; Bal-Ballum; Bra-Bratislava; Can-Canicola; Har-Hardjo; Gri-Grippotyphosa; Pom-Pomona; Pyr-Pyrogenes y Wol-Wolffi. Se utilizó anti-GspD_L (1:100) y anti-IgG de conejo HRP (1:400). MPM, marcador de peso molecular.

SDS-PAGE

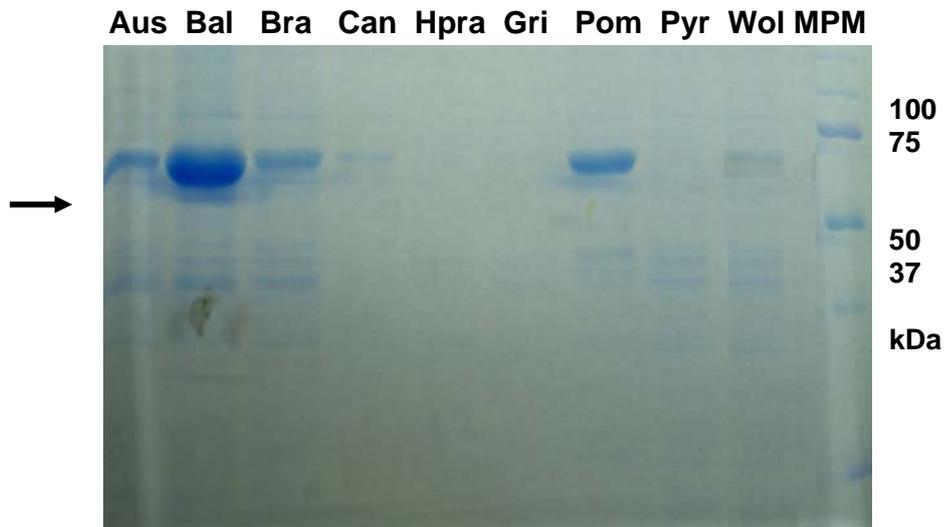


Figura 45. SDS-PAGE de preparaciones de ME de 9 serovariedades de *Leptospira* patógenas. De izquierda a derecha Aus-Australis; Bal-Ballum; Bra-Bratislava; Can-Canicola; Har-Hardjo; Gri-Grippotyphosa; Pom-Pomona; Pyr-Pyrogenes; Wol-Wolffi. MPM- Marcador de peso molecular.

Inmunodetección

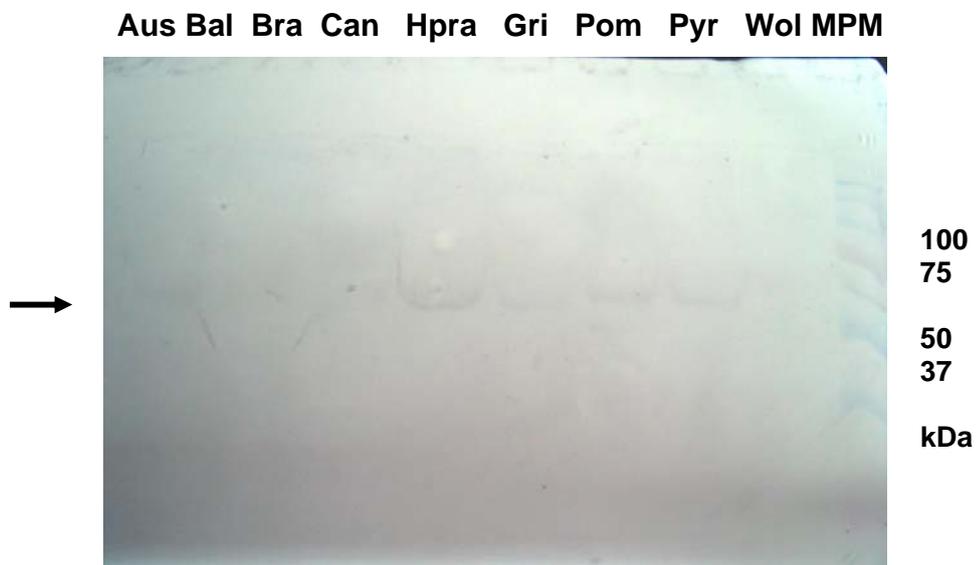


Figura 46. Inmunodetección tipo Western que muestra una banda común a partir de las preparaciones de proteínas de ME de las nueve serovariedades patógenas de *Leptospira*. Aus-Australis; Bal-Ballum; Bra-Bratislava; Can-Canicola; Har-Hardjo; Gri-Grippotyphosa; Pom-Pomona; Pyr-Pyrogenes y Wol-Wolffi. Se utilizó anti-GspD_L (1:100) y anti-IgG de conejo HRP (1:400). MPM- Marcador de peso molecular.

Inmunodetección tipo Western de rGspD_L utilizando sueros hiperinmunes anti-*Leptospira* producidos en conejo

Al enfrentar el suero hiperinmune anti-Hardjobovis con preparaciones de rGspD_L recombinante, sonicados de *E. coli* cepa Rosetta transformada con pAL208, y sonicados de *E. coli* cepa Roseta, se observaron reacciones positivas en las cuatro preparaciones en el mismo peso, aunque con diferente intensidad en la reacción (Figuras 47 y 48). Al enfrentar el suero de conejos negativos a *Leptospira* por la prueba AM antes ser inmunizados con GspD_L recombinante (control negativo) a preparaciones de rGspD_L, *E. coli* cepa Rosetta transformada con pAL208 y sin transformar, así como a un extracto de proteínas totales de la serovariedad Hardjo, se observaron reacciones positivas hacia diferentes proteínas de *E. coli* cepa Rosetta. Sin embargo, no se observó reacción alguna hacia rGspD_L en la fracción purificada ni en la preparación de PT de la cepa Rosetta-pAL208, (Figuras 49 y 50).

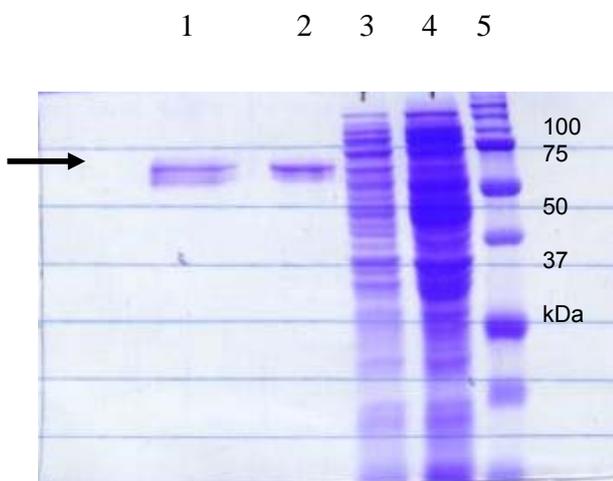


Figura 47. SDS PAGE de rGspD_L (Líneas 1 y 2), proteínas totales (PT) de *E. coli* cepa Rosetta-pAL208 (Líneas 3 y 4). Línea 5, marcador de peso molecular.

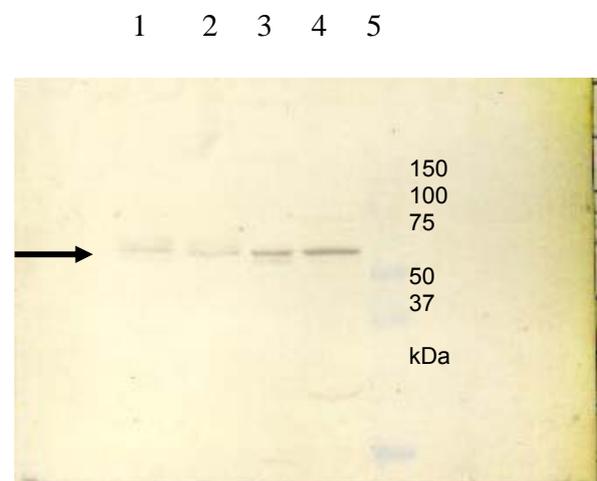


Figura 48. Inmunodetección tipo Western del gel de la figura 47, utilizando anticuerpo primario anti-Hardjobovis (1:100) y anticuerpo secundario anti-IgG de conejo HRP (1:400).

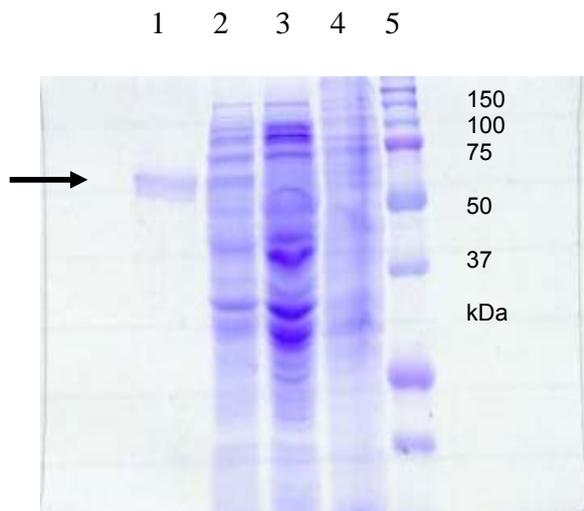


Figura 49. SDS PAGE de: Línea 1, rGspD_L, línea 2, Proteínas totales (PT) de *E. coli* Rosetta-pAL208, línea 3, PT de *E. coli* Rosetta y línea 4, PT de Hardjoprajitno. Línea 5, Marcador de peso molecular.

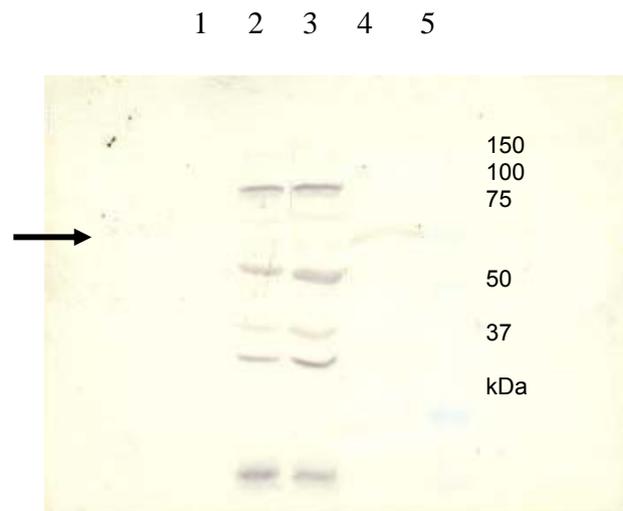


Figura 50. Inmunodetección tipo Western del gel de la figura 49. Línea 1, rGspD_L, línea 2, Proteínas totales (PT) de *E. coli* Rosetta-pAL208, línea 3, PT de *E. coli* Rosetta y línea 4, PT de Hardjoprajitno. Línea 5, marcador de peso molecular. Anticuerpo primario suero de conejo negativo a *Leptospira* (1:100); anticuerpo secundario anti-IgG de conejo-HRP (1:400).

Inmunodetección tipo Western de rGspD_L utilizando sueros de bovinos positivos en la prueba de aglutinación microscópica (AM)

Para conocer las propiedades antigénicas de la proteína rGspD_L se iniciaron ensayos de inmunodetección tipo Western utilizando 8 sueros positivos de bovinos que reaccionaron contra la serovariedad Hardjo en la prueba de AM. Los 8 sueros de bovino utilizados detectaron a rGspD_L (Cuadro 8 y Figuras 51 y 52).

Cuadro 8. Resultados en la inmunodetección tipo Western de rGspD_L con sueros de bovino positivos a la serovariedad Hardjoprajitno en la prueba de AM.

No. de suero	Título/serovariedad en AM	Dilución en Western blot	Detección de GspD _L
220	1:800 - Hardjoprajitno	1:80	+
264	1:800 - Hardjoprajitno	1:80	+
345	1:800 - Hardjoprajitno	1:80	+
543	1:800 - Hardjoprajitno	1:80	+
550	1:800 - Hardjoprajitno	1:80	+
551	1:800 - Hardjoprajitno	1:80	+

En el caso de los sueros de bovinos procedentes de la unidad de producción de leche del Estado de México, 30 sueros de un total de 40 seleccionados (75.0 %) detectaron rGspD_L (Cuadro 9). Se observó una asociación entre aquellos sueros que presentaron títulos \geq 1:800 contra la serovariedad Hardjo e inmunodetección positiva de rGspD_L (Cuadro 10).

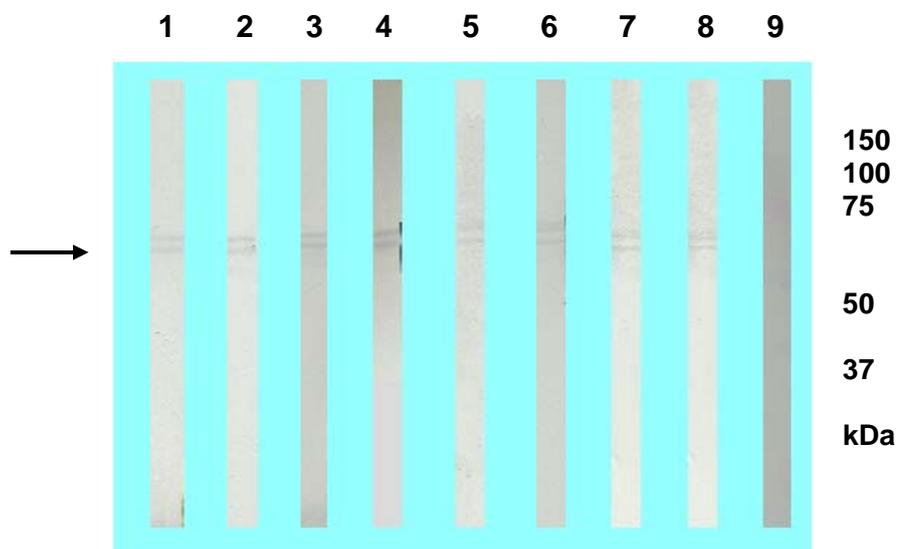


Figura 51. Inmunodetección tipo Western de rGspD_L utilizando diferentes sueros de bovinos positivos (1:800) a la serovariedad Hardjo mediante la prueba de AM. En las líneas 1 a la 8, se colocaron los sueros 276, 295, 654, 669, 1240, 1243, 1398 y 1795 respectivamente, que detectaron a la proteína recombinante. En la línea 9 se colocó el marcador de peso molecular.

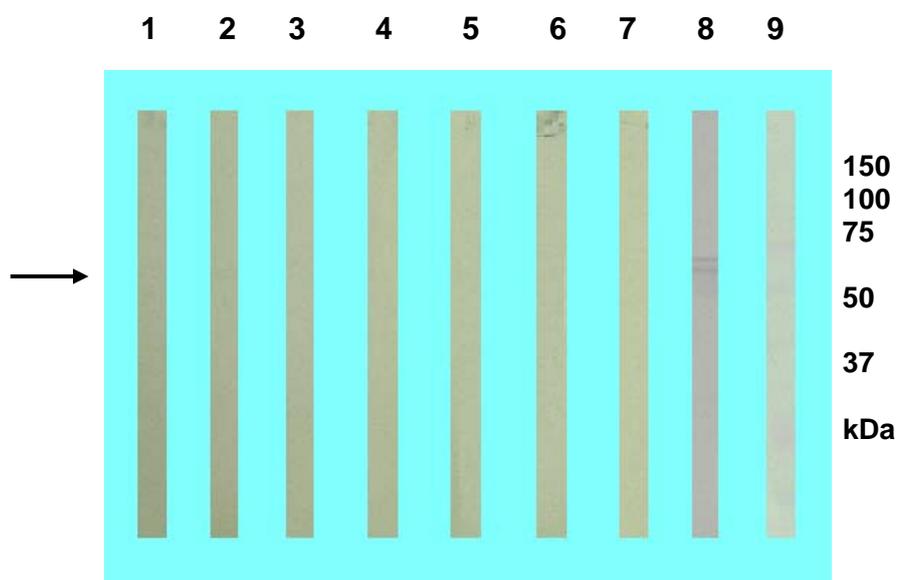


Figura 52. Inmunodetección tipo Western de rGspD_L utilizando diferentes sueros de bovinos negativos ($\leq 1:50$) mediante la prueba de AM. En las líneas 1 a la 7, se colocaron los sueros 013, 843, 1329, 1756, 1828, 1853 y 1928 respectivamente, que no detectaron a la proteína recombinante. En la línea 8, se colocó el anticuerpo monoclonal anti-T7-HRP (control positivo). En la línea 9 se colocó el marcador de peso molecular.

Cuadro 9. Resultados obtenidos en la prueba AM y en ensayos de inmunodetección de rGspD_L con los sueros de bovinos seleccionados.

Vaca	Aus	Aut	Ball	Bat	Bra	Can	Grip	Har	Ict	Pom	Pyr	Tar	Western blot
1398							1:50	1:3200		1:100			+
1410		1:200					1:100	1:1600	1:50	1:100			+
276						1:400	1:400	1:800		1:100	1:200		+
1075						1:50	1:400	1:800	1:200	1:50			+d
654		1:100		1:50		1:50	1:50	1:800	1:50	1:50			+
669	1:50				1:50	1:400	1:200	1:800	1:100	1:50	1:50		+
1240		1:100					1:200	1:800		1:100	1:50		+
1552						1:200	1:50	1:800	1:50	1:50	1:50		+d
1425						1:400	1:200	1:800	1:200	1:50	1:400		+d
513		1:50	1:50	1:50	1:200	1:800	1:200	1:800	1:50	1:200	1:100	1:50	+d
789		1:50				1:100	1:200	1:800	1:50	1:50	1:100		-
654		1:100		1:50		1:50	1:50	1:800	1:50	1:50			+
1344		1:50				1:400	1:100	1:400	1:200	1:200	1:400		-
760						1:200	1:50	1:400	1:200	1:50	1:200		+
1736				1:50		1:800	1:50	1:400		1:50			+
2577	1:100					1:100	1:50	1:400					+
2152						1:50		1:400	1:100	1:50	1:50		+d
1745			1:50			1:50		1:400	1:50		1:100		+
1513						1:100	1:100	1:400	1:100	1:50	1:200		+
1665	1:50					1:50		1:400	1:50	1:50	1:100		+
1118						1:50	1:100	1:400	1:50	1:50	1:100	1:50	-
2557					1:50	1:100	1:50	1:400		1:100			+d
1498			1:50			1:100	1:100	1:400	1:50	1:50	1:50		+
1503				1:100		1:100		1:400		1:50	1:100		+d
1243						1:200	1:100	1:200	1:200	1:100	1:100	1:50	+
1795						1:400	1:50	1:200	1:400	1:50	1:200		+
2499			1:50				1:50	1:200	1:50	1:50	1:100		+
1271								1:200		1:100			+d
2213							1:50	1:200					-
1519	1:50					1:400		1:200	1:100	1:100	1:200	1:50	+
2227	1:400		1:50*			1:200	1:100	1:200	1:100	1:200	1:50		+
868						1:400		1:200	1:50	1:50			+d
154	1:50					1:100	1:50	1:200	1:100	1:50	1:50*		+d
1110	1:50					1:400	1:200	1:200		1:50	1:200		-
1640						1:100	1:50	1:200	1:50				-
1763						1:50	1:100	1:200	1:50	1:50			-
1511	1:50					1:50	1:100	1:200		1:50			-
824	1:50	1:50		1:100			1:50	1:200		1:100			-
1409						1:200	1:100	1:200	1:50	1:50	1:50		-
295						1:200	1:100	1:100	1:50	1:50	1:100		+

El 77.5 % de los sueros utilizados presentaron anticuerpos contra hasta 7 diferentes serovariedades, entre las que se encontraba Hardjo. Del total de sueros analizados 40 (100 %), en 30 (75.0 %) aunque hubo reacción hacia diferentes serovariedades, el título

hacia la serovariedad Hardjo en la prueba AM fue el más alto (Cuadro 9). En 4 sueros (10.0 %) el título hacia la serovariedad Hardjo era igual al título máximo alcanzado hacia otras serovariedades y en 6 sueros (15.0 %) el título hacia Hardjo era menor al título máximo alcanzado contra otras serovariedades.

Cuadro 10. Relación del título de anticuerpos en la prueba AM de sueros de bovino seleccionados e inmunodetección tipo Western de rGspD_L.

Título en AM contra Hardjo	Número de sueros	Número de sueros + (%)
1:3,200	1	1 (100 %)
1:1,600	1	1 (100 %)
1:800	10	9 (90 %)
1:400	12	10 (83 %)
1:200	15	8 (53 %)
1:100	1	1 (100 %)

Treinta y dos de 40 (80.0 %) sueros de bovinos positivos en la prueba AM (1:800 – 1:3200) y 12 de 24 (50.0 %) sueros negativos en la prueba AM ($\leq 1:50$), detectaron rGspD_L en ensayos de inmunodetección tipo Western. Además, los sueros negativos que llegaron a reaccionar, mostraron reacciones más débiles en intensidad que los sueros positivos.

Inmunodetección tipo Western de rGspD_L utilizando sueros de perros y hámsteres infectados con *Leptospira*

Anticuerpos del tipo IgG presentes en sueros de perros infectados naturalmente (con aislamiento positivo) detectaron a rGspD_L en todos los casos (Figura 53). Así mismo, diferentes sueros de hámsteres infectados experimentalmente al ser enfrentados a rGspD_L reaccionaron detectándola, mientras que sueros de hámsteres no infectados con *Leptospira*, no mostraron reacción con la proteína recombinante (Figura 54).

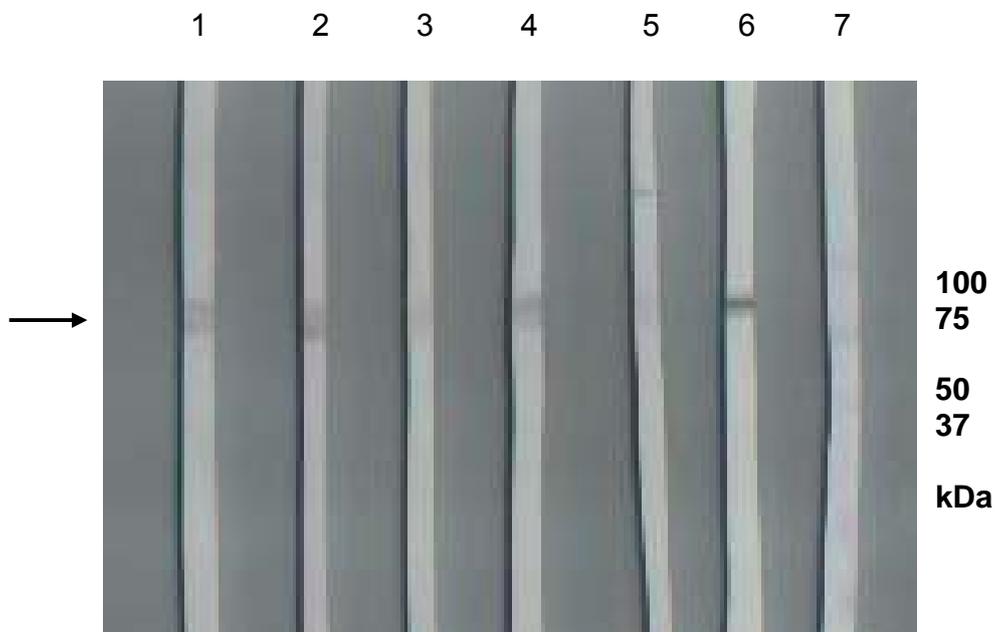


Figura 53. Inmunodetección tipo Western de rGspD_L utilizando diferentes sueros de perros infectados naturalmente con la serovariedad Canicola. Líneas 1 a 4, muestra la detección positiva de rGspD_L utilizando sueros de perros con aislamiento de *Leptospira*; línea 5, suero de un perro que presentó títulos de 1:3200 hacia la serovariedad canicola, línea 6, anticuerpo monoclonal T7-HRP (control positivo); línea 7, marcador de peso molecular.

