



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

“ Análisis de la firma genómica en espiroquetas ”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

SARA ESTRADA ARÉVALO

TUTOR

DOCTOR ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO

2008





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

1. Datos del alumno Estrada Arévalo Sara 56 59 50 00 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 098529630
2. Datos del tutor Doctor Arturo Carlos II Becerra Bracho
3. Datos del sinodal 1 M en C Tania Hernández Hernández
4. Datos del sinodal 2 Bióloga Bibiana Rodríguez Ponce
5. Datos del sinodal 3 M en C Sara Ernestina Islas Graciano
6. Datos del sinodal 4 M en C José Ervin Silva González
7. Datos del trabajo escrito. Análisis de la firma genómica en espiroquetas. 88 p. 2008

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Firmas genómicas	3
1.1.1. Definición y delimitación	7
1.1.2. Ejemplo de otras firmas genéticas de bacterias ya determinadas	8
A. Cianobacterias	8
B. Euryarchaeotas	9
1.2. Simbiosis, Simbiogénesis y el origen del <i>Undulipodium</i>	12
1.2.1. Undulipodium y cilios	13
1.2.2. Teoría Endosimbiótica de Lynn Margulis	16
1.2.3. Espiroquetas y el origen del undulipodium	17
1.3. Biología del <i>Phylum Spirochaetes</i>	19
1.3.1. Descripción general del <i>Phylum</i>	19
1.3.2. Taxonomía	23
1.4. Espiroquetas con genoma completo secuenciado	24
1.4.1. Descripción de las <i>Borrelia</i> secuenciadas	26
A. Biología de <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i>	26
B. Parasitología de <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i>	28
C. Características genéticas de <i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i>	30
D. Características genéticas de <i>Borrelia garinii</i>	32
E. Características genéticas de <i>Borrelia afzelii</i>	34
1.4.2. Descripción de las especies de <i>Treponema</i> secuenciadas	37
A. Biología de <i>Treponema Pallidum</i>	37
B. Características genéticas de <i>T. pallidum</i>	38
C. Biología de <i>Treponema denticola</i>	40
D. Características genéticas de <i>T. denticola</i>	41

1.4.3. Descripción de las especies de <i>Leptospiras</i> secuenciadas	43
A. Biología de <i>Leptospira interrogans</i>	43
B. Características genéticas de <i>Leptospira interrogans</i> serovar Copenhageni	45
C. Características genéticas de <i>Leptospira interrogans</i> serovar Lai	47
D. Biología de <i>Leptospira borgpetersenii</i>	48
E. Características genéticas de <i>Leptospira borgpetersenii</i> variedades L550 y JB197	49
2. OBJETIVOS	51
3. HIPÓTESIS	52
4. MATERIAL Y MÉTODO	53
5. RESULTADOS	56
6. DISCUSIÓN	61
7. CONCLUSIÓN	68
8. APÉNDICES	70
8.2. Flagelo bacteriano	70
8.1. Descripción por subgrupos (clasificación mostrada en NCBI 2006)	71
A) Familia <i>Leprospiraceae</i>	71
- Género <i>Leptospira</i>	71
- Género <i>Leptonema</i>	74
- Género <i>Turneriella</i>	74
B) Familia <i>Spirochaetaceae</i>	75
- Género <i>Borrelia</i>	75
- Género <i>Brevinema</i>	76
- Género <i>Cristispira</i>	77
- Género <i>Spirochaeta</i>	78
- Género <i>Spirosonema</i>	80
- Género <i>Treponema</i>	80
9. REFERENCIAS	83

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

A) Figuras:

Figura 1.2.1. Esquema de la estructura del flagelo de una bacteria <i>Gram negativa</i>	13
Figura 1.2.2. Diferencia entre el movimiento de los <i>cilios</i> y los <i>flagelos</i>	14
Figura 1.2.3. Esquema de la estructura 9(2)+2 del undulipodium	16
Figura 1.3.2. Esquema representativo de una espiroqueta	21
Figura 1.3.3. Microscopía electrónica de <i>Leptospira interrogans</i>	72
Figura 1.3.4. Micrografía electrónica de <i>Borrelia Burgdorferi</i>	76
Figura 1.3.5. Microfotografía de <i>Spirochaeta americana</i>	79
Figura 1.3.6. Micrografía electrónica de <i>Treponema pallidum</i>	81
Figura 4.1. Genes descartados para obtener el <i>core</i> .	54
Figura 1.4.1. Filogenia del <i>Phylum Spirochaetes</i>	25
Figura 5.1. Dendograma de las espiroquetas hecho con las secuencias de los genes firma.	60

B) Tablas:

Tabla 1.3.1. Clasificación de los subgrupos del <i>Phylum Spirochaetes</i>	24
Tabla 1.4.1 Características Biológicas	29
Tabla 1.4.2 Características Genéticas	36
Tabla 5.1 Genes que constituyen la Firma Genómica de las Espiroquetas	57
Tabla 5.2. Genes que constituyen la firma genética de las Espiroquetas	59

1. INTRODUCCIÓN

La comparación y análisis de secuencias genéticas a través de métodos bioinformáticos es un método ampliamente utilizado en el campo de estudio de la evolución molecular, ya que permite una buena descripción e interpretación de la evolución de un linaje, es útil para proponer marcadores taxonómicos, así como también puede utilizarse al tratar de otorgar identidad a un taxón. En este trabajo se analizaron nueve genomas completos de espiroquetas utilizando métodos bioinformáticos, en busca de genes únicos de las especies de espiroquetas analizadas. A estos genes encontrados solo dentro de los nueve genomas utilizados, y no en otras especies, se les considera su firma genética. Al hacer una filogenia de los genes firma, que ratifique que las especies analizadas son representativas de todo el grupo de las espiroquetas, es posible considerar la firma genómica encontrada para los nueve genomas analizados, como del *Phylum* completo, hasta que otros genomas de espiroquetas sean secuenciados y sea posible llevar a cabo nuevos análisis. Es por esto que en el presente trabajo se hizo también una filogenia de los genes firma.

Debido a la falta de información sobre este grupo de organismos, la determinación de un parámetro genético distintivo sería de gran ayuda en su estudio y la dilucidación del posible papel de estas bacterias en relación a la evolución de elementos estructurales en otros grupos de organismos. Así mismo, podría dar pie a una posterior búsqueda de firmas genómicas por especie en este mismo grupo.

Las espiroquetas son un grupo de bacterias que se caracterizan por tener una morfología en espiral o bien en forma de sacacorchos, y por poseer una forma de movimiento ondulante similar al de una hélice. Las principales variedades que se reconocen de este grupo incluyen *Treponema*, *Borrelia*, *Leptospira* y *Spirillum*. Es importante mencionar que uno de los factores que han

contribuido para que en la actualidad la información que existe de este grupo de organismos sea muy limitada, es quizá que la mayoría de los estudios se han enfocado en las especies patógenas de humanos, las cuales son muy pocas en relación con el grupo completo. En consecuencia, las filogenias realizadas hasta ahora, y la descripción por subgrupos del *Phylum* aún son tentativas, por lo que muy frecuentemente es necesario reconsiderar ciertas especies y crear nuevos géneros.

En suma, es posible decir que el *Phylum Spirochaetes* como blanco de estudios genéticos posee diversos puntos de interés. Desde el punto de vista médico, su estudio podría dilucidar aspectos de la patogeneidad de ciertas especies y la relación con sus hospederos, así como encontrar nuevas técnicas para el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades que ocasionan. Desde el punto de vista taxonómico, en apoyo a la caracterización y delimitación de los subgrupos del *Phylum*, y desde el punto de vista evolutivo, en apoyo de la teoría endosimbiótica. Debido a la morfología característica de las bacterias de este *Phylum* y a la naturaleza simbiote de varias de sus especies, se ha llegado a sugerir una relación directa de las espiroquetas con la evolución del undulipodium en los eucariontes, entre otras estructuras intracelulares.

Siendo las espiroquetas un grupo con tantos puntos de interés y tan poco estudiado, se espera que el presente trabajo aporte información que sirva de referencia para futuros trabajos sobre estas bacterias.

1.1. Firmas genómicas

El análisis de secuencias de DNA es extremadamente útil en estudios de historia evolutiva y en taxonomía. El muestreo exhaustivo de secuencias de DNA ha ayudado a entender mejor la diversidad de los seres vivos, y ha permitido a los investigadores analizar las relaciones evolutivas entre grupos de manera más objetiva que sólo tomando en las características fenotípicas. La secuenciación de DNA también ha sido utilizada para identificar especímenes, y para resolver los límites entre las diferentes especies dentro de poblaciones de organismos aparentemente similares (Stoeckle, M. 2003). La información genómica obtenida del análisis de genomas completos o secuencias más pequeñas, puede complementar o corroborar la información que proveen las características fenotípicas de los organismos (Rosselló-Mora & Amann, 2001).

La década de los años 50's fue testigo del florecimiento de la evolución molecular. Dos eventos fueron los responsables: el primero fue el descubrimiento por James Watson y Francis Crick de la estructura molecular del DNA (Watson & Crick, 1953). El segundo fue la publicación, en 1955, de la primer comparación de secuencias de aminoácidos (en ese caso de la insulina) de diferentes especies, llevada a cabo por Fred Sanger y sus colegas. A raíz de esto fue evidente que la evolución, a su nivel más fundamental, puede ser considerada como cambios en la estructura del DNA a pesar de que las fuerzas evolutivas actúen a nivel proteínico (Page, R.D.M. & Holmes, E.C. 1998).

Establecido lo anterior, a partir de 1953, con un nuevo marco de referencia evolutivo molecular, se comenzaron a desarrollar y a utilizar ampliamente métodos de análisis de secuencias genéticas para estudios evolutivos, con diferentes objetivos. Uno de los más importantes fue proponer nuevos parámetros para conocer la historia filogenética de los organismos y por ende su clasificación. Así, en los 70's Carl Woese y George Fox, utilizando el

altamente conservado gen del RNA ribosomal (rRNA) de la subunidad pequeña (16S), mostraron que había en realidad dos grupos muy diferentes de procariontes (las *Eubacterias* y las *Arqueobacterias*), y que uno de ellos, las *Arqueobacterias* de hecho están más cercanamente relacionadas con los *Eucariontes* de lo que están con las *Eubacterias* (Fox, E.G. *et al.* 1977). Estos resultados sirvieron como base para que posteriormente se estableciera el modelo de los tres dominios celulares Arquea, Bacteria Y Eucaria (Page, R.D.M. and Holmes, E.C. 1998).

Por otro lado, también se comenzaron a buscar elementos moleculares que, de alguna, manera pudieran definir o delimitar intrínsecamente a los organismos y a los linajes (Rosselló-Mora & Amann, 2001). Esto se buscaba hacer a través de la identificación de conjuntos de moléculas exclusivas a cada organismo, o linajes, surgiendo así el concepto de las firmas proteínicas, y después el de las firmas genómicas (Page, R.D.M. and Holmes, E.C. 1998). Tanto las firmas proteínicas como las firmas genómicas, incluyen proteínas y genes respectivamente, que se encuentran presentes en todos los organismos de un linaje, y que no tienen homólogos funcionales fuera del linaje para la cual se les define. Dada la naturaleza de las firmas proteínicas y genómicas, es posible utilizarlas como marcadores taxonómicos moleculares, ya que los marcadores taxonómicos señalan características específicas, únicas y conservadas dentro de los linajes. Los marcadores taxonómicos permiten reconocer organismos de un linaje determinado, de una manera más fácil y objetiva, al ser específicos y únicos de cada linaje (Graham D. *et al.* 1999).

También recientemente se ha introducido un nuevo concepto, en busca de un parámetro universal para la clasificación de los seres vivos, conocido como *The Bar Code of life* (el código de barras de la vida). Este proyecto, se basa en la utilidad potencial que podría tener un esfuerzo masivo por secuenciar blancos genéticos uniformes en todas las especies de seres vivos, con el

objetivo de proporcionar un método práctico para la identificación de las especies, y permitir un mejor entendimiento de la historia evolutiva de los seres vivos (Stoeckle, M. 2003). Se ha mostrado con el análisis de las secuencias de la subunidad c oxidasa del citocromo (COI), que el *DNA bar coding* puede distinguir al menos algunas especies entre especies cercanamente relacionadas, a través de diversos *phyla* en el reino animal (Hebert *et al.* 2003). Con estos ejemplos, es importante mencionar que mucha de la biología moderna depende de descifrar la información almacenada en las secuencias genómicas.

Al intentar aplicar los ya mencionados métodos de evolución molecular a las espiroquetas, es importante mencionar que actualmente la taxonomía de bacterias enfrenta todos los problemas de la clasificación biológica en general, como: la falta de consenso respecto al concepto de *especie*, que no existan límites absolutos entre los grupos, y que no todos los grupos de organismos cuentan con un registro fósil. Aunadas a estos problemas, se encuentran las dificultades taxonómicas propias de los procariontes, por ejemplo, su difícil (y a veces imposible) aislamiento en cultivos puros, que no se reproducen de manera sexual, la presencia de una alta tasa de transferencia horizontal, y que parecen ser geográficamente ubicuas (pueden estar presentes en todas partes) (Rosselló-Mora & Amann, 2001). Estas dificultades, que se han ido resolviendo por medio de las técnicas de secuenciación y comparación molecular (Holt, J., *et al.* 1999).

En términos filogenéticos, las espiroquetas son uno de los mayores grupos de bacterias cuyas relaciones filogenéticas naturales son evidentes por sus características fenotípicas, como: ultra estructura celular que es única entre las Eubacterias, *flagelos periplasmáticos*, la resistencia que tienen al antibiótico *rifampin* y la presencia de *ornitina* en los peptidoglicanos de su pared celular (Paster B.J. *et al.* 1991). Sin embargo, a pesar de que la relación de estas características de alguna forma muestran la historia y naturaleza de las

espiroquetas, no son necesariamente características definitorias, ya que algunas de las características compartidas podrían tener un origen análogo, en vez de homólogo (Graham D. *et al.* 1999).

Es importante mencionar que no existe una característica fisiológica, ecológica o estructural intrínseca de un grupo de organismos, definida por la filogenia de un solo gen, haciendo que la búsqueda de un solo gen representativo un grupo arroje poca o ninguna información sobre éste. Es quizá aquí donde entra la importancia de identificar no un gen, sino una firma genómica, ya que la filogenia del conjunto de genes de la firma genómica podría arrojar datos que posteriormente permitan definir alguna característica estructural intrínseca del grupo (ya que no estarán presentes en otros grupos), o incluso alguna característica fisiológica o ecológica.

Hacer una filogenia de los genes firma de las espiroquetas, ayuda a determinar que tan representativos son para el *phylum* completo de las espiroquetas (si están o no ampliamente distribuidos en la filogenia). Así mismo, permite comparar si los grupos resultantes en la filogenia de los genes firma corresponden, en origen y distancias evolutivas a los grupos filogenéticos descritos con 16s rRNA (Paster, B.J. *et al.* 1991). Esto último aportaría datos, que podrían ayudar en la taxonomía de estas bacterias. Para esto, es importante mencionar que los genes firma pueden funcionar como marcadores moleculares de las espiroquetas, al ser exclusivos de éstas, dando pie a la identificación y descripción de secuencias que están presentes (conservadas) en todas las espiroquetas. Así, las firmas genómicas ayudan a describir los taxa con más detalle, ya que su amplitud lejos de reemplazar, complementa las filogenias moleculares hechas con 16s rRNA, que son menos costosas, mejor entendidas en cuanto a función y estructura, y directamente comparables dentro de grandes distancias evolutivas. Por lo tanto, la definición de las firmas genómicas de las espiroquetas y de todos los grandes linajes será de gran ayuda para la

comprensión de cómo se dio la evolución de los tipos modernos de células (Graham D. *et al.* 1999).

Por otro lado, el reconocimiento de los genes firma de las espiroquetas podría ayudar a sugerir uno o varios marcadores taxonómicos, siendo ésta una importante aportación a las futuras investigaciones sobre los miembros de este grupo de bacterias. La identificación de nuevas especies sería más objetiva, y en la medicina los marcadores taxonómicos serían de gran utilidad para diagnosticar enfermedades causadas por espiroquetas.

1.1.1. Definición y delimitación

En realidad no existe una definición universal de *firma genómica*, ni una sola forma de delimitarla. Para fines de este trabajo, se definió la firma genómica en términos generales como el conjunto de genes que es posible encontrar en al menos dos miembros alejados de un taxón y que funcionan únicamente dentro del taxón al que pertenecen. Las proteínas de la firma no poseen homólogos que hayan sido o puedan ser reconocidos en otros taxa.

Más puntualmente, la firma genómica de las espiroquetas se delimitó para este trabajo como aquellos genes que es posible encontrar en al menos una de las especies de cada género que se analizó, que no es posible encontrar en ningún otro grupo de organismos fuera del *Phylum Spirochaete* y que no tienen homólogos claros en otros grupos.

1.1.2. Ejemplo de otras firmas genómicas de bacterias ya determinadas

Existen dos grupos de microorganismos cuyas firmas genómicas ya han sido identificadas, las *Cyanobacterias* (Martin, K.A. *et al.* 2002) y las *Euryarchaeotas* (Graham D. *et al.* 1999). Para determinar la firma genómica de ambos grupos se utilizaron 8 genomas secuenciados de organismos pertenecientes a cada uno de los dos grupos analizados.

A. Cyanobacterias

En el caso de las *Cyanobacterias* la identificación de su firma genómica, ha permitido describir las características que compartieron los primeros miembros que existieron de su grupo y la antigüedad de estos. Lo anterior resulta de gran interés para los estudios de la historia temprana de la vida, ya que algunas de estas características tuvieron gran impacto sobre la vida primitiva y podrían incluso persistir hasta hoy en día (Martin, K.A. *et al.* 2002).

Los 8 genomas de *Cyanobacterias* hoy día comparados, representan los mayores linajes de las ramas derivadas más recientemente en el árbol filogenético de las *Cyanobacterias*. El resultado de la comparación, reveló que existen 181 genes compartidos entre *Cyanobacterias*, que al parecer no tienen homólogos (mismo gen con la misma función) obvios en otras bacterias (Apéndice 1). Aproximadamente 25% de estos genes (43 genes) están asociados con alguna función conocida; 34 de estos están relacionados directa o indirectamente con la fotosíntesis, mientras que los 9 restantes están involucrados con otro tipo de funciones no relacionadas con la fotosíntesis. La mayoría de los genes de la firma (138 genes), aún son tomados como genes

hipotéticos (Martin, K.A. *et al.* 2002).

También se encontraron varios genes ampliamente conservados (dos o más genes de la firma), lo cual sugiere que las *Cyanobacterias* pueden tener procesos regulatorios específicos de ellas, que se hayan preservado durante su larga historia evolutiva (Martin, K.A. *et al.* 2002). Por otro lado, 46 de los 181 genes de la firma están incluidos dentro de un conjunto de 434 genes propuestos como candidatos para la transferencia horizontal inter-dominio de genes (Martin, K.A. *et al.* 2002).

Obtenida esta información, en el caso de las *Cyanobacterias*, la mayoría de los genes de la firma no contaron con una función asignada, y no se pudo determinar la relevancia de los genes de la firma en las características de las *Cyanobacterias*. Por lo tanto, la importancia de dichos genes aún se desconoce (Martin, K.A. *et al.* 2002).

B. Euryarchaeotas

En *Euryarchaeotas*, la comparación de genomas para obtener la firma genómica, llevada a cabo por Graham, *et al.*, se hizo para poder tener una mayor comprensión del proceso evolutivo de estas bacterias. Encontraron que en su mayoría, el conjunto de genes descritos dentro de la firma están altamente conservados. Estos genes cumplen su función únicamente dentro de las *Archaeas*, y a pesar de que el análisis comparativo fue únicamente entre *Euryarchaeotas* - ya que hasta la fecha solo existe un genoma de *Crenarchaeales* secuenciado - la firma genómica se hizo extensiva a todas las *Archaeas* (Graham D. *et al.* 1999).

La comparación mostró 351 grupos de genes identificados dentro de la firma, que comprenden 1, 149 genes codificantes de proteínas en las *Archaeas*.

Estos genes comprenden una porción significativa (9 – 15%) del DNA genómico de los organismos comparados. Se espera que la posterior secuenciación de más genomas de *Crenarchaeales* introduzca nuevos grupos de genes a la firma (Graham D. *et al.* 1999).

La mayor parte de los genes de la firma son hipotéticos, por lo que a la fecha, no tienen una función conocida, lo cual resulta lógico, ya que la mayor parte de los genes cuya función se conoce en las *Archaeas*, tienen homólogos en *Eubacterias* y *Eucariontes*.