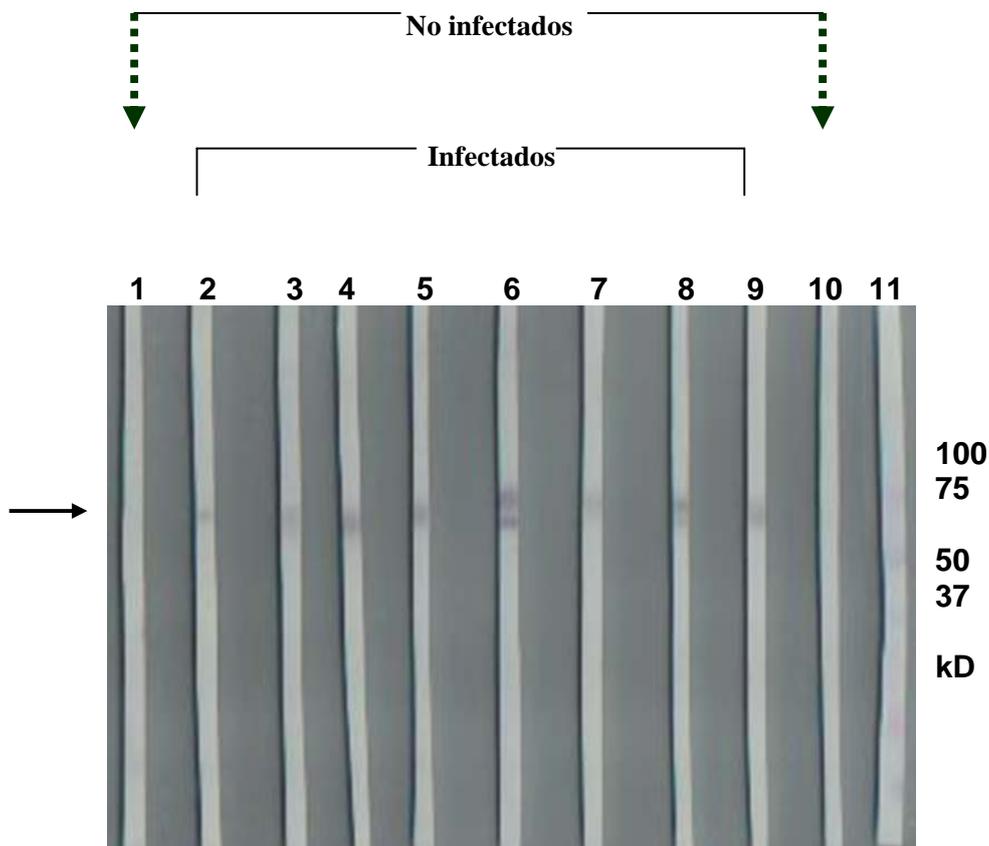


Figura 54. Inmunodetección tipo Western que muestra la detección de rGspD_L utilizando diferentes sueros de hámsteres infectados experimentalmente con la cepa LOCaS 46-R de *L. interrogans*. Líneas 1 y 10, hámsteres no infectados; líneas 2 a la 9, corresponden a reacciones positivas de detección de rGspD_L por los sueros de hámsteres infectados, con aislamiento positivo. Línea 11, marcador de peso molecular.

Ensayo piloto de inmunoprotección en hámsteres

Los ensayos de infección en hámster, utilizando a la cepa LOCaS-46R demostraron que se trataba de una cepa virulenta, ya que la cepa causó la muerte de los hámsteres después de cuatro días de haber sido inoculados. Las lesiones encontradas a la necropsia fueron: Hemorragias masivas en pulmón, hepatitis, hemorragias petequiales escasas en riñón y el

hallazgo de orina transparente, lo cual no es común en esta especie. Las lesiones encontradas coinciden con lo reportado en la literatura (Yukawa, 1991; Faine *et al.*, 1999). Aunque en ensayos realizados en hámsteres con la cepa LOCaS-46R recién aislada, se determinó claramente que ésta causaba la muerte de los hámsteres inoculados con 0.5 ml de cultivo correspondiente a la zona Dinger (anillo de crecimiento de leptospiras que se forma en medios semisólido). Entre los días 4 y 5 post-inoculación, la misma cepa LOCaS-46R (sexto pase) que había sido mantenida durante 6 meses en medio de cultivo artificial (Medio semisólido Fletcher), al ser inoculada nuevamente en un animal de laboratorio, no causaba manifestaciones clínicas, ni ocasionó la muerte en el periodo de tiempo en que inicialmente la causó. Posterior al sacrificio de dos hámsteres inoculados se detectaron hemorragias en pulmones y riñones, congestión hepática y en uno de los hámsteres se encontró aumento marcado en el tamaño de uno de los riñones. Los detalles se presentan en el cuadro 11.

Si bien no se reactivó la virulencia de la cepa Locas-46R al 100 %, los resultados obtenidos en las inoculaciones realizadas en hámster, si mostraron la capacidad para invadir al órgano blanco (riñón), así como causar lesiones en pulmones e hígado. De ahí que en este ensayo la finalidad era determinar si existía alguna diferencia fenotípica en cuanto al grado de lesión entre el grupo previamente inmunizado con rGspD_L y el grupo control, en órganos como hígado, pulmones y riñones.

Cuadro 11. Hallazgos macroscópicos y microscópicos en hámsteres inoculados con la cepa LOCaS-46R para reactivar la virulencia de la cepa.

Hámster 1	Hámster 2
<p>HALLAZGOS A LA NECROPSIA</p> <p>Riñones con hemorragias petequiales, uno de los riñones presentó un aumento marcado de tamaño, Hígado congestionado y los pulmones presentaban algunas hemorragias.</p>	<p>HALLAZGOS A LA NECROPSIA</p> <p>Riñones con aspecto normal, hígado con ligera congestión y pulmones con algunas hemorragias.</p>
<p>MUESTRAS DE TEJIDO COLECTADAS</p> <p>Pulmón: Histopatología Hígado: Observación en CO, Cultivo, PCR, Histopatología Riñón: Observación en CO, Cultivo, PCR, Histopatología Sangre: Observación en CO, Cultivo</p>	<p>MUESTRAS DE TEJIDO COLECTADAS</p> <p>Pulmón: Histopatología Hígado: Observación en CO, Cultivo, PCR, Histopatología Riñón: Observación en CO, Cultivo, PCR, Histopatología Sangre: Observación en CO, Cultivo</p>
<p>OBSERVACIÓN DE LEPTOSPIRAS EN MICROSCOPIO DE CAMPO OSCURO (CO)</p> <p>Riñón - ++++ Hígado - ++ Sangre - +</p>	<p>OBSERVACIÓN DE LEPTOSPIRAS EN MICROSCOPIO DE CAMPO OSCURO (CO)</p> <p>Riñón - ++ Hígado - + Sangre - +</p>
<p>CULTIVO EN MEDIO SEMISOLIDO</p> <p>Riñón - ++++ Hígado - S/D Sangre - ++</p>	<p>CULTIVO EN MEDIO SEMISÓLIDO</p> <p>Riñón - ++++ Hígado - S/D Sangre - S/D</p>

++++ - Abundante; ++ - Escaso; + - Únicamente un microorganismo. CO = Campo oscuro

El aspecto físico de los animales inmunizados con rGspD_L (grupo 1) era bueno, pelo con brillo, se mostraban con actividad, curiosos, comiendo y bebiendo agua en todo momento. Sin embargo, los animales del grupo 2 (grupo control) presentaban pelo hirsuto, dormían más, se mostraban menos activos y aunque continuaron comiendo y bebiendo agua, disminuyeron su consumo. Transcurridos 8 días después del desafío de ambos grupos, el hámster 1 del grupo 2 (grupo control) se encontró muerto por la mañana, con cierto rigor

mortis. La noche previa, se había mostrado estable. Al doceavo día post-desafío, un segundo hámster del grupo 2 se encontró muerto por la mañana, con un aspecto muy similar al anterior. Al día 23 post-desafío se realizó la eutanasia tanto del hámster sobreviviente del grupo 2, como de los tres hámsteres del grupo 1 (inmunizados con rGspD_L). Los hallazgos a la necropsia para los hámsteres del grupo 2 se muestran en el cuadro 12.

Cuadro 12. Hallazgos a la necropsia en los hámsteres del grupo 2 (Grupo control). Ensayo piloto de inmunoprotección en modelo animal.

Órganos	H1 Gpo2	H2 Gpo2	H3 Gpo2
Lesiones macroscópicas			
Pulmón	Muy congestionados, hemorragias difusas	Hemorragias severas difusas en ambos pulmones	Con escasas zonas de hemorragia, bien definidas en ambos lóbulos
Hígado	Congestión ligera	Congestión y bordes ligeramente redondeados	Congestión
Riñones	De aspecto pálido con una ligera tonalidad amarillenta	Hemorragias petequiales escasas y superficie rugosa	Hemorragias petequiales escasas
Vejiga	Con orina amarilla translúcida	Con orina amarilla translúcida	Con orina amarilla translúcida
Observación microscópica en campo oscuro			
Riñón	+++	+++	++++
Hígado	-	-	-
Orina	+	+	-
Sangre	-	-	-
Cultivo bacteriológico			
Riñón	+	+	+
Hígado	-	-	-
Orina	+	+	-

Fueron muy similares los hallazgos encontrados a la necropsia para los dos hámsteres del grupo 2, que murieron días posteriores al desafío. En ambos hámsteres los pulmones se encontraron sumamente congestionados y con hemorragias difusas, los riñones estaban pálidos y presentaban una ligera tonalidad amarilla, el hígado presentaba una ligera congestión y la vejiga contenía orina de color amarillo translúcido (la orina de un hámster sano normalmente es de color blanquecino debido al alto contenido de sales). La observación microscópica en campo oscuro de las preparaciones de los diferentes tejidos, reveló la presencia de abundantes leptospiras en riñón, escasas en orina y no se observaron en hígado.

El resultado obtenido al día 23 post-desafío, tiempo en el que se realizó la eutanasia de los sobrevivientes de ambos grupos fue: Para el grupo 2 (Grupo control) 33.0 % de supervivencia, mientras que para el grupo 1 (inmunizados con rGspDL), 100 % de supervivencia (Figura 55).

Sin embargo, la observación microscópica en campo oscuro de los hámsteres del grupo 1, reveló la presencia de leptospiras en riñón y escasas leptospiras en orina. En hígado, no se observaron. Los hallazgos encontrados posterior a la necropsia, para los hámsteres del grupo 1 se muestran en el cuadro 13.

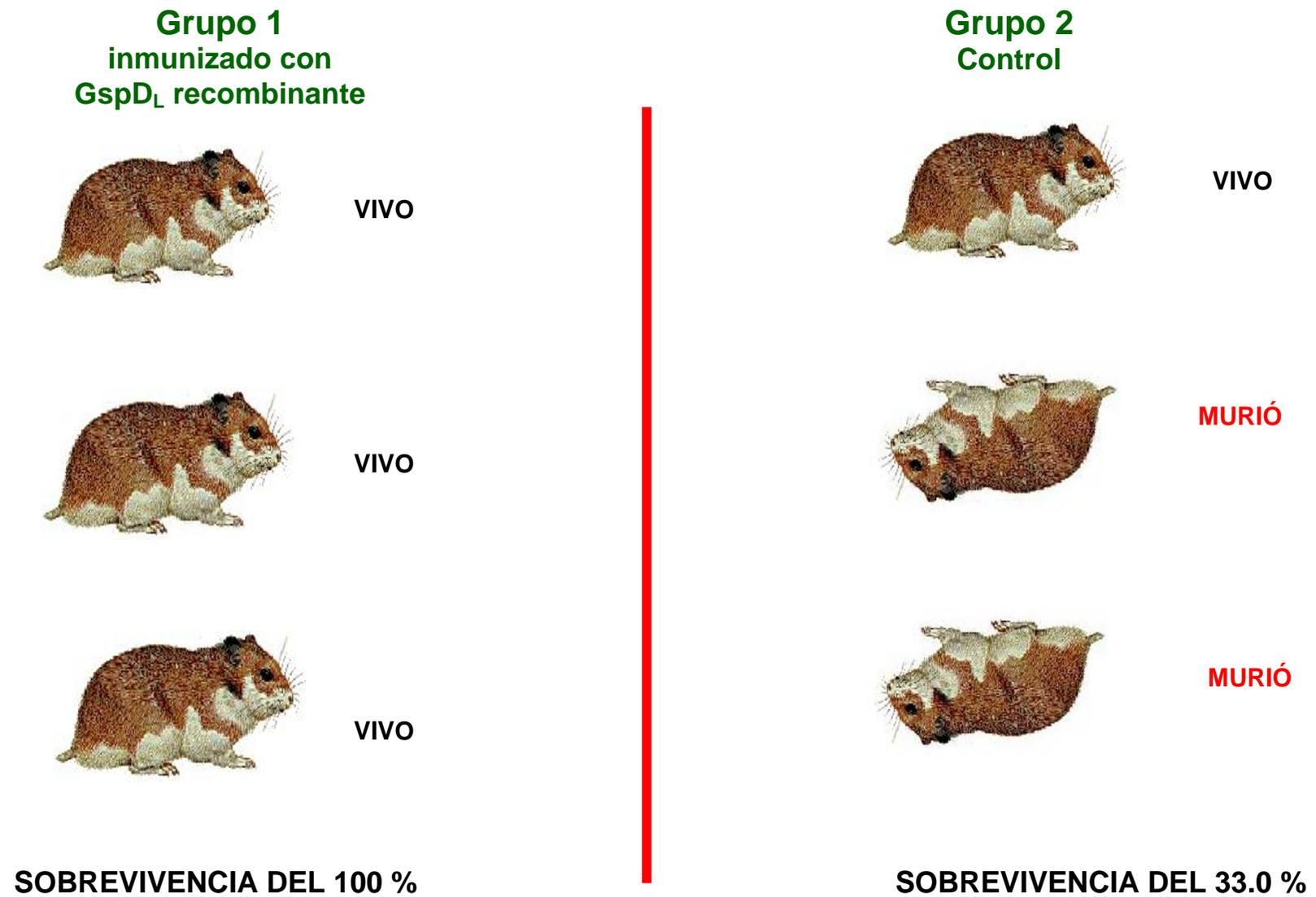


Figura 55. Resultados obtenidos en el ensayo piloto de inmunoprotección post-desafío.

Cuadro 13. Hallazgos a la necropsia en los hámsteres del grupo 1 (inmunizados con rGspD).
Ensayo piloto de inmunoprotección en modelo animal.

Órganos	H1 Gpo1	H2 Gpo1	H3 Gpo1
Lesiones macroscópicas			
Pulmón	Sin cambios aparentes	Sin cambios aparentes	Sin cambios aparentes
Hígado	Sin cambios aparentes	Sin cambios aparentes	Sin cambios aparentes
Riñones	Sin cambios aparentes	Sin cambios aparentes	Sin cambios aparentes
Vejiga	Orina amarillo translúcida	Orina amarillo translúcida	Orina amarillo translúcida
Observación microscópica en campo oscuro			
Riñón	+++	+++	++++
Hígado	-	-	-
Orina	+	+	-
Sangre	-	-	-
Cultivo bacteriológico			
Riñón	+	+	+
Hígado	-	-	-
Orina	+	+	-

En los hámsteres inmunizados con rGspD_L, no se apreciaron lesiones macroscópicas en los órganos recuperados (hígado, pulmones y riñones), sin embargo, al realizar la observación microscópica se observaron leptospiras viables, aunque en menor cantidad (46 leptospiras / campo) que las observadas en el grupo control (75 leptospiras / campo) y en todos los casos se recuperaron leptospiras al cultivo.

Análisis *in silico* y filogenético de GspD de *L. borgpetersenii*

Predicción de la secuencia de aminoácidos de GspD_L y su comparación con las bases de datos, mostró un 47.0 % de homología con GspD de *E. coli* y otras bacterias Gram negativas como *Shigella* 49.0 %, *Yersinia* 48.0 %, *Shewanella* 48.0 % y *Pseudomonas* 44.0 % entre otras. Se identificó una región conservada hacia el extremo C-terminal, del aminoácido 283 al 557, característica común para diferentes secretinas (Figura 56). La predicción del peso molecular de GspD_L de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo fue estimada en 66.7 kDa por el programa [ScanSite pl/Mw](http://ca.expasy.org/cgi-bin/peptide-mass.pl) en el sitio Expasy.^f La predicción del peso molecular de GspD_L de *L. borgpetersenii* fue similar a la predicción obtenida para sus homólogos en las serovariedades Copenhageni y Lai de *L. interrogans*; 66.5 y 68.7 kDa, respectivamente. Mientras que la secretina GspD de *E. coli*, tiene un peso molecular de 70.7 kDa (Chen *et al.*, 2006).

```
MYGTISQFSIFRIFPILILLFLVWDKPVFPQSKKKSSVKTRSATAPEEPAEKSFYANWRDTELNDFLKGMSAIL
KKNILLDESLKGGKITIISQKEIPIKNAFIFMKS SVLES LGFGVVEE PDLISIVKIKDALARSPVVRVGKELIPE
TEVG DYRTITQI IPIENTKPEELEPILKRLTSPNTDVIVYRNTNTIVLSGSGADINKLLVLINELDLKLEEASP
GAIASAGDVHIYTLHSEAEKIAATLVKLDNPVVQSEELSPEKKVPGQIPMKVEKIKAVGHKESNSVIVTATNA
EWAEIRKIIKVLD SARKQVLLLEVLIVELTSSDLNDFGIDWRYKGEAFGQFN SGLSKEANI INSNQINPNVNTL
SGFSLGFLKAGSEQIIGILSANQGNENFNVL SAPQVLTVDNQEAEISVGQDVPVVRTQSRNAGTGGTNAVTV DNY
EYRPTGIKLFKFTPHVNKNNRITL E L F Q E I K N I A E I A L A G G N P T F N R R E I K T S I S I E N T Q S I V I G G L I S N D K Q K R
I I K I P F L G D I P Y L G H L F K R T T E K I K K T N L M V F I T P H I L D S R E N A D K M T V K K M L Q E Q Y E L E R E R I L N K E K E I K S
FFEKED
```

Figura 56. Secuencia de aminoácidos de GspD_L de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo. El color azul muestra el dominio conservado que se ubica hacia el extremo C-terminal del aa 283 al aa 257. Obtenida con el programa CDD del NCBI.

^f <http://ca.expasy.org/cgi-bin/peptide-mass.pl>

El análisis de la relación filogenética con base en el gen *rrs* entre *Leptospira* y diferentes bacterias Gram negativas (*Alcanivorax*, *Aeromonas*, *Azoarcus*, *Burkholderia*, *Candidatus*, *Chlamydia*, *Cytophaga*, *E. coli*, *Legionella*, *Mixococcus*, *Neisseria*, *Photorhabdus*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Shewanella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Xanthomonas* and *Yersinia*), mostró que *Leptospira* forma un grupo genético con los géneros *Cytophaga*, *Chlamydia*, *Mixococcus* y *Candidatus* (Figura 57). En contraste, el filograma de *gspD* con los mismos géneros muestra a *Leptospira* en un grupo genético junto con *E. coli*, *Aeromonas*, *Shigella*, *Shewanella*, *Yersinia*, *Borkholderia*, *Ralstonia* y *Mixococcus* (Figura 58).

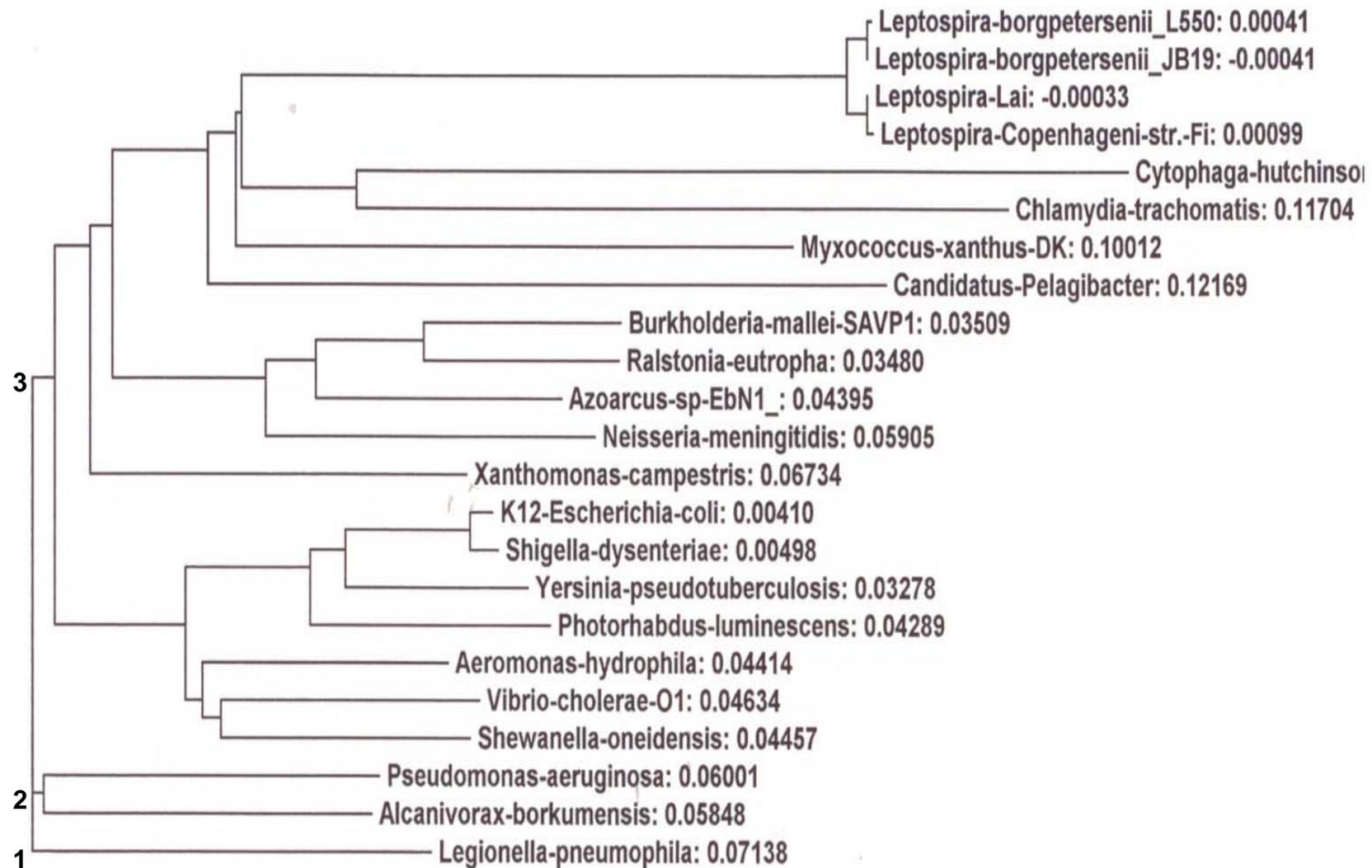


Figura 57. Árbol filogenético de *Leptospira* y diferentes bacterias Gram negativas que poseen genes del T2SS, usando el gen *rrs* (ARN 16S). Elaborado en el programa Clustal W.

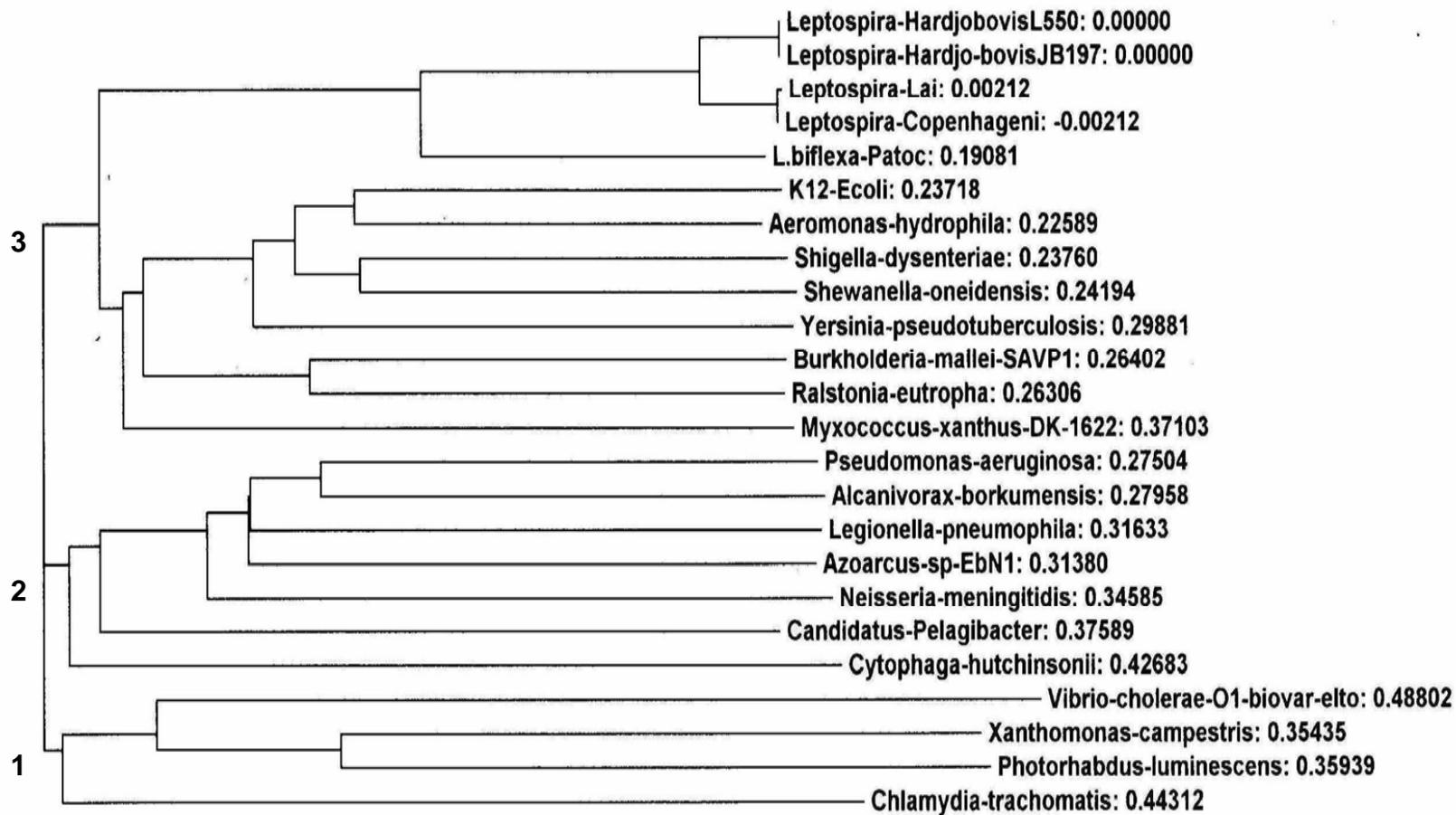


Figura 58. Árbol flogenético de *Leptospira* y diferentes bacterias Gram negativas que poseen genes del T2SS, usando la secuencia de *gspD*. Elaborado en el programa Clustal W.

X. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se reporta la clonación y expresión *in vitro* de *gspD_L* de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo subtipo Hardjobovis en *Escherichia coli*, cepa de expresión Rosetta DE3 *codon plus*. La estrategia para amplificar un fragmento de 1,533 pb del gen *gspD_L* a partir de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo cepa L550, se basó en el diseño de dos iniciadores con sitios de corte para dos diferentes enzimas de restricción, con la finalidad de lograr la clonación de manera orientada de un fragmento de 1,515 pb de *gspD_L* en el vector de expresión pET28a.

El empleo de la técnica de PCR como herramienta para una detección específica del inserto en las colonias transformantes, facilitó la selección de las colonias que contenían al plásmido recombinante (pAL208) durante los escrutinios. Una vez lograda la obtención de pAL208, la determinación de la secuencia de nucleótidos del fragmento clonado y la verificación de su orientación y fidelidad, permitió iniciar los ensayos de expresión de la proteína recombinante (rGspD_L).

Los ensayos iniciales de expresión de rGspD_L se realizaron en la cepa de expresión C43 de *Escherichia coli*, la cual es una cepa lisogena del fago T7, lo que permite sintetizar la enzima T7-ARN polimerasa, la cual reconoce de manera específica, al promotor T7, ubicado en el vector de expresión pET28a (pAL208) y una vez que se une a éste, puede iniciar la transcripción del gen clonado. Sin embargo, C43 tiene un diferente tipo de codones útiles para su síntesis proteica, lo cual se vio reflejado en una nula producción de rGspD_L en los ensayos de expresión. Diversos ensayos de expresión en *E. coli* C43, empleando diferentes concentraciones de IPTG, diferentes temperaturas y tiempos de incubación, resultaron insatisfactorios, como lo demostró la inmunodetección tipo Western, utilizando anticuerpos monoclonales, anti-T7-HRP y anti-His-HRP.

Por esta razón, fue necesario analizar el uso de codones en la secuencia clonada y realizar el análisis comparativo con los codones en uso en *E. coli*. El análisis de la frecuencia en el uso de codones del fragmento clonado (*gspD_L*) determinó que existían diferencias con respecto al uso en *E. coli*, en particular en la frecuencia de uso para el aminoácido arginina. El uso de la cepa Rosetta DE3 *codon-plus* de *E. coli* (*Novagene*), la cual posee un plásmido que codifica para diferentes tRNAs que en condiciones naturales *E. coli* no posee (amplio uso de codones) le permitió la expresión de rGspD_L. La confirmación de la expresión se realizó mediante ensayos de inmunodetección tipo Western, utilizando anticuerpos monoclonales anti-T7-HRP y anti-His-HRP.

Para fines prácticos, fue la detección del promotor T7 (basada en la detección de 11 aminoácidos que conforman el péptido T7), la que resultó de mayor utilidad, para confirmar la expresión de rGspD_L, en subsecuentes ensayos realizados.

Resultó evidente que el uso de codones, fue la causa por la cual, en la cepa C43 no se logró la expresión de rGspD_L, ya que el mismo plásmido recombinante pAL208, al ser introducido en las cepas Rosetta y pLysS, derivó en la expresión de rGspD_L, aunque en esta última, la expresión fue menos eficiente. Inicialmente, una concentración de 10 mM IPTG permitió inducir la expresión de rGspD_L en la cepa Rosetta después de 3 h a temperatura ambiente. En ensayos posteriores, disminución de la concentración a 5 mM y 2.5 mM IPTG, con 16 h de incubación a TA en agitación orbital, también permitió la expresión de rGspD_L.

Una estrategia que favorece la expresión de rGspD_L, consiste en la inactivación de la ARN polimerasa de *E. coli* mediante la acción de antibiótico rifampicina.²⁶⁸ La T7 ARN polimerasa se muestra refractaria a la acción inhibitoria de la rifampicina por lo que continua transcribiendo al gen clonado ubicado sobre vector. La posible utilidad de rGspD_L para desarrollar un inmunoensayo enzimático con fines diagnósticos,

demandaría una disponibilidad constante de proteína purificada. Es por eso, que la implementación de procedimientos que permitan hacer más eficiente la producción de rGspD_L, como ésta metodología, podrían mejorar el rendimiento de cada ensayo de expresión, a fin de lograr una producción sistematizada y que a su vez, facilite posteriormente la purificación de la proteína recombinante.

Por otro lado, el uso de la tecnología molecular para obtener una proteína recombinante más pura, puede ser el siguiente paso. La síntesis de proteínas en sistemas libres de células, también conocidos como sistemas de traducción rápida (STR) han venido a revolucionar la síntesis de proteínas recombinantes con fines de inmunoprotección. Estos sistemas combinan una serie de nuevas tecnologías para hacer más eficiente y optimizar la expresión de proteínas. A diferencia de otros sistemas libres de células que han sido utilizados en años anteriores, los sistemas STR han desarrollado una metodología basada en la optimización del templete, generando de este modo, templetos de expresión estables, optimización de las condiciones de expresión *in vitro* y alto rendimiento en la expresión de proteínas recombinantes mediante el principio de intercambio continuo libre de células.²⁶⁹ Los STR se fundamentan en el uso de reacciones acopladas de transcripción / traducción para la síntesis de proteínas *in vitro* en sistemas libres de células. Mientras la T7 ARN polimerasa transcribe el templete del gen, ribosomas obtenidos de un lisado de *E. coli*, inician la traducción en el extremo 5' del ARNm naciente. Esto hace al sistema más eficiente comparado con el uso de ARNm aislado, debido a la dependencia de la estabilidad del ARNm. Un lisado de *E. coli* ha derivado en un alto rendimiento y permite la expresión de proteínas a partir de templetos lineales generados mediante PCR y a partir de plásmidos recombinantes. La síntesis *in vitro* de la proteína recombinante puede ser escalada de µg a mg cuando son necesarias mayores concentraciones de la proteína. La obtención de una proteína más pura,

permitiría desarrollar la producción de anticuerpos monoclonales con un alto grado de especificidad, para detectar proteínas homólogas en diferentes serovariedades e implementar su uso en pruebas de ELISA, así como ensayos de inmunohistoquímica. Otra alternativa sería la utilización de la proteína purificada sola, o en combinación con otras proteínas expresadas mediante este sistema, para evaluar su potencial inmunogénico en algún modelo animal.

Los antígenos sobre la superficie de *Leptospira* son importantes considerando que interaccionan con las células del hospedero infectado, en el contexto de patogénesis e inmunidad que se desarrollan de manera simultánea. Proteínas como LipL32, LipL21, y LipL41 entre otras, han sido consideradas posibles candidatos para el desarrollo de inmunógenos, toda vez que se ha confirmado su localización sobre la superficie de *Leptospira*, en la que, al conjunto de proteínas expuestas en su superficie se le ha denominado superficioma.²⁷⁰ Debido a su importante participación en el proceso de secreción de proteínas, así como a su ubicación sobre la ME, la secretina GspD_L del T2SS de *Leptospira*, podría considerarse como un antígeno de interés para estudios de antigenicidad e inmunogenicidad.^{238,270}

El primer indicio de la presencia del T2SS en *Leptospira* fue la homología en la secuencia de aminoácidos de pL18 de *L. interrogans*, con la proteína GspG de *E. coli*.²⁵⁶ En el mismo año 2002, a partir de un análisis bioinformático del genoma de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo (Hardjobovis) cepa L550, se identificó el MAL completo, correspondiente a pL18 y una serie de 14 MAL contiguos, que conformaban un *locus* en el que los diferentes genes mostraban homología con genes del T2SS de *E. coli* y *Pseudomonas*. Tres MAL en dirección corriente arriba del MAL de pL18, se identificó un MAL que mostró homología con *gspD* de *E. coli*, el cual codifica para GspD (la secretina del T2SS), una proteína con una localización superficial en la ME.

Posteriormente, la secuencia de los genomas de *L. interrogans* serovariedades Lai y Copenhageni, reveló que ambas serovariedades poseen 17 MAL contiguos en su respectivo *locus gsp*.^{119,139} Mientras que se confirmó la organización del *locus gsp* con 14 MAL contiguos en la secuencia del genoma de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo,¹⁴⁰ los cuales guardan relación con el ordenamiento del operón que codifica para el secretón del T2SS, reportado en diversas bacterias Gram negativas. La relevancia de este hallazgo pudiera tener una inferencia directa con patogenicidad en *Leptospira*, ya que está reportado que diversas toxinas y enzimas extracelulares, como la toxina CLT de *Vibrio cholerae*,²⁷¹ la toxina LT de *E. coli* enterotoxigénica²⁷² o la enzima elastasa, exotoxina A, fosfolipasa C, fosfatasa alcalina y lipasas producidas por *Pseudomonas aeruginosa*,^{185,273} son secretadas a través del T2SS.

Por otro lado, en el año 2006 fue relevante la detección de los genes que constituyen el *locus gsp* en *L. biflexa* (especie no patógena de *Leptospira*), ya que se determinó la secuencia completa de los genes *gspD* y *gspE*, y fragmentos aledaños de los genes *gspC* y *gspF*.²⁵⁵ Estos resultados confirman que el T2SS de *Leptospira*, no es exclusivo de serovariedades patógenas, como había sido previamente demostrado en bacterias Gram negativas no patógenas como *Acinetobacter calcoaceticus*, que secreta estearasa y lipasa,¹⁸³ *Pseudomonas alcaligenes*, la cual secreta Lipasa LipA²³¹ y *Pseudomonas putida*, que secreta una enzima oxidante de manganeso.²³¹

Leptospira sintetiza diversas enzimas hidrolíticas como lipasas, catalasa, citocromo oxidasa y hialuronidasa entre otras, las cuales podrían ser secretadas a través del T2SS.

A pesar de que se encontraron varios de los genes del T2SS en *L. biflexa*, éstos muestran cierta divergencia con sus homólogos en serovariedades patógenas. El

alineamiento usando el programa BLASTn de *gspD* de la serovariedad Patoc con sus homólogos en las serovariedades patógenas de *L. interrogans*, reveló cuatro fragmentos con porcentajes de identidad de 72.0 %, 75.0 %, 75.0 % y 88.0 %. En tanto que, el alineamiento del mismo gen con su homólogo en *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo, reveló dos fragmentos con identidades de 72.0 y 76.0 %. Por otro lado, la identidad general entre *gspD* de serovariedades patógenas y no patógenas, fue a nivel de 59.0 % con el programa Clustal W.²⁵⁵ En el mismo estudio, las identidades de *gspE* de la serovariedad Patoc y sus homólogos en serovariedades patógenas de *L. interrogans*, mostraron el mismo nivel de identidad de 82.0 % por medio del programa BLASTn, a diferencia de Hardjobovis donde el alineamiento de los dos fragmentos reveló identidad de 73.0 %. La identidad general entre *gspE* de serovariedades patógenas y no patógenas, fue a nivel de 66.0 % con el programa Clustal W.²⁵⁵ El porcentaje general de identidad para *gspD* entre serovariedades patógenas y no patógenas, resultó menor al obtenido para ambos tipos de serovariedades con *gspE*, lo cual es un resultado normal, si se considera que la proteína GspD es altamente específica para el tipo de proteínas sintetizadas y que deben ser secretadas por una bacteria en particular. El extremo N-terminal de GspD presenta mayores variaciones, probablemente debido a que es la porción que interacciona con los diferentes sustratos que son transportados a través de esta secretina. De ahí que, cuando una secretina es intercambiada entre bacterias estrechamente relacionadas, el resultado sea pérdida de la capacidad secretora del T2SS.²³⁰ En cambio, GspE es una ATPasa cuya estructura y funcionamiento es similar entre miembros de diferentes familias, lo cual podría explicar en cierta forma, la mayor identidad de esta proteína.

Estos resultados demuestran la presencia del T2SS en *Leptospira*, un grupo de espiroquetas que incluye tanto serovariedades patógenas, como serovariedades de

vida libre, que posee mecanismos de regulación genética, todavía no muy bien conocidos y como género posee una gran diversidad antigénica, si se considera que existen más de 250 serovariedades patógenas y más de 60 serovariedades saprófitas, las cuales habitan tanto en diferentes reservorios animales, como en diferentes nichos acuáticos de prácticamente todo el mundo. Profundizar en el estudio del T2SS en *Leptospira*, permitirá establecer su participación, con respecto a diferentes mecanismos de virulencia, así como en diversas funciones metabólicas que actualmente tienen soporte en los estudios realizados en otras bacterias.

El análisis bioinformático de diferentes genomas secuenciados, ha revelado que genes del T2SS, son comunes, pero de ninguna manera universales en bacterias Gram negativas. Recientes estudios funcionales indican que el T2SS puede promover la virulencia en bacterias patógenas de humanos, animales y plantas, así como ser de utilidad para la fisiología de varias bacterias ambientales.^{274,275,276,277}

Bacterias como *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Vibrio* y *Aeromonas*, han sido modelos de estudio para el entendimiento de los componentes del T2SS así como para los mecanismos del proceso de secreción.¹⁷⁶

Anteriormente, el estudio del T2SS estaba restringido a 8 especies de bacterias pertenecientes al grupo de las γ -proteobacterias.¹⁷⁹ Una revisión de la literatura junto con un examen de 230 genomas completos registrados en las bases de datos del NCBI, reveló que genes del T2SS se encuentran presentes en muchas bacterias Gram negativas. Como se evidenció en los primeros estudios realizados, el T2SS es totalmente prevalente entre el grupo de las γ -proteobacterias, del cual, los 15 géneros representativos son: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Idiomarina*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Methylococcus*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Vibrio*, *Xanthomonas*, *Xylella* y *Yersinia*. De igual forma, este tipo de genes se ha identificado en el grupo de las α -proteobacterias, en el que los géneros

representativos incluyen a: *Bradyrhizobium*, *Caulobacter*, *Gluconacetobacter* y *Mesorhizobium*; en las β -proteobacterias que incluya a los géneros: *Azoarcus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium* y *Ralstonia*; en las δ -proteobacterias: *Bdellovibrio bacteriovorus* y *Geobacter sulfurreducens*. En la mayoría de los microorganismos antes mencionados se han identificado los genes que codifican para todas las proteínas que constituyen el secretón (T2SS: C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M y O). Estas evidencias sugieren fuertemente la presencia de un T2SS funcional en estas bacterias. Además, se ha demostrado en un número creciente de microorganismos que diferentes tipos de enzimas secretadas así como otro tipo de proteínas son dependientes del T2SS.¹⁷⁸

El número de proteínas conocidas y secretadas a través de un T2SS particular, varía de una, en el caso de *Klebsiella oxytoca*, a 11 en el caso de *Legionella pneumophila*. Por otra parte, en los últimos años, ha sido mayor el interés por la variedad y tipo de proteínas secretadas mediante el T2SS. Entre las enzimas que se han identificado se encuentran: aciltransferasas, amilasas, quitinasas, celulasas, pectin-lisas, enzimas ADP-ribosilantes, proteasas, lipasas, fosfolipasa A y C, lisofosfolipasas, fosfatasa ácida y alcalina, así como nucleasas, las cuales tienen en común naturaleza degradativa, que es lo que ocasiona daño a tejidos del hospedero.¹⁸⁰

En contraste, se han presentado casos donde un T2SS aparentemente completo no es funcional; o bien, la actividad de secreción se encuentra disminuida, como en el caso de *Burkholderia*, en donde al comparar los genes del T2SS entre diferentes especies, se observó que *B. mallei* presentaba una mutación en el MAL correspondiente a T2SS J y una inserción de 54 bases en el MAL correspondiente a T2SS L, lo cual explicaba la baja actividad secretoria que tiene este microorganismo.¹⁸² En contraparte, hay algunas bacterias en las cuales, de 1 a 3 de los genes que codifican para componentes del secretón, están ausentes, con base

en los resultados negativos en el programa BLAST del NCBI, usando como modelo secuencias de proteínas del T2SS. Específicamente, en *Azoarcus*, *Chromobacterium*, *Mesorhizobium*, *Yersinia pestis* y *Yersinia pseudotuberculosis*, se ha determinado la ausencia del gen que codifica para T2SS M,^{278,279} en *Acinetobacter* y *Bdellovibrio* hay aparentemente ausencia de los genes que codifican para T2SS L y M (NCBI); *Gluconacetobacter* evidenció ausencia de T2SS K;¹⁸⁴ *Methylococcus* carece de T2SS C (NCBI) y *Bradyrhizobium*, no poseía los genes correspondientes a T2SS C, I y M (NCBI). Estas aparentes ausencias de genes del T2SS en los géneros bacterianos antes mencionados, no necesariamente significan que estas bacterias carezcan de un sistema funcional, ya que actividades de secreción han sido asociadas con genes del T2SS de *Acinetobacter* y *Gluconacetobacter*.^{183,184}

Peabody *et al.* (2003) reportaron en algunas bacterias la presencia del *locus* T2SS pero incompleto, lo cual no permite establecer claramente que el sistema sea funcional. En *Aquifex aeolicus* se encontraron genes que mostraron homología con los genes que codifican para las proteínas T2SS D, E, F, G y O.¹⁷⁸ En *Thermotoga maritima* se encontraron los genes que codifican para T2SS D, E, F y G y en los géneros *Chlamydia* y *Chlamydomphila* los genes correspondientes a T2SS C, D, E, F y G.¹⁷⁸

Por otro lado, es de alguna forma posible que un conjunto de genes homólogos al T2SS, pero incompleto, por ejemplo T2SS D, E, F, G, H, I, J, K y O sea indicativo de síntesis de pili tipo 4 o de un sistema de captación de ADN.¹⁸⁰

En contraparte, genes del T2SS parecen estar ausentes en diferentes tipos de bacterias como: **α -proteobacterias:** *Agrobacterium tumefaciens*, *Anaplasma marginale*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Ehrlichia ruminantium*, *Gluconobacter oxydans*, *Rhodopseudomonasa palustris*,

Rickettsia conorii, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia typhi*, *Silbacter pomeroyi*, *Sinorhizobium meliloti*, *Wolbachia pipientis* y *Zymomonas mobilis*; **β -proteobacterias:** *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella pertussis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis*; **γ -proteobacterias:** *Buchnera sp.*, *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Mannheimia succiniciproducens*, *Pasteurella multocida*, *Photorhabdusa luminescens*, *Salmonella enterica* serovariedades Paratyphi, Typhi y Typhimurium, *Shigella flexneri* y *Wigglesworthii glossinidi*; **δ -proteobacterias:** *Desulfotalea psychrophila* y *Desulfovibrio vulgaris*; **ϵ -proteobacterias:** *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter hepaticus*, *Helicobacter pylori* y *Wollinella succinogens*; **Spirochaetes:** *Borrelia burgdorferi*, *Treponema denticola* y *Treponema pallidum*; **Bacteroides:** *Bacteriodes fragilis* y *Bacteriodes thetaiotamicron*, *Porphyromonas gingivalis*; **Chlorobi:** *Chlorobium tepidum*; **Fusobacterias:** *Fusobacterium nucleatum*. No se ha encontrado el T2SS en bacterias Gram positivas cuyo genoma ha sido secuenciado, ni en mollicutes como *Mycoplasmas* y *Ureaplasmas*.

Aunque hay una tendencia en el patrón de orden de los genes del T2SS, se ha observado algunas variaciones en la ubicación y unión de estos.¹⁷⁹

Un hallazgo relevante ha sido la presencia múltiple del T2SS en algunas bacterias. *Ps. aeruginosa*, *Ps. putida*, *R. solanacearum*, *X. axonopodia* y *Y. enterocolitica*, las cuales portan dos *loci* de genes del T2SS, cada uno aparentemente con distintas funciones secretoras.^{185,186,187} El segundo T2SS de *Ps. putida* por ejemplo, es más notable para el funcionamiento en la aparente ausencia de los genes que codifican para las proteínas T2SS C, L y M.¹⁸⁷

Genes que codifican para los componentes centrales del T2SS, están presentes en bacterias patógenas de mamíferos, peces y plantas, lo cual denota su importancia

en la funcionalidad del T2SS. Mutaciones en genes específicos del T2SS atenúan considerablemente la virulencia de bacterias patógenas como en el caso de la mutación en el gen que codifica para la secretina GspD de *E. coli* enterotoxigenica (ETEC), impidió por completo la secreción de la enterotoxina LT, mientras que la complementación de la cepa mutante con el gen *gspD* original, reestableció la secreción de la enterotoxina LT.²⁷² De igual forma, una mutante de *L. pneumophila* carente de la proteína F (GspF), fue incapaz de sobrevivir en los pulmones de ratones infectados experimentalmente.²⁸⁰

Entre las bacterias que usan el T2SS para causar enfermedad en humanos, se encuentran patógenos natos como *V. cholerae*²⁷¹ y oportunistas como *K. oxytoca*.²⁴⁴ Entre los patógenos de plantas, hay bacterias con un amplio rango de hospederos como *R. solanacearum* y patógenos específicos para un tipo de planta en particular como *E. carotovora*.¹⁸⁰

La participación del T2SS en el desarrollo de enfermedades se ha reportado en neumonías por *L. pneumophila* y *Ps. aeruginosa*,^{185,280} infecciones en el tracto urinario por *E. coli*,²⁷² diarrea acuosa por *V. cholera*.²⁷¹ Por lo tanto, la importancia del T2SS en la patogénesis bacteriana no está restringida a un sitio en particular de infección o proceso patogénico. Procesos facilitados por el T2SS incluyen: destrucción de tejidos, citotoxicidad, adherencia, diseminación y transmisión del microorganismo que lo posee (Sandkvist, 2001),¹⁷⁹ características que también han sido reportadas a lo largo del tiempo en serovariedades patógenas del género *Leptospira*. Además de ser ampliamente utilizado por bacterias patógenas extracelulares, el T2SS puede promover el desarrollo en nichos intracelulares como es el caso de *L. pneumophila*.²⁸⁰ En el caso de infección en humanos, hay también efectores liberados a través del T2SS, que se contraponen a la inmunidad innata, por ejemplo, la proteasa StcE de *E. coli* entero hemorrágica (EHEC), la cual inhibe

la activación de la ruta clásica del complemento al actuar sobre el inhibidor de estearasa C1 que regula al sistema de Complemento y otros mecanismos de la inflamación.²⁸¹ Así mismo, la proteasa ProA/Msp de *L. pneumophila*, inhibe el estallido oxidativo, al producir una disminución en la producción de aniones superóxidos e inhibir la quimiotaxis de células polimorfonucleares.²⁸⁰ Es por eso que, la presencia del T2SS en bacterias patógenas ha demostrado ser relevante y en algunos casos, ser crucial para la patogénesis. De ahí la importancia del estudio del T2SS en serovariedades patógenas de *Leptospira*, ya que a través de éste, se podrían liberar diferentes componentes con capacidad de causar daño en diferentes tejidos o bien, llevar a cabo la secreción de enzimas necesaria para su desarrollo en tejidos animales y el medio. Aunque en *L. biflexa* (no patógena), también posee genes del T2SS, la participación de este último puede estar dirigida a la secreción de enzimas metabólicas, como se ha reportado en diferentes bacterias no patógenas.^{274,275,276}

El T2SS puede trabajar solo o junto con otros sistemas de secreción para lograr una condición de virulencia más completa, por ejemplo, los sistemas de secreción 2 y 4 (T2SS y T4SS), son operativos en *L. pneumophila*;^{282,283,284} los sistemas de secreción 2 y 3 (T2SS y T3SS) son funcionales en *X. campestris*;¹⁸⁶ mientras que los sistemas 1, 2, 3 y 5 (T1S, T2SS, T3SS Y T5SS), han sido reportados en *B. pseudomallei* y *Ps. aeruginosa*.^{267,285} Análisis bioinformáticos realizados a partir de las secuencias de los cuatro genomas de serovariedades patógenas de *Leptospira*, confirman que ésta posee los sistemas de secreción tipos 1 y 2 (T1SS y T2SS), pero no existen evidencias de los sistemas 3, 4 y 5. Sin embargo, es necesario caracterizar funcionalmente los sistemas 1 y 2, para conocer el tipo de proteínas secretadas y su efecto, sobre los tejidos del hospedero, lo cual mejoraría el entendimiento de

diferentes aspectos del proceso de infección y desarrollo de la leptospirosis en diferentes especies de animales domésticos y silvestres, así como en el humano.