Estos conjuntos de genes hipotéticos en la firma incluyen 12 grupos de proteínas fijadoras de ATP/GTP; un grupo grande que incluye la ruta metabólica de la metanogénesis y 10 grupos de enzimas procesadoras de DNA o RNA únicas de *Archaeotas*. Por definición los grupos no incluyen proteínas conservadas universalmente (traducción, transcripción, metabolismo central, división celular, y la biosíntesis de aminoácidos y nucleótidos), y están casi por completo ausentes (Graham, D. *et al.* 1999).

A pesar de que ninguna de las proteínas de la firma genómica de las *Euryarchaeas* tiene homólogas cercanas fuera de los genomas de las *Archaeas*, algunas de ellas han divergido funcionalmente de sus homólogas en los genomas de *Eubacterias* y *Eucariontes*. A pesar de ello se toman dentro de la firma, ya que su modo de operación ancestral, como parte de una ruta metabólica *metanogénica reductiva* (en organismos *Euryarchaeales* profundamente ramificados), encaja dentro del criterio de función única dentro del linaje de las *Archaeas* (Graham, D. *et al.* 1999).

En perspectiva, la firma genómica de las *Euryarchaeas* cuestiona el punto de vista clásico sobre aquello que distingue de mejor forma las *Archaeas* de las *Eubacterias* o los *Eucariontes*. Los factores de resistencia a antibióticos, las

proteínas de pared celular y la mayor parte de los sistemas procesadores de información están ausentes en la firma. En su lugar se encuentran sistemas energéticos claves, biosíntesis de cofactores y muchos genes aún no caracterizados. Por lo tanto esta firma apoya la conclusión filogenética de que las *Archaeas* son un gran linaje que divergió ancestralmente, y que contiene una gran proporción de genes únicos (Graham, D. *et al.* 1999).

1.2. Simbiosis y Simbiogénesis

El término simbiosis se refiere a un tipo de interacción ecológica en la que dos o más organismos de diferentes especies (simbiontes), viven juntos en una relación muy estrecha que beneficia al menos a uno de ellos. En la naturaleza existen innumerables ejemplos de éste tipo de relación ecológica, la cual ha sido muy popular desde hace millones años entre los seres vivos, y ha permitido a muchos organismos vivir en nichos ecológicos donde individualmente no lo habrían podido hacer (Knox, B., *et al.* 2005).

El término simbiogénesis se basa en el de endosimbiosis – un tipo de simbiosis donde un simbiote vive dentro del otro (Knox, B., *et al.* 2005) –, y es utilizado para nombrar el proceso por el cual a través de una relación simbiótica a largo plazo entre diferentes organismos surgen nuevos tipos de organismos por “fusión” de las especies que originalmente participaban en la relación simbiótica (comunicación oral, Margulis, L. 2008). En la actualidad se sabe que fue a través de éste proceso que surgieron los primeros *Eucariontes*, y que así adquirieron varios de los organelos que poseen hoy en día. Esta teoría fue propuesta por Andreas Schimper en 1883 para explicar el origen de las mitocondrias, y en 1905 por Konstantin Mereschkowsky. En 1926, Ivan Wallin propuso que las mitocondrias se habían originado de cianobacterias capturadas en el interior de protistas. Sin embargo, la hipótesis de Wallin estaba basada en la falsa premisa de que las mitocondrias no contienen DNA, y fue discontinuada. Esta idea fue retomada y desarrollada posteriormente - después de que el DNA mitocondrial fuera identificado - por Lynn Margulis (Sagan, L. 1967), quién la consolidó en su Teoría Endosimbiótica (*Teoría Endosimbiótica del origen de las células eucarióticas*). Uno de los puntos de esta teoría, señala

que por simbiogénesis fue que se originó el *undulipodio* en los eucariontes a partir de una relación endosimbiótica que incluía espiroquetas (Margulis, L. 1981).

1.2.1. *Undulipodium* y cilios

Al hablar de undulipodium y cilios - los órganos de motilidad de las células eucariontes - es importantes no confundirlos con los flagelos bacterianos, cuya composición y estructura es muy diferente (ver apéndice I y figura 1.2.1.).

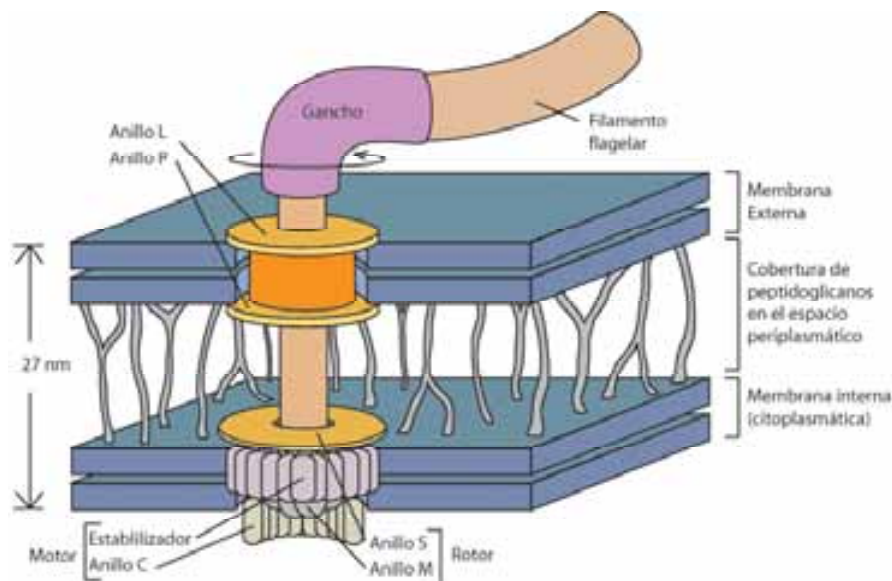


Figura 1.2.1. Esquema de la estructura del flagelo de una bacteria *Gram negativa* (modificación del original, Alberts, *et al.* 1994).

Los *cilios* son apéndices que se proyectan de las células eucariontes que miden cerca de $0.25 \mu m$ de diámetro y se encuentran en la mayoría de las especies animales y en algunas plantas simples. Su función principal es mover fluidos sobre la superficie de la célula o impulsar a las células a través de fluidos con un tipo de movimiento ondulante (figura 1.2.2.) (Alberts, *et al.* 1994). Sin embargo existe otro tipo de cilios sin movilidad que generalmente cumplen con

funciones sensoriales, y se encuentran uno por célula si los llegan a presentar. Ciertos protistas por ejemplo, usan a los cilios tanto para recolectar partículas de comida como para su locomoción. Los cilios también ayudan a arrastrar los óvulos a través del oviducto, y las estructuras relacionadas. Por su parte, los nemátodos y los artrópodos presentan cilios inmóviles en algunas células nerviosas sensoriales (Alberts, *et al.* 1994).

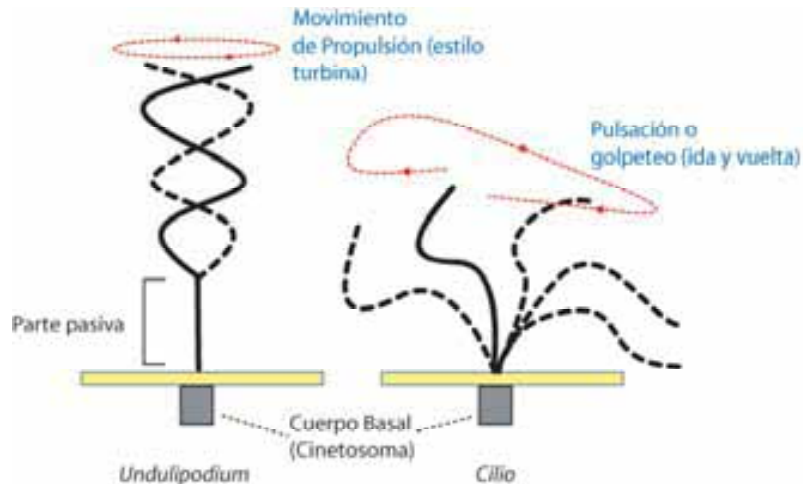


Figura 1.2.2. Diferencia entre el movimiento de los *cilios* y los *flagelos* (imagen modificada del original de Kohidai, L. 2008, hecha para *Wikimedia Commons*)

Los *undulipodia* (singular *undulipodium*) al igual que los *cilios*, son extensiones de las células eucariontes. Tienen forma de látigo y otorgan movimiento de propulsión a las células individuales, por lo que a diferencia de los *cilios*, son más largos e impulsan a las células con un movimiento parecido al de una hélice (figura 1.2.2.). Generalmente se encuentra un undulipodium por célula. Un ejemplo de estos son las colas de los espermatozoides.

Los cilios y flagelos son estructuralmente idénticos, ambos están compuestos de microtúbulos que son formados por moléculas de *tubulina*, un heterodímero consistente de dos subunidades globulares muy cercanamente relacionadas. Estas subunidades son proteínas relacionadas (cada una

compuesta de cerca de 450 residuos de aminoácidos) llamadas α -*tubulina* y β -*tubulina* (Alberts, *et al.* 1994).

Cuando las moléculas de *tubulina* se ensamblan en microtúbulos, forman *protofilamentos* lineares con la subunidad de la β -*tubulina* de una molécula de *tubulina* en contacto con la subunidad de la α -*tubulina* de la siguiente. En el microtúbulo completo hay 13 *protofilamentos* organizados en paralelo alrededor de un núcleo central que parece estar vacío en las micrografías electrónicas. A partir de que todos los protofilamentos están alineados en paralelo con la misma polaridad, un microtúbulo es una estructura polarizada con un lado positivo y uno negativo. El lado positivo está localizado en la punta distal del cilio o undulipodium (Alberts, *et al.* 1994).

A la estructura axial formada por microtúbulos de los *cilios* y *flagelos* se le denomina *axonema*, y se caracteriza por su disposición de microtúbulos $9(2)+2$, es decir, 9 pares de microtúbulos fusionados periféricos y dos en el centro (o núcleo), rodeados por una extensión de la membrana plasmática de la célula, teniendo el interior de estos órganos de locomoción acceso al citoplasma de la célula (figura 1.2.3). En la base de los *cilios* y los undulipodia se encuentra un cuerpo basal llamado *cinetosoma* que es el centro donde se organizan los microtúbulos, y es estructuralmente idéntico al los centriolos con la *conformación* $9+0$ (Margulis, L. & Dolan M.F. 2002).

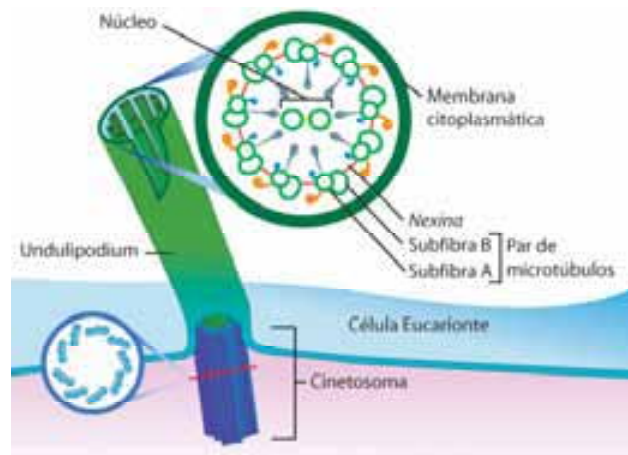


Figura 1.2.3. Esquema de la estructura 9(2)+2 del undulipodium (imagen modificada del original de Hats, L. 2007, hecha para *Wikimedia Commons*).

1.2.2. Teoría Endosimbiótica de Lynn Margulis

La teoría endosimbiótica del origen de las células eucarióticas de Margulis postula que *Arqueobacterias* y *Eubacterias* de vida libre se unieron como células hospedera y simbiote, primero por casualidad y después por necesidad formando asociaciones más estables, mucho antes de que se diera la simbiosis mitocondrial. La quimera resultante fue una célula anaerobia móvil. El núcleo emergió dentro de esta quimera arqueobacteria-bacteria, primero como un organelo simbiótico de unión – para unir genes de ambos organismos y poder segregarlos a su descendencia –, que posteriormente se adjuntó a las espiroquetas simbiotes que se unieron en algún momento a la quimera original, y dieron origen al undulipodio y a todas las estructuras celulares de movimiento interno con el arreglo 9(2)+2 característico de los axonemas. Con el paso del tiempo y conforme las presiones evolutivas favorecieron estas relaciones simbióticas, las células asociadas quedaron permanentemente unidas en un nuevo tipo de célula, ahora eucariótica, ya que tenía un núcleo y estaba

formada de componentes interdependientes. Este primer eucarionte era móvil gracias a su undulipodium, anaerobio debido a que aún no había adquirido mitocondrias, y heterótrofo ya que no tenía orgánulos fotosintéticos (Margulis, L. 2001).

De acuerdo a la teoría de Margulis, tres clases de organelos (undulipodium, mitocondrias y plástidos) vivieron alguna vez como procariontes independientes: móviles, respiradores de oxígeno y fotosintéticos, respectivamente. Esta idea explica el material genético separado y diferente en el caso de las mitocondrias y los plásmidos, sin embargo, el hecho de que el undulipodium no tenga DNA asociado a ellos aún necesita explicación (Margulis, L. 2001).

La teoría de Margulis se ha fundamentado principalmente en que esta secuencia de acontecimientos que describe, aparece en las relaciones simbióticas de muchas formas modernas de vida; muchos organismos viven en el interior de, o adheridos a, otros organismos. Por otro lado, la simbiosis hereditaria, aquella en la cual los miembros permanecen juntos a lo largo de todo su ciclo vital, es de una gran frecuencia también. Casi todos los grupos de organismos poseen miembros que han formado alguna estrecha asociación, ya sea para la alimentación, la limpieza o la protección. La fisiología y los modelos de herencia de las simbiosis modernas aportan analogías para la evaluación de esta teoría, en que los orgánulos celulares surgieron a través de una relación de simbiosis (Margulis, L. 2001).

1.2.3. Espiroquetas y el origen del undulipodium

En relación al origen del undulipodio, en particular, la teoría de la *endosimbiosis* plantea que el *undolipodio* surgió de una simbiosis temprana entre una bacteria móvil del tipo de las espiroquetas y una arqueobacteria. De

acuerdo con esta teoría, las espiroquetas se asociaban tanto con bacterias heterótrofas como autótrofas, para tomar ventaja del alimento que inevitablemente escapaba de la membrana exterior de éstas. Eventualmente las espiroquetas ondulantes comenzaron a propulsar a las bacterias con las que se asociaban a través del medio acuoso, y con el paso del tiempo las espiroquetas en la superficie se integraron con su arqueobacteria acompañante y se convirtieron en el *undulipodia* (Margulis, L. and Dolan M. 2002).

Este tipo de relaciones entre espiroquetas y protistas en la actualidad, incluso simbiosis específicas de motilidad, son bien conocidas. Un ejemplo es el de *Mixotrichia paradoxa*, un protista que vive en el intestino de las termitas australianas (*Mastotermes darwiniensis*), y su relación simbiótica con medio millón de espiroquetas que viven adheridas a su superficie. Las espiroquetas coordinan su movimiento para impulsar a *Mixotrichia* (Margulis, L. and Dolan M. 2002).

Si el undulipodia se deriva de las espiroquetas, sería fácil ver por qué los eucariontes en la actualidad, varían enormemente en el número de undulipodia que portan, pero no en el tamaño y la forma de cada undulipodium. Como todas las bacterias, las primeras espiroquetas simbiotes tenían un tamaño característico de undulipodium más o menos constante, pero el número de undulipodia que poseían era variable. Por lo tanto, es posible encontrar tan pocos undulipodia como uno solo en ciertas especies acuáticas, y más de un millón en algunos ciliados (Margulis, L. and Dolan M. 2002).

La teoría del origen del *undulipodia* tiene ciertos puntos débiles. No existe DNA en el *cinetosoma*, y el *undulipodia* no contiene su propio material genético. Los genes que determinan la secuencia de aminoácidos de la tubulina se encuentran en cromosomas en el núcleo celular, por lo que las espiroquetas originales no dejaron ningún remanente genético separado. Perdieron sus

membranas, se fusionaron completamente y ahora dependen totalmente de la célula protoctista, animal o vegetal para sustentarse y reproducirse. Aunque cabe mencionar que si poseen una mínima cantidad de RNA (Margulis, L. and Dolan M. 2002).

De acuerdo a lo postulado por la teoría endosimbiótica, algunas de las cosas que deberían encontrarse en futuras investigaciones, serían ciertas espiroquetas que contengan proteínas hechas de secuencias de aminoácidos similares a aquellas de la tubulina "MAPS" (microtubule-associated proteins) y algunas otras proteínas de motilidad funcionales eucarióticas. Y si estas espiroquetas son encontradas, deberían contener alguna parte de DNA y RNA con las mismas secuencias de nucleótidos que se encuentran en los genes responsables de los *kinetosomas* y los *axonemas* (Margulis, L. and Dolan M. 2002).

Una análisis importante relacionado con el origen del *undolipodio*, sería la búsqueda de genes en los genomas de las espiroquetas, que en la actualidad puedan compartir solamente con los eucariontes, e indagar aún quedan en sus genomas rastros de aquella relación simbiótica original, y si es posible, buscar alguna relación de esos genes que podrían compartir, con funciones de motilidad.

1.3. Biología del *Phylum Spirochaetes*

1.3. 1. Descripción General del *Pylum Spirochaetes*

Las bacterias del *Phylum Spirochaetes* son bacterias *Gram negativas* de morfología ondulada o en espiral (helicoidales) y dimensiones variables (0.1 a 3 μm de diámetro por 5 a 250 μm de longitud), cuya pared celular es fina y flexible. Poseen una membrana externa muy fina y frágil esencial para la integridad

estructural de las espiroquetas, formada por múltiples capas llamada *envoltura celular* o *membrana externa*. Esta envoltura es de naturaleza lipoproteína, y contiene lipopolisacáridos que constituyen la mayoría de los antígenos específicos estas bacterias. La *membrana externa* rodea completamente al llamado *cilindro protoplasmático* (helicoidal) constituido por el citoplasma (protoplasma) y el núcleo, y delimitado por el complejo formado por la *membrana citoplasmática* y la *pared celular* (capa de peptidoglicanos) que lo rodea, único de las espiroquetas, ya que en el resto de las bacterias *Gram negativas* los peptidoglicanos están asociados a la membrana externa. Casi todas son unicelulares, aunque se sospecha que *Spirochaeta plicatilis* pudiera ser multicelular (Pumarola, A. *et al.* 1987).

La característica distintiva de las espiroquetas es su mecanismo de locomoción, que consiste de apéndices llamados *filamentos axiales* o *flagelos periplásmicos*, que corren alrededor del *cilindro protoplasmático*, y están cubiertos junto con el *cilindro protoplasmático* por la *membrana externa*. Estos flagelos pueden llegar a presentarse desde una cantidad tan pequeña como dos, hasta una conglomeración de cien. Su estructura es casi idéntica a la de los flagelos bacteriales, pero se diferencian de estos por estar permanentemente dispuestos alrededor de la célula y por ser completamente intracelulares, ya que se encuentran entre la *membrana externa* y el *cilindro protoplasmático* cubiertos por una envoltura de proteínas, azúcares y lípidos. La función exacta de dicha envoltura se desconoce, pero se sabe que es esencial para el funcionamiento adecuado del *filamento axial*, ya que el removerla o dañarla resulta en una pérdida de movilidad en la bacteria. Uno de los extremos de cada *filamento axial* se encuentra insertado cerca de un polo del *cilindro protoplasmático*, y el otro extremo queda libre. Cada polo tiene el mismo número de *flagelos periplásmicos* insertados. En general, los extremos libres del *filamento axial* tienen terminaciones en forma de gancho. Los mutantes que carecen de

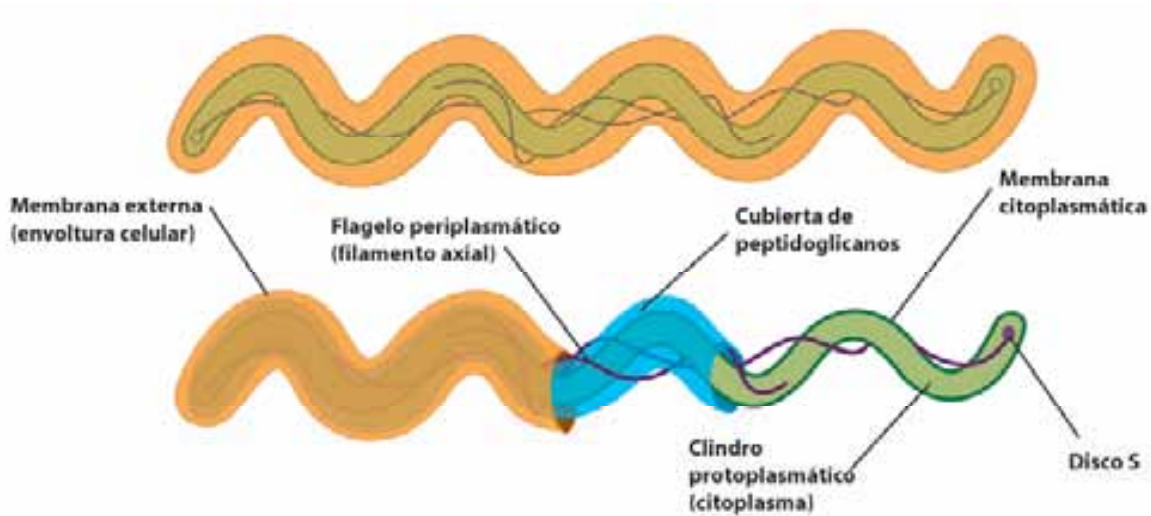


Figura 1.3.2. Esquema representativo de una espiroqueta. La cubierta anaranjada representa la *membrana externa*, el área azul, la fina *cubierta de peptidoglicanos*, que a su vez recubre el *cilindro protoplasmático* representado en verde. La línea verde oscuro señala la *membrana citoplasmática*, y los círculos en los polos del *cilindro protoplasmático* indican los *discos S* de inserción de los *filamentos axiales*. Las líneas moradas alrededor del *cilindro protoplasmático* son los *filamentos axiales* (modificado de Holt, J., *et al.* 1999).