Estudios recientes han dado a conocer que el T2SS puede promover el desarrollo de bacterias en diferentes nichos ambientales. El rango de bacterias de vida libre incluye a bacterias habitantes del agua y el suelo (*Acinetobacter calcoaceticus*, *Shewanella oneidensis*); bacterias comensales de plantas (*Ps. fluorescens*); bacterias simbiotes de plantas (*Bradyrhizobium japonicum*); bacterias simbiotes de animales (*Vibrio fischeri*); e incluso, bacterias que actúan como parásitos de otras bacterias (*Bdellovibrio bacteriovorus*). A pesar de formar un grupo bacteriano con diferentes nichos ambientales, este tipo de bacterias son metabólicamente diversas y se encuentran en ambientes extremos. Estas incluyen a bacterias anaerobias, desnitrificantes (*Azoarcus*); fijadoras de nitrógeno (*Bradyrhizobium japonicum*) y bacterias metanotróficas (*Methylococcus capsulatum*) entre otras.^{274,275,276}

Ha sido demostrado que el T2SS puede promover la persistencia de *L. pneumophila* en hábitats acuáticos, con la capacidad de desarrollarse a bajas temperaturas, así como la facilidad para infectar y multiplicarse en huéspedes eucarióticos, entre los que se incluyen células mononucleares de humanos y una amplia variedad de protozoarios de la familia *Amoebae*.^{286,287} En el caso de *Leptospira*, no se ha demostrado la capacidad de desarrollo intracelular, sin embargo, es una bacteria acuática y puede permanecer viable en ambientes acuáticos con temperaturas bajas.

Podríamos concluir que el T2SS esta presente en una amplia variedad de bacterias Gram negativas, funcionando como un importante sistema de secreción especializado, que es operativo en bacterias patógenas y no patógenas, promoviendo funciones asociadas con daño en diferentes tejidos de huéspedes animales y plantas, así como participando en diversos procesos metabólicos en

bacterias no patógenas, además de promover la persistencia de diversas bacterias en distintos nichos ambientales. A pesar de estos importantes hallazgos, muchas preguntas permanecen sin ser contestadas, ¿Qué importantes descubrimientos vendrán con el análisis de nuevos genomas?, ¿Cuáles son los efectores en aquellos microorganismos que poseen genes del T2SS, pero que no han sido caracterizados funcionalmente?, ¿Qué resultados revelará el desarrollo de mutantes específicas en el T2SS al ser probadas en diferentes modelos animales?, ¿Qué otros procesos patogénicos no conocidos, facilitados por el T2SS, favorecen que se desarrollen infecciones intracelulares o extracelulares en bacterias similares a *L. pneumophila*. ¿Qué otras funciones tiene el T2SS en bacterias de vida libre?, ¿Cómo es regulado en T2SS en respuesta a cambios en los estímulos externos?, interrogantes que aplican para el género *Leptospira*. Por el momento, desconocemos el tipo de proteínas transportadas y más aún, si el T2SS es funcional. Sin embargo, la presencia del *locus gsp* tanto en especies patógenas como en no patógenas del género *Leptospira*, podría ser indicativo de un sistema funcional, tanto para la secreción de proteínas con actividad biológica productora de daño en tejidos específicos del huésped, como para la secreción de enzimas con actividad metabólica. El desarrollo de herramientas moleculares para lograr la mutagénesis dirigida en serovariedades patógenas de *Leptospira*, las cuales se encuentran disponibles únicamente para *L. biflexa*,^{288,289} permitirá en serovariedades patógenas, la caracterización funcional de aquellos genes relacionados con virulencia, así como un mejor entendimiento de la patogénesis de *Leptospira*.

Con relación a las secretinas, éstas, se constituyen por complejos de una proteína en particular, por lo que se han denominado complejos homomultiméricos. Inicialmente, análisis de microscopia electrónica mostraron que los complejos de secretina consistían de doce subunidades.^{199,290} Sin embargo, estudios

posteriores²⁰³ demostraron que las secretinas involucradas en la biogénesis de fagos filamentosos forman un complejo con 14 pliegues simétricos, a través de la ME de *E. coli*. Estos resultados indican que los complejos de secretina pueden ser diferentes, dependiendo de la naturaleza de la secretina, por lo que no es posible generalizar sobre una estructura única (12 o 14 subunidades).

El tratamiento con proteasa de las secretinas XcpQ de *Ps. aeruginosa* y PulD de *Klebsiella oxytoca*, resultó en la detección de un fragmento resistente a la acción de la proteasa, el cual aparecía todavía como un complejo. Este fragmento representó exactamente el dominio de homología C-terminal. El análisis de microscopía electrónica de este complejo proteasa-resistente reveló estructuras en forma de anillo con dimensiones similares al complejo intacto. Subsecuentemente, mediciones de dicroísmo circular indicaron que este complejo tiene una conformación de hoja- β , lo cual confirmó la predicción de la estructura para esta región.¹⁹⁸ Esto probablemente significa que el dominio C-terminal de las secretinas forma un β -barril, análogo a otras proteínas de la membrana externa.²⁹¹ Éstos y otros resultados culminaron en un modelo para la estructura de secretinas. En este modelo, el dominio C-terminal de XcpQ forma un β -barril que está incluido en la membrana externa. Esta porción C-terminal está separada del dominio del N-terminal por una región de enlace. La mitad del dominio N-terminal de la proteína se extiende al interior del periplasma y probablemente interactúe con otros componentes de la maquinaria de secreción. La porción extrema del dominio C-terminal de la proteína también se dirige hacia el periplasma. Se ha demostrado que este dominio interactúa con lipoproteínas específicas.²⁹²

Para determinar si la cavidad central observada en el análisis de microscopía electrónica realmente formaba un canal, experimentos electrofisiológicos fueron llevados a cabo. La inserción de complejos de secretina purificados en bicapas de

lípidos resultó en la presencia de canales conduciendo iones activados por voltaje.^{198,210,293} Estos resultados demostraron que las secretinas forman un canal de transporte real en la membrana externa. Esta conclusión fue elegantemente confirmada por experimentos con el pili tipo IV de *Neisseria gonorrhoeae*. Usando mutantes de *N. gonorrhoeae* incapaces de sintetizar la secretina PilQ y la proteína PilT para la retractación del pili tipo IV, las fases intermedias de la biogénesis del pili pudieron ser recuperadas y observadas (Estas bacterias produjeron estructuras de pili tipo IV; sin embargo, los filamentos ensamblados fueron retenidos en el periplasma debido a la ausencia de la secretina PilQ.²⁹⁴

Normalmente, la expresión de la secretina, incluso en la ausencia de proteínas accesorias, no produce un aumento en la permeabilidad de la membrana externa o pérdida de proteínas periplásmicas, Wall *et al.*, (1999);²⁹⁵ Bitter W., (resultados no publicados).

¿Cómo es que sucede esto?. En primer lugar, la máxima conductancia de los canales observada en los experimentos sobre bicapas lipídicas planas, obtuvo un valor más bajo que el que se esperaría para canales de ese tamaño,^{198,210} lo cual indica que la cavidad central no es sólo un poro abierto. Además, el canal de la secretina mostró un incremento no lineal en la conductancia cuando el voltaje fue aplicado a través de la membrana. Esto indica que la conformación del canal no es constante sino que varía, dependiendo del potencial de membrana aplicado. Adicionalmente, el análisis computacional de pseudo-cristales formados por la secretina XcpQ, mostró la presencia de masas hacia el interior de la partícula,¹⁹⁸ lo cual demuestra que la aparente cavidad central de la secretinas no forma un poro abierto. Estos resultados muestran que las secretinas forman canales en la membrana externa, los cuales sin embargo, son estrictamente canales de conductancia regulados. El soporte para esta hipótesis se obtuvo con el análisis de

una mutación específica en la proteína pIV.²⁹³ Aunque esta proteína mutante no dañó la biogénesis del fago, la permeabilidad de la membrana externa fue significativamente aumentada.²⁹³ Estos datos también muestran que proteínas accesorias de las diferentes maquinarias de secreción, no forman alguna clase de tapón que participe en la obstrucción del canal en la membrana externa, formado por el complejo de la secretina. Sin embargo, estas proteínas podrían tener una función en la apertura y cerrado de este canal.

Aunque la inmunidad humoral (por sus siglas en Inglés, Th2) es al parecer dominante en la protección contra la infección con leptospiras patógenas,⁴⁸ la participación de la inmunidad mediada por células (por sus siglas en Inglés, Th1) ha mostrado ser relevante en la infección con *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo en la especie bovina,²⁹⁶ por lo que esta comenzando a ser estudiada.

Leptospira es considerada una bacteria extracelular, sin embargo, investigaciones realizadas sugieren que el interferón gamma (por sus siglas en Inglés, INF- γ), que tiene una participación importante en la respuesta inmune Th1, es producido en respuesta a la infección con leptospiras patógenas. La producción de INF- γ es altamente controlada por diferentes citocinas producidas por macrófagos. De estas, la interleucina 12 (IL-12) es el más fuerte inductor de la liberación de INF- γ . Otras citocinas involucradas en la síntesis de INF- γ incluyen a IL-18, IL-15 y el factor de necrosis tumoral alfa (por sus siglas en Inglés, TNF- α).^{297,298}

Antes de la década de los ochentas, se pensaba que la inmunidad protectora contra la leptospirosis se debía a la producción de anticuerpos dirigidos contra el lipopolisacárido (LPS), mismos que a su vez habían demostrado una inmunidad pasiva en algunos modelos animales en los que se observó protección específica contra diferentes serovariedades patógenas. Sin embargo, Bolin and Alt, (2001) demostraron que altos títulos de anticuerpos anti-LPS inducidos posterior a la

inmunización con bacterinas convencionales, no eran protectores contra el desafío con *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo. En contraste, la inmunización de bovinos con una vacuna monovalente elaborada con *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo, demostró protección contra la infección con la serovariedad homóloga, evitando la colonización renal, eliminación urinaria y además confirió protección transplacentaria al feto, siendo una respuesta de tipo Th1 la que se indujo.²⁹⁶ Aunque linfocitos T citotóxicos CD8 e INF- γ son ambos particularmente importantes en el control y eliminación de infecciones virales, bacterias intracelulares y protozoarios. El INF- γ puede participar también en la protección contra bacterias extracelulares a través de su habilidad para activar macrófagos en los cuales incrementa la eficiencia de eliminación al estimular la producción de óxido nítrico y además estimular la producción de inmunoglobulina de la clase IgG2, la cual se ha sugerido que participa en la inmunidad hacia las formas extracelulares de *Babesia bigemina*. Tanto la IgG2 como la IgG1 tienen la capacidad de fijar el complemento, que a su vez puede ser un importante mecanismo efector para el control de leptospiras. IgG2 bovina también actúa como opsonina, de forma tal que potencialmente puede conllevar a un incremento en el número de leptospiras fagocitadas.²⁹⁹ Naimann *et al.* (2001) al vacunar bovinos con un aislado inactivado de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo subtipo Hardjobovis, encontraron una fuerte respuesta en células mononucleares de sangre periférica (CMSP), aunado a un incremento en la producción de INF- γ por linfocitos T CD4+, lo cual es un indicativo de la inducción de una respuesta inmune de tipo Th1. Es por eso que se ha sugerido que en el caso de los bovinos, una respuesta de tipo Th1 puede ser necesaria para lograr una protección eficaz contra la infección con la serovariedad Hardjo.³⁰⁰ Las vacunas de nueva generación contra la leptospirosis bovina, deben lograr inducir una respuesta inmune protectora, que evite la infección y la consecuente eliminación urinaria de

leptospiras, que comúnmente implica riesgos para el humano, en el que ya ha sido documentada la infección con la serovariedad Hardjo.³⁰¹

Por otro lado, se ha demostrado que *Leptospira interrogans* serovariedad Rachmati induce la producción de INF- γ y TNF- α *in vitro*.³⁰² La producción de INF- γ fue grandemente dependiente de la síntesis de IL-12 y el patrón de citocinas inducido por *Leptospira*, corresponde a citocinas características de una respuesta de tipo Th1.

Es conocido que los biológicos disponibles para prevenir la leptospirosis evitan la manifestación de la enfermedad, sin embargo, no evitan la infección con diferentes serovariedades patógenas de *Leptospira*, no contenidas en el biológico. Es por eso, que la especificidad de las diferentes serovariedades de *Leptospira*, limita la eficacia de aquellos biológicos elaborados a base de leptospiras completas inactivadas. Dicha especificidad para cada serovariedad, esta mediada por el principal antígeno de este género, el lipopolisacárido (LPS). La principal ventaja de las proteínas de la ME sobre el LPS, es que pueden inducir una respuesta inmune protectora contra el desafío con una serovariedad heteróloga en el modelo animal.³⁰³ Por lo cual, los candidatos actuales para la obtención de antígenos que induzcan una respuesta inmune protectora contra la infección con diferentes serovariedades patógenas, para el desarrollo de vacunas sub-celulares, lo constituyen las proteínas de ME. La identificación de proteínas inmunogénicas ubicadas en la superficie de la ME, las cuales se encuentren conservadas entre diferentes serovariedades patógenas, de manera que induzcan protección cruzada entre serovariedades sin generar efectos secundarios, es un interés actual para los diferentes grupos de investigación en el mundo. La primera evidencia del uso potencial de proteínas de ME para inducir protección contra la infección con leptospiras patógenas, fue la inmunización de hámsteres con las proteínas recombinantes OmpL1-LipL41, lo cual reveló un efecto

sinérgico que indujo una protección del 71.0 % de los animales inmunizados, posterior al desafío con la cepa homóloga correspondiente a la serovariedad Grippotyphosa, comparado con una supervivencia del 25.0 % en el grupo no inmunizado. En este estudio, no se logró un efecto protector cuando se utilizó de manera individual ambas proteínas.³⁰⁴ Posteriormente, se determinó que el suero de pacientes con leptospirosis confirmada, presentó anticuerpos que interaccionaron con ambas proteínas.

La vacunación de gerbos (*Meriones unguiculatus*) utilizando adenovirus recombinantes expresando LipL32, indujo protección en el 87.0 % de los animales inmunizados. De esta forma, la inmunización con adenovirus expresando LipL32 derivada de la serovariedad Autumnalis, confirió inmunidad protectora contra el desafío con una cepa heteróloga correspondiente a la serovariedad Canicola de *L. interrogans*.³⁰⁵ En contraste, tanto la inmunización de gerbos con OmpL1, como con OmpL1-LipL32, no indujo el mismo efecto protector que la inmunización únicamente con LipL32, lo cual difiere de los resultados obtenidos con la sinergia de OmpL1-LipL41.³⁰⁵

Por otro lado, LipL32 recombinante mostró una buena sensibilidad y especificidad cuando se utilizó en pruebas de ELISA para detectar IgG en casos de leptospirosis humana.³⁰⁶

Proteínas similares a las inmunoglobulinas, denominadas proteínas LigA y LigB, también se encuentran expuestas en la superficie de la ME. Estas se caracterizan por poseer dominios de 90 aminoácidos similares a los que poseen las inmunoglobulinas.²⁶³ Dichos dominios bacterianos similares a los de las inmunoglobulinas son encontrados en varias proteínas de adhesión de bacterias patógenas, como la intimina de *E. coli*³⁰⁷ y la invasina de *Yersinia pseudotuberculosis*³⁰⁸ y pueden funcionar como moléculas de adhesión. El uso de

las proteínas Lig para la inmunización en un modelo animal, resultó en una respuesta inmune protectora contra el desafío, no solo con la serovariedad homóloga, sino también con una serovariedad heteróloga del serogrupo *Icterohaemorrhagiae*.³⁰⁹

En el presente estudio, un estudio piloto de la inmunización de hámsteres con rGspD_L de la serovariedad Hardjo, resultó en una supervivencia del 100 %, en contraste con el grupo no inmunizado con rGspD_L, que tuvo una supervivencia de 33.0 % posterior al desafío con una cepa virulenta heteróloga, correspondiente a la serovariedad Canicola. La respuesta inmune inducida por GspD_L evitó la muerte de los animales desafiados, así como la manifestación de enfermedad, que si se presentó en los animales no inmunizados con rGspD_L después del desafío. Los resultados preliminares obtenidos en este ensayo piloto de inmunoprotección, resultan favorables en primera instancia, si se considera que la búsqueda de nuevos antígenos de *Leptospira* que constituyan candidatos para el desarrollo de vacunas sub-celulares deben inducir una respuesta inmune protectora hacia diferentes serovariedades patógenas.^{270,305,310}

El curso clínico de la infección con leptospiras patógenas, es dependiente de la dosis infectante en animales de experimentación. Dosis superiores a 10⁸ leptospiras, ocasionan la muerte de los animales, de manera rápida y sin signología clínica previa en 24 a 48 horas. Dosis menores a 10⁸ leptospiras, ocasionan manifestaciones clínicas como pérdida de peso, ictericia, inactividad, arqueamiento dorso-lumbar y pelo hirsuto entre otros, que hacen evidente la infección. Dosis menores a 10³ leptospiras, resultan en la ausencia de signos, con colonización renal y la consecuente eliminación de leptospiras a través de la orina.⁴⁸

Aunque hay evidencias de que no todas las leptospiras pueden ser eliminadas uniformemente por la presencia de anticuerpos específicos, leptospiras que

persisten a pesar de la presencia de anticuerpos, podrían representar posibles mutantes antigénicas resistentes al efecto de eliminación, inducido por la presencia de anticuerpos específicos. Así mismo, leptospiras patógenas tienen la capacidad de persistir en el hospedero, al colonizar sitios privilegiados del organismo, en los cuales no puede tener alcance la respuesta inmune, como lo son los túbulos renales.⁴⁸ No obstante que la inmunización con rGspD_L evitó la muerte de los animales desafiados y el desarrollo de la enfermedad, la respuesta inmune inducida, no evitó la colonización renal con leptospiras. Una posible hipótesis, es que no enfermaron debido a una reducción del número de leptospiras del inóculo, mediante la respuesta inmune inducida por rGspD_L, lo cual impidió que éstas alcanzaran niveles tóxicos. Sin embargo, dicha respuesta inmune, no tuvo la capacidad de eliminar a la totalidad de las leptospiras, las cuales lograron llegar al riñón, su órgano blanco, colonizándolo. La presencia de leptospiras en el riñón, se limita a un proceso local, que solamente ocasionará manifestaciones clínicas sistémicas, cuando el daño en este órgano vital sea considerable. Es posible que una dosis más alta de lo requerido, como la dosis utilizada de la cepa LOCaS 46R para el desafío, haya influido en este resultado. Es necesario repetir el ensayo de inmunoprotección con rGspD_L de *L. borgpeterseni* serovariedad Hardjo Hardjobovis, utilizando grupos con un mayor número de animales y con el previo establecimiento de la dosis letal 50.0 % (LD₅₀) para la cepa LOCaS 46R, de manera que pueda ser establecido si esta proteína puede tener una utilidad con fines de protección contra la infección con serovariedades patógenas de *Leptospira*. La evaluación de la capacidad inmunogénica de un antígeno tiene un comienzo y los resultados obtenidos del ensayo piloto de inmunoprotección con rGspD_L, constituyen el inicio de esta evaluación. Como ya se ha mencionado, el interés mundial por diferentes grupos de investigación esta dirigido hacia aquellas proteínas ubicadas en la superficie de la

ME, conservadas entre diferentes serovariedades patógenas, de manera que logren inducir una protección cruzada hacia diferentes serovariedades sin generar efectos secundarios. rGspD_L de la serovariedad Hardjo ha mostrado una naturaleza conservada a nivel genético e inmunológico entre serovariedades patógenas e indujo protección contra el desafío con una cepa virulenta correspondiente a la serovariedad Canicola, es decir, una cepa heteróloga. Referente al reconocimiento de rGspD_L por la respuesta inmune de hospederos mamíferos, ensayos de inmunodetección tipo Western utilizando antisueros anti-Hardjobovis y anti-rGspD_L producidos en conejo, así como sueros de bovinos con títulos \geq a 1:800, revelaron en los tres casos, la detección de rGspD_L. Estos resultados indican que anticuerpos del tipo IgG presentes en el suero de animales con exposición a la serovariedad Hardjo detectados mediante la prueba AM, reconocieron a rGspD_L. Sin embargo, fue necesario repetir este ensayo, utilizando el suero de animales infectados que garantizara la presencia de *Leptospira* en los animales y la respuesta inmune hacia GspD_L. Fue de nuestro interés evaluar sueros de perros y hámsteres infectados con serovariedades patógenas de *Leptospira* mediante inmunodetección tipo Western, utilizando rGspD_L para determinar indirectamente su expresión *in vivo* y su probable aplicación diagnóstica en el desarrollo de un ensayo inmunoenzimático (ELISA). Al utilizar el suero de perros de la Ciudad de México, a partir de los cuales se había logrado el aislamiento de cepas patógenas de *Leptospira*,²⁶⁴ en ensayos de inmunodetección tipo Western, se obtuvo en todos los casos, la detección de la proteína rGspD_L. De igual forma, los sueros de hámsteres infectados experimentalmente con la cepa virulenta LOCaS 46R aisladas a partir de dichos perros, también detectaron la proteína rGspD_L de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo, mientras que los sueros de hámsteres no infectados, no la detectaron. El estímulo antigénico por *Leptospira* durante un proceso infeccioso,

revela el tipo de componentes que son expresados en su superficie, hacia los cuales se desarrolla una respuesta inmune específica. La detección de rGspD_L utilizando el suero de animales infectados, es una evidencia de que el suero de dichos animales, presentó anticuerpos contra rGspD_L, lo cual a su vez demuestra, que es reconocida por la respuesta inmune del hospedero, como ha sucedido con otras proteínas expuestas en la superficie de *Leptospira* como OmpL1-lipL41, LipL32 y las proteínas Lig.^{165,306,309} Así mismo, ensayos de inmunohistoquímica realizados, utilizando el suero hiperinmune anti-rGspD_L en cortes histológicos de riñones de hámsteres infectados con leptospiras patógenas (comunicación personal),⁹ confirmaron la expresión *in vivo* de GspD_L en la superficie de *Leptospira* durante el proceso de infección. La localización en la ME de una proteína, no garantiza su reconocimiento al enfrentarla al suero de animales infectados con la bacteria de la cual procede, como es el caso de LipL36, una lipoproteína de la ME de serovariedades patógenas de *Leptospira*, la cual al ser enfrentada al suero de pacientes infectados, no fue detectada. La razón fue su localización, ya que al estar ubicada en la parte interna de la ME, durante la infección no está expuesta a para ser reconocida por la respuesta inmune del huésped, por lo tanto, no se producen anticuerpos contra ésta. La detección de una proteína con peso cercano a los 66 kDa, la cual pudiera corresponder a GspD_L en preparaciones de ME de la serovariedad Hardjo y diferentes serovariedades patógenas, aunado a la inmunodetección de GspD_L a partir de tejido renal de hámsteres infectados mediante inmunohistoquímica, confirma su localización en la superficie de la ME de *L. borgpetersenii* serovariedad Hardjo, Hardjobovis.

La prueba AM detecta anticuerpos aglutinantes de tipo IgM dirigidos contra el LPS, mientras que los antígenos proteicos son detectados primordialmente por

⁹ (Alcaráz Sosa LE, 2007, comunicación personal)

anticuerpos de tipo IgG.¹⁶⁶ La presencia de anticuerpos de tipo IgG en sueros de bovinos con títulos iguales o menores a 1:50 en la prueba AM, los cuales detectaron a rGspD_L, podría ser un indicativo de la exposición de estos animales a *Leptospira* Hardjo, esto aunado a la condición del bovino como huésped de mantenimiento para esta serovariedad. Los anticuerpos policlonales producidos contra rGspD_L, serán de utilidad para la estandarización de un inmunoensayo enzimático.

La transferencia horizontal de genes en bacterias, es un mecanismo que contribuye de manera importante a la evolución de las bacterias y su efecto puede ser mayor que el obtenido por mutaciones discretas a pequeña escala en algún grupo de genes en particular, ya que puede tener un papel crucial en la habilidad de las bacterias para invadir nuevos nichos. Algunos de los genes transferidos pueden tener una relación directa con patogenicidad, contribuyendo además a la evolución de cepas no patógenas hacia cepas patógenas.³¹¹

El número de genes en los genomas bacterianos, no es estable, muchos genes pueden ser deletados, duplicados o insertados a lo largo del tiempo, dando origen a diferencias genotípicas y fenotípicas en especies bacterianas relacionadas. Dos mecanismos generales están involucrados en la generación de nuevos tipos evolutivos, duplicación/modificación de genes y adquisición de genes de origen exógeno mediante transferencia horizontal, dando como resultado, nuevas funciones para el microorganismo que los adquiere y en algunos casos, permitiendo la adaptación a nuevas condiciones ambientales.^{312,313} De igual forma, inserciones y deleciones como resultado de la transferencia horizontal de genes, contribuyen de manera importante, a las variaciones en el tamaño de los genomas y adquisición de nuevas propiedades patogénicas.³¹⁴

Serovariedades patógenas de *Leptospira* poseen organización genética distinta a la de otros miembros del orden *Spirochaetales*, como son, ausencia de plásmidos, dos

cromosomas circulares de aproximadamente 4.3 y 0.35 Mb y su genoma posee rearrreglos con la participación de elementos de inserción (IS) que dan origen a una diversidad genética.³¹⁵ Bulach *et al.*, (2006)¹⁴⁰ sugieren que *L. borgpetersenii* está llevando a cabo un proceso de reducción de su genoma mediado por IS, dando como resultado, la pérdida de genes con funciones sensoras del ambiente y metabólicas, los cuales le permitirían adaptarse a diferentes condiciones en el medio ambiente. La ausencia de estos genes, obliga a *L. borgpetersenii* a una dependencia hacia las condiciones encontradas dentro de su hospedero, dificultando su supervivencia por largos periodos fuera del hospedero, a pesar de haber condiciones de humedad en el ambiente, limitando así su transmisión a un ciclo de hospedero a hospedero. En contraste, *L. interrogans* puede estar llevando a cabo una expansión de su genoma a través de eventos de duplicación y adquisición de genes, como ha sido evidenciado por la presencia de nuevos genes, incluyendo potenciales genes de fagos.^{119,139} Esta expansión del genoma de *L. interrogans* refleja considerables diferencias con respecto a su capacidad para adaptarse a diferentes condiciones ambientales, manteniéndose viable, fuera de hospederos mamíferos, en condiciones de humedad.¹⁴⁰ Posiblemente, al tener la capacidad de mantenerse en el ambiente por mayor tiempo, *L. interrogans* se expone con mayor oportunidad a la transferencia horizontal de genes, provenientes de microorganismos que igualmente se mantienen en el medio ambiente, durante semanas o meses como las enterobacterias. El hallazgo en *L. interrogans* de homólogos de los genes *deVS* y *devR* que le permiten a *Myxococcus* mantenerse viable en el agua, en ausencia de nutrientes, podría ser resultado de una transferencia horizontal, entre bacterias que se comparten el mismo nicho ambiental.

Haake *et al.*, (2004) encontraron que la secuencia del gen *ompL1* de *Leptospira*, presentaba una composición de mosaico consistente con transferencia horizontal de

ADN, a partir de especies relacionadas. Segmentos de este gen, que codifican para dos asas expuestas en la superficie, fueron probablemente adquiridas por transferencia horizontal a partir de un alelo peregrino de un ancestro desconocido.³¹⁶ De la Peña *et al.*, (1999),¹²⁸ encontraron que genes del *locus rfb* para la biosíntesis del LPS de *L. interrogans* serovariedad Hardjo (Hardjoprajitno) fueron posiblemente adquiridos por transferencia horizontal a partir de Hardjobovis (*L. borgpetersenii*) a un ancestro de la serovariedad Copenhageni, lo cual le permitió a esta serovariedad la capacidad de adaptarse al hospedero bovino, dando así origen a la serovariedad Hardoprajitno.¹²⁸ Estos resultados, al parecer muestran que la transferencia horizontal de genes como mecanismo, ha contribuido a la evolución de *Leptospira* en aspectos de supervivencia y adaptación a nuevos nichos, variación antigénica, metabolismo y patogenicidad como ha sucedido en otras bacterias.

El análisis filogenético de GspD realizado en el presente trabajo, mostró una evidente cercanía entre *E. coli*, diferentes enterobacterias y *Leptospira*, comparado con el patrón del gen *rrs* para las mismas bacterias, lo cual podría sugerir un posible evento de transferencia horizontal de genes *gsp* entre *Leptospira* y miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Aunque ha sido confirmado que genes del T2SS se encuentran en una vasta mayoría de bacterias, localizados en el cromosoma, se identificó la presencia de genes del T2SS en *E. coli* O157:H7 codificados en el plásmido pO157.³¹⁷ Schmidt *et al.*, (1997) identificaron en el plásmido pO157 de *E. coli* entero hemorrágica (EHEC) una región de 14,162 pb con 15 MAL, de los cuales, 13 MAL mostraron homología con genes del T2SS.³¹⁸ Los diferentes genes del T2SS de pO157 mostraron un alto grado de homología a los genes del T2SS en *Klebsiella pneumoniae* (M32613), *Aeromonas hydrophila* (X66504), *Erwinia chrysanthemi* (L02214) y *Erwinia caratova* (X70049), con rangos de identidad de 40.0 % a 90.0 %. Los genes fueron designados de *etpC* a *etpO* en orden alfabético, por la analogía

mostrada con el *locus pul* del género *Klebsiella*.³¹⁸ Aunado a esto, la presencia de elementos IS aledaños al *locus etp*, sugiere que el grupo de genes del T2SS identificados en pO157, sea parte de un *cassette* de genes de virulencia, intercambiable entre plásmidos de EHEC y posiblemente también con otras bacterias. La relevancia de este hallazgo, tiene inferencia directa en la transferencia y distribución de genes del T2SS entre bacterias Gram negativas.

CONCLUSIONES

Se logró la clonación y expresión de rGspD_L de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo (Hardjovovis) en *Escherichia coli* cepa Rosetta DE3 *codon plus*.

GspD_L de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo (Hardjovovis) es una proteína antigénica, conservada entre diferentes serovariedades patógenas de *Leptospira* y expresada durante la infección.

rGspD_L fue reconocida por la respuesta inmune de huéspedes mamíferos, como bovinos, conejos, hámsteres y perros de acuerdo con los resultados de los ensayos de inmunodetección tipo Western.

El hecho de que GspD_L sea la única proteína del T2SS ubicada sobre la ME, plantea la posibilidad de estudiarla como un potencial antígeno proteico inmunogénico, que pudiera ser importante para la opsonización y eliminación de leptospiras patógenas.

Es necesario realizar un ensayo de inmunoprotección en el modelo animal, a mayor escala, utilizando a rGspD_L para determinar si verdaderamente induce una respuesta inmune protectora.

Comparación de los árboles filogenéticos del gen *rrs* y *gspD* sugieren la adquisición horizontal de GspD en *Leptospira*, a partir de miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.

REFERENCIAS

1. Bustamante ME. La nueva epidemiología de la fiebre amarilla. Tres casos de enfermedad de Weil. Gaceta Médica de México. 1937; 67:10-24.
2. Noguchi H, Klieger J. Immunological studies with a strain of *Leptospira* isolated from a case of yellow fever in Mérida, Yucatán. J Exp Med 1920; 32:627-637.
3. Gastélum BJ. Fiebre icterohemorrágica en el estado de Sinaloa. Trabajo presentado en el X Congreso Médico Nacional (edición especial) 1933.
4. Varela G, Vázquez A. Nota preliminar acerca de la leptospirosis en la ciudad de México. Med Rev Mex 1953; 33:679:291.
5. Varela G, Curbelo A, Vázquez A, Guzmán NE. Estudios de leptospirosis en las ciudades de Veracruz, Tampico y México de la República Mexicana". Rev Inst Salud Enf Trop 1954;14:123-131.
6. Varela G, Vázquez A, Mancera L. Investigación de aglutininas para L. icterohaemorrhagiae, L. pomona y L. canícola en sueros humanos y de animales en diferentes Estados. Rev Inst Salud Enf Trop 1958; 3:112-115.
7. Mendoza HP, Varela G, Méndez D. Estudios de leptospirosis en la ciudad de México. Rev Inst Salud Enf Trop 1958; 18:37-39.
8. Varela G, Zavala J. Estudios serológicos de leptospirosis en la República Mexicana. Rev Inst Salubr Enf Trop 1961; 31:49-52.

9. Zavala VJ, Bolio CA, Suárez HG. Leptospirosis en Yucatán. Informe de un caso clínico. *Patología* 1976a;14:131.
10. Zavala VJ, Caballero GC, Sánchez V. Leptospirosis en el estado de Chiapas, México. *S Pub Mex* 1976b;18:989-998.
11. Zavala VJ, Herrera HJ, Laviada FA. Leptospirosis humana en el Estado de Yucatán. Reporte de dos casos. *Rev Invest Clin Mex* 1977; 29:161-164.
12. Zavala VJ, Sosa LJ, Barrera PM, Bolio CA, Laviada AA. Leptospirosis humana en el Estado de Yucatán. Presentación de dos nuevos casos y revisión clínica. *Rev Invest Clin Mex* 1985; 37:353-357.
13. Zavala VJ, Vado SI, Rodríguez AE, Barrera PA. Leptospirosis anictérica en un brote epidémico de dengue en la Península de Yucatán. *Rev Biomed* 1998; 9:78-83.
14. Flisser A, Velasco VA, Martínez CC, González DF, Briceño GB, García SR, Caballero SA, Hernández MI, García LH, Gutiérrez CL, Rodríguez AG, López MI, Galindo VS, Vázquez CR, Balandrano CS, Guzmán BC, Olivo DA, De la Rosa JL, Magos C, Escobar GA, Correa D. Infectious Diseases in Mexico. A Survey from 1995-2000. *Arch Med Res* 2002; 33:343-350.

15. Zaiz Z. Contribución al estudio de la incidencia de leptospirosis en ganado bovino (tesis de licenciatura). México, D. F. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 1962.
16. Varela G, Roche E. Estudio serológico de leptospirosis en la República Mexicana. *Sal Pub Mex* 1965; 7:189-193.
17. Zavala VJ, Pinzón CJ, Flores CM, Damián CAG. La leptospirosis en Yucatán. Estudio serológico en humanos y animales. *S Pub Mex* 1984; 26:254-259.
18. Vado SI, Cárdenas MMF, Laviada MH, Vargas PF, Jiménez DB, Zavala VJ. Estudio de casos clínicos e incidencia de leptospirosis humana en el Estado de Yucatán, México durante el período 1998 a 2000. *Rev Biomed* 2002; 13:157-164.
19. Moles y CLP, Puebla CMA, Gavaldon RD, Rojas SN, Torres BJI. Estudio serológico de Leptospirosis bovina en México. *Rev Cub Med Trop* 2002; 54:24-27.
20. Luna AMA, Salazar GF, Moles CLP, Nava VC. Influencia de los factores ecológicos en la presentación de la leptospirosis bovina en México. Memorias del XXVIII Congreso Nacional de Buiatría; 2004 agosto 12-14; Morelia (Michoacán) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC, 2004:131.
21. Varela S. Leptospirosis en la República Mexicana. *Rev Salud Pub Mex* 1965; 2.

22. Rodríguez y HG. Exploración serológica de leptospirosis y brucelosis en ganado bovino y porcino con historia clínica de aborto (tesis de licenciatura). México, D. F. México: Escuela Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1969.
23. Bobadilla JZ. Estudio serológico de la leptospirosis por la técnica de aglutinación microscópica en ganado bovino del norte de Sinaloa (tesis de licenciatura). México, D.F. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 1978.
24. Dorantes AL. Estudio retrospectivo de leptospirosis en el centro de recría de becerras de la cuenca lechera de Tizayuca, Hidalgo de enero 1977 a diciembre de 1983 (tesis de licenciatura). México, D.F. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 1985.
25. Álvarez VY. Estudio serológico para la detección de anticuerpos contra *L. interrogans* en ganado de lidia por medio de la prueba de aglutinación microscópica (tesis de licenciatura). México, D. F. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1985.
26. Vázquez JC. Diagnóstico de prevalencia de *Leptospira* en ganado bovino de la tierra caliente del estado de Guerrero para su prevención y control (tesis de licenciatura). México, D.F. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 1986.

27. Sánchez BHF. Estudio de la frecuencia de casos positivos a leptospirosis bovina en 14 estados de la República a partir de 1400 sueros sospechosos (tesis de licenciatura). México, D.F. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 1987.
28. Mendoza LA. Prevalencia de reactores positivos a *Leptospira interrogans* en bovinos Holstein en el Centro Nacional para la Enseñanza, Investigación y Extensión de la zootecnia (tesis de licenciatura). México, D. F. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 1987.
29. Fernández LJJ. Detección de anticuerpos contra *L. interrogans* en bovinos de hatos lecheros en el valle de Atlixco Puebla mediante la prueba de aglutinación microscópica (tesis de licenciatura). México, Memoxpan San Pedro Cholula, Puebla: Escuela Superior de Medicina Veterinaria y Zootecnia, A. C., 1991.
30. Arteaga TG. Leptospirosis bovina en el complejo agroindustrial Tizayuca, Hidalgo: Prevalencia y consideraciones epidemiológicas (tesis de maestría). México, D. F. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 1991.
31. Torres AF. Frecuencia de leptospirosis en bovinos productores de leche con problemas reproductivos, en una explotación de Ixtapaluca, Estado de México. Mediante un diagnóstico integral de leptospirosis (tesis de licenciatura). México, D. F. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 1995.

32. Hernández GE, Rodríguez REA, Jiménez FF, De la Peña MA. Perfil del serodiagnóstico de leptospirosis en animales de 1989 a 1996. Memorias de la XXXIII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria; 1997 noviembre 3 – 8; Veracruz (Veracruz) México. SARH, UNAM, PAIEPEME, UAM, GOBIERNO DEL ESTADO DE VERACRUZ, CP, 1997:300. 1996.
33. Esparza VJC. Comparación de la seropositividad contra leptospirosis en humanos, bovinos y roedores de la cuenca de Xochimilco (tesis de licenciatura). México, D. F. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1998.
34. Moles CLP, Baéz RUA, Urrutia VRM, Luna AMA, Gavaldón RD, Cisneros MP, Torres BJI. Distribución de la leptospirosis bovina en 10 ranchos del estado de Tabasco. Memorias del XXIII Congreso Nacional de Buiatría; 1999 Agosto 18 – 21; Aguascalientes (Aguascalientes) México. Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC, 1999.
35. Torres BJI, Arias IJ, Moles CLP, Gavaldón RB, Cisneros PMA. Evidencias serológicas de leptospirosis en ganado bovino del estado de Querétaro. Memorias del XXIII Congreso Nacional de Buiatría; 1999a Agosto 18 – 21; Aguascalientes (Aguascalientes) México. Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC, 1999:51-53.
36. Moles CLP, Torres BJI. Situación actual de la leptospirosis en el estado de Sonora y su repercusión en salud pública. Memorias de la XXXVI Reunión Nacional de Investigación Pecuaria; 2000b noviembre 7 – 10; Hermosillo

(Sonora) México. SARH, UNAM, PAIEPEME, UAM, GOBIERNO DEL ESTADO DE SONORA, CP, FUPRO, 2000:1-8.

37. Córdova LD, Urrutia VRM, Moles CLP, López MJ, Zacarias ML, Mojarro JJ. Datos preliminares de la prevalencia de leptospirosis bovina en la ganadería del estado de Guanajuato. Memorias de la XXXVI Reunión Nacional de Investigación Pecuaria; 2000 noviembre 7 – 10; Hermosillo (Sonora) México. SARH, UNAM, PAIEPEME, UAM, GOBIERNO DEL ESTADO DE SONORA, CP, FUPRO, 2000:51.

38. Gutiérrez CHAJ. Evaluación de la calidad fisicoquímica y bacteriológica de la leche producida en una región tropical con ganado bovino, considerando prácticas de ordeño y salud animal. (tesis de maestría). México, D. F. México: Escuela Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 2001.

39. Moles CLP, Báez RUA, Urrutia VRM, Luna AMA, Gavaldón RD. Análisis serológicos de leptospirosis en ranchos de ganado bovino de Tabasco, México. XXXIX Reunión Nacional de Investigación Pecuaria; 2003 noviembre 12 – 14; México (Distrito Federal) México. SARH, UNAM, PAIEPEME, UAM, SAGARPA, CENID-MICROBIOLOGÍA INIFAP, CP, UACH 2003:34..

40. Robles GJJ. Análisis de la información sobre estudios serológicos para *Leptospira interrogans* serovariedad Hardjo, por medio de la prueba de microaglutinación, en el Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal, México, de 1983 a 1992 (tesis de licenciatura). México, D. F. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 2003.

41. Escamilla HP. Frecuencia y causas de aborto de origen infeccioso en un hato de bovinos en el estado de Querétaro (tesis de licenciatura). México, D. F. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 2004.
42. Moles y CLP, Hernández VJ, Gavaldón RD, Torres BJI, Rojas SN, Cadena LJG. Resultados preliminares del seroperfil de leptospirosis bovina realizado en el centro de recría en Tizayuca, Hidalgo. Memorias del XXVIII Congreso Nacional de Buiatría; 2004 agosto 12-14; Morelia (Michoacán) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC, 2004:129. 2004.
43. Córdova IA, Cano MS, Moles CLP, Torres BJI, Rodríguez AG, Ávila GJ y Pérez GJF. Diagnóstico de leptospirosis en ganado bovino productor de carne. Memorias del XIX Congreso Nacional de Buiatría; 2005 agosto 10-13; Puebla (Puebla) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC, 2005:(Memorias electrónicas).
44. Carmona GCA, De la Peña MA. Frecuencia de anticuerpos contra *Leptospira spp.* en una unidad de producción lechera del centro de México. Memorias del XIX Congreso Nacional de Buiatría; 2005 agosto 10-13; Puebla (Puebla) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC, 2005:(Memorias electrónicas).
45. Torres BJI, Moles CLP, Rojas SN, Benavides PL, Estrada CJD, Melgarejo GE. Importancia de un aislamiento nacional de *Leptospira interrogans* serovariedad

Hardjo Hardjoprajitno en el diagnóstico de la leptospirosis bovina. Memorias del XIX Congreso Nacional de Buiatría; 2005 agosto 10-13; Puebla (Puebla) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC, 2005:(Memorias electrónicas).

46. Levett PN. Leptospirosis. Clin Microbiol Rev 2001; 14:296-326.

47. Bharti AR, Nally EJ, Ricardi NJ, Matthias AM, Diaz MM, Lovett AM, Levett NP, Gilman HR, Willig RM, Gotuzzo E, Vinetz MJ. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. Lancet Infect Dis 2003; 3:757-771.

48. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and Leptospirosis. MediSci, Melbourne, Australia 1999.

49. Adler B, De la Peña-Moctezuma A. *Leptospira*. In: Gyles CL, Prescott J, Songer J, Thoen C. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 385 - 396. Blackwell Publishing. Ames, Iowa, USA, 2004.

50. Ellis WA. The diagnosis of leptospirosis in farm animals. In: The present state of leptospirosis diagnosis and control. Martinus Nijhoff Publishers. Brussels (Luxembourg). 1986: 13-24.

51. Little TWA. Changes in our understanding of the epidemiology of leptospirosis. In: Ellis WA, Little TWA, eds. The present state of leptospirosis diagnosis and control. Amsterdam: Martinus Nijhoff Publishers, 1986:149-74.

52. Ellis WA, Michna SW. Bovine leptospirosis: Infection by the Hebdomadis serogroup and abortion. A herd study. *Vet Rec* 1976; 99:409-412.
53. Higgins RJ, Harbourne JF, Little TW, Stevens AE. Mastitis and abortion in dairy cattle associated with *Leptospira* of the serotype Hardjo. *Vet Rec* 1980; 107:307-310.
54. Smith CR, McGowan MR, McClintock CS, Corney BG, Ketterer PJ, Smythe L, Ward W. Experimental *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo infection of pregnant cattle. *Aust Vet J* 1997; 75:822-826.
55. Karaseva EV, Chernukha GY, Piskunova AL. Results of studying the time of survival of pathogenic leptospira under natural conditions. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immun* 1973; 17:339–345.
56. Faine S. Guidelines for the control of leptospirosis. Edit. World Health Organization. Offset publication No. 67 Geneva (Switzerland): WHO, 1982.
57. Kaiser GE, Doetsch RN. Enhanced translational motion of *Leptospira* in viscous environments. *Nature* 1975; 255: 656-657
58. Greenberg EP, Canale-Parola E. Relationship between cell coiling and motility of spirochetes in viscous environments. *J Bacteriol* 1977; 131:960–969.
59. Petrino MG, Doetsch RN. "Viscotaxis" a new behavioral response of *Leptospira interrogans (biflexa)* strain B16. *J Gen Microbiol* 1978; 109: 113-117.

60. Trueba GA, Zapata SE, Madrid K, Cullen PA, Haake DA. Cell aggregation: a potential mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. *Int Microbiol* 2004; 7:35-40.
61. Ellis WE. Clinical leptospirosis in animals. En memorias del: Segundo Taller Internacional y Segunda Reunión Científica. Leptospirosis, Habana 2004; 2004 mayo 17-28; La Habana, Cuba.
62. Rocha RMJ, Ríos GAM, Moles y CLP, Cisneros PMA, Rojas SN, Torres BJ, Sánchez MMC. Identificación serológica de una cepa de *Leptospira interrogans* aislada de un bovino por sueros homólogos. Memorias del XVII Congreso Nacional de Buiatría; 1992, Villahermosa (Tabasco) México. México (DF): Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC, 1992: 210-212.
63. Rojas SN, Cisneros PMA, Moles y CLP, Gavaldón RD, Luna AMA, Torres BJI. Situación actual de la leptospirosis en México. Memorias del XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias; 1994 octubre 9-15; Acapulco (Guerrero) México. México (DF) Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. 1994: 531-532.
64. Webster JP, Ellis WA, Macdonald DW. Prevalence of *Leptospira* spp. in wild brown rats (*Rattus norvegicus*) on UK farms. *Epidemiol Infect* 1995; 114:195-201.

65. Nieto H. Epidemiología de la leptospirosis. Boletín de temas de salud de la Asociación de Médicos Municipales de la Ciudad de Buenos Aires. Suplemento del Diario del Mundo Hospitalario; 2001.
66. Ruiz PH, Puc FM, Flores AJ, Vado SI, Cardenas MM. Isolation of *Salmonella enterica* and serologic reactivity to *Leptospira interrogans* in Opossums (*Didelphis virginiana*) from Yucatán, México. Rev Inst Med trop S Paulo 2002; 44:235-237.
67. Vinetz JM. Leptospirosis. Curr Opin Infect Dis. 2001; 14:527- 538.
68. Johnson M, Smith H, Priya J, Gilman H, Bautista CT, Campos KJ, Céspedes M, Klatsky P, Vidal C, Terry H, Calderon MM, Coral C, Cabrera L, Parmar PS, Vinetz JM. Environment exposure and leptospirosis, Peru. Emerg Infect Dis. 2004; 10:1016-22.
69. Thierman AB. Leptospirosis. Clin Infec Dis 1995;21:1-6.
70. Western K. Vigilancia epidemiológica con posterioridad a los desastres naturales. Oficina Panamericana Sanitaria. Organización Mundial de la Salud. Pub. Científica No. 420, 1970.
71. McBride AJA, Athanazioa AD, Reis GM, Ko AI. Leptospirosis. Curr Opin Infect Dis 2005; 18:376-386.

72. Plank R, Dean D. Overview of the epidemiology, microbiology and pathogenesis of *Leptospira spp.* in humans. *Microb Infect* 2000; 2:1265-1276.
73. Morgan J, Bornstein SL, Karpati AM, Bruce M, Bolin CA, Austin CC, Woods CW, Lingappa J, Langkop C, Davis B, Graham DR, Proctor M, Ashford DA, Bajani M, Bragg SL, Shutt K, Perkins BA, Tappero JW. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. *Clin Infect Dis* 2002; 34:1593-1599.
74. Sejvar J, Bancroft E, Winthrop K, Bettinger J, Bajani M, Bragg S, Shutt K, Kaiser R, Marano N, Popovic T, Tappero J, Ashford D, Mascola L, Vugia D, Perkins B, Rosenstein N. Leptospirosis in "Eco-Challenge" athletes, Malaysian Borneo, 2000. *Emerg Infect Dis* 2003; 9:702-707.
75. Vinetz JM, Glass GE, Flexer CE, Muller P, Kaslow DC. Sporadic urban leptospirosis. *Ann Intern Med* 1996; 125:794-798.
76. Ko AL, Galvao RM, Ribeiro DCM, Johnson WD, Riley LW. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. *Lancet* 1999; 354:820-825.
77. Torres BJI. La leptospirosis bovina. Memorias del Primer Seminario-Taller Nacional sobre el Diagnóstico y Control de la Leptospirosis; 1997 julio 23 al 25; México (DF) Universidad Autónoma Metropolitana.