Las estructuras de la cubierta y el centro del *filamento axial* en general han sido vagamente caracterizados. En la bacteria *Treponema pallidum*, la cubierta parece estar hecha de dos tipos de proteínas grandes, una de 37 kilodaltones y la otra de 31.5 kilodaltones, y algunas otras moléculas pequeñas dispersas. El centro del filamento parece estar compuesto de al menos dos polipéptidos, uno de 33.5 kilodaltones y el otro de 34 kilodaltones.

Las espiroquetas son microorganismos móviles, que a diferencia de otras bacterias tienen movilidad en contacto directo con el medio externo, aún sin la

presencia de flagelos que las impulsen por rotación. Presentan tres tipos de movimiento en medios líquidos: rotación a lo largo de su eje longitudinal, flexión y progresión en forma de tirabuzón (Pumarola, A. *et al.* 1987). También pueden desplazarse en ambientes altamente viscosos, medios donde otras bacterias flageladas normalmente se vuelven inmóviles, incluso son capaces de moverse en medios sólidos con 1% de agar. Los mecanismos por los que el *filamento axial* produce estos movimientos son desconocidos y las teorías sobre este tema son altamente presuntuosas.

Los grupos de espiroquetas se diferencian por sus caracteres morfológicos y fisiológicos. Los de mayor diámetro pueden observarse con un microscopio óptico en preparaciones teñidas con el métodos de *Giemsa* o de *Gram*. Los más finos sólo se observan en fresco con el microscopio de fondo oscuro y contraste de fases o por métodos de coloración que aumenten su diámetro, como las técnicas de impregnación antigénica (Pumarola, A. *et al.* 1987). En general es casi imposible cultivar a estos organismos en el laboratorio, ya que sus necesidades nutritivas son diversas lo que hace su estudio más difícil, sin embargo algunas especies si pueden cultivarse en medios artificiales. Pueden ser aeróbias o anaeróbias, y su metabolismo de tipo oxidativo o fermentativo (Pumarola, A. *et al.* 1987).

Las espiroquetas se encuentran muy difundidas en la naturaleza ya sea de vida libre y anaerobias en las aguas, o como simbiotes en los animales y los humanos, donde generalmente se comportan como comensales, aunque se tienen algunas especies patógenas (Pumarola, A. *et al.* 1987). Los carbohidratos, los aminoácidos, las largas cadenas de ácidos grasos o las cadenas largas de alcoholes grasos les sirven de fuente de carbono y energía.

1.3.2. Taxonomía

Las espiroquetas son un grupo con muy pocas especies bien estudiadas, por lo que su clasificación taxonómica cambia frecuentemente conforme se encuentran nuevas especies, son caracterizadas y es necesario reagruparlas, a veces teniendo que reconsiderar los géneros anteriormente establecidos, siendo muy común que surjan nuevos géneros y desaparezcan. En la actualidad el número de familias y géneros, así como sus nombres y las especies que incluyen varían aún ampliamente de autor a autor, salvo por algunos géneros como *Borrelia* y *Leptospira*, que se han conocido y estudiado por más tiempo.

En función de definir lo mejor posible a este grupo de bacterias para su comparación y análisis, en el presente trabajo únicamente se tomará en cuenta una sola de las clasificaciones existentes, la de NCBI mostrada en la figura 1.3.1. (NCBI Website, 2006). Existen otras clasificaciones importantes propuestas para las espiroquetas como la que aparece en el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey's (Holt, J. *et al.* 1984-1999), donde coincide con la clasificación de NCBI en 7 géneros (*Borrelia*, *Brevinema*, *Cristispera*, *Spirochaeta*, *Treponema*, *Leptospira* y *Leptonema*), pero propone otros dos géneros (*Serpulina* y *Brachyspira*) que no concuerdan con ninguno de los géneros que aparecen en NCBI (*Turneriella* y *Spironema*) y que no aparecen en Bergey's. Esto tiene que ver los parámetros que utilizan las diferente clasificaciones para determinar los diferentes grupos y especies. En el caso del manual de Bergey's el enfoque es más morfológico y médico, de tal forma que parámetros genéticos importantes (como contenido G+C), no son tomados en cuenta para la clasificación. En el caso de la clasificación de NCBI, los parámetros morfológicos no son tomados en cuenta.

En términos de la taxonomía de espiroquetas, será necesario hacer un consenso de los grupos hasta ahora propuestos por diferentes clasificaciones, tomando en cuenta en la mayor cantidad posible parámetros genéticos y fenotípicos, para tener una clasificación y una delimitación de grupos mucho más objetiva (Roselló-Mora, R., & Amann, R., 2001).

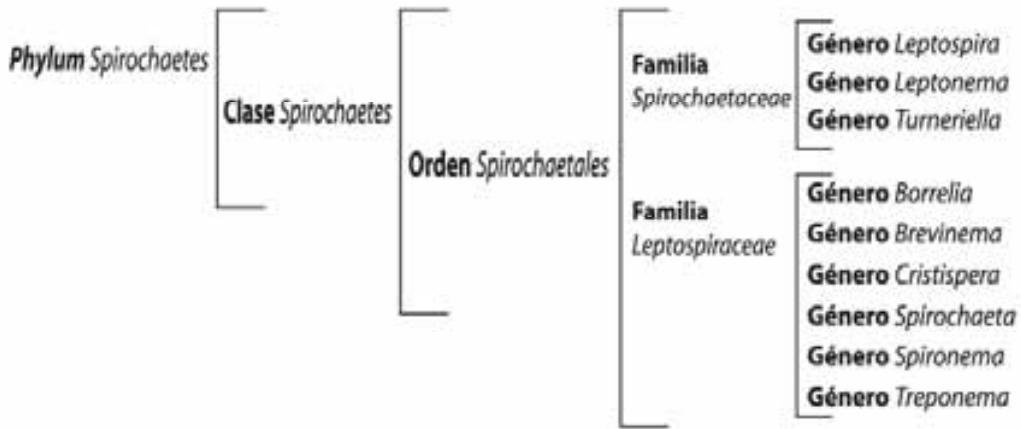


Tabla 1.3.1. Clasificación de los subgrupos del *Phylum Spirochaetes* (NCBI, 2006).

1.4. Espiroquetas con genoma completo secuenciado

Hoy día existen 12 genomas de espiroquetas secuenciados completos, de los cuales en este trabajo se utilizaron 9 para buscar su firma genética - los disponibles en el momento en que se llevo a cabo la comparación de secuencias y el análisis de datos - (KEGG Website, 2007). Los genomas pertenecen a las siguientes especies de espiroquetas: tres especies del género *Borrelia* (*B. burgdoferi*, *B. garinii* y *B. afzelii*), dos del género *Treponema* (*T. pallidum* y *T. denticola*) y dos especie del género *Leptospira* secuenciadas para dos genotipos cada una (*L. interrogans* serovar LAI, *L.interrogans* serovar Copenhageni, *L. borgpetersenii* JB197 y *L. borgpetersenii* L550).

De acuerdo a una filogenia publicada de espiroquetas (Paster, B.J. *et al.* 1991), los nueve genomas de espiroquetas utilizados para obtener la firma genómica pueden tomarse como representativos del *phylum* completo (al menos hasta que se pueda hacer un análisis con más genomas), ya que los géneros que representan se encuentran en diferentes ramas del árbol filogenético con distancias evolutivas aceptables entre ellas (Fig. 1.4.1.).

Para ver una descripción más detallada de las características morfológicas y fisiológicas del diverso *Phylum Spirochaetes* enumeradas género por género, ver el Apéndice II.

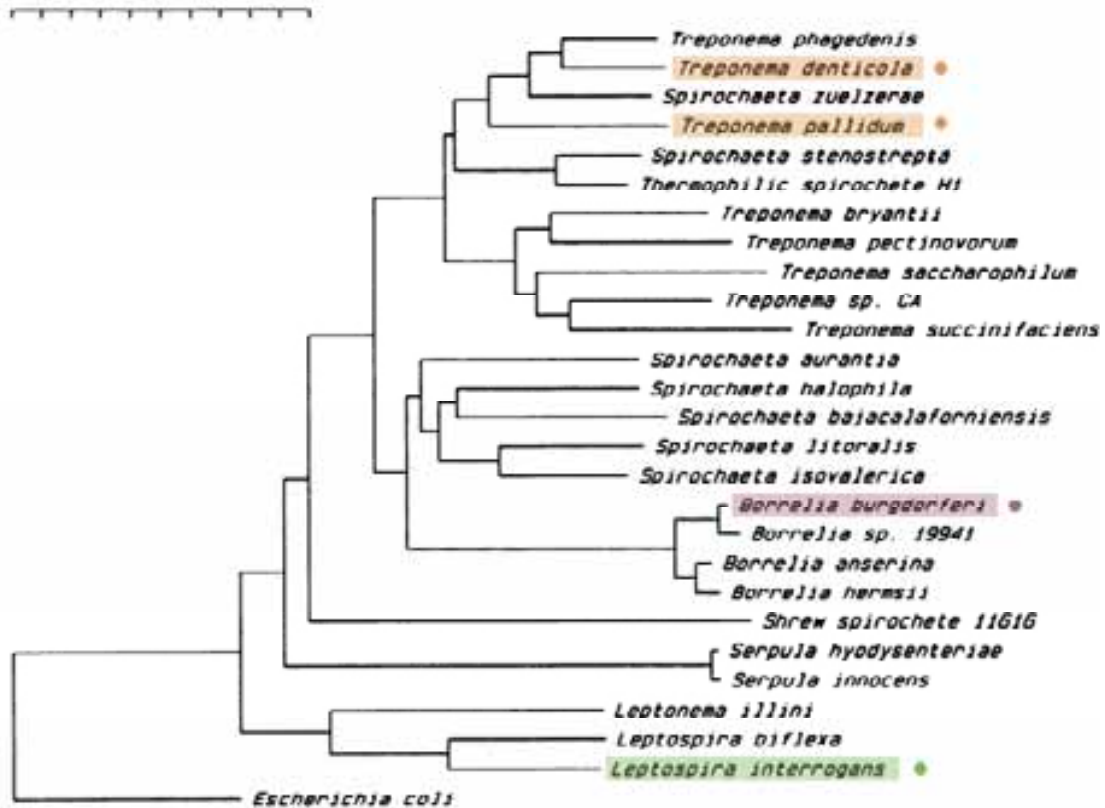


Figura 1.4.1. Filogenia del *Phylum Spirochaetes*, con *E. coli* como grupo externo. La escala representa una diferencia del 10% en las secuencias de nucleótidos, determinada tomando la suma de todas las líneas horizontales que conectan dos especies (Paster, B.J. *et al.* 1991).

1.4.1. Descripción de las *Borrelia* secuenciadas

Los genomas secuenciados del género *Borrelia* pertenecen a tres especies de espiroquetas (*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii*) que biológicamente son descritas como una misma especie: *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Hasta hace muy poco se hizo la separación de estas tres especies que originalmente eran variedades de una sola especie, *B. burgdorferi*. Sin embargo, análisis genéticos comparativos de las diferentes variedades de *B. burgdorferi*, mostraron que al menos dos de las variedades debían ser consideradas especies separadas. De esta forma *B. burgdorferi* fue dividida en tres especies separadas, *B. burgdorferi sensu stricto*, encontrada en los Estados Unidos y Europa, y *B. garinii* y *B. afzelii* encontradas en Europa y Japón (Cossart P., et al. 2005).

A. Biología de *Borrelia burgdorferi sensu lato*

Las tres especies de *Borrelia* que se incluyen en *Borrelia burgdorferi sensu lato* son morfológica y fisiológicamente idénticas, y únicamente pueden ser diferenciadas a nivel genético y por los síntomas que causan. Una de las formas más efectivas para identificar las diferentes genopecies de *B. burgdorferi sensu lato* es la amplificación de PCR específico de especie del 16S r DNA (De la Maza, L. et al. 2004).

Todos los microorganismos de este grupo, son bacterias altamente patógenas. Fueron aisladas y cultivadas por primera vez a principio de los años 80's por Willy Burgdofer, quien las aisló del intestino de la termita *Ixodes* y posteriormente de pacientes que presentaban la enfermedad de *Lyme*, confirmando a *Borrelia burgdorferi sensu lato* como el agente causante de esta

enfermedad (www.tigr.org). Se piensa que infectan a través de la piel, produciendo síntomas variados como comezón, fiebre, complicaciones neurológicas y artritis (Cossart P., *et al.* 2005). La enfermedad de *Lyme* aguda se caracteriza por fiebre, erupción cutánea en forma de “ojo de buey” (concéntrica) migratoria, mialgias, y a menudo pruebas de irritación meníngea. En una forma crónica que evoluciona durante varios años pueden desarrollarse meningoencefalitis, miocarditis y artritis recurrente incapacitante (Ryan y Ray, 2004).

Estas borrelias pasan por un ciclo complejo que incluye garrapatas, ratones y ciervos (aunque actualmente también se relaciona con aves marinas). La enfermedad ocurre cuando las garrapatas se alimentan de seres humanos que invaden su hábitat. La enfermedad es endémica en diversas regiones de Estados Unidos y Canadá, y en las porciones templadas de Europa y Asia. Cerca del 90% de los 10,000 a 15,000 casos informados cada año en Estados Unidos ocurren en regiones situadas a lo largo de la costa nororiental y media del Atlántico. Es probable que la mayoría de los casos pasen inadvertidos, en particular fuera de las regiones endémicas primarias (Ryan y Ray, 2004).

Los miembros de *Borrelia burgdorferi sensu lato* como el resto de las espiroquetas son bacterias helicoidales, altamente especializadas, móviles, con doble membrana y de 7 a 11 flagelos periplasmáticos, las cuales viven principalmente como patógenos extracelulares. Las células se caracterizan por estar conformadas por 3 a 10 giros sueltos sobre su propio eje longitudinal, y miden de 10 a 30 μm de largo, por 0.2 a 0.5 μm de diámetro (Aguero-Rosenfeld M. *et al.* 2005).

Los microorganismos cultivados de *B. burgdorferi sensu lato* son móviles y nadan sobre las placas recién preparadas. Los organismos vivos pueden observarse por medio de la microscopía de campo oscuro o de contraste de fases. Estas bacterias también pueden ser vistas por medio de microscopía de

campo claro (light microscopy) después de haber sido teñidas con tintes de plata, o con métodos microscópicos de fluorescencia (Aguero-Rosenfeld M. *et al.* 2005).

B. Parasitología de *Borrelia burgdorferi sensu lato*

Como la enfermedad de *Lyme* es un padecimiento recién descubierto y que tiene una biología compleja, no se han podido establecer aún con claridad los mecanismos patogénicos de estas borrelias en el ser humano (Ryan y Ray, 2004).

Se cree que algunas adhesinas podrían tener importancia en las etapas incipientes de la infección humana. Se ha demostrado que estas proteínas y lipoproteínas en la superficie de las bacterias, median la fijación a integrinas, plaquetas y elementos relacionados con colágena en la matriz extracelular (ECM). Otras moléculas que se fijan a la *plasmina* sobre la superficie de las espiroquetas pueden activar sistemas proteolíticos del huésped y facilitar su diseminación por la matriz extracelular hacia los tejidos adyacentes. Se sabe que la membrana exterior de la espiroqueta contiene proteínas y un lipopolisacárido tóxico que difiere de la endotoxina *Gram* negativa ordinaria. El peptidoglicano de *B. burgdorferi sensu lato* tiene propiedades inflamatorias, persiste por tiempo considerable en los tejidos y puede contribuir a la artritis cuando se deposita en los tejidos articulares (Ryan y Ray, 2004).

B. burgdorferi persiste en humanos y animales por meses o años una vez que se ha presentado la infección inicial, a pesar de provocar una fuerte respuesta inmune. *B. burgdorferi* es susceptible a antibióticos *in vitro*, sin embargo, hay reportes contradictorios sobre la eficacia de los antibióticos *in vivo*. Por lo tanto se ha dado mucho énfasis al desarrollo de una vacuna contra la enfermedad de Lyme.

TABLA 1.4.1 Características Biológicas

		CARACTERISTICAS FISIOLÓGICAS	FLAGELO	MEDIDA		PATOGENIA	OBSERVACION
				LARGO (µm)	DIAMETRO (µm)		
BORRELLIA	B.burgdorferi sensu stricto	ESPIRAL CON 3 a 10 GIROS SUELTOS SOBRE SU EJE LONGITUDINAL	7 a 11	10 a 30	0.2 a 0.5	LYME	MICROSCOPIA DE CAMPO OSCURO
	B.Garinii					NEURO-BORRELIOSIS	
	B. Afzelli					BORRELIOSIS	
TREPONEMA	T.pallidum	FORMA DE SACACORCHOS. MOTILIDAD ROTATORIA Y LENTA.	6 a 8	5 a 15	0.15	SIFILIS	MICROSCOPIA DE CAMPO OSCURO, TECNICAS DE IMPREGNACION ANTIGENICA O DE INMUNOFLOURESCENCIA.
	T.Denticola	PLIEGES POCO PEGADOS ENTRE SI.	2 a 10	6 a 12	0.50	PERIODONTITIS REFRACTORIA Y NECROGINGIVITIS AGUDA	
LEPTOSPIRA	L.interrogans Serovar Copenhageni	ESPIRALES MUY FINAS Y APRETADAS. EXTREMOS EN FORMA DE GANCHOS.	2 (1 EN CADA POLO)	5 a 15	0.15	LEPTOSPIROSIS	MICROSCOPIA DE CAMPO OSCURO
	L.borgpeterseni Variedad JB197; Variedad L550; Serovar Lai						

C. Características genéticas de *B. burgdorferi sensu stricto*

El genoma de *B. burgdorferi* fue el primer genoma de espiroquetas en ser completamente secuenciado (Fraser C., *et al.* 1997) y presenta una de las estructuras genómicas más complejas conocidas en los procariontes (Porcella, S.F. and Schwan, T.G., 2001). El tamaño del genoma de la variedad *B. burgdorferi sensu stricto* B31 incluye un cromosoma linear de aproximadamente una megabase de tamaño (910,724 pb), con un origen de replicación localizado en el centro (Cossart P., *et al.* 2005), y con un contenido G+C de 28% y 21 plásmidos (12 lineares y 9 circulares) (Aguero-Rosenfeld M. *et al.* 2005).

Cuando *B. burgdorferi* se cultiva por un periodo largo de tiempo ocurre la pérdida de algunos sus plásmidos así como cambios en los patrones de expresión de proteínas, lo cual esta asociado con una pérdida en la capacidad de infectar animales en el laboratorio sugiriendo de esta forma que los plásmidos codifican para varios genes involucrados en su patogeneidad (www.tigr.org).