78. Jost BH, Adler B, Vinh T, Faine S. A monoclonal antibody reacting with a determinant on leptospiral lipopolysaccharide protects guinea pigs against leptospirosis. *J Med Microbiol.* 1986; 22:269-275.
79. Vinh T, Shi MH, Adler B, Faine S. Characterization and taxonomic significance of lipopolysaccharides of *Leptospira Interrogans* serovar Hardjo. *J Gen Microbiol.* 1989; 135:2663-2673.
80. Perolat P, Merien F, Ellis WA, Baranton G. Characterization of *Leptospira* isolates from serovar Hardjo by ribotyping, arbitrarily primed PCR, and mapped restriction site polymorphisms. *J Clin Microbiol* 1994; 32:1949-1957.
81. Torres BJI, Valdivieso LB, Romero RPIE, Cisneros PMA, Moles CLP. Exploración serológica de leptospirosis en ganado bovino de carne del estado de Chiapas. Memorias del XXV Congreso Nacional de Buiatría; 2001, Villahermosa (Tabasco) México. México (DF): Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC, 2001: 210-212.
82. Vinh T, Faine S, Adler B. Adhesion of leptospire to mouse fibroblasts (L929) and its enhancement by specific antibody. *J Med Microbiol* 1984; 18:73-85.
83. Ballard SA, Williams M, Adler B, Faine S. Interactions of virulent and avirulent leptospire with primary cultures of renal epithelial cells. *J Med Microbiol* 1986; 21:59-67.

84. Merien F, Truccolo J, Baranton G, Perolat P. Identification of a 36-kDa fibronectin binding protein expressed by a virulent variant of *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae. FEMS Microbiol Lett 2000; 185:17-22.
85. Cinco M, Banfi E, Furlani A, Scarcia V. Cytotoxic activity of supernatant extracts of virulent and saprophytic leptospire. Zentralblatt Bakteriologie, Mikrobiologie Hygiene Abteilung I. Originale A 1980; 248:260-267.
86. Cinco M, Vacile E, Murgia R, Dobrina P, Dobrina A. *Leptospira interrogans* and *Leptospira* peptidoglycans induce the release of tumor necrosis factor alpha from human monocytes. FEMS Microbiol Lett 1996;1;138:211-214.
87. Estavoyer JM, Racadot E, Couetdic G, Leroy J, Grosperin L. Tumor necrosis factor in patients with leptospirosis. Rev Infect Dis 1991; 13:1245-1246.
88. Tajiki H, Salomao R. Association of plasma levels of tumor necrosis factor alpha with severity of disease and mortality among patients with leptospirosis. Clin Infect Dis 1996; 23:1177-1178.
89. Vinh T, Adler B, Faine S. Ultrastructure and chemical composition of lipopolysaccharide extracted from *Leptospira interrogans* serovar *copenhageni*. J Gen Microbiol 1986; 132:103-109.
90. Younes-Ibrahim M, Burth P, Faria MV, Buffin-Meyer B, Marsy S, Barlet-Bas C, Cheval L, Doucet A. Inhibition of Na, K-ATPase by an endotoxin extracted from *Leptospira interrogans*: a possible mechanism for the pathophysiology of

leptospirosis. Comptes Rendus de l'Academie des Sciences. Serie III, Sciences de la Vie 1995; 318:619-625.

91. Pereira MM, Andrade J, Lacerda MD, Batoreu NM, Marchesvsky RS, Ribeiro dos Santos R. Demonstration of leptospiral antigens on tissues using monoclonal antibodies and avidin-biotin peroxidase staining. *Exp Toxicol Pathol* 1997; 49:505–511.
92. Alves V, Gayotto LC, Yasuda PH, Wakamatsu A, Kanamura CT, de Brito T. Leptospiral antigens *L. interrogans* serogroup *icterohaemorrhagiae* in the kidney of experimentally infected guinea-pigs and their relation to the pathogenesis of renal injury. *Exp Pathol* 1991; 42:81-93.
93. Diament D, Brunialti MK, Romero E, Kallas EG, Salomao R. Peripheral blood mononuclear cell activation induced by *Leptospira interrogans* glycolipoprotein. *Infect Immun* 2002; 70:1677-1683.
94. Burth P, Younes-Ibrahim M, Goncalvez FH, Costa ER, Faria MV. Purification and characterization of a Na⁺, K⁺ ATPase inhibitor found in an endotoxin of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun* 1997; 65:1557-1560.
95. Yuri K, Takamoto Y, Okada M, Hiramune T, Kikuchi N, Yanagawa R. Chemotaxis of leptospires to hemoglobin in relation to virulence. *Infect Immun* 1993; 61:2270-2272.

96. Cinco M, Banfi H. Interactions between human polymorphonuclear leukocytes and one strain of pathogenic *Leptospira* (*Leptospira interrogans* sp.) and one of saprophytic *Leptospira* (*L. biflexa* sp.). FEMS Microbiol Lett 1983; 19:51-54.
97. Wang B, Sullivan J, Sullivan GW, Mandell GL. Interaction of leptospires with human polymorphonuclear neutrophils. Infect Immun 1984; 44:459-464.
98. Anderson DL, Johnson RC. Electron microscopy of immune disruption of leptospires: action of complement and lysozyme. J Bacteriol 1968; 95:2293-2309.
99. Vinh T, Adler B, Faine S. The role of macrophages in the protection of mice against leptospirosis: *In vitro* and *in vivo* studies. Pathol 1982; 14: 463-468.
100. Farrelly HE, Adler B, Faine S. Opsonic monoclonal antibodies against lipopolysaccharide antigens of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. J Med Microbiol 1987; 23:1-7.
101. de Brito T, Prado MJ, Negreiros VA, Nicastrri AL, Sakata EE, Yasuda PH, Santos RT, VA A. Detection of leptospiral antigen (*Leptospira interrogans* serovar *copenhageni* serogroup Icterohaemorrhagiae) by immunoelectron microscopy in the liver and kidney of experimentally infected guinea-pigs. Int J Exp Pathol 1992; 73: 633-642.

102. Merien F, Baranton G, Perolat P. Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. *Infect Immun* 1997; 65:729-738.
103. Barocchi MA, Ko AI, Reis MG, McDonald KL, Riley LW. Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but nonintracellular pathogen. *Infect Immun* 2002; 70:6926-6932.
104. Segers RP, van Gestel JA, van Eys GJ, van der Zeijst BA, Gaastra W. Presence of putative sphingomyelinase genes among members of the family *Leptospiraceae*. *Infect Immun* 1992; 60:1707-1710.
105. Lee SH, Kim KA, Park YG, Seong IW, Kim MJ, Lee YJ. Identification and partial characterization of a novel hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar Lai. *Gene* 2000; 254:19-28.
106. Yanagihara Y, Kamisango K, Takeda K, Mifuchi I, Azuma I. Identification of 4-*o*-methylmannose in cell wall polysaccharide of *Leptospira*. *Microbiol Immunol* 1983; 27:711-715.
107. Sangari FJ, Agüero J. Molecular bases of *Brucella* pathogenicity: an update in: Molecular pathogenesis of bacterial infections. *Microbiología* 1996;12:207-218.
108. Pizarro-Cerda J, Méresse S, Parton RG, Van der Goot G, Sola.Landa A, Lopez-Goñi I, Moreno E, Gorvel JP. *Brucella abortus* transits through the

autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect Immun* 1998; 66: 5711-5724.

109. Isogai E, Isogai H, Fujii N, Oguma K. Biological effects of leptospiral lipopolysaccharide on mouse B, T and NK cells. *Jap J Vet Sci* 1990a; 52:923-930.

110. Isogai E, Isogai H, Fujii N, Oguma K. Macrophage activation by leptospiral lipopolysaccharide. *Zentralblatt für Bakteriologie* 1990b; 273:200-208.

111. Werts C, Tapping RI, Mathison JC, Chuang TH, Kravchenko V, Saint Girons, Haake DA, Godowski PJ, Hayashi F, Ozinsky A, Underhill DM, Kirschning C, Wagner H, Aderem A, Tobias PS, Ulevitch RJ. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nature Immunol* 2001; 2:346-352.

112. Emmanouilides CE, Kohn OF, Garibaldi R: Leptospirosis complicated by a Jarisch-Herxheimer reaction and adult respiratory distress syndrome: case report. *Clin Infect Dis* 1994; 18:1004–1006.

113. Ellis WA. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*. 1994; 10:463-478.

114. Yasuda PH, Steigerwalt AG, Sulzer KR, Kaufmann AF, Rogers F, Brenner, DJ. Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the

family *Leptospiraceae* with proposals for seven new *Leptospira* species. Int J Syst Bacteriol 1987; 37:407-415.

115. Ramadass P, Jarvis BWD, Corner RJ, Penny D, Marshall RB. Genetic characterizations of pathogenic *Leptospira* species by DNA hybridization. Int J Syst Bacteriol. 1992; 215-219.

116. Nauman KR, Holt SC, Cox CD. Purification, ultrastructure and composition of axial filament from *Leptospira*. J Bacteriol 1969; 98:264-280.

117. Trueba GA, Bolin CA, Zuerner RL. Characterization of the periplasmic flagellum proteins of *Leptospira interrogans*. J Bacteriol 1992; 174:4761-4768.

118. Goldstein S, Charon N. Multiple exposure photographic analysis of a motile spirochete. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990; 87: 4895-4899.

119. Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, Xu H, Zhang YX, Xiong H, Lu G, Lu LF, Jiang HQ, Jia J, Tu YF, Jiang JX, Gu WY, Zhang YQ, Cai Z, Sheng HH, Yin HF, Zhang Y, Zhu GF, Wan M, Huang HL, Qian Z, Wang SY, Ma W, Yao ZJ, Shen Y, Qiang BQ, Xia QC, Guo XK, Danchin A, Saint Girons I, Somerville RL, Wen YM, Shi MH, Chen Z, Xu JG, Zhao GP. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole genome sequencing. Nature 2003; 422: 888-893.

120. Singh R, Stine C, Smith DL, Spitznagel JK, Labib ME, Williams HN. Microbial diversity of biofilms in dental unit water systems. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 3412-3420.
121. Meyer TL, Kaiser D. *devRS*, an autoregulated and essential genetic locus for fruiting body development in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* 1993; 175:7450–7462.
122. Khisamov GZ, Morozovka NK. Fatty acids as resource of carbon for leptospirae. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 1988; 32:87-93.
123. Johnson RC, Harris GV, Wallbyn KJ. Characterization of leptospiras according to fatty acid requirements. *J Gen Microbiol* 1969; 55:399-407.
124. Schömberg A. Growth of 10 *Leptospira interrogans* serovars using polyvinylpyrrolidone (PVP)-treated tween in protein-free medium. *Zentralbl Für Bakteriol Mikrobiol Hyg Abteilung* 1983; 254:540-544.
125. Faine S. Iron as a growth requirement for pathogenic *Leptospira*. *J Gen Microbiol* 1959; 20:246-251.
126. Stalheim OHV, Wilson BJ. Cultivation of leptospirae. I. Nutrition of "*Leptospira canicola*" *J Bacteriol* 1964; 88:48-54.

127. Midwinter A, Faine S, Adler B. Vaccination of Mice With Lipopolysaccharide (LPS) and LPS-Derived Immuno-Conjugates From *Leptospira interrogans*. J Med Microbiol 1990; 33:199-204.
128. De la Peña-Moctezuma A, Bulach DM, Kalambaheti T, Adler B. Comparative analysis of the LPS biosynthetic loci of the genetic subtypes of serovar Hardjo: *Leptospira interrogans* subtype Hardjoprajitno and *Leptospira borgpetersenii* subtype Hardjobovis. FEMS Microbiol Lett 1999; 177:319-326.
129. De la Peña MA, Bulach DM, Adler B. Genetic differences among the LPS biosynthetic loci of serovars of *Leptospira Interrogans* and *Leptospira borgpetersenii*. FEMS Immunol Med Microbiol 2001; 31:73-81.
130. Cullen PA, Cordwell SJ, Bulach DM, Haake DA, Adler B. Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. Infect Immun 2002; 70:2311-2318.
131. Charon NW, Lawrence CW, O'Brien S. Movement of antibody-coated latex beads attached to the spirochete *Leptospira interrogans*. Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78:7166-7170.
132. Midwinter A, Vinh T. Characterization of an antigenic oligosaccharide from *Leptospira interrogans* serovar Pomona and its role in immunity. Infect Immun 1994; 62:5477-5482.

133. Kalambaheti T, Bulach DM, Rajakumar K, Adler B. Genetic organization of the lipopolysaccharide antigen biosynthetic locus of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjobovis. *Microb Pathog* 1999; 27:105-117.
134. De la Peña-Moctezuma A. Studies on the genetic organisation of the *rfb* loci of *Leptospira interrogans* serovars. Doctoral Thesis. Monash University, Melbourne, Victoria, Australia, 2002a.
135. Carrillo CEM, Rojano RR, Bulach DM, Adler B, De la Peña MA. Evaluación de la capacidad reguladora de la transcripción de la región intergenica *orfJ14-orfJ15* del locus *rfb* de la serovariedad Hardjo subtipo Hardjoprajitno de *Leptospira interrogans*. Memorias del 34 Congreso Nacional de Microbiología; 2004 agosto 27-29; Cancún (Quintana Roo) México. México (DF): Asociación Mexicana de Microbiología, A.C. 2004:34.
136. Carrillo CEM, Rojano RR, Bulach DM, Adler B, De la Peña MA. Evaluación de la transcripción del locus *rfb* para la biosíntesis de LPS en *Leptospira interrogans* subtipo Hardjoprajitno. *Rev Cubana Med Trop* 2005; 57:43-44.
137. Bulach DM, Kalambaheti T, De la Peña-Moctezuma, Adler B. Lipopolysaccharide byosynthesis in *Leptospira*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2000a; 2:375-380.
138. Bulach DM, Kalambaheti T, De la Peña-Moctezuma A, Adler B. Functional analysis de genes in the *rfb* locus of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo subtype Hardjobovis. *Infect Immun* 2000b; 68:3793-3798.

139. Nascimento ALTO, Almeida VS, Van Sluys MA, Monteiro-Vitorello B, Camargo LEA, Digiampietri LA Harstkeerl RA, Ho PL, Marques MV, Oliveira MC, Setubal JC, Haake DA, Martins EA. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. Braz Jour Med Biol Res 2004; 37: 459-478.
140. Bulach DM, Zuerner RL, Wilson P, Seemann T, McGrath A, Cullen PA, Davis J, Johnson M, Kuczek E, Alt DP, Burch BP, Coppe RL, Rood JI, Davies JK, Adler B. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. PNAS 2006; 103:14560-14565.
141. Auran NE, Jonson RC, Ritzi DM. Isolation of the outer sheath of *Leptospira* and its immunogenic properties in hamsters. Infect Immun 1972; 5:968-975.
142. Bey RF, Jonson RC. Humoral immune responses of cattle vaccinated with leptospiral pentavalent outer envelope and whole culture vaccines. Am J Vet Res 1978; 39:1109-1114.
143. Bey RF, Johnson RC. Leptospiral vaccines in dogs: immunogenicity of whole cells and outer envelope vaccines prepared in protein free medium. Am J Vet Res 1982; 43:831-834.
144. Brown JA, LeFebvre RB, Pan JM. Protein and antigen profiles of prevalent serovars of *Leptospira interrogans*. Infect Immun 1991; 59:1772-1777.

145. Johnson RC, Muschel LH. Antileptospiral activity of serum. I. Normal and immune serum. *J Bacteriol* 1966; 91:1403-1409.
146. Thiermann AB, Garret LA. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to *Leptospira interrogans* serovar Hardjo and Pomona in cattle. *Am J Vet Res* 1983; 44:884-887.
147. Nicholson VM, Prescott JF. Outer membrane proteins of three pathogenic *Leptospira* species. *Vet Microbiol* 1993; 36:123-138.
148. Haake DA, Walker EM, Blanco DR, Bolin CA, Miller JN, Lovett MA. Changes in the surface of *Leptospira interrogans* serovar Grippotyphosa during in vitro cultivation. *Infect Immun* 1991; 59:1131-1140.
149. Segers RPAM, Van der Drift A, de Nijs A, Corcione P, Van der Ziejt BAM, Gastra W. Molecular análisis of sphingomielinase C gene from *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. *Infect Immun* 1990; 58:2177-2185.
150. Baril C, Richaud C, Fournie E, Baranton G, Saint Girons I. Cloning of *dapD*, *aroD* and *asd* of *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae and nucleotide sequence of the *asd* gene. *J Gen Microbiol* 1992; 138:47-53.
151. Zuerner R, Herrmann JL, Saint Girons I. Construction and comparison of genetic maps for two *Leptospira interrogans* serovars provides evidence for two chromosomes and intraspecies heterogeneity in genomic organization. *J Bacteriol* 1993; 175:5445-5451.

152. Fukunaga M, Mifuchi I. Unique organization of *Leptospira interrogans* rRNA genes. *J Bacteriol* 1989; 171: 5763-5767.
153. Chiu CH, Tang P, Chu C, Hu S, Bao Q, Yu J, Chou YY, Wang HS, Lee YS. The genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis, a highly invasive and resistant zoonotic pathogen. *Nucleic Acids Res* 2005; 33:1690-1698.
154. Mattoo S, Yuk MH, Huang LL, Miller JF. Regulation of type III secretion in *Bordetella*. *Mol Microbiol* 2004; 52:1201-1214.
155. Parkhill J, Dougan G, James KD, Thomson NR, Pickard D, Wain J, Churcher C, Mungall KL, Bentley SD, Holden MTG, Sebaihia M, Baker S, Basham D, Brooks K, Chillingworth T, Connor P, Cronin A, Davis P, Davies RM, Dowd L, White N, Farrar J, Feltwell T, Hamlin N, Haque A, Hien TT, Holroyd S, Jagels K, Krogh A, Larsen TS, Leather S, Moule S, O'Gaora P, Parry C, Quail M, Rutherford K, Simmonds M, Skelton J, Stevens K, Whitehead S, Barrell BG. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature* 2001; 413:848-852.
156. Ter Huurne AA, Muir S, Van Houten M, Van der Zeijst BA, Gastra W, Kusters JG. Characterization of three putative *Sepulina hyodysenteriae* hemolysins. *Microbiol Pathog* 1994; 16:269-282.

157. Zuerner RL. Nucleotide sequence analysis of IS1533 from *Leptospira borgpetersenii* – identification and expression of two IS-encoded proteins. *Plasmid* 1994; 31:1–11.
158. Conlan LH, Stanger MJ, Ichiyanagi K, Belfort M. Localization, mobility and fidelity of retrotransposed Group II introns in rRNA genes. *Nucleic Acids Res* 2005; 33:5262–5270.
159. Preston A, Parkhill J, Maskell DJ. Preston A, Parkhill J, Maskell DJ. The *Bordetellae*: lessons from genomics *Nat Rev Microbiol* 2004; 2:379–390.
160. Shigenobu S, Watanabe H, Hattori M, Sakaki Y, Ishikawa H. Bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. *APS. Nature* 2000; 407:81–86.
161. Seshadri R, Myers GS, Tettelin H, Eisen JA, Heidelberg JF, Dodson RJ, Davidsen TM, DeBoy RT, Fouts DE, Haft DH, Selengut J, Ren Q, Brinkac LM, Madupu R, Kolonay J, Durkin SA, Daugherty SC, Shetty J, Shvartsbeyn A, Gebregeorgis E, Geer K, Tsegaye G, Malek J, Ayodeji B, Shatsman S, McLeod MP, SMajs D, Howell JK, Pal S, Amin A, Vashisth P, McNeill TZ, Xiang Q, Sodergren E, Baca E, Weinstock GM, Norris SJ, Fraser CM, Paulsen IT. Comparison of the genome of the oral pathogen *Treponema denticola* with other spirochete genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:5646–5651.
162. Moran NA, Dunbar HE, Wilcox JL. Regulation of transcription in a reduced bacterial genome: nutrient-provisioning genes of the obligate symbiont *Buchnera aphidicola*. *J Bacteriol* 2005; 187:4229–4237.

163. Berven FS, Flikka K, Jensen HB, Eidhammer I. BOMP: a program to predict integral beta-barrel outer membrane proteins encoded within genomes of Gram-negative bacteria. *Nucleic Acids Res* 2004; 32:W394–W399.
164. Shang ES, Exner MM, Summers TA, Martinich C, Champion CI, Hancock RE, Haake DA. The rare outer membrane protein, OmpL1, of pathogenic *Leptospira* species is a heat-modifiable porin. *Infect Immun* 1995; 63:3174-3181.
165. Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnet JK, Barnett D, Mazel M, Matsunaga J, Levett PN, Bolin CA. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun* 2000; 68:2276-2285.
166. Guerreiro H, Croda J, Flannery B, Mazel M, Matsunaga J, Galvao Reis M, Levett PN, Ko AI, Haake DA. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. *Infect Immun* 2001; 68: 4958-4868.
167. Haake DA, Martinich C, Summers TA, Sang ES, Pruetz JD, McCoy AM, Mazel MK, Bolin CA. Characterization of leptospiral outer membrane lipoprotein LipL36: downregulation associated with late-log-phase growth and mammalian infection. *Infect Immun* 1998; 66:1579-1587.
168. Barnet JK, Barnett D, Bolin CA, Summers TA, Wagar EA, Cheville NF, Hartskeerl, Haake DA. Expression and distribution of leptospiral outer membrane components during renal infection of hamsters. *Infect Immun* 1999; 67:853-861.

169. Haake DA, Matsunaga J. Characterization of leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins. *Infect Immun* 2002; 70: 4936-4945.
170. Shang ES, Summers TA, Haake DA. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41 a surface-exposed lipoprotein of *Leptospira* species. *Infect Immun* 1996; 64:2322-2330.
171. Cullen PA, Haake DA, Bulach DM, Zuerner RL, Adler B. LipL21 is a novel surface exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. *Infect Immun* 2003; 71:2414-2421.
172. Matsunaga J, Young TA, Barnett JK, Barnett D, Bolin CA, Haake DA. Novel 45-kilodalton leptospiral protein that is processed to a 31-kilodalton growth-phase-regulated peripheral membrane protein. *Infect Immun* 2002; 70:323-334.
173. Haake DA, Champion CI, Martinich C, Shang ES, Blanco DR, Miller JN, Lovett MA. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding OmpL1, a transmembrane outer membrane protein of pathogenic *Leptospira* spp. *J Bacteriol* 1993; 175:4225-4234.
174. Voulhoux R, Ball G, Ize B, Vasil ML, Lazdunski A, Wu LF, Filloux F. Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *EMBO J* 2001; 20:6735- 6741.

175. Desvaux M, Parham NJ, Scott-Tucker A, Henderson IR. The general secretory pathway: a general misnomer?. *Trends Microbiol* 2004; 12:306–309.
176. Filloux A. The underlying mechanisms of type II protein secretion. *Biochim Biophys Acta* 2004;1694:163–179.
177. Rossier O and Cianciotto NP. The *Legionella pneumophila* *tatB* gene facilitates secretion of phospholipase C, growth under iron-limiting conditions, and intracellular infection. *Infect Immun* 2005; 73:2020-2032.
178. Peabody CR, Chung YJ, Yen MR, Vidal-Ingigliardi D, Pugsley AP, Saier MH. Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella. *Microbiol* 2003; 149:3051–3072.
179. Sandkvist M. Biology of type II secretion. *Mol Microbiol* 2001; 40:271-283.
180. Cianciotto NP. Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *TRENDS in Microbiol* 2005; 13:581-588.
181. Pugsley AP, Francetic O, Possot OM, Sauvonet N, Hardie, KR. Recent progress and future directions in studies of the main terminal branch of the general secretory pathway in Gram-negative bacteria - a review. *Gene* 1997; 192:13-19.
182. Nierman WC, DeShazer D, Kim HS, Tettelin, Nelson KE, Feldblyum T, Ulrich RL, Ronning CM, Brinkac LM, Daugherty SC, Davidsen TD, Deboy RT, Dimitrov

G, Dodson RJ, Durkin AS, Gwinn ML, Haft DH, Khouri H, Kolonay JF, Madupu R, Mohammoud Y, Nelson WC, Radune D, Romero CM, Sarria S, Selengut J, Shamblin C, Sullivan SA, White O, Yu Y, Zafar N, Zhou L, Fraser CM. Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome. Proc Natl Acad Sci 2004; 101:14246–14251.