El cromosoma linear contiene 851 genes que codifican para el grupo de proteínas de replicación de DNA, transcripción, translación, transporte de solventes y metabolismo energético, pero como en el genoma de *Mycoplasma genitalium*, no contiene genes para las reacciones celulares biosintéticas, por lo que estas *borrelias* dependen completamente del huésped para la obtención de aminoácidos, ácidos grasos, cofactores de enzimas y nucleósidos. Debido a que *B. burgdorferi* y *M. genitalium* son bacterias distantes, se sugiere que dichas capacidades metabólicas limitadas reflejan una convergencia evolutiva a través de la pérdida de genes de progenitores que eran metabólicamente competentes. De 430 genes en 11 plásmidos, la mayoría no tienen una función biológica conocida; 39% de los genes de los plásmidos son parálogos que forman 47 familias genéticas. La significación biológica de los genes codificantes en los

múltiples plásmidos aún no es clara, pero podría estar involucrada con una variación antigénica o con una evasión inmune (Östberg Y., *et al.* 2004).

No todas las variedades de *B. burgdorferi* tienen el complemento de plásmidos completos, por lo que el tamaño del genoma completo de las diferentes *B. burgdorferi* aisladas puede variar (Aguero-Rosenfeld M. *et al.* 2005). En general poseen una abundancia de genes virulentos obvios pero más aún, un gran número de genes para la quimiotaxis, los cuales se encuentran duplicados entre los diferentes plásmidos. Se ha sugerido que pueden ser importantes en el proceso patológico con una posible expresión diferencial de los genes duplicados en diversos tejidos. Debido a esto, y a que muchos otros genes son encontrados también en varios de los plásmidos se piensa que podría ser la base para la recombinación que lleva a las variaciones antigénicas. Esta evidencia de recombinación viene de pseudogenes en los plásmidos, que llegan a disminuir la capacidad para codificar de éstos hasta un 71% comparada con el 93% en el cromosoma (Cossart P., *et al.* 2005).

Los análisis genéticos han revelado también que *B. burgdorferi* posee ciertas estructuras genéticas poco comunes entre los procariontes como su cromosoma lineal y múltiples plásmidos lineares y circulares dentro de la misma bacteria. También *B. burgdorferi* muestra una organización única en su grupo de genes de rRNA, que consiste de un solo gen 16s rRNA (*rrs*), un 23s (*rrl*) repetido en tándem y genes 5s (*rrf*) rRNA. Así mismo, esta especie cuenta con más de 150 genes que codifican para lipoproteínas que constan el 4.9% de los genes cromosomales y el 14.5% de los genes en los plásmidos, lo cual es significativamente más alto que en cualquier otro genoma de bacteria secuenciado hasta la fecha (Aguero-Rosenfeld M. *et al.* 2005).

Otros aspectos genéticos particulares de *B. burgdorferi* son una fracción substancial de DNA de los plásmidos que parece encontrarse en un estado de

decaimiento evolutivo (tienden a desaparecer), la evidencia de numerosos rearrreglos potencialmente recientes de DNA entre los genes de los plásmidos, y la ausencia de genes conocidos que codifiquen para enzimas requeridas para la síntesis de aminoácidos, ácidos grasos, cofactores de enzimas y nucleótidos. *B. burgdorferi* también carece de genes que codifiquen para enzimas del ciclo del ácido tricarboxílico o para compuestos involucrados en el transporte de electrones. Todas estas características genéticas particulares de *B. burgdorferi* remiten necesariamente a la naturaleza parásita de este microorganismo (Aguero-Rosenfeld M. *et al.* 2005).

D. Características genéticas de *Borrelia garinii*

La especie *Borrelia garinii* fue originalmente clasificada como una variedad de *Borrelia burgdorferi*, sin embargo, *B. garinii* fue subsecuentemente determinada como una especie separada con base en análisis genéticos (Baranton G., *et al.* 1992). La variedad tipo de *B. garinii* fue aislada de la especie de garrapata *Ixodes ricinus* en Francia, y es el mayor agente causante de las borreliosis asociadas a las garrapatas en Eurasia. Los síntomas que ocasiona este organismo difieren de los causados por *B. burgdorferi*.

B. garinii es transmitida por aves y roedores (hospederos) a los humanos a través de *I. ricinus* y *I. persulcatus*. Por su parte, *I. uriae* es una garrapata de aves marinas que recientemente también fue identificada como hospedera de *B. garinii*, manteniendo a este agente en un silencioso ciclo enzootico en las aves marinas y sus nidos sobre una gran pero discontinua área (Smith R., *et al.* 2006).

Borrelia garinii posee un cromosoma linear de 904,246 pb con un contenido G+C del 28%. Este cromosoma contiene un total de 870 genes, de los cuales 832 codifican para proteínas. Hasta el momento solo se han identificado

dos de los plásmidos en este organismo (cp26 y lp54), ambos lineares, que contienen aproximadamente 100 genes en total (www.ncbi.nlm.nih.gov), pero como el resto de las *Borrelias*, *B. garinii* posee más de 20 plásmidos que pueden ser lineares o circulares. Al igual que el genoma de *B. burgdorferi*, el genoma de *B. garinii* no contiene genes para las reacciones celulares biosintéticas, por lo que también depende de su huésped.

Un análisis comparativo entre el genoma de *Borrelia garinii* variedad Pbi y *B. burgdorferi sensu stricto* B31, mostró que la mayor parte del cromosoma lineal se ha conservado en ambas especies (92.7% de identidad tanto en DNA como en aminoácidos), y no se observaron reareglos cromosomales, (inserciones o pérdidas grandes). El cromosoma y los dos plásmidos lineares (lp54 y cp26) de *B. garinii*, parecen pertenecer al inventario genómico básico de las especies *Borrelia*. La comparación genética también mostró que la mayoría de la información genética en los plásmidos de *B. burgdorferi* está también presente en *B. garinii*, a pesar de que los genes ortólogos no son fáciles de definir debido a la alta redundancia en los plásmidos. Sin embargo, no se encontró contraparte alguna para los plásmidos *lp36 K* y *lp38 J* de *B. burgdorferi* en el repertorio genético de *B. garinii*. De esta forma se sugirió que las diferencias fenotípicas entre estas dos especies se pueden atribuir a la presencia o ausencia de estos dos plásmidos, así como los genes potencialmente seleccionados positivamente, ya que las duplicaciones y reareglos interplasmídicos pueden cambiar el fenotipo virulento de las especies de *Borrelia* (Glöckner G., *et al.* 2004).

De los genes predichos para *B. burgdorferi*, 36 no están presentes en el genoma de *B. garinii*, donde dos de las secuencias codificantes que aún no han sido verificadas parecen estar fusionadas con sus secuencias codificantes vecinas. En total 768 genes se encuentran predichos igualmente para ambas especies (Glöckner G., *et al.* 2004). La mayor parte de los plásmidos de

B. garinii aún deben ser aislados y estudiados, para poder tener una mejor perspectiva de las características únicas de esta especie en comparación al resto de las *Borrelias*, así como para entender en cuales de sus genes o plásmidos está la clave para su tipo de virulencia en particular.

E. Características genéticas de *Borrelia afzelii*

Borrelia afzelii es una geno especie de *B. burgdorferi sensu lato* prevalente en Europa y principalmente en Asia. En estudios recientes para la identificación genotípica de las geno especies de *B. burgdorferi sensu lato* (como PCR específico de especie, análisis de la curva de fusiónamiento o análisis polimórfico amplificado al azar de DNA) se ha encontrado que la diferencia entre los valores de referencia encontrados para *B. burgdorferi sensu stricto* y *B. afzelii* es demasiado pequeña, de tal forma que no pueden ser utilizados para distinguir las dos especies (Pietila, J. *et al.* 2000).

Aunque estas dos especies podrían ser diferenciadas si un gen con una más amplia heterogeneidad fuera utilizado para su identificación y descripción genotípica en futuros análisis, por el momento es difícil contar con una descripción genética que difiera mucho de la hecha para *B. burgdorferi sensu stricto* (Pietila, J. *et al.* 2000), esto también debido a la falta de investigación sobre *B. afzelii* como una especie separada, ocasionada por su reciente separación como especie independiente de *B. burgdorferi sensu stricto*.

El genoma de *B. afzelii* mide 905,394 pb, y tiene un contenido G+C del 28%. Su cromosoma es lineal, y hasta la fecha han sido identificados 8 de sus plásmidos (*cp30*, *cp27*, *lp60*, *lp60-2*, *lp34*, *lp32*, *lp28* y *lp25*). Tiene 894 genes de los cuales 855 han sido predichos para ser codificantes (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Al igual que para *B. garinii* es necesario aislar y analizar los plásmidos de *B. afzelii*, para poder entender la diferencia entre su tipo de virulencia y el del resto de las *Borrelias*. Un análisis genético comparativo entre *B. afzelii*, *B. garinii* y *B. burgdorferi* sería de gran utilidad, aunque es posible sugerir que el cromosoma de estas 3 especies resultaría ser colinear, y sus diferencias fenotípicas y virulentas serían el resultado de la presencia o ausencia de ciertos plásmidos en específico.

Tabla 1.4.2 Características Genéticas

		G+C	CROMOSOMA				GENES			PLASMIDOS***		
			LINEAR		CIRCULAR		CELLULAR PROCESSES****	CELL MOTILITY*****	BACTERIAL CHEMOTAXIS	LINEAR	CIRCULAR	TOTAL
			PARES DE BASES	GENES CODIFICANTES	PARES DE BASES	GENES CODIFICANTES						
BORRELIA	B. burgdorferi	28.00%	910,724 pb	851			15	36	23	12	9	21
	B. Garinii	28.00%	904,246 pb	832			15	36	23	1	1	2
	B. Afzelii	28.00%	905,394 pb	855			18	33	23	2	6	8
TREPONEMA	T. pallidum	52.00%			1,138,011 pb	1,036	19	38	17	0	0	0
	T. Denticola	37.00%			2,843,201 pb	2,767	20	37	19	0	0	0
LEPTOSPIRA	L. interrogans	35.00%			4,277,185 pb	3394	24	47	35	0	0	0
	Serovar Copenhageni	34.00%			350,181 pb	264						
	Serovar Lai	35.00%			4,332,241 pb	4360	26	49	37	0	0	0
	Serovar Lai	35.00%			358,943 pb	367						
	L. borgpetersenii	40.00%			3,614,446 pb	2,703	25	48	33	0	0	0
	Variedad L550	40.00%			317,336 pb	242						
	Variedad JB197	40.00%			3,576,473 pb	2,645	25	48	33	0	0	0
	Variedad JB197	40.00%			299,762 pb	235						

pb - PARES DE BASES

** CROMOSOMA

*** IDENTIFICADOS

**** EXCLUYE CELL MOTILITY

***** EXCLUYE CHEMOTAXIS

1.4.2 Descripción de las especies de *Treponema* secuenciadas

A. Biología de *Treponema pallidum*

Treponema pallidum es el organismo responsable de la sífilis, una enfermedad sistémica de evolución crónica transmitida por contacto sexual, que se reconoció por primera vez durante el siglo XVI y fue considerada como una de las grandes plagas que se extendió por Europa como consecuencia de la urbanización y las campañas militares. Su evolución extendida y la naturaleza variable y a menudo impresionante de sus manifestaciones (úlceras genitales, ataxia, demencia, estallamiento aórtico), se deben a un estado de parasitismo equilibrado que dura decenios. La bacteria causante de la sífilis es en realidad una subespecie, *T. pallidum* subespecie *pallidum* (Ryan y Ray, 2005).

Los miembros de esta especie son espiroquetas delgadas con forma de sacacorchos por sus extremidades afiladas, de 5 a 15 μm de longitud por 0.15 μm de diámetro, con espirales regulares (de 4 a 14) con una longitud de onda de 1 μm y una amplitud de 0.3 μm . Son bacterias que poseen de 6 a 8 *flagelos* *periplasmáticos* enredados alrededor del *cilindro* *protoplasmático* (Zavala, 1995). Su motilidad es rotatoria y lenta característicamente, con flexiones repentinas en un ángulo de 90° (Ryan y Ray, 2005).

Para observar estos microorganismos se utilizan la microscopía de campo oscuro, técnicas histológicas de impregnación antigénica o técnicas de inmunofluorescencia (Ureña, 2002). El cultivo de estas bacterias es difícil, hasta ahora se han logrado mantener cepas vivas inoculadas en testículos de conejo, transfiriéndolas periódicamente bajo un control cuidadoso de la tensión de oxígeno y pH. Se multiplica durante varias generaciones en un cultivo celular primario. Su crecimiento es lento, con un tiempo promedio de generación de 30 horas. Debido a su difícil cultivo, la información sobre las propiedades

metabólicas de los miembros de esta especie es limitada por la dificultad extrema para obtener microorganismos suficientes para su estudio. *Treponema pallidum* es en extremo susceptible a cualquier desviación en las condiciones fisiológicas de su entorno. Muere con rapidez al desecarse y lo matan con facilidad gran variedad de detergentes y desinfectantes. También es muy susceptible a cambios de temperatura (Ryan y Ray, 2005).

La capacidad patogénica de estos microorganismos parece estar relacionada con su capacidad de adherirse por medio de las proteínas en su membrana externa, a ciertos receptores celulares (fibronectina) del hospedero, junto con la producción en las cepas virulentas de hialuronidasa, que actúa sobre el ácido hialurónico presente en los espacios intercelulares de los hospederos, facilitando la infiltración perivascular, con una respuesta inmune fundamentalmente de base celular, a la que se debe la destrucción tisular y las lesiones observadas (Ureña, 2002).

B. Características genéticas de *Treponema pallidum*

El genoma de *Treponema pallidum* fue el segundo genoma de espiroquetas en ser secuenciado (Fraser, C.M., *et al.* 1998). A diferencia de *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, el genoma de *T. pallidum* posee un cromosoma circular de 1,138,011 pb, con un solo replicón y un contenido G+C del 52%, para el cual se han predicho 1,036 proteínas de las cuales 46% tienen ortólogas en *B. burgdorferi*. Mas de 70 de estas proteínas ortólogas parecen ser únicas de espiroquetas, sin embargo no están presentes en los plásmidos de *B. burgdorferi*. Las similitudes en los complementos de genes para la reparación de DNA, el transporte y el metabolismo de energía, junto con la ausencia de genes para las rutas metabólicas biosintéticas, sugieren que *B. burgdorferi* y *T. pallidum* pueden haber sufrido evolución reductiva convergente. A pesar de que

ambos genomas favorecen los transportadores de amplio espectro, estos frecuentemente están compuestos de diferentes familias de transportadores de proteínas (Cossart P., *et al.* 2005).

El hecho de que para más de la mitad de las secuencias codificantes predichas para *T. pallidum* no se hayan encontrado ortólogos en *B. burgdorferi sensu stricto*, da una idea de cuan lejanamente están emparentadas estas dos especies de bacterias, y ya que el 80% de los genes predichos para *T. pallidum* no cuentan con una función biológica conocida, aún hace falta mucha investigación sobre la genética y biología de *T. pallidum* (Cossart P., *et al.* 2005), sobre todo para poder relacionar ciertos aspectos de su patogeneidad con algunas de sus características genéticas particulares.

La naturaleza microaerofílica de *T. pallidum* se correlaciona con un requerimiento metabólico de oxígeno junto con la ausencia de enzimas para la protección contra sus propiedades destructivas. La ausencia de enzimas en la membrana externa de *T. pallidum* ocasiona problemas para su detección inmune y el desarrollo de vacunas. De esta forma es de gran interés que la secuenciación del genoma muestre una numerosa familia de proteínas (TprA-L) las cuales pueden funcionar como porinas o adhesinas (Cossart P., *et al.* 2005).

Por otro lado, es importante mencionar que la especie *Treponema pallidum* incluye tres subespecies (subesp. *Pallidum* [Sífilis], subesp. *Endemicum* [bejel], y subesp. *Pertenue* [yaws]). Esta clasificación está basada en los rasgos distintivos de los hospederos y la manifestación clínica de cada infección. Estas tres subespecies son morfológicamente indistinguibles por microscopía de inmunofluorescencia o electrónica, e inducen cambios histopatológicos similares, indicando un alto nivel de relación antigénica (Centurión-Lara A., *et al.* 2006).

C. Biología de *Treponema denticola*

Las bacterias de la especie *Treponema denticola* son espiroquetas relacionadas con la incidencia y la severidad de las enfermedades periodontales humanas, que se comportan casi como patógenos oportunistas. Son bacterias anaerobias estrictas, probablemente de las bacterias conocidas que requieren el más bajo potencial de oxidorreducción. Miden de 6 a 12 μm de largo por 0.5 μm de diámetro, tienen pliegues poco pegados entre sí y poseen de 2 a 10 *flagelos periplasmáticos*. La energía que requieren la obtienen del metabolismo de aminoácidos (Ureña, 2002).

Como parásitos de la cavidad bucal de los humanos, viven en las zonas más profundas de las placas supragingivales o en el surco gingival, es decir donde las condiciones anaerobias permiten su desarrollo. Su crecimiento se establece por sinergia con otras bacterias que les proporcionan compuestos excretados y productos de deshecho que las *T. denticola* pueden aprovechar. Viven dentro de una comunidad microbiana muy compleja y diversa, por lo que son microorganismos altamente especializados. Estas bacterias poseen una adaptación especial al medio que les permite utilizar cualquier nutriente que les sea necesario (Ureña, 2002). En estudios recientes se ha encontrado que *T. denticola* forma agregaciones específicas dentro de la cavidad bucal con las bacterias *P. gingivalis*, *S. crista* y *Fusobacterium nucleatum* (Edwards, A.M. et al. 2003).

La infección polimicrobial y la inflamación de la gingiva que causan estos microorganismos la llega a presentar el 80% de la población adulta en alguna etapa de su vida, y puede evolucionar a formas severas incluyendo una periodontitis refractoria y una necrogingivitis aguda, resultando en una reabsorción ósea o la pérdida de los dientes (Seshadri, R. et al. 2004)..

T. denticola produce una enzima similar a la tripsina y algunas enzimas del tipo las esterasas y fosfatasas activas sobre diversos sustratos. Esta bacteria degrada la gelatina y tiene la capacidad de producir ácidos grasos de cadena corta, que pueden ejercer un efecto tóxico tisular. Su movilidad le permite penetrar, invadir y difundirse en los tejidos periodontales de tal forma que en esta zona las sustancias como la endotoxina u otros compuestos tóxicos actuarían directamente sobre los fibroblastos, las células epiteliales y otros componentes tisulares. *In vitro*, *T. denticola* altera la funcionalidad de los leucocitos polimorfonucleares, inhibiendo la fusión de los fagosomas y lisosomas así como disminuyendo la respuesta linfocítica a varios antígenos y mutágenos, causando una inmunodepresión que podría ser la causa del déficit de anticuerpos que existe en las periodontitis más agresivas (Ureña, 2002).

D. Características genéticas de *Treponema denticola*

El genoma de *Treponema denticola* refleja claramente sus adaptaciones para la colonización y la supervivencia en la placa dental subgingival. Comparada con otras espiroquetas, *T. denticola* es relativamente fácil de cultivar y manipular genéticamente, haciéndola un excelente modelo para la investigación de las espiroquetas (Seshadri, R. *et al.* 2004).

El cromosoma de 2,843,201 pb de *T. denticola* con una concentración de G+C del 37%, se predice codifica 2,767 proteínas de las cuales el 26.5% (734 secuencias codificantes) son únicas. A pesar de que el tamaño del genoma de *T. denticola* es considerablemente más grande que el de *T. pallidum*, el número de RNAs estables presentes en cada uno es casi idéntico. Las diferencias entre ambos genomas se atribuyen a la combinación de tres fenómenos: reducción genómica, expansiones específicas al linaje y transferencia horizontal de genes. Los genes perdidos a consecuencia de la evolución reductiva parecen estar ampliamente implicados en el metabolismo y el transporte, mientras que los

genes que han aparecido a consecuencia de expansiones específicas al linaje, están implicados en varios tipos de interacciones patógenas. Los genes adquiridos vía transferencia horizontal de genes están relacionados con la fagocitosis o no se conoce su función (Seshadri, R. *et al.* 2004).

La organización del origen cromosómico de replicación de *T. denticola* es diferente de la organización típica de las bacterias, incluidas el resto de las espiroquetas. Esto sugiere que quizá hubo un rearrreglo genético específico del linaje en la región del origen de la replicación (Seshadri, R. *et al.* 2004).

Se ha propuesto que el genoma de *T. pallidum* se derivó del genoma de *T. denticola* o de otros treponemas asociados a hospederos, a través de la deleción y la divergencia. Las comparaciones revelan que el genoma de *T. pallidum* comparte una identidad limitada de nucleótidos con el genoma de *T. denticola*. Cerca de un cuarto de los genes de *T. denticola* (728 genes) tienen sus contrapartes más similares en el genoma de *T. pallidum*, y en promedio, estos comparten solamente 53% de la identidad en aminoácidos (70.6% de similitud). Esencialmente no existe una conservación en el orden de los genes entre los genomas de ambas especies (a excepción de los operones altamente conservados que codifican para proteínas ribosomales (TDE0766-TDE0792) y flagelares (TDE1198-TDE1219))(Seshadri, R. *et al.* 2004).

Los estudios genéticos han mostrado que la divergencia entre *T. denticola* y *T. pallidum* de su ancestro común fue un evento muy antiguo relativo a la reciente divergencia de muchos grupos de bacterias. La comparación del genoma completo de *T. denticola* con el de otras espiroquetas secuenciadas, reveló un conjunto de 618 genes conservados en otros tres genomas de espiroquetas. De estos aproximadamente 90% tienen una función asignada, principalmente de mantenimiento (replicación de DNA, división celular, transcripción, translación, metabolismo de energía, etc.), y los genes restantes

incluyen transportadores ABC (aproximadamente 120 CDS), y genes relacionados la quimiotaxia (Seshadri, R. *et al.* 2004).

Un total de 1,268 genes de *T. denticola* no tienen una contraparte en el genoma del resto de las espiroquetas. Más de la mitad de estos son genes hipotéticos (Seshadri, R. *et al.* 2004).

Un pequeño subconjunto de 618 productos genéticos predichos conservados en *T. denticola* y el resto de las espiroquetas no tienen contrapartes significativas en otros *phyla*. Estos incluyen componentes flagelares, FliL (TDE2764) y FliE (TDE1214), la proteína putativa de membrana exterior FlaA (TDE1408) y sus parálogos distantes TDE1712 y TDE1409 que quizá pueden contribuir a la ubicación flagelar periplasmática única de las espiroquetas y a sus propiedades de motilidad. Los otros genes asociados a espiroquetas (TDE2598, TDE2751, TDE1300 y TDE1334) no tienen una función predicha, y dos tienen regiones de similitud al fibronectina (TDE0446), y a las proteínas con dominio TPR (TDE2696). Este grupo de genes podría ser el responsable de las propiedades específicas de espiroquetas, incluyendo su morfología y las interacciones hospedero-patógeno (Seshadri, R. *et al.* 2004).

1.4.3. Descripción de las especies de *Leptospiras* secuenciadas

A. Biología de *Leptospira interrogans*

Leptospira interrogans es una de las especies patógenas del género *Leptospira* e infecta tanto a humanos como a animales. Es una espiroqueta delgada de unos 0.15 μm de diámetro por 5 a 15 μm de longitud, con espirales muy finas y apretadas, y extremos en forma de gancho. Estas bacterias únicamente poseen un *flagelo protoplasmático* en cada polo de la célula. No es posible visualizarlas con los procedimientos ordinarios de coloración, y su

identificación se logra mejor con microscopia de campo oscuro. Puede cultivarse de forma aerobia en ciertos medios especiales semisólidos enriquecidos. Las bacterias de esta especie puede sobrevivir en el ambiente durante días o semanas en algunas aguas con pH superior a 7.0. Las condiciones ácidas, como las que pueden encontrarse en la orina, matan rápido a este microorganismo. Es muy sensible a la desecación y a gran variedad de desinfectantes. (Ryan, K.J. y Ray, C.G. 2005). Las bacterias de esta especie y sus serotipos utilizan la beta-oxidación de cadenas largas de ácidos grasos como su mayor fuente de energía y de carbono (Nascimento, A. *et al.* 2004).

Leptospira interrogans ha sido clasificada serológicamente en múltiples serogrupos y más de 200 serotipos patógenos, muchos de ellos considerados especies con anterioridad (p.ej., *L. icterohaemorrhagiae*, *L. canicola* y *L. pomona*). Esta diversidad de serotipos es el resultado de la heterogeneidad estructural en el componente carbohidrato de los lipopolisacáridos (Nascimento A. *et al.* 2004). Los serotipos o serogrupos además se catalogan con base en su ocurrencia geográfica, las diferencias en las especies que los hospedan y los síntomas clínicos relacionados. La distinción entre serogrupos y serotipos tiene importancia epidemiológica y epizoológica, pero no clínica (Ryan, K.J. y Ray, C.G. 2005).

Leptospira interrogans es uno de los agentes causantes de la *leptospirosis*, una enfermedad sistémica del tipo de la influenza, relacionada con aguas contaminadas por orina de animales. Se inicia con fiebre, náuseas, vómitos, cefalea, dolor abdominal y mialgias. En casos graves ocurre una segunda fase caracterizada por el trastorno de las funciones hepática y renales, con ictericia, postración y colapso circulatorio. A menudo se encuentra afectado el sistema nervioso central, con cuello rígido y cambios inflamatorios en el líquido cefalorraquídeo (Ryan, K.J. y Ray, C.G. 2005).

Muchos de los serotipos están adaptados a huéspedes mamíferos específicos, que transportan a estos microorganismos en sus túbulos renales. Debido al gran espectro de especies animales que sirven de reservorios a estas bacterias, la leptospirosis es considerada como la enfermedad zoonótica más ampliamente distribuida en el mundo (Nascimento A. *et al.* 2004).

B. Características genéticas de *Leptospira interrogans serovar Copenhageni*

El genoma de *L. interrogans serovar Copenhageni* contiene dos cromosomas circulares con un total de 4,627,366 pb. El cromosoma I tiene 4,277,185 pb, con un contenido G+C del 35% y el cromosoma II mide 350,181 pb, con un contenido G+C del 35% (www.ncbi.nlm.nih.gov). Para el cromosoma I hay 3394 secuencias codificantes, de un total de 3481 genes. Para el cromosoma II se han predicho 264 secuencias codificantes de un total de 272 genes. El origen de replicación del replicón grande se identificó entre los genes *dnaA* y *dnaN*, como en los genomas de otras bacterias, sin embargo, los genes rRNA de *L. interrogans serovar Copenhageni* no están organizados en operones como en la mayoría de las bacterias, encontrándose dispersos a lo largo del cromosoma I (Nascimento, A. *et al.* 2004).

El genoma de *L. interrogans serovar Copenhageni* incluye un número relativamente grande de genes relacionados con la motilidad y la quimiotaxis. Las bacterias por lo regular poseen cerca de 50 genes que codifican para proteínas estructurales y funcionales involucradas en la motilidad. Un número similar de genes se han identificado para las espiroquetas *T. pallidum* y *B. burgdorferi sensu stricto*. Aparentemente, el aparato de motilidad y quimiotaxis de *L. interrogans serovar Copenhageni* es más complejo, ya que su genoma contiene al menos 79 genes putativos asociados a la motilidad. Todos los genes se encuentran bien conservados entre *L. interrogans serovar Copenhageni*, *T.*

pallidum y *B. burgdorferi sensu stricto*, y 42 de estos genes son comunes a estos tres géneros. Sin embargo, el genoma *L. interrogans serovar Copenhageni* contiene copias múltiples de cierto número de genes asociados al movimiento, que contribuyen parcialmente al alto número de estos genes en sus cromosomas. Por ejemplo, el genoma del *L. interrogans serovar Copenhageni* contiene 5 genes *fla B*, 4 genes *motB* y 2 genes *motA* comparados con 3 genes *flaB* y una sola copia de los genes *motA* y *motB* en el genoma de *T. pallidum*, y una sola copia de cada uno en el genoma de *B. burgdorferi* (Nascimento, A. et al. 2004).

En *L. interrogans serovar Copenhageni* como en *T. pallidum* y *B. burgdorferi*, la mayoría de los genes estructurales y funcionales de movimiento se localizan en operones potenciales. Sin embargo, probablemente los operones en *L. interrogans serovar Copenhageni* sufrieron reareglos extensivos, ya que generalmente son más pequeños, muy frecuentemente correspondiendo únicamente a partes de los operones principales de *Treponema* y *Borrelia*. La diferencia en número de genes y su organización en operones podría estar asociada a la gran flexibilidad de las leptospiros patógenas en general, permitiéndoles sobrevivir y adaptarse a una variedad de ambientes y hospederos (Nascimento, A. et al. 2004).

El genoma de *L. interrogans serovar Copenhageni* provee un nuevo entendimiento sobre las rutas metabólicas, familias de transportadores, respuestas al medio ambiente y patogeneidad. Una amplia selección de proteínas reguladoras le permite a este microorganismo responder a las señales del ambiente. Varias categorías de proteínas expuestas a la superficie requeridas para la colonización y la supervivencia del hospedero mamífero han sido identificadas en *L. interrogans serovar Copenhageni*. Dichas proteínas podrían tener un rol importante en el mecanismo de la patogeneidad leptospiral y la inmunidad protectora. Las proteínas expuestas a la superficie que se

conservan entre los serotipos patógenos podrían ser usadas en el desarrollo de vacunas para la prevención de la leptospirosis (Nascimento, A. *et al.* 2004).

C. Características genéticas de *Leptospira interrogans* serovar Lai

Leptospira interrogans serovar Lai fue identificado por primera vez en 1958 en China, donde es el agente etiológico causante de leptospirosis más comúnmente encontrado, responsable del 50% de los casos reportados. En 1966 fue catalogada como un nuevo serovar dentro del *serogrupo* icterohaemorrhagiae, que contiene otros 11 serovares (Masuzawa, T. *et al.* 1988).

El genoma de *Leptospira interrogans* serovar Lai al igual que el genoma del serovar Copenhageni tiene dos cromosomas, pero a diferencia del serovar Copenhageni, *Leptospira interrogans* serovar Lai posee un plásmido circular de 54 kb de largo, que contiene 103 secuencias codificantes predichas ausentes en el genoma del serovar Copenhageni. Este plásmido es una isla genómica patogénica que se encuentra en algunos otros serotipos de *L. interrogans* (Bourhy, P. *et al.* 2007). El cromosoma I de *Leptospira interrogans* serovar Lai, mide 4,332,241 pb con un contenido G+C del 35%, y el cromosoma II mide 358,943 pb con un contenido G+C del 35% también. Se han predicho 4,727 genes codificantes en total para los dos cromosomas (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Un análisis comparativo hecho entre los genomas de *L. interrogans* serovar Lai y el del serovar Copenhageni, mostró un porcentaje promedio de identidad de nucleótidos entre ambos genomas del 95%. El porcentaje promedio de identidad de nucleótidos entre pares de genes codificantes predichos que son ortólogos fue del 99%. Los cromosomas II de ambas serovares son colineares, pero existe una inversión grande en el cromosoma I, y la evidencia sugiere que el rearreglo se llevo a cabo en el serovar Lai (Nascimento, A. *et al.* 2004).

El genoma de *L.interrogans* serovar Lai contiene al menos 79 genes asociados a la motilidad, y 5 genes que codifican para hemolisinas esfingomilasas secretadas del tipo C y una fosfolipasa que le sirven a la hora de infectar diferentes tejidos para degradar las membranas celulares (Nascimento, A. *et al.* 2004).

D. Biología de *Letospira borgpetersenii*

Leptospira borgpetersenii es otra de las especies patógenas del género *Leptospira*, que fue aislada por primera vez en 1987 (Yasuda, *et al.* 1987). Son bacterias con células espirales, delgadas y extremos en forma de gancho de 0.1 μm de diámetro por aproximadamente 6 μm de longitud. Al igual que el resto de las leptospiras solamente poseen un *flagelo periplasmático* en cada polo celular. Estas bacterias son patógenos aeróbios, y son los agentes causantes de la leptospirosis bovina que infectan principalmente ganado, causando grandes pérdidas por mortalidad y abortos en la industria ganadera. Sin embargo, también pueden llegar a causar infecciones zoonóticas en los humanos (Naiman, Brian M. *et al.* 2002). La transmisión de la *leptospirosis bovina* ocurre únicamente de hospedero a hospedero, ya que recientemente se ha descubierto que *L. borgpetersenii* está perdiendo su capacidad de vivir en el agua y está evolucionando hacia un ciclo estricto de transmisión de huésped a huésped (Bulach, D.M., *et al.* 2006).

Los miembros de esta especie son organismos mesófilicos, por lo que su temperatura óptima de crecimiento es de 28 a 32°C. Son parásitos obligados, por lo que no es posible cultivarlos en el laboratorio y no existen muchos estudios sobre su crecimiento o características morfológicas. En general se han estudiado más ampliamente a nivel genético, sobre todo su expresión proteínica durante la infección. El serovar más estudiado hasta ahora es el serovar *Hardjo*.

E. Características genéticas de *Leptospira borgpetersenii* variedades L550 y JB197.

Leptospira borgpetersenii L550 y *Leptospira borgpetersenii* JB197 son dos variedades genéticas virulentas del serotipo Hardjo, uno de los más frecuentemente utilizados para estudios de patogeneidad (Bulach, D.M., *et al.* 2006). El genoma de ambas variedades contienen dos cromosomas circulares, uno grande y uno pequeño. El cromosoma I de la variedad L550 mide 3,614,446 pb con un contenido G+C del 40%, y su cromosoma II mide 317,336 pb con un contenido G+C del 40%. En total para ambos cromosomas se predicen 2,945 secuencias codificantes. Por su parte el cromosoma I de la variedad JB197 mide 3,576,473 pb con un contenido G+C del 40%, y el cromosoma II mide 299,762 pb con un contenido G+C también del 40% . En total para ambos cromosomas se predicen 2,880 secuencias codificantes (www.ncbi.nlm.nih.gov).

El cromosoma I (**CI**) de ambas variedades es un cromosoma bacteriano típico, posee la mayoría de los genes para el mantenimiento celular, incluyendo aquellos que codifican para todos los tipos de RNA, la mayoría de las proteínas ribosomales, y los necesarios para la síntesis del DNA y el proceso de replicación. Como en las otras leptospiras, los genes rRNA no están organizados en operones, encontrándose dispersos alrededor del replicón del cromosoma I (Bulach, D.M., *et al.* 2006).

En una comparación hecha entre los genomas de las dos variedades de *L. borgpetersenii* (L550 y JB197) contra el genoma de *L. interrogans*, se encontró que los genomas de las variedades de *L. borgpetersenii* son en promedio 16% más pequeños que el de *L. interrogans*. El 12% de las secuencias codificantes predichas para las variedades L550 y JB197 codifican para transposasas o son pseudogenes o son fragmentos de genes, en

comparación con sólo el 4% en el genoma de *L. interrogans*, por lo que se concluyó que *L. borgpetersenii* esta sufriendo una reducción genómica, al contrario que *L. interrogans* cuyo genoma esta en expansión. La pérdida de la capacidad para vivir en el agua fuera del hospedero, en las variedades de *L. borgpetersenii*, pueden estar relacionadas a esta reducción génica, ya que la presencia de menos funciones metabólicas y de transporte de solutos limita la diversidad de nutrientes que pueden consumir las variedades de *L. borgpetersenii* (Bulach, D.M., et al. 2006).

2. OBJETIVOS

A) General:

Identificar la firma genómica de las espiroquetas utilizando nueve genomas de *Phylum Spirochates*.

B) Particulares:

- Analizar con la identificación de la firma genómica algunas de las características genotípicas de este grupo de organismos.
- Identificar posibles marcadores taxonómicos moleculares.
- Analizar la información filogenómica de los genes firma.
- Buscar genes presentes únicamente en espiroquetas y eucariontes que pudieran apoyar la teoría de Endosimbiosis, sobre el origen del undulipodio.
- Indagar y discutir la posible función de las proteínas hipotéticas que se encuentren dentro de los genes firma.

3. HIPÓTESIS

- Dada la escasa información sobre las funciones de los genes en genomas completamente secuenciados, la mayor parte de los genes identificados en la firma no tendrán una función conocida.
- Debido a la función central de los genes firma en la evolución de las espiroquetas, estos serán parte del cromosoma, y muy pocos se encontrará en los plásmidos.
- Un grupo de genes de la firma estará relacionado con el flagelo, ya que todas las espiroquetas conocidas se caracterizan por su tipo movilidad.
- La firma carecerá completamente de genes involucrados en la biosíntesis, ya que dichos genes son parte de las rutas metabólicas comunes al metabolismo básico de todos los seres vivos.
- Si el origen del undulipodio se encuentra en las espiroquetas, existirían genes homólogos entre los eucariontes y las espiroquetas que no se encuentren en el resto de los procariontes.
- Habrá genes compartidos únicamente entre las espiroquetas y algunas especies de eucariontes.

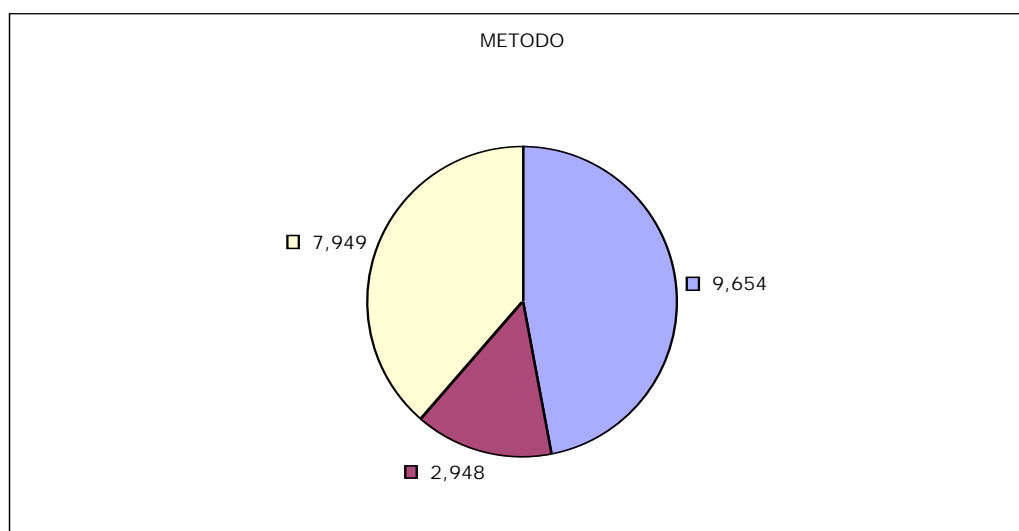
4. MATERIAL Y MÉTODO

Se analizaron nueve genomas secuenciados de espiroquetas. Los genomas fueron *Borrelia burgdorferi* B31 (Fraser, C.M., et al. 1997), *Borrelia Garinii* PBi (Glockner, G., et al. 2004), *Borrelia Afzelii* Pko (Glockner, G., et al. 2006), *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* Nichols (Fraser, C.M., et al. 1998), *Treponema denticola* ATCC 35405 (Seshadri, R., et al. 2004), *Leptospira interrogans* serovar Lai 56601 (Ren, S.X., et al. 2003), *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni Fiocruz L1-130 (Nascimento, A.L., et al. 2004), *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo-bovis JB197 (Bulach, .DM., et al. 2006), y *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo-bovis L550 (Bulach, D.M., et al.2006). Los nueve genomas se tomaron de la *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (www.genome.jp/kegg) y se añadieron a una base de datos.

Se hizo una comparación inicial de los 9 genomas de espiroquetas contra ellos mismos. Los genes que se encontraron presentes en al menos una especie de cada uno de los tres géneros de espiroquetas representados por los 9 genomas y que no eran genes de biosíntesis de la maquinaria celular básica (comunes a todos los seres vivos), fueron seleccionados para hacer un *core* de genes (Figura 4.1). La alineación de secuencias multigénicas se llevó a cabo usando CLUSTAL W plataforma LINUX (Higgins, D.G. et al. 1994), y la comparación de los nueve genomas se hizo con BLAST P (Smith, T.F., & Waterman, M.S., 1981) con un valor de $e= 0.0000001$ (10^{-7}). La tabla que arrojó BLAST se analizó manualmente para seleccionar los genes del *core*.

Figura 4.1. Genes descartados para obtener el core.

GENES QUE NO SON DE METABOLISMO BÁSICO Y ESTÁN PRESENTES EN AL MENOS UNA ESPECIE DE CADA GÉNERO DE LAS ESPIROQUETAS ESTUDIADAS	9,654
GENES QUE NO SON DE METABOLISMO BÁSICO Y ESTÁN EN AL MENOS UNA ESPECIE DE CADA GÉNERO DE LAS ESPIROQUETAS ESTUDIADAS	2,948
GENES DE METABOLISMO BÁSICO	7,949
TOTAL GENES CODIFICANTES EN LOS 9 GENOMAS ESPIROQUETAS	20,551



Se hizo una búsqueda de los genes del *core* en todos los genomas disponibles hasta noviembre del 2006 (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, www.genomes.jp/kegg) y se eliminaron todos los genes presentes en organismo que no fuera espiroquetas, obteniendo la lista de genes únicos de espiroquetas (firma genómica). La alineación y la comparación de secuencias se hizo también con CLUSTAL W y BLAST P respectivamente. La selección de los genes presentes en organismos que no fueran espiroquetas para eliminarlos de la tabla que arrojó el BLAST se hizo manualmente.