183. Parche S, Geissdörfer W, Hillen W. Identification and characterization of xcpR encoding a subunit of the general secretory pathway necessary for dodecane degradation in *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1. J Bacteriol 1997; 179:4631–4634.

184. Arrieta JG, Sotolongo M, Menéndez C, Alfonso D, Trujillo LE, Soto M, Ramirez R, Hernández L. A type II protein secretory pathway required for levansucrase secretion by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. J Bacteriol 2004; 186:5031–5039.

185. Ball G, Durand E, Lazdunski A, Filloux A. A novel type II secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol 2002; 43, 475–485.

186. da Silva ACR, Ferro JA, Reinach FC, Farra CS, Furlan LR, Quaggio RB, Monteiro-Vitorello CB, Van Sluys MA, Almeida NF, Alves LMC, do Amaral AM, Bertolini MC, Camargo LEA, Camarote G, Cannavan F, Cardozo J, Chambergo F, Ciapina LP, Cicarelli RMB, Coutinho LL, Cursino-Santos JR, El-Dorry H, Faria JB, Ferreira AJS, Ferreira RCC, Ferro MIT, Formighieri EF, Franco MC, Greggio CC, Gruber A, Katsuyama AM, Kishi LT, Leite RP, Lemos EGM, Lemos MVF, Locali EC, Machado MA, Madeira AMBN, Martinez-Rossi NM, Martins EC,

Meidanis J, Menck CFM, Miyaki CY, Moon DH, Moreira LM, Novo MTM, Ocurra VK, Oliveira MC, Oliveira VR, Pereira HA, Rossi A, Sena JAD, Silva C, de Souza RF, Spinola LAF, Takita MA, Tamura RE, Teixeira EC, Tezza RID, Trindade dos Santos M, Truffi D, Tsai SM, White FF, Setúbal JC, Kitajima JP. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 2002; 417:459–463.

187. De Vrind J, Kube M, Bauer M, Teeling H, Lombardot T, Ludwig W, Gade D, Beck A, Borzym K, Heitmann K, Rabus R, Schlesner H, Amann R, Reinhardt R. Identification of a novel Gsp-related pathway required for secretion of the manganese-oxidizing factor of *Pseudomonas putida* strain GB-1. *Mol Microbiol* 2003; 47: 993–1006.

188. Glockner FO, Kube M, Bauer M, Teeling H, Lombardot T, Ludwig W, Gade D, Beck A, Borzym K, Heitmann K, Rabus R, Schlesner H, Amann R, Reinhardt R. Complete genome sequence of the marine planctomycete *Pirellula* sp. strain 1. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100: 8298–8303.

189. Thanassi DG, Hultgren SJ. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr Op Cell Biol* 2000; 12:420-430.

190. Lee VT, Schneewind O. Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. *Gen Devel* 2001; 15:1725-1752.

191. Driessen AJM. SecB, a molecular chaperone with two faces. *Trends Microbiol* 2001a; 9:193-196.

192. Driessen AJ, Manting EH, Van der Does C. The structural basis of protein targeting and translocation in bacteria. *Nat Struct Biol* 2001b; 8:492-498.
193. Sauvonnet N, Vignon G, Pugsley AP, Gounon P. Pilus formation and protein secretion by the same machinery in *Escherichia coli*. *EMBO J* 2000; 19:2221-2228.
194. Bitter W. Secretins of *Pseudomonas aeruginosa*: large holes in the outer membrane. *Arch Microbiol* 2003; 179:307- 314.
195. Genin S, Boucher CA. A superfamily of proteins involved in different secretion pathways in Gram-negative bacteria: modular structure and specificity of the N-terminal domain. *Mol Gen Genet* 1994; 243:112- 118.
196. Russel M. Mutants at conserved positions in gene IV, a gene required for assembly and secretion of filamentous phages. *Mol Microbiol* 1994; 14:357-369.
197. Bitter W, Koster M, Latijnhouwers M, Cock H, Tommassen J. Formation of oligomeric rings by XcpQ and PilQ, which are involved in protein transport across the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 1998; 27:209-219.
198. Brok R, Van Gelder P, Winterhalter M, Ziese U, Koster AJ, Cock H, Koster M, Tommassen J, Bitter W. The C-terminal domain of the *Pseudomonas* secretin XcpQ forms oligomeric rings with pore activity. *J Mol Biol* 1999; 294:1169-1179.

199. Nouwen N, Stahlberg H, Pugsley AP, Engel A. Domain structure of secretin PulD revealed by limited proteolysis and electron microscopy. *EMBO J* 2000; 19:2229-2236.
200. Möeck GS, Coulton JW. TonB-dependent iron acquisition: mechanisms of siderophore-mediated active transport. *Mol Microbiol* 1998; 28:675- 681.
201. Possot OM, Letellier L, Pugsley AL. Energy requirement for pullulanase secretion by the main terminal branch of the general secretory pathway. *Mol Microbiol* 1997; 24:457- 464.
202. Hobbs M, Mattick JS. Common components in the assembly of type IV fimbriae, DNA transfer systems, filamentous phage and protein-secretion apparatus: a general system for the formation of surface-associated protein complexes. *Mol Microbiol* 1993; 10:233- 243.
203. Opalka N, Beckmann R, Boisset N, Simon MN, Russel M, Darst SA. Structure of the filamentous phage pIV multimer by cryoelectron microscopy. *J Mol Biol* 2003; 325:461-470.
204. Collins RF, Ford RC, Kitmitto A, Olsen RO, Tonjum T, Derrick JP. Three-dimensional structure of the *Neisseria meningitidis* secretin PilQ determined from negative-stain transmission electron microscopy. *J Bacteriol* 2003; 185:2611-2617.

205. Davis BM, Lawson EH, Sandkvist M, Ali A, Sozhamannan S, Waldor MK. Convergence of the secretory pathways for cholera toxin and the filamentous phage, CTXphi. *Science* 2000; 288:333-335.
206. Hardie KR, Lory S, Pugsley AP. Insertion of an outer membrane protein in *Escherichia coli* requires a chaperone-like protein. *EMBO J* 1996a; 15:978- 988.
207. Hardie KR, Seydel A, Guilvout I, Pugsley AP. The secretin-specific, chaperone-like protein of the general secretory pathway: separation of proteolytic protection and piloting functions. *Mol Microbiol* 1996b; 22:967- 976.
208. Shevchik VE, Condemine G. Functional characterization of the *Erwinia chrysanthemi* OutS protein, an element of a type II secretion system. *Microbiol* 1998; 144:3219- 3228.
209. Daefler S, Guilvout I, Hardie KR, Pugsley AP, Russel M. The C'-terminal domain of the secretin PulD contains the binding site for its cognate chaperone, PulS, and confers PulS dependence on pIVf1 function. *Mol Microbiol* 1997; 24:465- 475.
210. Nouwen N, Ranson N, Saibil H, Wolpensinger B, Engel A, Ghazi A, Pugsley AP. Secretin PulD: association with pilot PulS, structure, and ion-conducting channel formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:8173- 8177.

211. Francetic O, Belin D, Badaut C, Pugsley AP. Expression of the endogenous type II secretion pathway in *Escherichia coli* leads to chitinase secretion. EMBO J 2000; 19:6697-6703.
212. Nunn D. Bacterial Type II protein export and pilus biogenesis: more than just homologies? Trends in Cell Biol 1999; 9:402-408.
213. Turner LR, Lara JC, Nunn DN, Lory S. Mutations in the consensus ATP-binding sites of XcpR and PilB eliminate extracellular protein secretion and pilus biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 1993; 175:4962- 4969.
214. Possot O, Pugsley AP. Molecular characterization of PulE, a protein required for pullulanase secretion. Mol Microbiol 1994; 12:287-299.
215. Sandkvist M, Bagdasarian M, Howard SP, DiRita VJ. Interaction between the autokinase EpsE and EpsL in the cytoplasmic membrane is required for extracellular secretion in *Vibrio cholerae*. EMBO J 1995; 14:1664- 1673.
216. Py B, Loiseau L, Barras F. Assembly of the type II secretion machinery of *Erwinia chrysanthemi*: direct interaction and associated conformational change between OutE, the putative ATP-binding component and the membrane protein OutL. J Mol Biol 1999; 289: 659- 670.
217. Possot O, d'Enfert C, Reyss I, Pugsley AP. Pullulanase secretion in *Escherichia coli* K-12 requires a cytoplasmic protein and a putative polytopic cytoplasmic membrane protein. Mol Microbiol 1992; 6:95-105.

218. Planet PJ, Kachlany SC, DeSalle R, Figurski DH. Phylogeny of genes for secretion NTPases: identification of the widespread *tadA* subfamily and development of a diagnostic key for gene classification. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98:2503- 2508.
219. Christie PJ, Ward JE, Gordon MP, Nester EW. A gene required for transfer of T-DNA to plants encodes an ATPase with autophosphorylating activity. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86:9677-9681.
220. Economou A, Wickner W. SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. Cell 1994; 78:835- 843.
221. Kagami Y, Ratliff M, Surber M, Martinez A, Nunn DN. Type II protein secretion by *Pseudomonas aeruginosa*: genetic suppression of a conditional mutation in the pilin-like component XcpT by the cytoplasmic component XcpR. Mol Microbiol 1998; 27:221-233.
222. Groot A, Filloux A, Tommassen J. Conservation of *xcp* genes, involved in the two-step protein secretion process, in different *Pseudomonas* species and other gram-negative bacteria. Mol Gen Genet 1991; 229:278- 284.
223. Pugsley AP. Translocation of a folded protein across the outer membrane in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89:12058- 12062.

224. Shevchik VE, Bortoli-German I, Robert-Baudouy J, Robinet S, Barras F, Condemine G. Differential effect of *dsbA* and *dsbC* mutations on extracellular enzyme secretion in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Microbiol* 1995; 16:745- 753.
225. Sauvonnet N, Pugsley AP. The requirement for DsbA in pullulanase secretion is independent of disulphide bond formation in the enzyme. *Mol Microbiol* 1998; 27:661-667.
226. Pugsley AP, Bayan N, Sauvonnet N. Disulfide bond formation in secretion component PulK provides a possible explanation for the role of DsbA in pullulanase secretion *J Bacteriol* 2001; 183:1312- 1319.
227. Liebeton K, Zacharias A, Jaeger KE. Disulfide bond in *Pseudomonas aeruginosa* lipase stabilizes the structure but is not required for interaction with its foldase. *J Bacteriol* 2001; 183:597-603.
228. Shevchik VE, Robert-Baudouy J, Condemine G. Specific interaction between OutD, an *Erwinia chrysanthemi* outer membrane protein of the general secretory pathway, and secreted proteins. *EMBO J* 1997; 16:3007- 3016.
229. Guilvout I, Hardie KR, Sauvonnet N, Pugsley AP. Genetic dissection of the outer membrane secretin PulD: are there distinct domains for multimerization and secretion specificity. *J Bacteriol* 1999; 181:7212-7220.
230. Lindeberg M, Salmond GP, Collmer A. Complementation of deletion mutations in a cloned functional cluster of *Erwinia chrysanthemi* *out* genes with *Erwinia*

carotovora out homologues reveals OutC and OutD as candidate gatekeepers of species-specific secretion of proteins via the type II pathway. Mol Microbiol 1996; 20:175-190.

231. Groot A, Koster M, Gerard-Vincent M, Gerritse G, Lazdunski A, Tommassen J, Filloux A. Exchange of Xcp (Gsp) secretion machineries between *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas alcaligenes*: species specificity unrelated to substrate recognition. J Bacteriol 2001; 183:959- 967.
232. Durand D, Bernadac A, Ball G, Lazdunski A, Sturgis JN, Filloux. A Type II secretion protein in *Pseudomonas aeruginosa*: the pseudopilus is a multifibrillar and adhesive structure. J Bacteriol 2003; 185:2749-2758.
233. Gerard-Vincent M, Robert V, Ball G, Bleves S, Michel GP, Lazdunski A, Filloux A. Identification of XcpP domains that confer functionality and specificity to the *Pseudomonas aeruginosa* type II secretion apparatus. Mol Microbiol 2002; 44:1651- 1665.
234. Groot A, Krijger JJ, Filloux A, Tommassen J. Characterization of type II protein secretion (*xcp*) genes in the plant growth-stimulating *Pseudomonas putida*, strain WCS358. Mol Gen Genet 1996; 250:491-504.
235. Pugsley AP. Multimers of the precursor of a type IV pilin-like component of the general secretory pathway are unrelated to pili. Mol Microbiol 1996; 20:1235-1245.

236. Santini CL, Ize B, Chanal A, Muller M, Giordano G, Wu LF. A novel sec-independent periplasmic protein translocation pathway in *Escherichia coli*. *EMBO J* 1998; 17:101- 112.
237. Michel G, Ball G, Goldberg JB, Lazdunski A. Alteration of the lipopolysaccharide structure affects the functioning of the Xcp secretory system in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2000; 182:696-703.
238. Yen MR, Peabody CR, Partovi SM, Zhai Y, Tseng YH, Saier MH. Protein-translocating outer membrane porins of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1562: 6–31.
239. Douet V, Loiseau L, Barras F, Py B. Systematic analysis, by yeast two-hybrid analysis, of protein interaction between components of the type II secretory machinery of *Erwinia chrysanthemi*. *Res Microbiol* 2004; 155: 71-75.
240. Cao TB, Saier MH. The general protein secretory pathway: phylogenetic analyses leading to evolutionary conclusions. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1609:115-125.
241. Bieker KL, Silhavy TJ. The genetics of protein secretion in *E. coli*. *Trends Genet* 1990; 6:329-334.
242. Pugsley AP. The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* 1993; 57:50-108.

243. Stathopoulos C, Hendrixson DR, Thanassi DG, Hultgren SJ, St. Geme JW, Curtiss R. Secretion of virulence determinants by the general secretory pathway in gram negative pathogens: an evolving story. *Microbes Infect* 2000; 2:1061-1072.
244. Pugsley AP, Possot O. The general secretory pathway of *Klebsiella oxytoca*: no evidence for relocalization or assembly of pili-like PulG protein into a multiprotein complex. *Mol Microbiol* 1993; 10:665-674.
245. Wandersman C. The general secretory pathway in bacteria. *Trends Microbiol* 1993; 1: 249-251.
246. Pugsley AP, Francetic O, Possot OM, Sauvonnnet N, Hardie KR. Recent progress and future directions in studies of the main terminal branch of the general secretory pathway in Gram-negative bacteria-a review. *Gene* 1997a; 192:13-19.
247. Pugsley AP, Francetic O, Hardie KR, Possot OM, Sauvonnnet N, Seydel A. Pullulanase: model protein substrate for the general secretory pathway of Gram-negative bacteria. *Folia Microbiol* 1997b; 42:184-192.
248. Henderson IR, Nataro JP, Kaper JB, Meyer TF, Farrand SK, Burns DL, Finlay BB, St. Geme JW. Renaming protein secretion in the Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol* 2000; 8:352.

249. Van Wely KHM, Swaving J, Freud R, Driessen AJM. Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 2001; 25:437-454.
250. Christie PJ. Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Mol Microbiol* 2001; 40:294-305.
251. Fischer W, Haas R, Odenbreit S. Type IV secretion systems in pathogenic bacteria. *Int J Med Microbiol* 2002; 292:159-168.
252. Sijbrandi R, Urbanus ML, Hagen-Jongman CMT, Bernstein HD, Oudega B, Otto BR, Luirink J. Signal recognition particle (SRP)-mediated targeting and Sec-dependent translocation of an extracellular *Escherichia coli* protein. *J Biol Chem* 2003; 278:4654-4659.
253. Beha D, Deitermann S, Müller M, Koch HG. Export of beta-lactamase is independent of the signal recognition particle. *J Biol Chem* 2003; 278:22161-22167.
254. Valent QA, Scotti PA, High S, de Gier JW, Heijne G, Lentzen G, Wintermeyer W, Oudega B, Luirink J. The *Escherichia coli* SRP and SecB targeting pathways converge at the translocon. *EMBO J* 1998; 17:2504-2512.

255. Mena BR. Análisis *in silico* de los genes *gspD* y *gspF* del sistema de secreción tipo II de *Leptospira biflexa* serovariedad Patoc. (Tesis de Maestría) México D. F. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 2006.
256. De la Peña-Moctezuma, A., P. A. Cullen, D. M. Bulach and B. Adler. pL18 a novel OMP is encoded in a locus homologous to the Type II secretion pathway system of *E. coli*. Proceedings of the 3th Scientific Meeting, International Leptospirosis Society; 2002b October 28-30. Bridgetown, Barbados.
257. Johnson RC, Harris VG. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires. Growth at low temperatures. J Bacteriol 1967; 94:27-31.
258. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DM, Seldman JG, Smith JA, Struhl K. Current Protocols in Molecular Biology. USA: John Wiley and Sons, 1993.
259. Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning, laboratory manual. 3th ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
260. Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227:680-685.
261. Cooper MH, Paterson Y. Production of polyclonal antisera. In: Ausubel MF, Brent R, Kingston ER, Moore DD, Seidman GJ, Smith AJ, Struhl K. Current Protocols in Molecular Biology Copyright (c) 2003 John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved.

262. Graber A, Zingales B. Alternative method to remove antibacterial antibodies from antisera used for screening of expression libraries. *Biotechniques* 1985; 19:28-30.
263. Matsunaga J, Barocchi MA, Croda J, Young TA, Sánchez Y, Siquiera I, Bolin CA, Reis MG, Riley LW, Haake DA, Ko AI. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Molec Microbiol* 2003; 49:929–945.
264. Castillo SLO, Roa RMA, Ordóñez BML, De la Peña MA. Detección de perros portadores de leptospiras patógenas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* 2005; 25:68.
265. Yukawa M. Differential susceptibility of two stocks of Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) to *Leptospira*. *J Exp Anim Sci* 1991; 34:1-5.
266. Chen SL, Hung CS, Xu J, Reigstad CS, Magrini V, Sabo A, Blasiar D, Bieri T, Meyer RR, Ozersky P, Armstrong JR, Fulton RS, Latreille JP, Spieth J, Hooton TM, Mardis ER, Hultgren SJ, Gordon JI. 2006. Identification of genes subject to positive selection in uropathogenic strains of *Escherichia coli*: A comparative genomics approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103: 5977-5982.
267. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, Brinkman FSL, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GKS, Wu Z, Paulsen IT,

- Reizer J, Saier MH, Hancock REW, Lory S, Olson MV. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* 2000; 406: 959–964.
268. Lama J, Carrasco L. Expression of poliovirus nonstructural proteins in *Escherichia coli* cells. *J Biol Chem* 1992; 267:15932-15937.
269. Swartz JR. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Curr Opin Biotechnol* 2001; 12:195-201.
270. Cullen PA, Xu X, Matsunaga J, Sánchez Y, Ko AI, Haake DA, Adler B. The surfaceome of *Leptospira*. *Infect Immun* 2005; 73:4853-4863.
271. Sandkvist M, Michel LO, Hough LP, Morales VM, Bagdasarian M, Koomey M, Dirita VJ, Bagdasarian M. General secretion pathway (*eps*) genes required for toxin secretion and outer membrane biogenesis in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* 1997; 179:6994–7003.
272. Tauschek M, Gorrell RJ, Strugnell RA, Robins-Browne RM. Identification of a protein secretory pathway for the secretion of heat labile enterotoxin by an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99:7066–7071.
273. Filloux A, Michel G, Bally M. GSP-dependent protein secretion in gram-negative bacteria: the Xcp system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev* 1998; 22:177–198.

274. Rabus R, Kube M, Heider J, Beck A, Heitmann K, Widdel F, Reinhardt R. The genome sequence of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch Microbiol* 2005; 183:27–36.
275. Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Minamisawa K, Uchiumi T, Sasamoto S, Watanabe A, Idesawa K, Iriguchi M, Kawashima K, Kohara M, Matsumoto M, Shimpo S, Tsuruoka H, Wada T, Yamada M, Tabata S. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res* 2002; 9:189–197.
276. Ward N, Larsen O, Sakwa J, Bruseth L, Khouri H, Durkin AS, Dimitrov G, Jiang L, Scanlan D, Kang KH, Lewis M, Nelson KE, Methé B, Wu M, Heidelberg JF, Paulsen IT, Fouts D, Ravel J, Tettelin H, Ren Q, Read T, DeBoy RT, Seshadri R, Salzberg SL, Jensen HB, Birkeland NK, Nelson WC, Dodson RJ, Grindhaug SH, Holt I, Eidhammer I, Jonassen I, Vanaken S, Utterback T, Feldblyum TV, Fraser CM, Lillehaug JR, Eisen JA. Genomic insights into methanotrophy: the complete genome sequence of *Methylococcus capsulatus* (Bath). *PLoS Biol* 2004; 2: 1616-1628.
277. Hou S, Saw JH, Lee KS, Freitas TA, Belisle C, Kawarabayasi Y, Donachie SP, Pikina A, Galperin MY, Koonin EV, Makarova KS, Omelchenko MV, Sorokin A, Wolf I, Li QX, Keum YS, Campbell S, Denery J, Aizawa SI, Shibata S, Malahoff A, Alam M. Genome sequence of the deep-sea gammaproteobacterium *Idiomarina loihiensis* reveals amino acid fermentation as a source of carbon and energy. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 2004; 101:18036–18041.

278. Brazilian National Genome Project Consortium. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100:11660–11665.
279. Deng W, Burland V, Plunkett G, Boutin A, Mayhew GF, Liss P, Perna NT, Rose DJ, Mau B, Zhou S, Schwartz DC, Fetherston JD, Lindler LE, Brubaker RR, Plano GV, Straley SC, McDonough KA, Nilles ML, Matson JS, Blattner FR, Perry RD. Genome sequence of *Yersinia pestis* KIM. *J Bacteriol* 2002; 184:4601–4611.
280. Rossier O, Starkenburg SR, Cianciotto NP. *Legionella pneumophila* type II protein secretion promotes virulence in the A/J mouse model of Legionnaires' disease pneumonia. *Infect Immun* 2004; 72: 310–321.
281. Grys TE, Siegel MB, Lathem WW, Welch RA. The StcE protease contributes to intimate adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to host cells. *Infect Immun* 2005; 73:1295–1303.
282. Cazalet C, Rusniok C, Brüggemann H, Zidane N, Magnier A, Ma L, Tichit M, Jarraud S, Bouchier C, Vandenesch F, Kunst F, Etienne J, Glaser P, Buchrieser C. Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nat Genet* 2004; 36:1165–1173
283. Chien M, Morozova I, Shi S, Sheng H, Chen J, Gomez SM, Asamani G, Hill K, Nuara J, Feder M, Rineer J, Greenberg JJ, Steshenko V, Park SH, Zhao B, Teplitskaya E, Edwards JR, Pampou S, Georghiou A, Chou IC, Iannuccilli W, Ulz

ME, Kim DH, Geringer-Sameth A, Goldsberry C, Morozov P, Fischer SG, Segal G, Qu X, Rzhetsky A, Zhang P, Cayanis E, De Jong PJ, Ju J, Kalachikov S, Shuman HA, Russo JJ. The genomic sequence of the accidental pathogen *Legionella pneumophila*. *Science* 2004; 305:1966–1968.

284. Morozova I, Shi S, Sheng H, Chen J, Gomez SM, Asamani G, Hill K, Nuara J, Feder M, Rineer J, Greenberg JJ, Steshenko V, Park SH, Zhao B, Teplitskaya E, Edwards JR, Pampou S, Georghiou A, Chou IC, Iannuccilli W, Ulz ME, Kim DH, Geringer-Sameth A, Goldsberry C, Morozov P, Fischer SG, Segal G, Qu X, Rzhetsky A, Zhang P, Cayanis E, De Jong PJ, Ju J, Kalachikov S, Shuman HA, Russo JJ. The genomic sequence of the accidental pathogen *Legionella pneumophila*. *Science* 2004; 305:1966–1968.

285. Holden MTG, Titball RW, Peacock SJ, Cerdeño-Tárraga AM, Atkins T, Crossman LC, Pitt T, Churcher C, Mungall C, Bentley SD, Sebahia M, Thomson NR, Bason N, Beacham IR, Brooks K, Brown KA, Brown NF, Challis GL, Cherevach I, Chillingworth T, Cronin A, Crossett B, Davis P, DeShazer D, Feltwell T, Fraser A, Hance Z, Hauser H, Holroyd S, Jagels K, Keith KE, Maddison M, Moule S, Price C, MA Quail, Rabbinowitsch E, Rutherford K, Sanders M, Simmonds M, Songsivilai S, Stevens K, Tumapa S, Vesaratchavest M, Whitehead S, Yeats C, Barrell BG, Oyston PCF, Parkhill J. Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 2004; 101:14240–14245.