También se hizo una búsqueda manual de genes presentes en espiroquetas y eucariontes únicamente, en la tabla resultante de la comparación de genes entre el *core* y los todos los genomas secuenciados.

Se hizo también una filogenia de los del *core* genes que se encontraron únicamente en espiroquetas (genes firma) para comprobar si eran representativos. La alineación de secuencias se hizo en CLUSTAL W (Higgins, D.G. *et al.* 1994) y la filogenia se hizo con el programa PHYLIP (Felsenstain, J. 2003) con *neighborhood joining*. Para la prueba de robustez se utilizaron 500 alineaciones.

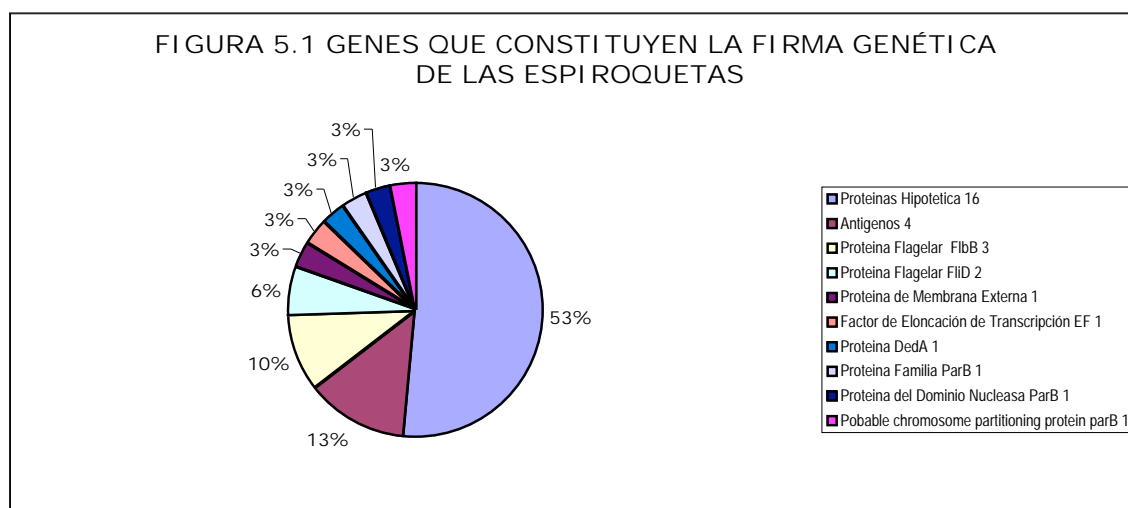
5. RESULTADOS

La comparación inicial de los 9 genomas de espiroquetas contra ellos mismos dio como resultado un *core* con 2948 genes (que no incluía ningún gen de la maquinaria celular básica). La búsqueda de estos 2948 genes en todos los genomas secuenciados hasta noviembre del 2006, mostró que 98.5% de los genes del *core* también estaban presentes en el genoma de otros organismos, descartando 2917 genes *core* como genes firma de las espiroquetas. El 1.5% de los genes del *core* que no se encontraron en ningún otro organismo que no fuera espiroqueta, correspondiente a 31 genes en total, fueron tomados como los genes firma de las espiroquetas conformando así la firma genómica de estas. El 54.8% de los genes firma codifican para proteínas hipotéticas.

Como genes firma se encontraron tres proteínas flagelares *flbB* (asociadas al cuerpo basal), dos proteínas flagelares *FliD* (asociadas al gancho), cuatro antígenos (p83/100), una proteína de membrana externa (tpn 50), un factor de elongación de transcripción EF, una proteína DedA, una proteína de la familia ParB y una proteína del dominio nucleasa del tipo ParB. El resto fueron proteínas hipotéticas (Tabla 5.1 , Figura 5.1 y Tabla 5.2).

TABLA 5.1 Genes que constituyen la firma genómica de las espiroquetas

Gen	Cantidad	%
Proteínas Hipotética	16	53.00%
Antígenos	4	13.00%
Proteína Flagelar FlbB	3	10.00%
Proteína Flagelar FlhD	2	6.00%
Proteína de Membrana Externa	1	3.00%
Factor de Elongación de Transcripción EF	1	3.00%
Proteína DedA	1	3.00%
Proteína Familia ParB	1	3.00%
Proteína del Dominio Nucleasa ParB	1	3.00%
Pobable chromosome partitioning protein parB	1	3.00%
TOTAL	31	100.00%



El análisis de la tabla resultante de comparar el *core* contra todos los genomas en busca de genes presentes únicamente en espiroquetas y eucariontes, mostró que solamente dos eucariontes comparten genes con las espiroquetas, la especie *Danio rerio* (pez zebra), que contiene 3 copias del gen BB0236 (proteína hipotética) del genoma de *B. burgdorferi*, y *Caenorhabditis elegans* (nemátodo) que contiene 2 copias del gen TP0421 (proteína hipotética).

Los demás genomas de eucariontes no contenían ninguna copia de los genes del *core* de genes de espiroquetas.

La filogenia hecha con los genes firma resultó en el dendograma mostrado en la Figura 5.1. Las relaciones filogenéticas obtenidas con el análisis de las secuencias de los genes firma no variaron mucho de las obtenidas en estudios previos hechos con el análisis de secuencias 16s rRNA (Paster, B.J. *et al.* 1991)(Figura 1.4.1.).

Tabla 5.2. Genes que constituyen la firma genética de las Espiroquetas

Genoma	Clave del gen	Gen
<i>B. burgdorferi</i>	BB0011	K09766 hypothetical protein
	BB0149	K02407 flagellar hook-associated protein 2
	BB0744	Antigen p83/100
<i>B. garinii</i>	BG0011	K09766 hypothetical protein
	BG0148	K02407 flagellar hook-associated protein 2
	BG0765	Antigen p83/100
	BG0774	Hypothetical protein
<i>B. afzelii</i>	BAPKO_016	Outer membrane protein (tpn50)
	BAPKO_0245	Hypothetical protein
	BAPKO_0787	Antigen p83/100
<i>T. pallidum</i>	TP0018	Transcription elongation factor EF
	TP0258	Hypothetical protein
	TP0396	K02387 flagellar basal-body rod protein FlgB
	TP0486	Antigen p83/100
	TP0567	K02383 flagellar protein FlbB
	TP0779	DedA protein (DedA)
	TP0829	K09766 hypothetical protein
	TP0996	Hypothetical protein
<i>T. denticola</i>	TDE1212	K02387 flagellar basal-body rod protein FlgB
	TDE2187	ParB-like nuclease domain protein
	TDE2274	K09766 hypothetical protein
	TDE2293	Hypothetical protein
	TDE2598	Hypothetical protein
	TDE2608	Hypothetical protein
	TDE2751	Hypothetical protein
<i>L. interrogans Lai</i>	LA0365	Hypothetical protein
	LA2634	Probable chromosome partitioning protein parB
	LA2739	K09766 hypothetical protein
<i>L. interrogans Copenhageni</i>	LIC10314	Hypothetical protein
	LIC11273	K09766 hypothetical protein
	LIC11353	ParB family protein

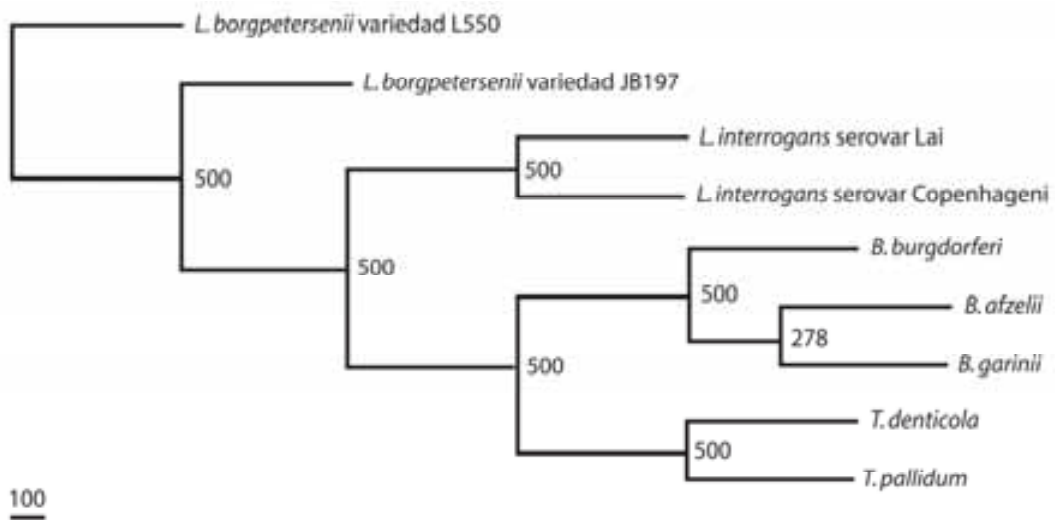


Figura 5.1. Dendrograma de las espiroquetas hecho con las secuencias de los genes firma.

6. DISCUSIÓN

La búsqueda de genes firma con 9 genomas de espiroquetas, comparando las secuencias de un *core* de genes de espiroquetas contra todos los genomas secuenciados hasta noviembre del 2006, mostró que existen 31 genes exclusivos de espiroquetas, que no pueden ser encontrados en ningún otro organismo. Como se esperaba, varios genes de la firma genómica están involucrados con el flagelo, el 16% de la firma en total. Tres de estos genes codifican para proteínas flagelares *flbB*, asociadas al cuerpo basal y a la regulación de la síntesis del flagelo, y dos para proteínas flagelares *FliD* asociadas al gancho, y esenciales para la polimerización de la flagelina (Ikeda, T., et al. 1996). Estos 5 genes dentro de la firma genómica deben estar estrechamente ligados con la función y disposición únicas de los flagelos endoplasmáticos, característica distintiva de las espiroquetas. Su presencia dentro de la firma genómica parece bastante lógica, ya que tanto el cuerpo basal como el gancho de los flagelos de las espiroquetas deben tener características diferentes a las de los flagelos del resto de las bacterias, ya que son capaces de desenvolver su función de motilidad aún estando dentro del espacio periplasmático.

El 13% de los genes de la firma genómica (4 genes) correspondieron a secuencias que codifican para antígenos p83/100 (antígeno 83-kDa). La presencia de antígenos dentro de la firma genómica no se esperaba, pero era de suponerse, ya que los nueve genomas de espiroquetas utilizados en la comparación, pertenecen a espiroquetas patógenas. La presencia de estos 4 antígenos (*BAPKO_0787*, *BB0744*, *BG0765* y *TP0486*) dentro de la firma genómica de las espiroquetas tiene implicaciones médicas importantes, ya que sugiere que es posible utilizarlos como marcadores taxonómico de ciertas espiroquetas patógenas. En estudios previos, para la búsqueda de métodos más

precisos para la diagnosis de la enfermedad de *Lyme*, donde se utilizaron antígenos nativos y recombinantes, se encontró que en los estadios avanzados de la enfermedad, los anticuerpos son reactivos al poco expresado antígeno *p83* de *B. burgdorferi* (gen BB0744), y también a los antígenos *p94* y *p100* que son homólogos del *p83*. Y aunque la función celular y las posibles implicaciones patológicas del antígeno *p83* y sus homólogos en *B. burgdorferi* aún no han sido clarificados, se encontró que son antígenos altamente específicos, muy útiles como marcadores taxonómicos de las etapas avanzadas de la enfermedad de *Lyme* (Rauer, S., *et al.* 1995). De esta forma por extrapolación, es posible decir que la presencia de cualquiera de los 4 antígenos en la firma genómica confirmaría, en primera instancia, que se trata de espiroquetas, y podría dar pie a una identificación más específica por especie, dependiendo el genoma donde se encuentre cada antígeno *p83*. Esto puede ser de gran ayuda en el diagnóstico de las enfermedades que causan estos microorganismos, en especial *B. burgdorferi*, *B. garinii*, *B. afzelii* y *T. pallidum*. También podría contribuir a la caracterización de nuevas especies de espiroquetas, al hacer más fácil la identificación de microorganismos como espiroquetas, a través de la presencia en el genoma de cualquiera de estos 4 antígenos, sin embargo habría que corroborar si los genomas de las especies saprofiticas de espiroquetas también contienen estos genes.

El 3% de los genes de la firma genómica corresponde a una proteína de membrana externa *tpN50*. Este tipo de proteína es funcionalmente equivalente a las proteínas *OmpA* en *E. coli*, y no está presente en la especie saprofitica de espiroqueta *B. biflexa* (Hsieh, W.J., & Pan, M.J. 2006). Esto sugiere que esta proteína puede estar relacionada con la composición particular de la cubierta de lipopolisacáridos en las espiroquetas patógenas. Las proteínas en la membrana externa de las espiroquetas patógenas juegan un papel fundamental en su capacidad de infectar otras células y su virulencia. Sin embargo, también sería necesario corroborar la presencia de este gen en el genoma de las espiroquetas

saprofíticas. Otro aspecto importante de la presencia de la proteína *tpN50* en la firma genómica de las espiroquetas que salta a la vista, es que el gen que la codifica fue descrito para la especie *T. pallidum*, cuya membrana externa es única por su composición y los cambios rápidos que puede sufrir en dicha composición para adaptarse a diferentes medios. Es extremadamente raro encontrar una proteína de la membrana externa de *T. pallidum* dentro de los genes firma, en especial porque uno de los genomas que se incluyeron dentro de la comparación, fue el de *T. denticola*, que ha ido perdiendo este tipo de sistemas complejos de proteínas en su membrana. Sin embargo, la presencia de esta proteína *tpN50* dentro de la firma genómica debe estar relacionada directamente con la patogeneidad de las 9 especies de las que se tomaron los genomas, confiriéndoles alguna ventaja de adaptabilidad a sus hospederos respectivamente. En el caso de *T. denticola* podría ser una de las pocas proteínas de la membrana externa conservadas que contribuyen a su virulencia.

Otro de los genes firma, resultó ser un factor de elongación de transcripción EF, lo cual es sumamente raro ya que los factores de elongación de transcripción son parte de los genes de la maquinaria celular básica en todos los seres vivos. Hasta el momento no se conoce ninguna función específica de las espiroquetas que pudiera explicar este factor de elongación de transcripción dentro de los genes de la firma genómica, sin embargo, se corroboró la presencia del gen que codifica para este dentro de la firma. Se alineó y comparó nuevamente la secuencia que codifica para el factor de transcripción EF con el *core*, con parámetros más estrictos (que requirieran un porcentaje de similitud mayor entre las secuencias), y el factor de elongación de transcripción EF siguió apareciendo dentro de los genes firma (presente en al menos una especie de cada género de espiroquetas). Aún así con la información que hay sobre las espiroquetas hasta la fecha no es posible explicar que función cumple este gen en las espiroquetas, que lo haga único de éstas.

Un 3% de la firma genómica fue un gen que codifica para una proteína de la familia *dedA*. Es difícil interpretar la presencia de este gen dentro de la firma genómica ya que las proteínas de la familia *dedA* son proteínas integrinas de membrana cuya función hasta la fecha es completamente desconocida (Ledgham, L. *et al.* 2004). Es posible que también este asociado con la patogeneidad de las espiroquetas por ser una proteína de membrana, dando alguna clase de ventaja a las espiroquetas patógenas para infectar células. No es posible que esta proteína pudiera estar relacionada con el reconocimiento de las circunstancias externas para la sobrevivencia, ya que se incluyó para identificar la firma genómica el genoma de *T. denticola*, una espiroqueta que ha perdido la capacidad de llevar a cabo este tipo de funciones de reconocimiento.

Un gen codificante para una proteína *ParB* (proteína de partición) representa otro 3% de los genes firma. En general los genes que codifican para proteínas *ParB* son encontrados en los plásmidos de otras bacterias, y cumplen con varias funciones, entre ellas estabilizar los plásmidos (Funnell, B.E. 1998), lo cual podría sugerir que en las espiroquetas la proteína *ParB* se encuentre en sus cromosomas para darles algún tipo de estabilidad. Las proteínas *ParB* son DNA-binding proteins, involucradas en la partición de los plásmidos y los cromosomas bacterianos, y por lo tanto con la segregación cromosómica (Sievers, J. *et al.* 2002). En muchas bacterias como *E. coli*, la región *ParB* codifica para dos genes, *hok* y *sok*, que sirven básicamente para matar otras células. El gen *hok* codifica para un factor que es un potente asesino de células, y el gen *sok* regula al gen *hok* (Gerdes, *et al.* 1986). Ya que en diferentes estudios se ha demostrado que el mecanismo por el cual las proteínas de la familia *ParB* funcionan se ha conservado en la mayoría de las bacterias (Sievers, J. *et al.* 2002), es posible que la proteína *ParB* en la firma genómica de las espiroquetas les conceda a éstas alguna función para infectar células de una forma más rápida y eficaz, pero sin matar a la célula hospedera. Las proteínas *ParB* trabajan conjuntamente con las proteínas *ParA* y *ParS* (Lobocka, M., &

Yarmolinsky, M. 1996), sin embargo no se encontró ningún gen codificante para proteínas *ParA* ni *ParS* dentro de los genes firma. Esto puede deberse a que cambios en las proteínas *ParB* pueden modificar radicalmente la función y desempeño de las proteínas *ParA* y *ParS* (Lobočka, M., & Yarmolinsky, M. 1996), por lo que no es necesario tener proteínas *ParA* y *ParS* diferentes al del resto de las bacterias para tener una función específica y única en las espiroquetas. De esta forma suena lógico sugerir que la proteína *ParB* en los genes firma de las espiroquetas cambie el funcionamiento de las proteínas *ParA* y *ParS* también, otorgando alguna característica diferente que le de ventajas en su reproducción a las espiroquetas patógenas, por ejemplo, poder incrementar más rápidamente su población.

Otro de los genes firma posiblemente codifica para una proteína con un dominio del tipo *ParB* (3% de la firma genómica). Esto no ha sido ratificado todavía. Estudios sobre las proteínas con un dominio del tipo *ParB*, han sugerido que posiblemente se originaron por una duplicación del gen que codifica para las proteínas *ParB*, ya que al compararlas son idénticas en un 36%. Debido a que la segregación cromosómica es esencial, se cree que las proteínas con dominio del tipo *ParB* también están involucradas en esta función (Sievers, J., *et al.* 2002). Al igual que la presencia de una proteína *ParB* dentro de la firma genómica de las espiroquetas, el que las espiroquetas tengan una proteína con dominio tipo *ParB* única de ellas, puede estar asociado con tener una reproducción más rápida para facilitar la infección del hospedero. Sería necesario ratificar la presencia de esta proteína en las especies de espiroquetas saprofitas. Su ausencia en las especie saprofitas ratificaría su contribución a la virulencia de las especies patógenas de espiroquetas.

Como se esperaba, la mayor proporción de genes dentro de la firma genómica de las espiroquetas codifican para proteínas hipotéticas (55%). Esto se debe a que la mayoría de las proteínas para las que codifican estos genes

(15 genes de la firma genómica), no tienen homólogos conocidos en los genomas de otras especies, por lo que su caracterización es más difícil, y aún no se ha hecho. Es posible sugerir que varios de estos genes estén relacionados con proteínas flagelares, sin embargo, dadas las características y funciones diversas de los genes para los que se sabe que proteínas codifican dentro de la firma, no es posible hacer una suposición acertada, ya que también podría tratarse de proteínas relacionadas con la virulencia y patogeneidad de las 9 especies cuyos genomas se utilizaron en este análisis. También podría tratarse de genes involucrados en funciones poco conocidas o desconocidas de las espiroquetas, como podría ser su tipo único de esporulación.

Para determinar la representabilidad de los nueve genomas de espiroquetas para el *Phylum* completo de las espiroquetas, se hizo una filogenia con los genes firma. La filogenia mostró que los géneros representados en los nueve genomas si pueden ser representativos del grupo completo, al menos hasta que se hayan secuenciado más genomas de espiroquetas, ya que los géneros *Borrelia*, *Treponema* y *Leptospira* aparecen en diferentes ramas evolutivas. Esta filogenia comparada con la filogenia de espiroquetas hecha antes con 16S rRNA (Paster, B.J. *et al.* 1991), confirma que la firma genómica de los 9 genomas de espiroquetas secuenciados puede extrapolarse al *Phylum* completo hasta que se hagan nuevas comparaciones con más genomas.

Por otro lado, la búsqueda de genes del *core* de espiroquetas, presentes también eucariontes, mostró que los genes BB0236 y TP0421 se encuentran presentes en *Danio rerio* y *Caenorhabditis elegans* respectivamente. El primero con 3 copias y el segundo con 2 copias. Este hecho no tiene ninguna implicación con la aparición del undulipodo en eucarionte, y es muy difícil dar una interpretación a la presencia de estos genes de espiroquetas en eucariontes. Podría deberse a una posible transferencia horizontal de genes fortuita sin implicaciones evolutivas.

Dentro de la información obtenida con la firma genómica de las espiroquetas, no fue posible encontrar ningún indicio de alguna evidencia relacionada con el origen endosimbiótico del undulipodium. Esto podría deberse a que con el paso del tiempo el *undolipodio* ha perdido todos sus genes, y quizá no se encuentre una evidencia tan clara en el genoma eucarionte, como en el caso de las mitocondrias y los cloroplastos.

7. CONCLUSIÓN

El 1.5% de los genes del *core* de espiroquetas no se encontraron en ningún otro organismo que no fuera espiroqueta, correspondiente a 31 genes en total y se tomaron como la firma genómica de las espiroquetas. Los genes firma incluyen tres proteínas flagelares *flbB* (asociadas al cuerpo basal), dos proteínas flagelares *FliD* (asociadas al gancho), cuatro antígenos (p83/100), una proteína de membrana externa (tpn 50), un factor de elongación de transcripción EF, una proteína DedA, una proteína de la familia ParB y una proteína del dominio nucleasa del tipo ParB. El resto fueron proteínas hipotéticas (Tabla 5.1 y 5.2).

Los resultados de este trabajo no pueden ser complementados con futuros trabajos, ya que el número de genomas disponibles hoy día es muy limitado. Aún es necesario hacer un análisis comparativo de los genes de la firma genómica contra genomas de espiroquetas saprofitas para determinar si todos ellos pueden extrapolarse como genes firma de todo el *Phylum*. Así mismo, en el futuro será necesario caracterizar las proteínas hipotéticas de la firma genómica, para poder tener una mejor idea de las características morfológicas y fisiológicas distintivas de las espiroquetas.

En lo que respecta a la búsqueda de evidencia sobre el origen endosimbiótico del undulipodium, los resultados fueron no contundentes. En el futuro podría hacerse una comparación entre las secuencias de las proteínas hipotéticas de la firma genómica de las espiroquetas y las secuencias de los genes que codifican para las proteínas asociados a microtúbulos y síntesis de *tubulina*, en busca de secuencias de aminoácidos similares.

La identificación de los genes firma puede ayudar al diagnóstico clínico, ya que incluyen genes relacionados directamente con la patogeneidad, que

sirven como marcadores taxonómicos. Pueden servir para identificar las especies patógenas de espiroquetas.

8. APÉNDICES

1) APÉNDICE I: Flagelos bacterianos

El término *flagelo* se refiere al órgano de locomoción bacteriano cuya composición y estructura difiere mucho de la de los flagelos eucarióticos denominados undulipodia. Los *flagelos* bacterianos son mucho más pequeños y simples, constan de un solo filamento helicoidal de unos 20 nanómetros de diámetro conformado únicamente por un tipo de subunidad proteínica llamada *flagelina*. Cada *flagelo* está unido a la célula en su base a través de un *gancho* corto y flexible que se adhiere a *discos (anillos)* proteicos incrustados en las membranas bacterianas (Alberts, *et al.* 1994).

Las bacterias *Gram positivas* poseen dos *anillos proteínicos*, uno en la cubierta de peptidoglicanos, y otro incrustado en la membrana citoplasmática. Las bacterias *Gram negativas* por su parte, tienen cuatro de estos *anillos*: el *anillo L*, asociado a los lipopolisacáridos, el *anillo P* asociado con la cubierta de peptidoglicanos, el *anillo M* que está incrustado en la membrana periplasmática, y el *anillo S* unido directamente sobre la membrana periplasmática. Estos anillos son parte de un pequeño “motor” o *máquina rotatoria* que utiliza la energía almacenada en el *gradiente transmembranal H⁺* para originar y controlar el movimiento rotatorio del flagelo (Alberts, *et al.* 1994).

En el caso de las espiroquetas, el flagelo se llama *filamento axial* o *flagelo periplasmático* ya que es un flagelo que se encuentra dispuesto a lo largo del espacio periplasmático y genera el movimiento bacteriano desde el interior de la célula (figura 1.4.1).

2) APÉNDICE II: Descripción del *Phylum Spirochaetes* por subgrupos (Clasificación de NCBI 2006).

A) Familia *Leptospiraceae*

Familia de bacterias del orden *Spirochaetales*, que incluye tres géneros. Sus miembros se caracterizan por ser bacterias aeróbicas helicoidales flexibles, con un diámetro celular de 0.1 micrómetro y una conformación dextrógira. Estos organismos contienen ácido diaminopimélico y utilizan los ácidos grasos y los alcoholes en las largas cadenas como fuentes de carbono y energía.

Género *Leptospira*

El género *Leptospira* es un grupo increíblemente amplio de microorganismos, con más de 200 *serotipos* descritos hasta el momento (NCBI, 2006). Las bacterias que lo conforman son muy delgadas en forma de espiral (dexógiras), con 0.1 μm de diámetro y una longitud de 6 a 20 μm (Holt, J., *et al.* 1999). La distancia promedio entre sus crestas es de unos 0.5 μm . Por lo general uno o ambos extremos del organismo están curvados en forma de gancho (figura 1.3.3). Como el resto de las espiroquetas presentan los característicos *flagelos periplasmáticos*, uno en cada polo, por lo que las espiroquetas de este género solo presentan 2 *flagelos periplasmáticos* en total, que raramente se sobreponen hacia el centro de la célula. En virtud de su estructura en espiral, alrededor de su eje axial puede haber hasta 20 enrollamientos de los flagelos en función de su longitud total (Ryan, K.J. y Ray, C.G. 2004). En medios líquidos el movimiento típico de estas células es la rotación sobre su eje axial, alternada con una traslación (por plegamiento) en dirección del extremo de la célula que no llega a tener forma de gancho. En

medios viscosos su movimiento se caracteriza por ser flexuloso, lento y serpenteado (Holt, J., *et al.* 1999).

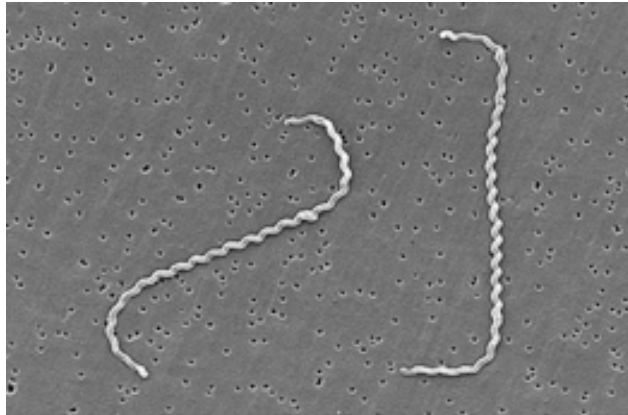


Figura 1.3.3. Microscopía electrónica de *Leptospira interrogans* (CDC Public Health Image Library, 2007).

Las bacterias del género *Leptospira* son tan delgadas que es muy difícil verlas con el microscopio de luz corriente. Se pueden teñir ligeramente con tintes de anilina, pero se visualizan con mayor facilidad con un microscopio de campo oscuro o de contraste de fases. Se pueden cultivar en medios al 1% y 2% de agar, a una temperatura óptima de 28 a 30 °C (Holt, J., *et al.* 1999).

Son organismos aeróbios, quimoorganotróficos que utilizan ácidos grasos y alcoholes grasos con 15 o más átomos de carbono como fuente de carbono y energía. Son resistentes a la acción inhibitoria del 5'-*fluorouracilo* al cual los demás géneros de espiroquetas son muy sensibles y sus lípidos celulares no contienen glucolípidos. Pueden encontrarse en diversos ambientes y ciclos de vida. Una parte de estas bacterias son patógenas de mamíferos y la otra organismos saprofitos (complejo *biflexa*) de vida libre geográficamente ubicuos

(excepto en la Antártida). La mayoría de las *Leptospira* de vida libre son hidrofílicas (una alta humedad y un pH neutral son esenciales para su supervivencia), por lo que es más común encontrarlas en reservorios naturales como las aguas estancadas, pantanos, lagunas, estanques, y charcos (Ryan, K.J. y Ray, C.G. 2004).

Las variedades no saprofíticas causan la *leptospirosis*, una zoonosis que infecta principalmente animales domésticos y salvajes, que actúan como incubadores. Los humanos pueden contraer leptospirosis como un hospedero accidental. La capacidad de invadir tejidos de las especies patógenas de este género, está facilitada por la producción de la enzima hialuronidasa, la cual altera la permeabilidad del tejido conjuntivo al hidrolizar el ácido hialurónico (Céspedes, 2005).

La clasificación de las leptospiras ha sido difícil, debido a la casi inexistente diferencia dentro del género (casi todos los miembros lucen idénticos), y son generalmente consideradas un grupo demasiado complejo debido a todas las tablas, listas, agrupamientos y argumentos que se publican cada año sobre el tema.

Las características diferenciales entre los dos complejos que forman el género *Leptospira* (patógenos y *biflexa*), además de su capacidad para infectar ciertos mamíferos, incluyen inhibición del crecimiento con ciertas sustancias o diferencias en la temperatura de crecimiento y pruebas moleculares generales como la hibridación DNA-DNA, en las que se ha encontrado distinción genética entre ambos complejos. Sin embargo, la taxonomía de las leptospiras continúa siendo provisional, en tanto los continuos avances en la microbiología básica de estos microorganismos permitan la caracterización más exacta y la definición de nuevas especies. Sobre la base de sus características genéticas, se reconocen actualmente no menos de 17 especies de *Leptospira*.

Género ***Leptonema***

Este género fue creado en 1979 por Hovind-Hougen (Int. J. Syst. Bacteriol. 29: 245-251) y validado en 1983. Incluye solo una especie *Leptonema illini*. El género se describe morfológicamente casi idéntico al género *Leptospira* a excepción de que el *filamento axial* está insertado en la célula por medio de un cuerpo basal con un solo par de discos en vez de dos como en el género *Leptospira*, y que las células contienen dos juegos de *túbulos intracitoplasmáticos* que se originan en los extremos de la célula y corren paralelos al *filamento axial* (Holt, J., et al. 1999).

El metabolismo estas bacterias es respiratorio, y utilizan ácidos grasos como su principal fuente de carbono. No son organismos patógenos. Y a diferencia de las leptospiras, pueden crecer sin tener que adicionar *serum* o *serum albumina* al medio de cultivo (Holt, J., et al. 1999).

Género ***Turneriella***

El género *Turneriella* surgió en el año 2005 (Levett et al. 2005, gen. nov.), después de que un análisis de contenido G+C, así como un análisis de relación DNA-DNA contra las demás leptospiras y una secuenciación genética del RNA 16s de la especie antes llamada *Leptospira parva* (Hovind-Hougen et al. 1982), mostraron que esta especie no tenía relación alguna con las demás leptospiras. De esta forma *Leptospira parva* fue renombrada *Turneriella parva* y considerada dentro de un nuevo género aparte (<http://www.bacterio.cict.fr> y Holt, J., et al. 1999).

En este nuevo género, las bacterias se caracterizan por ser células de $0.3 \mu\text{m}$ de ancho por 3.5 a $7.5 \mu\text{m}$ de largo, que poseen 2 flagelos cada uno, insertados en cada extremo de la célula. Son organismos de vida libre en agua dulce, e igualmente pueden ser aisladas de muestras de *albúmina bobina* y del útero de los cerdos hembras. Son bacterias aeróbicas y crecen a una temperatura óptima de 13 a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. No crecen en presencia de 8-azaguanina (<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/ll/leptospira.html>).

B) Familia *Spirochaetaceae*

Familia de bacterias de vida libre en su mayoría, que se encuentran con mayor frecuencia en agua dulce o salada, aunque también es posible encontrarlas en una relación de comensalismo en los cuerpos de ostras y algunas cuantas especies son patógenas. Son anaerobias facultativas o microaerófilas, de forma helicoidal con un diámetro comprendido entre 0.1 y 3.0 micrómetros. Los extremos de sus células no están curvados como en las *leptospiras*. En sus peptidoglicanos poseen L-ornitina. Utilizan carbohidratos o aminoácidos como fuente de energía y de carbono (Ryan, K.J. y Ray, C.G. 2005).

Género *Borrelia*

El género *Borrelia* está formado por bacterias espirales laxas de 0.2 a $0.5 \mu\text{m}$ de diámetro por 3 a $20 \mu\text{m}$ de largo, compuestas de 3 a 10 espirales sueltas (figura 1.3.4.). Las bacterias de este género poseen de 7 a 30 *filamentos axiales* en cada extremo de la célula, que se enrollan sobre el *cilindro protoplasmático* y se superponen hacia el centro de la célula. Las células son altamente móviles, y presentan una frecuente inversión de la dirección en la que se transportan. No presentan túbulos intracitoplasmáticos (Holt, J., *et al.* 1999).

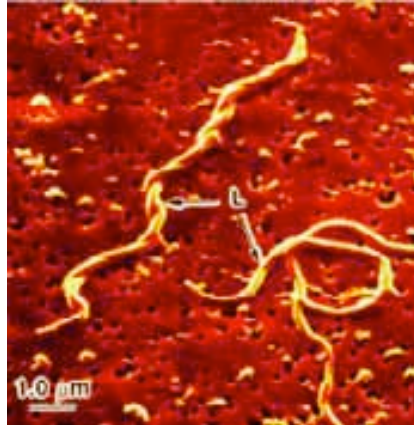


Figura 1.3.4. Micrografía electrónica de *Borrelia burgdorferi* (<http://fai.unne.edu.ar>).

Las especies de *Borrelia* que se han cultivado *in vitro* son microaerófilas, quimoorganotróficas, y los requerimientos para cultivarlas *in vitro* son complejos. Estos microorganismos son patógenos de los humanos, otros mamíferos y aves (Holt, J., *et al.* 1999). Son los agentes causantes de la enfermedad de *Lyme* en humanos, que provoca anomalías dermatológicas, reumatológicas, neurológicas y cardíacas, así como otros padecimientos transmitidos por insectos y piojos. Tiene *endotoxinas* como factor principal de su virulencia (Ryan, K.J. y Ray, C.G. 2005). La especie tipo de este género es *Borrelia anserina* (Holt, J., *et al.* 1999).

Género ***Brevinema***

El género *Brevinema* fue creado en 1995 (Defosse *et al.* 1995, gen. nov.) y consta de una sola especie, *Brevinema andersonii*. Esta especie está conformada por un grupo de espiroquetas infecciosas que han sido aisladas de la musaraña de cola corta (*Blarina brevicauda*) y del ratón de patas blancas (*Peromyscus leucopus*), que mostraron tener diferencias ultra estructurales y serológicas considerables respecto a los demás grupos de espiroquetas.

Las espiroquetas de este género son bacterias helicoidales de 0.2 a 0.3 μm de diámetro, por 4 a 5 μm de largo, que presentan de una a dos ondulaciones (con longitud de onda de 2 a 3 μm), poseyendo de esta forma la estructura típica de las espiroquetas. Son móviles a 30°C y presentan movimientos de flexión, rotación y de translación, gracias a dos flagelos periplasmáticos en total (<http://www.bacterio.cict.fr>).

Son organismos quimioorganotróficos, microaerofílicos, desprovistos de catalasas. Se cultivan en medios BSK (Barbour-Stoenner-Kelly) o BSK modificado (sin N-acétilglucosamina o piruvato, a una temperatura óptima de 30 a 34°C y un pH de 7.4. No requieren adicionar sérum albúmina bovina, pero necesitan cisteína, triptofano y catalasas. (www.bacterio.cict.fr).

Estos organismos viven en la sangre, bazo y riñones de la musaraña de cola corta (*Blarina brevicauda*) y del ratón de patas blancas (*Peromyscus leucopus*).

Género ***Cristispira***

El género *Cristispira* esta formado por células helicoidales de 0.5 a 3.0 μm de diámetro por 30 a 180 μm de longitud, que generalmente muestran de 2 a 10 ondulaciones. Los extremos de las células están redondeados (achatados) y estrechos. En preparaciones fijadas o teñidas, un filamento o *espícula* puede emanar de uno o ambos extremos. Las preparaciones teñidas revelan una serie de inclusiones ovaladas que otorgan una apariencia de cámara al *cilindro protoplasmático*. Un conjunto de 100 o más *filamentos axiales* se entrelazan con el *cilindro protoplasmático* y puede dilatar la *membrana externa* para formando una cresta (llamada *crista*) en el *cilindro protoplasmático*. La *crista* no es siempre obvia en células vivas, pero puede ser muy evidente cuando la célula deja de

moverse (Holt, J., *et al.* 1999).

El movimiento de las bacterias de este género es paralelo al eje axial de sus células. Una célula individual se mueve hacia atrás o hacia adelante sin una polaridad anterior-posterior. El tipo de movimiento puede ser rotatorio sobre el eje axial o puede tomar la forma de una onda helicoidal que viaja sin rotación. Los movimientos de flexión son comunes en este género (Holt, J., *et al.* 1999).

Las variedades de *Cristispira* están ampliamente distribuidas entre los moluscos marinos y de agua dulce (calamares, mejillones y ostras) y habitan dentro del tracto digestivo. Son probablemente comensales. También se encuentran en gasterópodos y en especies que no son moluscos. La especie tipo de este género es *Cristispira pectinis* (Holt, J., *et al.* 1999).

Género ***Spirochaeta***

El género *Spirochaeta* esta formado por bacterias helicoidales de 0.2 a 0.75 μm de diámetro por 5 a 20 μm de largo (figura 1.3.5.), que bajo condiciones desfavorables forman células esféricas (*esferas espiroquetales*) o estructuras tipo espora, de 0.5 a 2.0 μm de diámetro (ocasionalmente mayores a 10 μm). Todas las especies de este género tienen dos *filamentos axiales*, uno insertado en cada extremo de la célula, excepto en *Spirochaeta plicatilis*, que tiene varios *filamentos axiales*. Son bacterias altamente móviles cuando están suspendidas en líquidos, sin embargo en contacto con superficies sólidas avanzan más lentamente o se arrastran. El diaminoácido presente en los peptidoglicanos es L-ornitina (Holt, J., *et al.* 1999).

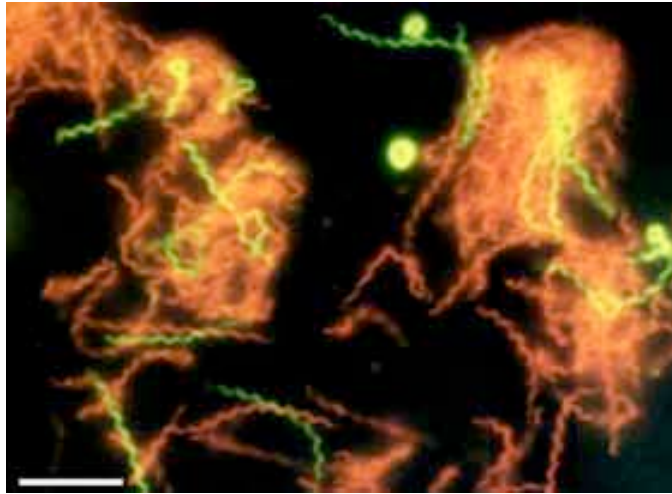


Figura 1.3.5. Microfotografía de *Spirochaeta americana*, una especie encontrada recientemente en el lago Mono de California, donde se pensaba no había vida (<http://ciencia.nasa.gov>).

Las *espirochaetas* son organismos anaeróbios o anaeróbios facultativos, quimioorganotróficos (usan una variedad de carbohidratos como fuente de carbono y energía), y tienen una temperatura óptima de crecimiento de 25 a 40°C. Las especies anaeróbicas facultativas bajo condiciones de crecimiento aeróbicas, producen pigmentos carotenóides que dan una coloración amarillenta, anaranjada-amarillenta o roja a sus colonias. Los principales productos del metabolismo anaeróbico de carbohidratos son etanol, acetato, CO₂, y H₂, excepto en una especie (*Spirochaeta zuelzeriae*) que produce succinatos y lactatos en lugar de etanol. Las especies anaeróbicas facultativas oxidan carbohidratos aeróbicamente produciendo principalmente CO₂ y acetato. Una especie marina (*Spirochaeta isovalerica*) fermenta L-valina, L-iso-leucina y L-leucina generando ATP, pero no utiliza estos aminoácidos como única fuente de carbono y energía para su crecimiento (Holt, J., *et al.* 1999).