286. Hales ML, Shuman HA. *Legionella pneumophila* Contains a Type II General Secretion Pathway Required for Growth in Amoebae as Well as for Secretion of the Msp Protease. *Infect Immun* 1999; 3662-3666.
287. Soderberg MA, Rossier O, Cianciotto NP. The type II protein secretion system of *Legionella pneumophila* promotes growth at low temperatures. *J Bacteriol* 2004; 186: 3712–3720.
288. Saint Girons I, Bourhy P, Ottone C, Picardeau M, Yelton D, Hendrix RW, Glaser P, Charon N. The LE1 bacteriophage replicates as a plasmid within *Leptospira biflexa*: Construction of an *L. biflexa*-*Escherichia coli* shuttle vector. *J. Bacteriol* 2000; 182:5700-5705.
289. Bauby H, Saint-Girons I, Picardeau M. Construction and complementation of the first auxotrophic mutant in the spirochaete *Leptospira meyeri*. *Microbiol* 2003; 149: 689–693.
290. Collins RF, Davidsen L, Derrick JP, Ford RC, Tonjum T. Analysis of the PilQ secretin from *Neisseria meningitidis* by transmission electron microscopy reveals a dodecameric quaternary structure *J Bacteriol* 2001; 183:3825–3832.
291. Schulz GE. β -Barrel membrane proteins. *Curr Opin Struct Biol* 2000;10:443–447.

292. Chami M, Guilvout I, Gregorini M, Remigy HW, Muller SA, Valerio M, Engel A, Pugsley AP, Bayan N. Structural insights into the secretin PulD and its trypsin resistant core. *J Biol Chem* 2005; 280: 37732–37741.
293. Marciano DK, Russel M, Simon SM. An aqueous channel for filamentous phage export. *Science* 1999; 284:1516–1519.
294. Wolfgang M, van Putten JP, Hayes SF, Dorward D, Koomey M. Components and dynamics of fiber formation define a ubiquitous biogenesis pathway for bacterial pili. *EMBO J* 2000; 19:6408–6418.
295. Wall D, Kolenbrander PE, Kaiser D. The *Myxococcus xanthus* pilQ (*sglA*) gene encodes a secretin homolog required for type IV pilus biogenesis, social motility, and development. *J Bacteriol* 1999; 181:24–33.
296. Bolin CA, Alt DP. Use of a monovalent leptospiral vaccine to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. *Am J Vet Res* 2001;62:995–1000.
297. Tripp CS, Wolf SF, Unanue ER. Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90:3725–3729.
298. Carson WE, Ross ME, Baiocchi RA, Marien MJ, Boiani N, Grabstein K, Caligiuri M A. Endogenous production of interleukin 15 by activated human

monocytes is critical for optimal production of interferon-gamma by natural killer cells in vitro. *J Clin Invest* 1995; 96:2578–2582.

299. McGuire TC, Musoke AJ, Kurtti T. Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: interaction with complement, macrophages, neutrophils, and skin. *Immunol* 1979; 38:249–56.

300. Naiman BM, Alt D, Bolin CA, Zuerner R, Baldwin CL. Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and $\gamma\delta$ T lymphocytes. *Infect Immun* 2001; 69:7550–7558.

301. Marshall RB. A nationwide experiment to control human leptospirosis by vaccinating dairy cattle. *Isr J Med Sci* 1987; 43:271–276.

302. De Fost M, Hartskeerl RA, Groenendijk MR, Poll TV. Interleukin 12 in part regulates gamma interferon release in human whole blood stimulated with *Leptospira interrogans*. *Clin Diag Lab Immunol* 2003; 10:332–335.

303. Sonrier C, Branger C, Michel V, Ruvoën-Clouet N, Garnière JP, André-Fontaine G. Evidence of cross-protection within *L. interrogans* in an experimental model. *Vaccine* 2000; 19:86-94.

304. Haake DA, Mazel MK, McCoy AM, Milward F, Chao G, Matsunaga J, Wagar EA. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. *Infect Immun* 1999; 67:6572-6582.

305. Branger C, Sonrier C, Chatrenet B, Klonjowski B, Ruvoen-Clouet N. Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination. *Infect Immun* 2001; 69:6831-6838.
306. Flannery B, Costa D, Carvalho FP, Guerreiro H, Matsunaga J, Da Silva ED, Ferreira AGP, Riley LW, Reis MG, Haake DA, Ko AI. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol* 2001; 39:3303-3310.
307. Kelly G, Prasannan S, Daniell S, Fleming K, Frankel G, Dougan G, Connerton I, Matthews S. Structure of the cell-adhesion fragment of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Nat Struct Biol* 1999; 6:313-318.
308. Hamburger ZA, Brown MS, Isberg RR, Bjorkman PJ. Crystal structure of invasins: a bacterial integrin binding protein. *Science* 1999; 286:291-295.
309. Koizumi, N., Watanabe, H., 2004. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. *Vaccine* 22, 1545-1552.
310. Koizumi N, Watanabe H. Leptospirosis vaccines: Past, present and future. *J Postgrad Med* 2005; 51:210-214.
311. Hacker J, Kaper JB. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* 2000; 40:169-189.

312. Dutta C, Ran A. Horizontal gene transfer and bacterial diversity. *J Biosci* 2002; 27:27–33.
313. Mira A, Ochman H, Moran NA. Deletional bias and the evolution of bacterial genomes. *Trends Genet* 2001; 17:589–596.
314. Rode CK, Melkerson-Watson LJ, Johnson AT, Bloch CA. Type-specific contributions to chromosome size differences in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1999; 19:230–236.
315. Saint Girons I, Norris SJ, Gobel U, Meyer J, Walker EM, Zuerner R. Genome structure of spirochetes. *Res Microbiol* 1992; 143:615–621.
316. Haake DA, Suchard MA, Kelley MM, Dundoo M, Alt DP, Zuerner RL. Molecular Evolution and mosaicism of leptospiral outer membrane proteins involves horizontal DNA transfer. *J Bacteriol* 2004; 186:2818-2828.
317. Burland V, Shao Y, Perna NT, Plunkett G, Sofia HJ, Blattner FR. The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. *Nucleic Acids Res* 1998; 26:4196–4204.
318. Schmidt H, Henkel B, Karch H. A gene cluster closely related to type II secretion pathway operons of Gram-negative bacteria is located on the large plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. *FEMS Microbiol Lett* 1997; 148:265-272.

APÉNDICE I

MEDIOS DE CULTIVO

MEDIOS DE CULTIVO

Medio de cultivo EMJH 10X para el desarrollo de *Leptospira*

Ingredientes:

Albúmina sérica bovina (ASB) Fracción V	100 g
Piruvato de sodio	2 g
Acetato de sodio anhidro (CH ₃ COONa)	1 g
EMJH base	23 g
Tween 80	12.5 g
Sulfato ferroso (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	0.1 g
Cloruro de calcio (CaCl ₂) más cloruro de magnesio (MgCl ₂ ·2H ₂ O) en solución (1.5 % de cada uno)	7 ml
Sulfato de zinc (ZnSO ₄ ·7H ₂ O) 0.4 % solución	10 ml
Sulfato cúprico (CuSO ₄ ·5H ₂ O) 0.3 % solución	1 ml
Vitamina B12 (Cianocobalamina) 0.1 % solución	2 ml
Glicerol al 20 % solución	5 ml
Sulfato Manganoso (MnSO ₄ ·4H ₂ O) 0.1 % solución	10 ml

Preparación:

Disolver primero, Tween 80 en 50 ml de agua destilada autoclaveada y el sulfato ferroso a 37 °C en 5 ml de agua destilada autoclaveada.

Incorporar el resto de los ingredientes en un volumen de 900 ml de agua destilada estéril, manteniendo el medio en agitación constante con ayuda de una bala magnética, hasta que los ingredientes se hayan disuelto completamente (~1 hora).

Agregar las soluciones de Tween 80 y sulfato ferroso, ajustar el pH a 7.4 y aforar a un volumen de 1 litro.

El medio es prefiltrado a través de un prefiltro (*Millipore™*) seguido de una membrana, ambos no estériles. Las membranas que se utilizan para el prefiltrado son de 0.65 μm, 0.45 μm y finalmente 0.22 μm (*Millipore™*). Posteriormente se esteriliza filtrando nuevamente todo el medio a través de una membrana de 0.22 μm (*Millipore™*) estéril.

Puede almacenarse a 4 °C hasta tres meses.

Para utilizar el medio se requiere diluir a 1X con agua destilada autoclaveada.

Medio de cultivo Luria Bertani (LB)

10 g de bacto triptona

5 g de extracto de levadura

5 g de NaCl

1 ml de 1N NaOH

En caso necesario, agregar 10 g de Bacto agar.

Disolver en 800 ml de agua destilada cada uno de los componentes. Agitar hasta disolver totalmente y aforar a 1000 ml con agua destilada. Esterilizar en autoclave a 15 lbs. 15 minutos.

Medio SOC

20 g Bacto triptona

5 g Extracto de levadura

0.5 g NaCl

20 ml glucosa 1M (disolver 18 g de glucosa en 90 ml agua destilada y después aforar a 100 ml)

10 mM de Cloruro de Magnesio 1M estéril

10 mM de Sulfato de Magnesio 1M estéril

Disolver en 500 ml de agua destilada la Bacto triptona, el Extracto de levadura y el NaCl. Esterilizar en autoclave 15 minutos a 15 libras de presión. Posterior a la esterilización, se añade la glucosa previamente filtrada a través de un filtro de 0.22 μm estéril.

Al momento de realizar la transformación química, se añaden el Cloruro de Magnesio y el Sulfato de Magnesio al medio SOC.

Medio SOB

Es igual al medio SOC pero, sin glucosa, Cloruro de Magnesio, ni Sulfato de Magnesio. Es recomendable preparar volúmenes pequeños de medio SOB y convertirlo en medio SOC al momento de realizar la transformación química.

Antibióticos

Kanamicina sulphate	50 µg/ml
Cloranfenicol	34 µg/ml
Rifampicina	50 µg/ml

Diferentes antibióticos son adicionados al medio de cultivo para seleccionar el crecimiento de bacterias con un genotipo específico de resistencia a antibacterianos mediado por plásmidos R. Los antibióticos ya diluídos en agua o etanol (según sea el caso), se filtran a través de membranas estériles de 0.22 µm (*Millipore™*) y se almacenan a 4 °C.

APÉNDICE II

SOLUCIONES PARA PURIFICACIÓN DE ADN CROMOSOMAL Y PLÁSMIDOS

SOLUCIONES PARA EXTRACCIÓN DE ADN

CTAB/NaCl

CTAB	10 g
NaCl	4.1 g

Disolver en 50 ml de agua desionizada estéril, aforar a 100 ml con agua desionizada y colocar la solución en baño María para que se homogenice, se esteriliza en autoclave y se almacena a temperatura ambiente.

Fenol equilibrado

Retirar el fenol del congelador y permitir que se caliente a temperatura ambiente.

Agregar quinolinol a una concentración de 0.1 %.

Agregar un volumen igual de 0.5 M Tris-HCl (pH 8.0) y mantener en agitación constante con ayuda de una bala magnética durante 15 min .

Retirar de la agitación y permitir que las dos fases se separen, decantarse la fase acuosa (la fase superficial) tanto como posible.

Agregar un volumen igual de 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) y mantener en agitación constante con ayuda de una bala magnética durante 15 min.

Retirar de la agitación y permitir que las dos fases se separen, medir el pH en la fase acuosa correspondiente al Tris (fase superficial) y decantar la fase acuosa tanto como posible.

Repita este procedimiento, hasta que la medición del pH en la fase acuosa corresponda al valor deseado (pH 8.0).

Finalmente agregue 0.1 volumen de 0.1M Tris-HCl (pH 8.0) que contenga 0.2 % de β -mercaptoethanol y se almacena a 4 °C.

Solución del acetato de potasio (para la precipitación de los ácidos nucleicos)

Acetato de potasio de 5M	60 ml
Acido acético glacial	11.5 ml
Agua destilada	28.5 ml

Amortiguador TE (TRIS / EDTA)

10 mM Tris·HCl

1 mM EDTA, pH 8.0

Solución de 0.5M de EDTA (etilenediaminotetraacetato de sodio) (pH8.0)

Agregar 18.61 g de EDTA en 60 ml de agua bidestilada. Mezclar perfectamente con ayuda de una bala magnética.

Ajustar a un pH de 8.0 durante la agitación con una solución 1N de NaOH, aforar a 100 ml con agua bidestilada y esterilizar en autoclave.

Solución 1M de Tris

Disolver 121.1 g de tris base en 600 ml de agua bidestilada, manteniendo la solución en agitación constante. El pH se ajusta con HCl puro de acuerdo al valor requerido (6.8, 7.0, 7.5, 8.0, 8.8 entre otros). Es importante considerar que el ajuste del pH para esta solución requiere varias mediciones a intervalos de 1 a 2 horas, manteniendo la solución en agitación constante. Dejar reposar la solución durante la noche y hacer un nuevo ajuste de pH al día siguiente. Aforar el volumen a 1 litro y esterilizar por autoclave.

SOLUCIONES PARA LA EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDOS POR EL MÉTODO DE LISIS ALCALINA

Solución I (Mini-prep para ADN de plásmidos)

50 mM Glucosa

25 mM Tris·HCl pH 8.0

10 mM EDTA pH 8.0

Solución II (Preparar al momento) (Mini-prep para ADN de plásmidos)

NaOH 0.2 N

SDS 1.0 %

Solución III (Mini-prep para ADN de plásmidos)

5M Acetato de potasio 60 ml

Ácido acético glacial 11.5 ml

Agua destilada estéril 28.5 ml

Solución de Acetato de Sodio 4M pH6

En un matraz se colocan 15 ml de agua desionizada, se agregan 6.563g de Acetato de sodio. Se ajusta el pH a 6 con ácido acético glacial y se aforar a 20 ml con agua desionizada.

Soluciones para electroforesis de ácidos nucleicos y preparación de geles de agarosa.

Solución de TAE (Tris / acetato / EDTA) 50X (pH ~ 8.5)

Tris 60.5 g

Ácido acético glacial 14.27 ml

EDTA 0.5M 25 ml

Agua destilada cbp 250 ml

Solución TAE de trabajo

20 ml de la solución TAE 50X

aforar a 1 litro con agua destilada

Amortiguador de carga para electroforesis de ADN bacteriano

38.0 % de Sucrosa	1.9 g
0.1 % de Azul de Bromofenol	5 mg
67mM de EDTA	0.124 g
Agua bidestilada	5 ml

Amortiguador de carga con dos colorantes para geles de agarosa

Azul de Bromofenol	25.0 %
Xyleno Cianol FF	0.25 %
de glicerol en agua	30.0 %

Agarosa

Disolver la cantidad de agarosa requerida (varia de acuerdo a la concentración que se desee del gel) en amortiguador TAE, calentando la mezcla en horno de microondas (calentar hasta que comience a hervir y mezclar en tres ocasiones). La mezcla ya lista debe quedar transparente y sin restos de agarosa en el fondo del matraz.

APÉNDICE III

**SOLUCIONES PARA EL ANÁLISIS,
PURIFICACIÓN Y DETECCIÓN DE
PROTEÍNAS TOTALES Y
DE MEMBRANA EXTERNA**

PREPARACIÓN DE GELES Y SOLUCIONES PARA EL PROCEDIMIENTO DE SDS-PAGE (LAEMMLI)

Acrilamida

Acrilamida 30g

Bis Acrilamida 0.8 g

Aforar a 100 ml con agua destilada estéril, filtrar y almacenar a 4 °C en frasco ámbar.

1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

Tris Base 54.45g

Agua destilada 150 ml

Ajustar el pH a 8.8 con HCl, aforar a 300 ml y almacenar a 4 °C

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

Tris base 6.0 g

Agua destilada 50 ml

Ajustar el pH a 6.8 con HCl.

Aforar a 100 ml y almacenar a 4 °C

SDS al 10.0 %

Disolver 10 g de SDS en 50 ml de agua destilada, agitar suavemente y aforar a 100 ml

Persulfato de amonio al 10.0 %

Disolver 25 mg de Persulfato de amonio en 0.25 ml de agua bidestilada estéril.

producto en frascos con la menor cantidad ya que se caduca rápidamente.

Se preparar y utilizar al momento

Amortiguador de muestra

0.5 M Tris-HCl, pH6.8	1.0 ml
Glicerol	0.8 ml
SDS, 10.0 %	1.6 ml
2-Mercaptoethanol	0.4 ml
0.5 % azul de bromofenol en agua	0.4 ml
Agua destilada	3.8 ml

Diluir la muestra en proporción 1:1 con el amortiguador de muestra. Calentar a 100 °C durante 5 minutos antes de colocar en el pozo del gel
Preferentemente almacenar a 4 °C en un recipiente ámbar.

Amortiguador para electrodos 5X (Tanque)

Tris base	15.0 g
Glicina	72 g
SDS	5.0 g
Agua destilada cbp	1000 ml

Almacenar a 4 °C. Calentar a 37 °C si se precipita. Solución de trabajo: diluir 200 ml en 1 litro de agua para una corrida

Preparación del gel separador

Agua destilada	3.35 ml
30.0 % Acrilamida	4.0 ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	2.5 ml
SDS al 10.0 %	100 µl
Persulfato de amonio al 10.0 %	50 µl
TEMED	5 µl

Volumen total de monómero 10 ml

La mezcla para el gel se prepara agregando los componentes antes mencionados, excepto el persulfato de amonio y el TEMED. Se homogenizan perfectamente los componentes y previo al vaciado de la mezcla en la cámara de electroforesis, se agregan los dos catalizadores (persulfato de amonio y el TEMED), se homogeniza esta nueva mezcla rápidamente por agitación y se vierte al interior de dos cristales, ensamblados en un aditamento de la cámara.

Preparación del gel concentrador al 4.0 %

Agua destilada	3.05 ml
30.0 % Acrilamida	0.67 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.25 ml
SDS al 10.0 %	50 μ l
Persulfato de amonio	
al 10.0 %	25 μ l
TEMED	5 μ l

Volumen total de monómero 5.05 ml

La mezcla para el gel se prepara agregando los componentes antes mencionados, excepto el persulfato de amonio y el TEMED. Se homogenizan perfectamente los componentes y previo al vaciado de la mezcla en la cámara de electroforesis, se agregan los dos catalizadores (persulfato de amonio y el TEMED), se homogeniza esta nueva mezcla rápidamente por agitación y se vierte al interior de dos cristales, ensamblados en un aditamento de la cámara.

Amortiguador para electro-elución

Tris	25 mM
Glicina	192 mM
SDS	1.0 %

Solución teñidora de azul de Coomasie

Metanol Absoluto	500 ml
Ácido Acético	100 ml
Agua bidestilada	500 ml
Azul de Coomasie	0.55 g

Solución desteñidora para la tinción de azul de Coomasie

Metanol Absoluto	40.0 %
Ácido Acético	10.0 %
Agua	60.0 %

Conservación de geles de poliacrilamida

Mojar papel celofán dulce con agua bidestilada y mojarse los dedos para facilitar el manejo del mismo y colocarlo sobre un cristal previamente humedecido con agua. A continuación se coloca el gel de poliacrilamida y se cubre con otro pedazo de papel celofán dulce de tamaño mayor al del cristal. Se eliminan las burbujas, se colocan unas reletas de acrílico en los cuatro lados y se sujetan con pinzas para mantenerlo estirado. Esperar 24 a 48 horas para que se seque por completo el gel.

Alternativamente si se cuenta con un secador de geles, se coloca el gel sobre papel filtro Whatman, se le coloca una capa de papel celofán dulce y es mantenido en el secador de geles en condiciones de vacío a 50 °C durante 45 minutos.

SOLUCIONES PARA EXTRACCIÓN DE PROTEINAS DE LA MEMBRANA EXTERNA

2X TNE-PI

20 mM Tris/HCl pH 8.0

300 mM NaCl

4 mM EDTA

0.5 % (v/v) Inhibidores de Proteasas

PBS-5mM MgCl

Se prepara primeramente el PBS

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g
Agua destilada	800 ml

Ajustar el pH a 7.4 con HCl

Ajustar el volumen a 1,000 ml y esterilizar por autoclave

Por separado, se prepara la solución de cloruro de magnesio con una mayor molaridad a la requerida (50 mM, 500 mM o 1M), recordando que, la molaridad se obtiene a partir del peso molecular de la sal expresado en gramos, c.b.p. 1000 ml, lo cual equivale a una concentración 1M o 1000 mM. La solución concentrada de MgCl se esteriliza mediante vapor a presión (15 libras/15 min). A continuación se diluye la solución de MgCl de tal forma que se obtenga la concentración de 5 mM, utilizando como diluyente al PBS.

Amortiguador final de muestra (AFM)

62.5 mM Tris hydrochloride pH6.8

10.0 % Glicerol

2.0 % SDS

AFM-0.25 mM fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF)

Se prepara primeramente el AFM. Por separado, se prepara la solución de PMSF con una mayor molaridad a la requerida (2.5 mM, 25 mM o 250 mM), recordando que, la molaridad se obtiene a partir del peso molecular de la sal expresado en gramos, c.b.p. 1000 ml de agua destilada estéril, lo cual equivale a una concentración 1M o 1000 mM. Por las concentraciones a las que se usa este reactivo, es conveniente preparar volúmenes pequeños (5 o 10 ml). La solución concentrada de PMSF se esteriliza mediante filtración (membranas de 0.45µm estériles). A continuación se diluye la

solución de PMSF de tal forma que se obtenga la concentración de 0.25 mM, utilizando como diluyente al AFM.

Solución de Tritón X-114 al 10.0 %

Tritón X-114 grado proteína	10 ml
Agua destilada estéril	90 ml

Almacenar a 4 °C en frasco ambar.

1M CaCl₂

CaCl ₂	Peso molecular en g
Agua destilada	1000 ml

Se esteriliza mediante vapor a presión (15 libras/15 min). Se almacena a TA.

SOLUCIONES PARA ELECTROTRANSFERENCIA E INMUNODETECCIÓN TIPO WESTERN

Amortiguador de Towbin

Tris (25 mM)	3.023 g
Glycina (192 mM)	14.4 g
Metanol (20.0 %)	200 ml
SDS	0.037 %

pH a 8.3
H₂O destilada cbp 1000 ml.

Se coloca en un matraz 700 ml de agua bidestilada, el tris y la glicina. La mezcla se mantiene en agitación hasta que se disuelvan completamente las sales, se agrega el SDS, disminuyendo la velocidad de agitador magnético para evitar la formación de espuma. Se ajusta el pH con NaOH 10 N y se afora a 800 ml. El amortiguador se mantiene en refrigeración hasta su uso. Antes de comenzar a utilizar el amortiguador de Towbin, se agregan 200 ml de metanol frío.

Amortiguador salino de tris [*Tris Buffered saline (TBS)*]

100 mM Tris HCl, pH 7.5

0.9 % NaCl

Almacenar a 4 °C

Amortiguador salino de Tris-Tween 20 (TBS-T)

100 mM Tris HCl, pH 7.5

0.9 % NaCl

0.05 % de Tween 20

Almacenar a 4 °C

Solución de revelado para inmunodetección tipo Western

100 ml TBS pH 8.0

20 ml de Metanol helado (-20 ° C) al cual se le agregan 60 mg de 4-1-cloro naftol

60 µl de peróxido de hidrógeno al 30.0 %

Los 100 ml de TBS se mantienen en refrigeración durante 30 min. El 4-1-cloro naftol se agrega al metanol que debe estar frío (-20 °C) y se mezclan perfectamente (esta mezcla debe hacerse al momento en que se realizará el revelado). La mezcla anterior y el peróxido de hidrógeno se agregan al mismo tiempo pero en diferente sitio cada uno, del recipiente que contiene el TBS y se mezcla rápidamente para que se homogenicen todos los componentes. A continuación se introducen las membranas que se van a revelar, se tapa el recipiente y se cubre con papel aluminio para que la reacción se lleve a cabo en la oscuridad.

APÉNDICE IV

SOLUCIONES PARA LA EXPRESIÓN Y DE PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN *E. coli*

Solución de IPTG (Isopropyl thio-galactosido)

Disolver 2 g de IPTG (PM= 238.3) en 8 ml de agua destilada estéril. Ajustar a un volumen final de 10 ml con agua destilada. Esterilizar por filtración con filtros de 0.22 μm . Hacer alícuotas de 1 ml y conservar en congelación a -20°C .

SOLUCIONES AMORTIGUADORAS PARA LA PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) [Phosphate buffered saline]

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g
Agua destilada	800 ml

Ajustar el pH a 7.4 con HCl

Ajustar el volumen a 1,000 ml y esterilizar por autoclave

Solución de lisis

NaH ₂ PO ₄ (100 mM)	13.8 g
Tris Base (10 mM)	1.2 g
Urea (8 M)	480.5 g

Aforar a 1,000 ml y ajustar el pH a 8.0 con NaOH.