Las bacterias de éste género organismos de vida libre autóctonas de los

ambientes acuáticos donde habitan, como los sedimentos, el lodo, los estanques, los pantanos, las ciénegas, los lagos y los ríos. Se les encuentra comúnmente en ambientes que contienen H₂S y están presentes ambientes de agua dulce y marinos. No se ha reportado que ningún miembro de este género sea patógeno. La especie tipo de este grupo es *Spirochaeta plicatilis* (Holt, J., et al. 1999).

Género ***Spironema***

El género *Spironema* se creó para clasificar una nueva especie de espiroquetas que aun no ha sido formalmente nombrada ni descrita: *Spironema culisis*. Este microorganismo se encuentra en los mosquitos, en específico en el mosquito *Culex pipiens* junto con otros 7 tipos de espiroquetas aun no identificadas hasta la fecha (Chechova L., et al. 2004).

El único documento donde se hace una descripción general de esta especie aun no ha sido publicado (Turk N., et al. [unpublished], 1999).

Género ***Treponema***

Las bacterias de este género son finas y pequeñas con forma de bastones helicoidales de 0.1 a 0.4 μm de diámetro por 5 a 20 μm de largo (Holt, J., et al. 1999). Las células tienen espirales estrechas regulares o irregulares, y extremos afilados (figura 1.3.6.). Poseen de uno a cinco *filamentos axiales* insertados en cada extremo del cilindro periplasmático, generalmente 3. Son móviles en medios líquidos por medios de rotación o translación (Ryan, K.J. y Ray, C.G. 2005). En medios semisólidos o sólidos las células exhiben un movimiento de tipo serpenteado (Holt, J., et al. 1999).

Los miembros de este género se tiñen muy poco (o prácticamente nada) con los métodos de *Gemsa* o *Gram*, de tal forma que los métodos más adecuados para teñirlas son los de impregnación con plata. La mejor forma de observar estas bacterias, es por medio del microscopio de campo oscuro o el de contraste de fases. Bajo condiciones de cultivo o ambientales desfavorables forman células esféricas llamadas *esferas espiroquetales*, que son estructuras tipo esporas exclusivas de las espiroquetas. Esto también sucede en cultivos viejos (Holt, J., *et al.* 1999). Las especies patógenas son difíciles de cultivar en laboratorio, siendo más factible visualizar el organismo directamente de la muestra con inmunofluorescencia directa y ciertas tinciones especializadas (Ryan, K.J. y Ray, C.G. 2005).

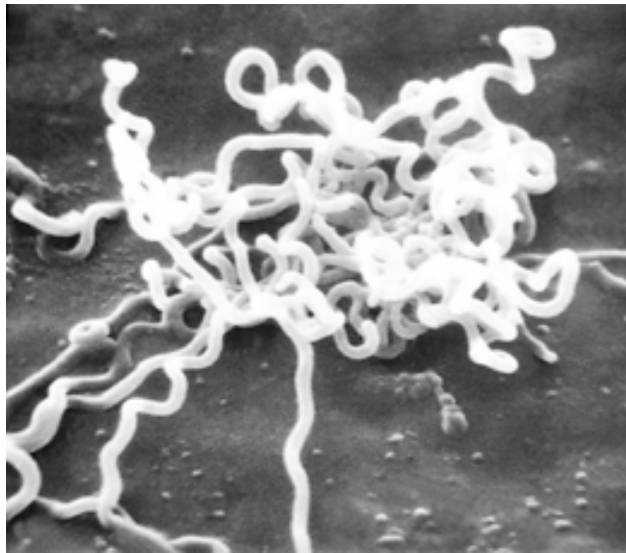


Figura 1.3.6. Micrografía electrónica de *Treponema pallidum* (CDC Public Health Image Library, 1980).

Los microorganismos de este grupo son aeróbios estrictos o microaerófilos. Las especies patógenas de humanos actualmente se consideran microaerófilas y no han podido ser cultivadas en medios artificiales, a pesar de

que algunas han sido cultivadas (con dificultad y sin poder ser serialmente transferidas) en cultivos de tejido. Las *treponema* son quimoorganótrofas, y utilizan una variedad de carbohidratos o aminoácidos como fuente de carbono y energía. Las especies anaerobias cultivadas son catalasa y oxidasa negativas. Algunas requieren largas cadenas de ácidos grasos en el medio de cultivo para crecer, mientras otras especies cultivadas requieren volátiles cadenas cortas de ácidos grasos para desarrollarse. También presentan L-ornitina en sus peptidoglicanos (Holt, J., *et al.* 1999).

Estos microorganismos son normalmente parásitos y patógenos de humanos y animales. Viven en la cavidad bucal, en el tracto intestinal y en las áreas genitales (Ryan, K.J. y Ray, C.G. 2005). Los miembros del género siempre están asociados con un hospedero, y algunas especies son patógenas. La especie tipo que representa a este grupo es *Treponema pallidum* (Holt, J., *et al.* 1999).

9. REFERENCIAS

<http://www.ucmp.berkeley.edu/bacteria/spirochetes.html>

http://www.msd.com.mx/publicaciones/mmereck_hogar/seccion_17

<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/bb/brevinema.html>

<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/ll/leptospira.html>

<http://www.tigr.org/tdb/CMR/gbb/htmls/Background.html>

<http://textbookofbacteriology.net/Lyme.html>

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

Alberts, B. et al. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, USA. 1994.

Aguero-Rosenfeld, M.E., Wang, G., Schwartz, I., & Wormser, G.P.
Diagnosis of Lyme Borreliosis. Clin Microbiol Rev. 2005 Jul; 18(3): 484-509.

Anderson, J.F., Johnson, R.C., Magnarelli, L.A., Hyde, F.W., & Andreadis, T.G. *New infectious spirochete from short-tailed shrews and White-footed mice*. J. Clin. Microbiol., 1987, 25, 1490-1494.

Baranton, G., Postic, D., Saint Girons, I., Boerlin, P., Piffaretti, J.C., Assous, M., & Grimont, P.A. *Delineation of Borrelia burgdorferi sensu stricto, Borrelia garinii sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis*. Unite de Bacteriologie Moleculaire et Medicale, Institut Pasteur, Paris, France. International Journal of Systematic Bacteriology, Vol 42, 378-383. 1992.

Bourhy, P., Salaun, L., Lajus, A., Médigue, C., Boursaux-Eude, C., & Picardeau, M. *A Genome Island of the Pathogen Leptospira interrogans Serovar Lai Can Excise from Its Chromosome*. Infection and Immunity. American Society for Microbiology. Feb 2007.

Bulach, D.M., Zuerner, R.L. Wilson, P., Seemann, T., McGrath, A., Cullen, P.A., Davis, J., Johnson, M., Kuczek, E., Alt, D.P., Peterson-Burch, B., Coppel, R.L., Rood, J.I., Davies, J.K. & Adler, B. *Genome reduction in Leptospira borgpetersenii reflects limited transmission potential*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 September 26; 103(39): 14560–14565.

Casjens, S., Palmer, N., Van Vugt, R., Huang, W.M., Stevenson, B., Rosa, P., Lathigra, R., Sutton, G.G., Peterson, J.D., Dodson, R.J., Haft, D.H., Hickey, E.K., Gwinn, M.L., White, O., & Fraser, C.M. *A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete Borrelia burgdorferi.* Mol. Microbiol. 2000 35:490-516.

Cechova, L., Durnova, E., Sikutova, S., Halouzka, J., & Nemeč, M. *Characterization of spirochetal isolates from arthropods collected in South Moravia, Czech Republic, using fatty acid methyl esters analysis.* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2004 Sep 5;808(2):249-54. [Click here to read](#)

Centuri3n-Lara, A., Molini, J.B., Gordones, C., Sun, E., Henver, K., Van Boris, W.C., & Lukehart, S.A. *Molecular differentiation of Treponema pallidum subspecies.* Journal of Clinical Microbiology. p 3377-3380. Septiembre, 2006.

Cespedes Z, M. *Leptospirosis: Enfermedad Zoon3tica Emergente.* Rev. Per3. med. exp. Salud publica. oct./dic 2005, vol.22, no.4 p.290-307.

Cockayne, A., Bailey, M., & Penn, C. *Analysis of sheath and core structures of the axial filament of Treponema pallidum.* Journal of General Microbiology. 1987.

Cossart, P., Bouguet, P., Normark, S., & Rappuoli, R. *Cellular Microbiology.* 2nd edition. ASM press. Washington, D.C. USA, 2005.

De La Maza, L.M., Pezzlo, M.T., Shigei, J.T., & Peterson, E.M. *Color Atlas of Medical Bacteriology.* 1st edition. ASM press. Washington, D.C. USA 2004.

Defosse, D.L., Johnson, R.C., Paster, B.J., Dewhirst, F.E., & Fraser, G.J. *Brevinema andersonii gen. nov., sp. nov., an infectious spirochete isolated from the short-tailed shrew (Blarina brevicauda) and the white-footed mouse (Peromyscus leucopus).* Int. J. Syst. Bacteriol., 1995, 45, 78-84.

Edwards, A.M., Dymock, D., Woodward, M.J., & Jenkinson, H.F. *Genetic relatedness and phenotypic characteristics of Treponema associated with human periodontal tissues and ruminant foot disease.* Microbiology. 2003.

Fox, G. E., Magrum, L. J., Balch, W. E., Wolfe, R. S., & Woese, C. R.. *Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization.* Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 4537-4541. USA, 1977.

Fraser, C.M., Casjens, S., Huang, W.M., Sutton, G.G., Clayton, R.A., Lathigra, R., White, O., Ketchum, K.A., Dodson, R.J., Hickey, E.K., Gwinn, M.L., Dougherty, B.A., Tomb, J.-F., Fleischmann, R.D., Richardson, D.L., Peterson, J.D., Kerlavage, A.R., Quackenbush, J., Salzberg, S.L., Hanson, M., Van Vugt, R., Palmer, N., Adams, M.D., Gocayne, J.D., Weidman, J.F.,

Utterback, T.R., Watthey, L., McDonald, L.A., Artiach, P., Bowman, C., Garland, S.A., Fujii, C., Cotton, M.D., Horst, K., Roberts, K.M., Hatch, B., Smith, H.O., & Venter, J.C. *Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, Borrelia burgdorferi.* Nature 1997 390:580-586.

Funnell, B.E. *Mini-P1 plasmid partitioning: excess ParB protein destabilizes plasmids containing the centromere parS.* Journal of Bacteriology. USA, February 1988; 170(2): 954–960.

Gerdes, K., Bech, F.W., Jørgensen, S.T., Løbner-Olesen, A., Rasmussen, P.B., Atlung, T., Boe, L., Karlstrom, O., Molin, S., & von Meyenburg, K. *Mechanism of postsegregational killing by the hok gene product of the parB system of plasmid R1 and its homology with the relF gene product of the E. coli relB operon.* The EMBO Journal. Vol 5. Num 8. pp 2023-2029. August, 1986.

Glöckner, G., Lehmann, R., Romualdi, A., Pradella, S., Schulte-Spechtel, U., Schilhabel, M., Wilske, B., Sühnel, J., & Platzer, M. *Comparative Analysis of the Borrelia Garinii genome.* Nucleic Acids Research, Vol. 32 No. 20. Oxford University Press, 2004.

Graham, D.E., Overbeek, R †, Olsen, G.J., & Carl R. Woese. *An archaeal genomic signature.* PNAS March 28, 2000 vol. 97 no. 7 3304-3308.

Hats, L. *Eukaryotic_cillium_diagram_en.svg.* Public domain image. Wikimedia Commons Website. 2007.

Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., & deWaard, J.R. 2003. *Biological identifications through DNA barcodes.* Proceedings of the Royal Society of London, B 270: 313–322.

Higgins, D., Thompson, J., Gibson, T., Thompson, J.D., Higgins, D.G., & Gibson, T.J. *CLUTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequences alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.* Nucleic Acids Res. Germany, 1994.

Hsieh, Wang-Ju., & Pan, Ming-Jeng. *Identification Leptospira santarosai serovar shermani specific sequences by suppression subtractive hybridization.* FEMS Microbiology Letters. Taiwan, 2006.

Holt, J., et al. *Bergey's manual of systematic bacteriology.* Williams & Wilkins. Maryland, USA. 1984-1999.

Ikeda, T., Oosawa, K., & Otan, H. *Self-assembly of the filament capping protein, FliD, of bacterial flagella into an annular structure.* Journal of Molecular Biology. Japan, 1996.

Knox, B., Ladiges, P., Evans, B. and Saint, R. *Biology*. 3rd edition. McGraw Hill. Sydney, 2005.

Kohidai, L. *Flagellum-beating.png*. Public domain image. Wikimedia Commons Website. 2008.

Larkin, M.A. , Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. & Higgins, D.G. *ClustalW and ClustalX version 2.0*. Bioinformatics. Ireland, 2007.

Ledgham, F., Quest, B., Vallaey, T., Mergeay, M., & Covès, J. *A probable link between the DedA protein and resistance to selenite*. Research in Microbiology. Volume 156, Issue 3, April 2005, Pages 367-374.

Lobocka, M., & Yarmolinsky, M. *P1 plasmid partition: a mutational analysis of ParB*. Journal of Molecular Biology. Volume 259, Issue 3, pp. 366-382. June 1996.

Margulis L. *Symbiosis in cell evolution*. New York: W.H. Freeman, 1981. 452 p.

Margulis, L. *El origen de la célula*. Editorial Reverté. 1a Edición en español. Barcelona, España. 2001.

Margulis, L., & Dolan, M.F. *Early Life. Evolution on the PreCambrian Earth*. 2nd Edition. Jones and Bartlett Publishers. USA, 2002.

Margulis, L. Conferencia: *Simbiosis y evolución: el origen de las células eucariontes*. Auditorio Alberto Barajas Celis. Facultad de Ciencias, UNAM. México, 2008.

Masuzawa, T., Kumagai, M., Shimizu, T., & Yanagihara, Y. *Classification of Leptospira interrogans Serovar Lai Strain 017 by Using Monoclonal Antibodies*. Journal of Clinical Microbiology. Nov. 1988.

Naiman, B.M., Blumerman, S., Alt, D., Bolin, C.A., Brown, R., Zuerner, R., & Baldwin, C.L. *Evaluation of Type 1 Immune Response in Naïve and Vaccinated Animals following Challenge with Leptospira borgpetersenii Serovar Hardjo: Involvement of WC1+ $\gamma\delta$ and CD4 T Cells*. Infect Immun. 2002 November; 70(11): 6147–6157.

Nascimento, A.L., Ko, A.I., Martins, E.A., Monteiro-Vitorello, C.B., Ho, P.L., Haake, D.A., Verjovski-Almeida, S., Hartskeerl, R.A., Marques, M.V., Oliveira, M.C., Menck, C.F., Leite, L.C., Carrer, H., Coutinho, L.L., Degraive, W.M., Dellagostin, O.A., El-Dorry, H., Ferro, E.S., Ferro, M.I., Furlan, L.R.,

Gamberini, M., Giglioti, E.A., Góes-Neto, A., Goldman, G.H., Goldman, M.H., Harakava, R., Jerónimo, S.M., Junqueira-De-Azevedo, I.L., Kimura, E.T., Kuramae, E.E., Lemos, E.G., Lemos, M.V., Marino, C.L., Nunes, L.R., De Oliveira, R.C., Pereira, G.G., Reis, M.S., Schriefer, A., Siqueira, W.J., Sommer, P., Tsai, S.M., Simpson, A.J., Ferro, J.A., Camargo, L.E., Kitajima, J.P., Setubal, J.C., & Van Sluys, M.A. *Comparative Genomics of Two Leptospira interrogans Serovars Reveals Novel Insights into Physiology and Pathogenesis.* Journal of Bacteriology. Abril 2004.

Nascimento, A.L., Verjovski-Almeida, S., Van Sluys, M.A., Monteiro-Vitorello, C.B., Camargo, L.E., Digiampietri, L.A., Harstkeerl, R.A., Ho, P.L., Marques, M.V., Oliveira, M.C., Setubal, J.C., Haake, D.A., & Martins, E.A. *Genome features of Leptospira interrogans serovar Copenhageni.* Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2004.

Östberg, Y., Bunikis, I., Bergström, S., & Johansson, J. *The Etiological Agent of Lyme Disease, Borrelia burgdorferi, Appears To Contain Only a Few Small RNA Molecules.* J Bacteriol. 2004 Dec; 186(24): 8472-8477

Page, R.D.M. And Holmes, E.C. *Molecular Evolution. A Phylogenetic Approach.* Blackwell Science Ltd. Oxford, USA. 1998.

Paster, B.J., Dewhirst, F.E., Weisburg, W.G., Tordoff, L.A., Fraser, G.J., Hespell, R.B., Stanton, T.B., Zablén, L., Mandelco, L., & Woese, C.R. *Phylogenetic analysis of the spirochetes.* J. Bacteriol., 1991, 173, 6101-6109.

Pietlía, J., He, Q., Oksi, J., & Viljanen, M.K. *Rapid Differentiation of Borrelia Garinii from Borrelia afzelii and Borrelia burgdorferi Sensu Stricto by LightCycler Fluorescence Melting Curve analysis of a PCR Product of the recA Gene.* Journal of Clinical Microbiology. P. 2756-2759. July 2000.

Porcella, S.F. & Schwan, T.G. *Borrelia Burgdorferi and Treponema pallidum: a comparison of functional genomics, environmental adaptations, and pathogenic mechanisms.* The Journal of Clinical Investigation. Vol. 107. Num. 6. March 2001.

Pumarola, A., Rodríguez Torres, A., Garcia Rodríguez, J.A, & Piedrola Angulo, G. *Microbiología Y Parasitología Medica.* 2 Edición. Barcelona: Salvar Editores, S. A. , 1987. 908 P.

Rauer, S., Kayser, M., Neubert, U., Rasiah, C., & Vogt, A. *Establishment of enzyme-linked immunosorbent assay using purified recombinant 83-kilodalton antigen of Borrelia burgdorferi sensu stricto and Borrelia afzelii for serodiagnosis of Lyme disease.* Journal of Clinical Microbiology. Germany, 1995.

Rosselló-Mora, R. & Amann, R. *The species concept for prokaryotes.* FEMS Microbiol Rev. 2001 Jan;25(1):39-67.

Ryan, K.J., & Ray, C.G. *Sherris Medical Microbiology.* 4th ed. McGraw Hill. 2004.

Sagan, L. *On the origin of mitosing cells.* J Theor Biol. 1967 Mar;14(3):255-74.

Seshadri, R., Myers, G., Tettelin, H., Eisen, J., Heidelberg, J.F., Dodson, R.J., Davidsen, T., Deboy, R.T., Fouts, D.E., Haft, D.H., Selengut, J., Ren, Q., Brinkac, L.M., Madupu, R., Kolonay, J., Durkin, S.A., Daugherty, S.C., Shetty, J., Shvartsbeyn, A., Gebregeorgis, E., Geer, K., Tsegaye, G., Malek, J., Ayodeji, B., Shatsman, S., Mcleod, M.P., Smajs, S., Howell, J.K., Pal, S., Amin, A., Vashisth, P., Mcneill, T.Z., Xiang, Q., Sodergren, E., Baca, E., Weinstock, J.M, Norris, S.J., Fraser, C.M., & Paulsen, I.T. *Comparison of the genome of the oral pathogen Treponema denticola with other spirochete genomes.* PNAS | April 13, 2004 | vol. 101 | no. 15 | 5646-5651.

Sievers, J., Raether, B., Perego, M., & Errington, J. *Characterization of the parB-Like yyaA Gene of Bacillus subtilis.* Journal of Bacteriology. United Kingdom. February 2002; 184(4): 1102–1111.

Smith, T.F., & Waterman, M.S. Identification of common molecular subsequences. Journal of Molecular Biology. USA, 1981.

Smith, Jr R.P., Muzaffar, S.B., † Lavers, J., † Lacombe, E.H., Cahill, B.K., Lubelczyk, C.B., Kinsler, A., Mathers, A.J., & Rand, P.W. *Borrelia garinii* in Seabird Ticks (*Ixodes uriae*), Atlantic Coast, North America. Emerging Infectious Diseases. Vol. 12, No. 12. December 2006.

Stoeckle, M. *Taxonomy, DNA and the Bar Code of Life.* BioScience. September 2003 / Vol. 53 No. 9.

Ureña, J.L. *Microbiología oral.* 2ª Edición. Mc Graw Hill-Interamericana. España, 2002.

Yasuda, B.H., Steigerwalt, A.G., Sulzer, L.R., Kuhnann, A.F., Rogers, F., & Brenner, D.J. *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.

Watson J.D. and Crick F.H.C. *A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid.* Nature. Abril 1953. 171, 737-738.